

寡糖素诱导冬枣果实水杨酸信号变化的研究

郭红莲, 孙媛媛, 王晓枫

(天津科技大学食品工程与生物技术学院, 天津 300457)

摘要: 以采后冬枣为实验对象, 研究寡糖素诱导处理对冬枣果实抗病反应过程中水杨酸信号分子的影响。实验结果表明, 冬枣果实在寡糖素诱导作用下, 12 h 内果实水杨酸含量升高, 增加量达 60.60%, 至诱导后 24 h 果实内游离水杨酸含量急剧下降, 水杨酸信号与果实钙离子通道的抑制作用相互协作, 共同参与了寡糖素诱导的苯丙氨酸代谢酶活性升高过程。

关键词: 寡糖素; 冬枣; 诱导抗性; 水杨酸; 信号转导途径

文章编号: 1673-9078(2012)3-249-251

The Research of Salicylic Acid Signal Transduction in Postharvest Jujube induced by Oligosaccharins

GUO Hong-lian, SUN Yuan-yuan, WANG Xiao-feng

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

Abstract: The salicylic acid signal transduction pathways influence on postharvest fruit under oligosaccharins was studied in this paper. The results showed that, induced by exogenous inducer-oligosaccharins, endogenous salicylic acid content increased, which may play a role as signal molecules of antagonistic reaction in postharvest jujube. The signal transduction pathway of salicylic acid may be involved with the synthesis of nitric oxide, calcium ion channel and phenylalanine metabolism pathways and the PAL enzymes activities changed too.

Key words: oligosaccharins; jujube fruit; induced resistance; salicylic acid (SA); signal transduction pathways

冬枣果实营养丰富, 鲜美多汁, 但果实皮薄肉脆, 极易受微生物污染而腐烂。常温下, 冬枣全红果采后 2~3 d 就会软化腐烂, 难于贮藏保鲜^[1]。近年来, 果蔬采后潜在的抗病性逐渐被认识, 以外源诱导子激发果实潜在抗病性从而开展对果蔬采后腐烂的防治是近年来较新的病害防控技术^[2], 外源物的诱导抗病性对采后果蔬保鲜具有重要的应用开发前景^[3-5]。

在植物抗病反应的次生代谢中。苯丙烷类代谢是重要的代谢途径之一。可形成包括植保素、木质素和酚类化合物等抗病次生物质^[6]。苯丙氨酸解氨酶 (Phenylalanine ammonia-lyase, PAL) 是这一途径的关键酶和限速酶, 其活性与植物抗病性有着密切的关系, 可以作为一个衡量植物抗病性的生化指标, 同时参与了植物抗病次生物质的合成与积累, 因而在植物抗病反应中起着重要作用。

寡糖素可以诱导多种果蔬产生采后抗病性, 对冬枣果实的应用结果表明, 可诱导果实抵抗灰霉等病原

菌的侵染^[7]。本研究主要围绕寡糖素诱导冬枣果实的水杨酸变化情况及其诱导与水杨酸信号转导相关的钙离子途径的关系进行相关研究, 以期发现果实诱抗中内源水杨酸及其衍生物调控抗病信息进程积累基础, 为相关的调控机理研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

冬枣果实, 从天津蓟县枣园内选取。选择大小均匀一致、无病斑、无机械伤、七成成熟的枣果, 转入纸箱后迅速运至天津科技大学农产品保鲜研究室的冷库中储藏待用。寡糖素溶液由酶法降解壳聚糖而成, 聚合度为 4~11。用无菌水将寡糖素粉末超声波溶解后配成浓度为 50 mg/L 的寡糖素溶液。

1.2 方法

1.2.1 诱导处理

选择果形整齐、色泽及成熟度一致的冬枣果实, 用流水充分清洗冬枣表面泥沙和残留农药, 通风处晾干, 分成六组, 分别用清水 (对照 CK)、寡糖素溶液、钙离子抑制剂氯化镧 (LaCl₃) 浸泡果实 10 min、LaCl₃ 和寡糖素共同处理先后浸泡浸泡果实各 5 min, 取出

收稿日期: 2011-12-16

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30871758)

通讯作者: 郭红莲 (1971-), 女, 博士, 副教授, 主要从事农产品保鲜方面的研究

后再自然风干,分装在水果盘内,每个处理重复3次,置于室温(20~25℃)下贮藏。

1.2.2 SA含量测定

随机取3个果实置液氮中速冻后,充分研磨,参照文献^[4]的方法,略有改动。取经加入液氮充分研磨的冬枣果实果肉共10.0g,置于100mL的离心管中,加4.0mL 5M三氯乙酸溶液,定容至20.0mL后以30.0mL乙醚萃取,12h,于1000×g下离心5min,水相再经乙醚重复提取2次,合并乙醚相,加入10.0mL 50%甲醇+50%乙酸缓冲液(pH=3.2)的混合液溶解,置于离心管中保存,即为组织水杨酸提取液。

以高效液相色谱法(HPLC)检测。检测条件为:色谱柱:SB-C18柱,4.6×150mm,5μm;流动相:50%甲醇:50%乙酸缓冲液(pH 3.2)=50:50;安捷伦荧光检测器(激发波长为310nm,发射波长为415nm);流速为1.0mL/min;柱温30℃;进样量为10μL。

HPLC标准工作曲线确定:用50%甲醇+50%乙酸缓冲液(pH=3.2)的混合液配制浓度为1mg/mL的SA溶液,依次稀释至浓度为0、50、100、150、200、250、300、350μg/L的标准溶液,HPLC测定不同浓度的标准溶液,重复测定3次取平均值,得到浓度与峰面积的标准曲线。

1.2.3 苯丙氨酸解氨酶(PAL)活性测定

随机取3个果实置液氮中速冻后,充分研磨,取果肉共2.5g,加入10mL浓度为50mmol的硼酸缓冲液和0.5g聚乙烯吡咯酮(PVP),8000×g冷冻离心15min,上清液即为粗酶提取液。取1mL粗酶液分别加入反应液,对照组加入pH 8.7硼砂缓冲液3.0mL,寡糖素处理组加入20mmol苯丙氨酸1mL、pH 8.7硼砂缓冲液2mL。37℃水浴保温30min,后各加入0.2mL 6mol的HCl终止反应,在290nm测定吸光度值。重复测定三次。酶活性以每小时内吸光度变化0.01为一个单位(U)。

1.3 数据统计及图形分析

Excel 2003 统计分析所有数据,计算标准误并制图;应用 SPSS 11.5 软件对数据进行方差分析(ANOVA),利用邓肯式多重比较对差异显著性进行分析。

2 结果与分析

2.1 寡糖素诱导枣果内源水杨酸(SA)信号分子含量变化

寡糖素诱导组的冬枣果实在24h之内含量有明显变化(如图1a所示),呈先升高后逐渐下降趋势,而

对照组游离水杨酸含量变化相对不大;寡糖素诱导组果实在4~12h内SA含量迅速增加,升高了60.61%;12h至24h内水杨酸迅速降低,含量由71.16μg/g下降至33.71μg/g。

每隔24h连续跟踪检测6d的诱导效果表明,寡糖素诱导组游离水杨酸含量从第5d开始明显增加,在1~4d内均低于对照水处理组,尤其是第1d即24h的游离水杨酸含量明显下降(图1b)。而对照组果实中游离SA含量没有明显变化,处理组最高峰即在处理后第5d时果实游离SA含量比对照果实高3.86倍。

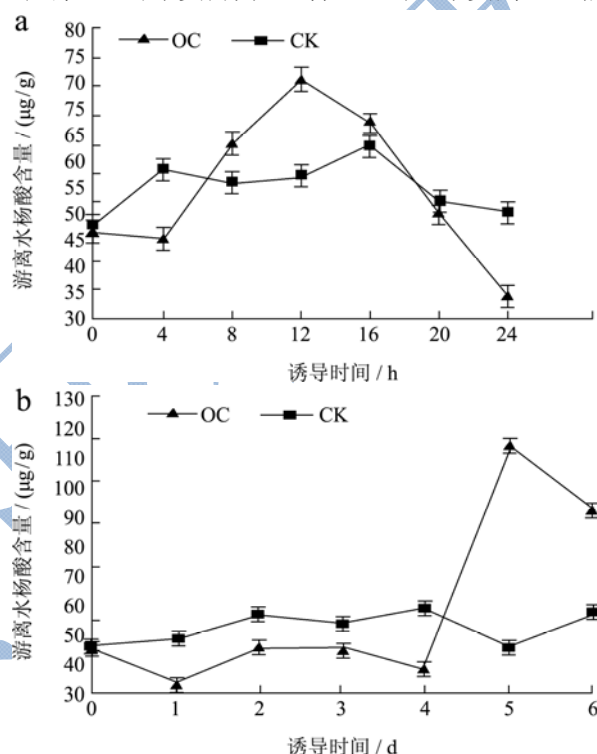


图1 寡糖素诱导冬枣果实24h(a)和6d(b)内水杨酸信号分子的含量变化

Fig.1 Effect of Oligochitosan on the content of salicylic acid in postharvest jujube within 24h (a) and 6d (b)

寡糖素诱导冬枣果实产生明显的抗灰霉病的作用^[7],而冬枣果实在诱导期内其水杨酸信号在诱导24h和5d时均有明显效果变化。寡糖素处理后冬枣果实的内源游离水杨酸分子含量均低于相同处理时间的水对照组果实(1~4d内),说明游离水杨酸以其他形式参与了果实内部信号分子的转导作用。寡糖素处理的果实游离水杨酸含量在12h后迅速下降,24h时含量降到最低点,说明冬枣果实内水杨酸信号分子参与信号转导途径可能是短时内的反应,在处理时间较长的第5d变化可能与果实抗病生理反应有关。

2.2 结合抑制剂处理后枣果内源水杨酸含量的变化

氯化镧为细胞内钙离子通道的抑制剂,以细胞内源水杨酸为检测指标的结果如图2所示。

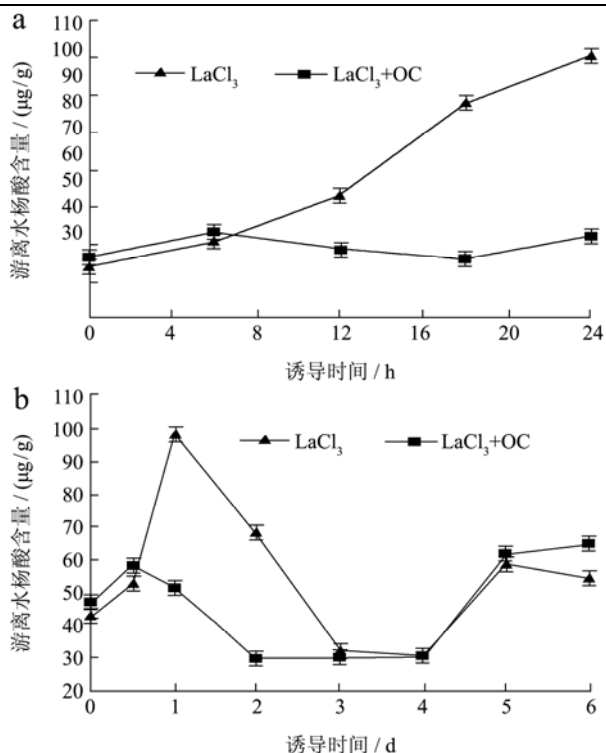


图2 氯化镧抑制剂处理采后冬枣果实 24 h(a)和 6 d(b)内游离SA含量变化

Fig.2 Content of salicylic acid in postharvest jujube treatment with inhibition treatment in 24 h (a) and 6 d (b)

钙离子通道抑制的情况下,枣果内游离水杨酸含量极剧增加,而寡糖素处理可抑制这种升高。在寡糖素处理与通道抑制的双重作用下,细胞内游离水杨酸含量无明显升高,其结果与对照处理组相近(见图1)。表明寡糖素诱导的抗性转导过程与钙离子信号转导有关,钙离子通道抑制时,寡糖素诱导可打破此抑制途径,与水杨酸途径相互协同,共同引发了果实的抗病反应。

2.3 寡糖素诱导采后冬枣果实中苯丙氨酸解氨酶(PAL)活性的变化

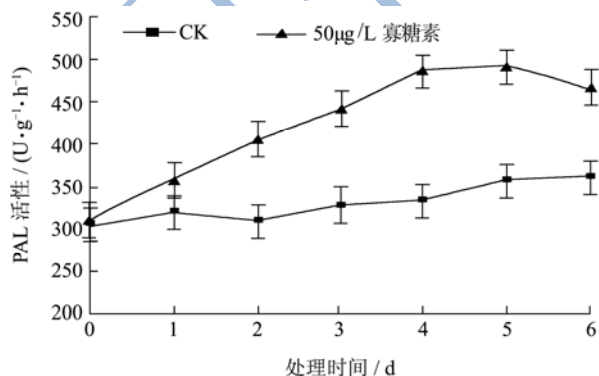


图3 寡糖素诱导采后冬枣后果实中PAL活性变化

Fig.3 Effect of oligochitosan treatment on the activities of PAL in postharvest Jujube

苯丙氨酸角氨酶(PAL)是植物细胞抗病生理的

标志性酶,其活性的高低标志了抗病能力的强弱。以寡糖素诱导处理的冬枣果实PAL酶活性明显高于对照处理组,峰值出现在第5d,至第6d仍保持很高的活性,对照处理组PAL酶活性在测定期内无明显变化(图3),这种变化趋势与冬枣果实的诱导抗病性正相关^[4],与果实内源水杨酸含量变化一致,表明水杨酸含量变化与PAL相互协同,共同诱导了果实抗病性。

3 讨论

3.1 采后果实SA含量的变化可能与果实内SA合成相关基因的起动的有关,对果实抗病信号转导途径的研究结果表明,SA信号可能参与了抗病信号的转导过程。本试验结果表明,寡糖素诱导冬枣果实内游离水杨酸在24 h内迅速变化,而且这种变化与钙离子信号途径有关系,这种变化与猕猴桃果实及脐橙果实等变化相类似^[8,9]。

3.2 寡糖素作为诱导子刺激采后冬枣果实12~24 h内游离SA迅速下降,以结合态水杨酸或者其他形式信号参与果实抗性诱导。在较长时间诱导作用下,游离水杨酸信号直接参与了果实内源苯丙氨酸代谢途径,至5 d时达到最高值,PAL酶活性也逐渐上升到最大值。

3.3 钙离子通道抑制剂 LaCl_3 与寡糖素共同处理24 h时果实内源游离水杨酸含量高于 LaCl_3 单独处理时的SA含量,说明在钙离子通道受抑制条件下寡糖素诱导的水杨酸信号转导途径同时受阻,导致游离SA含量积累升高。

3.4 综上所述,寡糖素诱导采后冬枣果实的水杨酸信号转导途径属短期内部反应,信号转导途径的大致过程可能如下所示:寡糖素诱导子诱导采后冬枣果实内源游离SA转化为其他形式继续参与信号转导途径,转化过程与钙离子通道有关,共同改变或参与了苯丙氨酸代谢。

参考文献

[1] 张顺和,张超. ClO_2 对冬枣贮藏品质的影响[J].现代食品科技,2006,22(3):84-86
 [2] 王亮,薛梦林,施俊凤,等.梅奇酵母 XY201菌株对采后冬枣黑斑病和青霉病的抑制效果[J].园艺学报,2010,37(10):1583-1590
 [3] 田世平,范青.控制果蔬采后病害的生物学技术[J].植物学通报,2000,17(3):211-217
 [4] Zhang Y, Chen K S, Zhang S L, Ferguson I. The role of salicylic acid in postharvest ripening of kiwifruit [J]. Postharvest Biology and Technology, 2003, 28(1): 67-74

- [5] 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
- [6] 彭金英,黄勇平.植物防御反应的两种信号转导途径及其相互作用[J].植物生理与分子生物学学报,2005,31(4):347-353
- [7] Guo Honglian, wang Boyu,Hu yunfeng. Postharvest Disease of Lingwu Changzao (*Ziziphus. Jujuba* Mill) fruit and the effect of biocontrol agent on fruit decay, proceeding of the first international jujube symposium [J]. Acta Horticultural, 2009, 840: 475-478
- [8] 邓雨艳,明建,张昭其.壳聚糖诱导脐橙果实抗病性、水杨酸及活性氧代谢变化[J].中国农业科学, 2010, 43(4): 812-820
- [9] 臧威,孙剑秋,张淑园.植物诱导抗病性及其机理的研究现状[J].种子, 2006, 25(9): 45-50

现代食品科技