

# 水杨酸对采后番茄抗逆性及病程相关蛋白的影响

郭红莲<sup>1</sup>, 路玉蓉<sup>1</sup>, 王刚志<sup>2</sup>, 王晓枫<sup>1</sup>

(1. 天津科技大学食品工程与生物技术学院, 天津 300457) (2. 天津科技大学理学院, 天津 300457)

**摘要:** 为探索水杨酸(SA)处理对采后番茄生理机制的影响, 用0.1 g/L的水杨酸溶液浸泡番茄5 min, 空白(CK)用蒸馏水浸泡番茄15 min, 分两组分别置于常温(25 ℃)和低温(2±1 ℃)条件下, 每天取样, 用比色法测定蛋白含量及与抗逆性相关的酶(PPO和POD)活性, 结果表明: SA处理的番茄蛋白含量以及与其抗逆性有关的酶(PPO和POD)活性较对照(CK)有明显的增强, 且聚丙烯酰胺凝胶电泳结果可知: SA处理后出现了小分子诱导蛋白。研究表明: 水杨酸处理可诱导番茄病程相关蛋白的表达。

**关键词:** 番茄; 水杨酸处理; 病程相关蛋白

文章编号: 1673-9078(2012)2-131-134

## Effects of Salicylic Acid Treatment on Resistance and Pathogenesis-related Protein of Postharvest Tomato

GUO Hong-lian<sup>1</sup>, LU Yu-rong<sup>1</sup>, WANG Gang-zhi<sup>2</sup>, WANG Xiao-feng<sup>1</sup>

(1. School of Food Engineering and Biological Technology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China) (2. School of Science, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

**Abstract:** To explore the effect and mechanism of salicylic acid (SA) treatment on physiological indexes of Tomato, Tomato were immersed in concentrations (0.1 g/L) of solution, respectively for 5 minutes and stored under the conditions of (2±1) ℃ and 25 ℃, contents of protein and the activities of resistance related enzymes in postharvest tomato were measured with Colorimetry. Results showed that SA treatment resulted the contents of protein and the activities of resistance related enzymes significantly enhanced after SA treatment. And the result of separation gel concentrations showed that small molecule induced protein was appeared. In conclusion, SA treatment can lead the pathogenesis-related protein to express.

**Key words:** Tomato; SA treatment; pathogenesis-related protein.

水杨酸(salicylic acid, SA)是广泛存在于植物体内的一种简单的酚类物质, 能诱导植物系统获得抗性, 因此被广泛地应用于植物抗性研究<sup>[1]</sup>。许多研究证明: 水杨酸作为植物抗病反应的重要信号分子, 激活植物抗逆反应相关的防御机制, 在植物信号传导中起着关键作用<sup>[2,3]</sup>。水杨酸用于植物保护方面的研究已有很多报道, 机理也相对较清楚。外源水杨酸处理采后甜樱桃能够诱导果实中3-葡聚糖酶, 苯丙氨酸解氨酶(PAL)以及POD活性的上升<sup>[4]</sup>。赵喜喜也认为水杨酸处理能够降低幸水梨果实采后的发病率, 减少维生素C含量的损失, 同时能提高保护酶活性, 减轻膜脂过氧化程度<sup>[5]</sup>。番茄含有丰富的胡萝卜素、维生素和B族维生素, 是一种营养丰富的蔬菜, 但番茄含水量高, 采后贮藏易腐烂发病, 因此, 为进一步研究水

收稿日期: 2011-11-11

基金项目: 国家自然科学基金(30871758)

作者简介: 郭红莲(1971-), 女, 教授, 主要从事农产品保鲜与加工方面的教学与科研工作

杨酸对采后果蔬抗逆性的影响, 本实验以番茄为材料, 探索水杨酸对采后番茄贮藏期间生理生化的影响及作用机理, 以提高抗逆性及培育抗逆性强的品种。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料及处理

小番茄(*Lycopersicon esculentum* MILLER)冬大棚栽培, 选择完熟期, 果型正, 果个适中, 无机械伤果实, 冲洗干净, 并晾干后分别放在蒸馏水(CK)和0.1 g/L水杨酸(韩涛确定的最适浓度<sup>[6]</sup>)中, 浸泡5 min后, 拿出放在果筐中晾干, 各分两批装入保鲜袋, 分别置于常温(25 ℃)和低温(2±1 ℃), 每天取样, 测定各项指标。

#### 1.2 测定方法

##### 1.2.1 硬度

采用GY-B硬度计测硬度。

##### 1.2.2 病程相关蛋白的提取

参照杜春梅(2000)方法<sup>[6]</sup>。取5 g番茄果实于研

钵中,加 6 mL 可溶性蛋白提取液(0.1 MTris-HCL, pH 7.8 内含 0.5 M 蔗糖,0.1 M 氯化镁,0.05 mM 苯甲磺酰氟和 5 mM 的巯基乙醇)研磨;浸提 2 h,4 °C 下 12000×g 离心 20 min,取上清液即为可溶性蛋白提取液。采用考马斯亮蓝 G-250 法则测定蛋白含量,用牛血清蛋白做标准曲线,取 0.5 mL 蛋白样本提取液,加入考马斯亮蓝 2.5 mL,充分混匀,放置 2 min 后在 595 nm 下比色,记录吸光值,在标准曲线上查得每个样品的蛋白含量。

1.2.3 与抗逆性相关酶活性的测定

POD 活性测定参照 Jiang 等的方法<sup>[7,8]</sup>。取 4 g 果肉,加 6 mL 0.1 mol/L 磷酸缓冲液(pH=6.4),冰浴研磨,4 °C 下 12000×g 离心 45 min,取上清液 0.5 mL,然后加入 3 mL 2%的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 混匀,立即加入 1 mL 三氯乙酸终止反应,1 min 后扫描 1 min 内 460 nm 处吸光值的变化,酶活性以每克鲜重果每分钟酶活力单位变化数来表示,重复 3 次。

PPO 活性参照文献<sup>[8]</sup>。取 4 g 果实,加 6 mL 0.1 mol/L 磷酸缓冲液(pH=6.4),冰浴研磨,冰浴浸提 2 h,4 °C 下 12000×g 离心 45 min,取上清液 0.5 mL,然后加入 1 mL 0.5 mol/L 邻苯二酚。在 37 °C 水浴中平衡 10 min 并立即加入 1 mL 三氯乙酸终止反应,1 min 后扫描 1 min 内的 400 nm 处吸光值的变化,酶活性以每克鲜重果肉每分钟内的酶活力单位变化数表示,重复 3 次。

1.2.4 蛋白质 SDS-PAGE 电泳及同工酶谱的测定

蛋白质电泳采用 SDS-PAGE 不连续系统,分离胶 2%,浓缩胶 6%,在考马斯亮蓝 R-250 中进行染色。

同工酶谱采用非变性-PAGE 万云龙等方法<sup>[9]</sup>,分离胶浓度 7.5%,浓缩胶浓度 3.5%进行。

2 结果与分析

2.1 贮藏期间果实硬度的变化

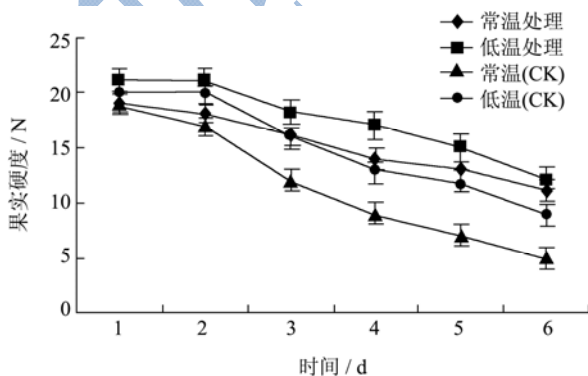


图 1 不同处理果实硬度随时间的变化趋势

Fig.1 The hardness changes of different treatment in different processing time

由图 1 可知,番茄的硬度随贮藏时间的延长总体呈下降趋势,2 d 时低温处理的果实硬度高于常温处理和 CK 常温的果实硬度,与 CK 低温基本持平,但第 4、5、6 d 后 3 d 时常温处理的果实硬度已明显高于 CK 常温,差异达到显著水平(P<0.05),低温处理的果实硬度高于 CK 低温,但两者差异不显著,常温处理的果实与 CK 低温基本持平。说明水杨酸处理可有效抑制番茄变软的趋势。尤其在有冷藏的条件下,水杨酸处理在一定程度上可减缓变软的趋势。

2.2 与抗逆性相关的酶活性的影响

2.2.1 处理后番茄果内 POD 活性变化

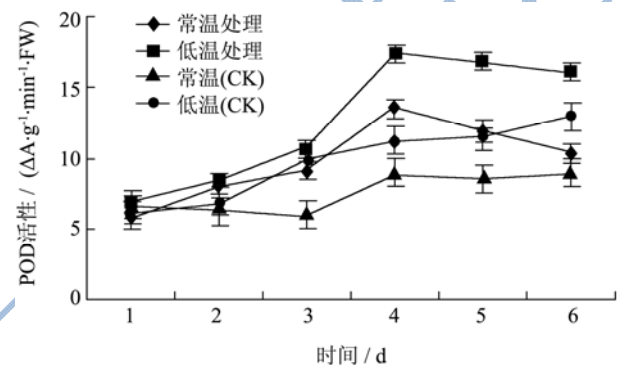


图 2 POD 活性变化趋势图

Fig.2 changes of POD enzyme activity

由图 2 可知,POD 活性在整个贮藏期呈上升趋势,水杨酸的处理虽然没有改变它的变化趋势,但可以看出,低温处理的 POD 活性呈先迅速上升而后基本保持不变的趋势,3~4 d 迅速上升,并达到峰值。此时 POD 的活性比 2 d 时高 111%,4 d 后低温处理的 POD 活性基本没变;CK 低温的 POD 活性在整个贮藏期间呈上升的趋势,但变化平缓,与低温处理差异显著(P<0.05)。常温处理的 POD 活性呈上升后略有下降的趋势,也是在第 4 d 达到峰值,4 d 后略有下降。

2.2.2 处理后番茄果内 PPO 活性变化

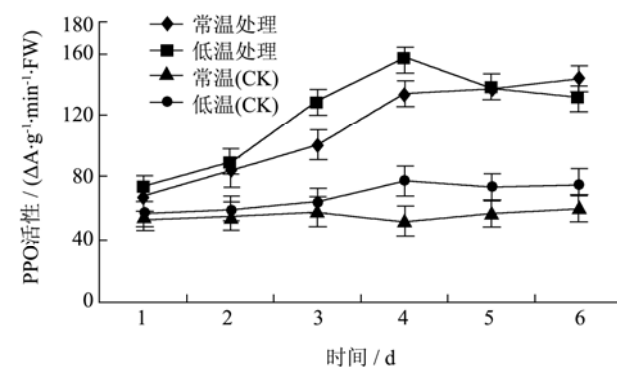


图 3 PPO 活性变化趋势

Fig.3 changes of PPO enzyme activity

由图 3 可知,低温处理的 PPO 活性高于其他 3 个。低温处理 PPO 的活性相对于 CK 低温在第 4 d 出现高

峰, 分别是 CK 常温的 2 倍和 CK 低温的倍, 也高于常温处理, 而后有下降的趋势; CK 低温的 PPO 酶活性在 3~4 d 略有上升趋势, 但在整个贮藏期间变化不明显, 也高于 CK 常温, 与低温处理相比差异达到显著水平 ( $P<0.05$ ); 常温处理的 PPO 酶活性在整个贮藏期间呈上升趋势, 明显高于 CK 常温的酶活性, 差异达到显著水平 ( $P<0.05$ )。

### 2.3 同工酶电泳结果

#### 2.3.1 POD 同工酶谱带分析

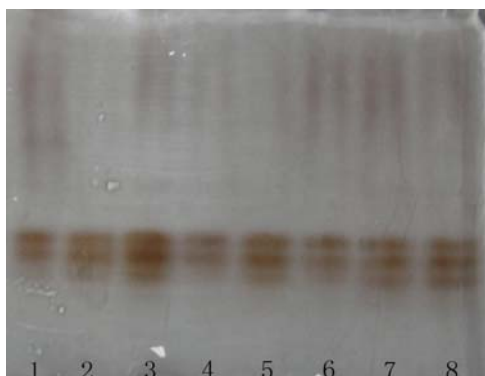


图 4 不同时间 POD 电泳图

Fig.4 PPO isoenzyme patterns in different processing time

注: 1: 2 d 常温(CK); 2: 2 d 常温处理; 3: 2 d 低温处理; 4: 低温(CK); 5: 4 d 低温(CK); 6: 4 d 常温(CK); 7: 4 d 常温处理; 8: 4 d 低温处理。

由图 4 可以看出, POD 同工酶谱带有 3 条, 但其中只有第 4 d 的低温处理、CK 低温、常温处理与第 2 天的低温处理、常温处理有 3 条谱带, 而第 4 d 的 CK 常温, 第 2 d CK 低温、CK 常温均为 2 条谱带, 且第 2 d 的低温处理酶带颜色相对较深, 这与酶活性的测定结果基本相符。各处理比较说明水杨酸处理可刺激番茄产生抗逆性, 诱导番茄果实内 POD 同工酶谱带的变化, 适当逆境如低温也会起到类似的作用, 但效果没有水杨酸的明显, 从而起到诱导番茄系统获得抗性。

#### 2.3.2 PPO 同工酶酶谱带分析

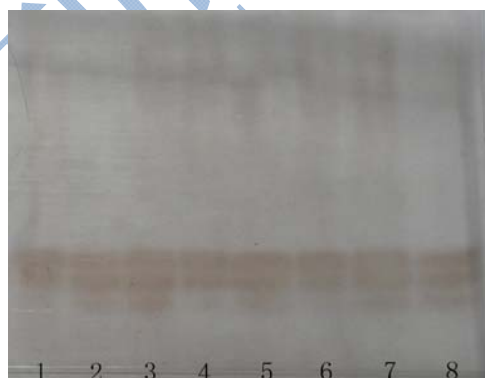


图 5 不同处理时间 PPO 电泳图

Fig.5 PPO isoenzyme patterns in different processing time

注: 1: 2 d 常温(CK); 2: 2 d 常温处理; 3: 2 d 低温处理;

4: 低温(CK); 5: 4 d 低温(CK); 6: 4 d 常温(CK); 7: 4 d 常温处理; 8: 4 d 低温处理。

由图 5 可知, PPO 同工酶谱带也主要有 3 条。但第 4 d 的 CK 常温、第 2 d 的 CK 常温、CK 低温、及常温处理只有 2 条酶带, 且第 2 d 的 CK 常温、CK 低温第 2 条酶带颜色较浅, 这与酶活性测定结果基本相符; 第 4 d 的低温处理、常温处理、CK 低温、第 2 d 的低温处理有 3 条酶带, 且第 4 d 的低温处理与第 2 d 的低温处理酶带颜色相对较深, 这也与酶活性测定结果基本相符, 说明水杨酸处理可使番茄产生抗逆性。各处理比较说明: 水杨酸处理可使番茄果实内 PPO 同工酶谱带变化; 低温处理也会起到类似的作用, 但效果没有水杨酸明显。从而使番茄获得系统性抗性。

#### 2.4 蛋白质含量变化及电泳结果

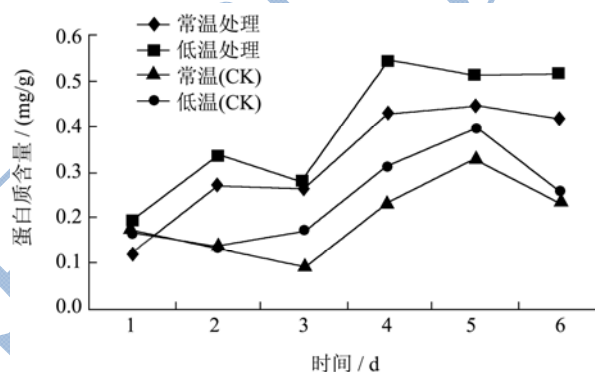


图 6 蛋白质变化趋势图

Fig.6 changes of Protein in different processing time

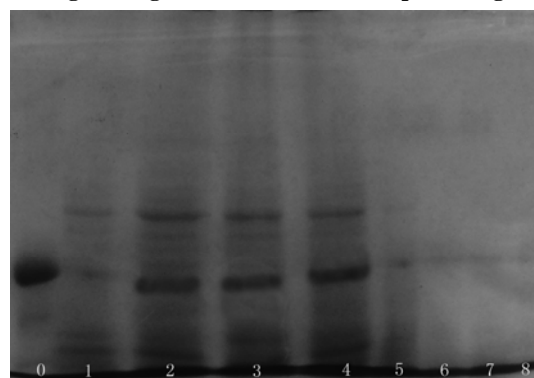


图 7 蛋白质电泳图

Fig.7 SDS-PAGE of Protein

注: 0: 牛血清蛋白; 1: 4 d 常温(CK); 2: 4 d 低温处理; 3: 4 d 常温处理; 4: 4 d 低温(CK); 5: 2 d 低温处理; 6: 2 d 常温处理; 7: 2 d 低温(CK); 8: 2 d 常温(CK)。

蛋白质含量变化在诱导过程中变动很大。水杨酸处理虽然没有改变它的变化趋势, 但增强了变化峰的高度 (图 6), 第 2 d 出现第一个小峰, 第 4 d 出现第二个小峰, 此时蛋白质含量变化达到最大值, 之后有缓慢的下降趋势。低温处理与 CK 低温的蛋白质表达量达到显著性差异 ( $P<0.05$ ); 常温处理与 CK 常温的

蛋白质表达量也达到显著性差异 ( $P < 0.05$ )。据推测出现这种现象的原因可能是水杨酸诱导下增强了某些酶的活性如 PPO、POD, 及一些跟抗性相关的小分子蛋白的产生。

可溶性蛋白的电泳图谱显示, 与第 4 d 的蛋白表达量相比, 第 2 d 只有痕量的蛋白质表达, 且只有低温处理的番茄可以看到 2 条很不清晰的谱带, 这与数据分析的结果相符; 而第 4 d 的蛋白表达量很多, 低温处理的有 7 条谱带, 与 CK 低温相比多了条谱带; 常温处理有 6 条谱带, CK 常温有 5 条谱带, 且常温处理较 CK 常温颜色深很多, 这也与数据统计结果相符。从牛血清蛋白电泳谱带分析, 推出低温处理较 CK 低温有大于 67000 Da 的新的蛋白产生; 常温处理较 CK 常温相比也有大于 67000 Da 的新蛋白产生, 但常温处理较 CK 常温小于 67000 Da 的蛋白量多一些。因而可以认为, 水杨酸可以诱导番茄果实产生 PR 蛋白, 从而诱导果实系统获得抗性。

### 3 结论

本实验表明水杨酸处理可使番茄果实 PPO、POD 酶活性升高, 从而起到诱导抗逆性的作用, POD 是植物体内活性氧自由基清除剂, 可以清除活性氧自由基, 使细胞免遭膜脂过氧化作用引起的伤害<sup>[10,11]</sup>。经处理 PPO、POD 的活性均有增加, 活性氧清除能力的提高可能使水杨酸诱导番茄产生抗逆性<sup>[12]</sup>。刘利华也得出番茄受到外源水杨酸诱导产生的防卫反应为拮抗, 它们主要包括活性氧的释放、防卫基因表达、过敏性反应 (HR) 和系统获得抗性<sup>[13]</sup>。

病程相关蛋白是由于病原物的侵染或某些物理化学因子刺激下产生的一类诱导蛋白, 与植物抗病性关系密切<sup>[14]</sup>。有报导指出, 乙烯利能诱发番茄产生一种分子量为 45 kD 的 PR, 具有 POD 的活性<sup>[15]</sup>。病程相关蛋白总是与水杨酸和植物防卫反应联系在一起, 植物内源水杨酸的积累对病程相关蛋白, 植物寄主系统获得抗性和过敏反应的诱导起作用<sup>[14]</sup>。已有研究证明经水杨酸处理植物后, 内源水杨酸在 4~6 h 后就有明显的增加<sup>[16,17]</sup>。本实验表明: 水杨酸处理诱导了番茄病程相关蛋白的表达。系统获得抗性。病程相关蛋白的表达可能是水杨酸诱导番茄产生抗逆性的原因之一, 但诱导蛋白具体是什么, 以及水杨酸在诱导抗逆性中起多大作用, 仍需进一步的深入研究。

### 参考文献

- [1] 苏雪痕等,植物造景[M].北京:中国林业出版社,1994
- [2] Lin Z-P, Hu Y-L. Stress resistance of plants induced via the salicylic acid-mediated signal transduction pathway [J]. Acta Bot sin, 1997, 39: 85-88
- [3] Yu D-Q, Cen C, Li B-J, et al. Systemic acquired disease resistance and signal transduction in plant [J]. Aca Bot sin, 1999, 4: 5-25
- [4] Yao H J, Tians P. Effect of pre-and postharvest application of SA or MeJA on inducing disease resistance of sweet cherry in storage [J]. Postharvest Biology and Technology, 2005, 35: 253-262
- [5] 赵喜喜,赵月丽,王会珍,等.水杨酸处理对幸水梨品质和生理特性的影响[J].湖北农业科学,2009,48(5):1165-1167
- [6] 杜春梅,吴元华,赵秀香等.菌克毒防止烟草花叶病毒(TMV)及对病程相关蛋白诱导作用的研究[J].中国烟草科学,2000,3:4-6
- [7] 韩涛等,外源水杨酸处理对采后番茄和黄瓜果实抗冷性的影响[J].中国农业科学,2002,35(5):57-575
- [8] Jiang Aili, Tian shiping, Xu Yong. Effect of CA with high-O<sub>2</sub> or high CO<sub>2</sub> concentrations on potharvest physiology and storability of sweet cherry [J]. Acta Bo-tanica Sinica. 2002, 44(8): 925-930
- [9] 朱广廉,植物生理学实验[M].北京:北京科学出版社,1990
- [10] 王军节,毕阳,范存斐,等.采后水杨酸处理对早酥梨果实色泽和质地的影响[J].现代食品科技,2010,26(10):1047-1051
- [11] 戴金平,沈征言.低温锻炼对黄瓜幼苗几种酶活性的影响[J].植物学报,1991,33(8):627-632
- [12] Van loon LC. Induce resistance in plants and role of pathogenesis-related proteins [J]. European J of Plant Pathology, 1997, 103(9): 753-765.
- [13] 刘利华,林奇英,谢华安,等.病程相关蛋白与植物抗病性研究[J].福建农业学报,1999,14(3):53-58
- [14] 王勇刚,植物诱导抗病性与病程相关蛋白[J].湖南农业大学学报,2002,28(2):77-82
- [15] Willi Fischer, Urs Christ, Monika Baumgartner, et al. Pathogenesis-related proteins of tomato: II. Biochemical and immunological characterization [J]. Physiological and Molecular Plant Pathology, 1989, 35(1): 67-83
- [16] 余小平,贺军民,张健,等.水杨酸对盐胁迫下黄瓜幼苗生长抑制的缓解效应[J].西北植物学报,2002,22(2):401-405
- [17] 姜晶,李天来,李伟,等.乙酰水杨酸对番茄果实品质与产量的影响[J].北方园艺,2006,4:4-5