

“花壳”病菌对辣椒防御系统的影响

郑文宇, 丁筑红*, 刘海, 邓程, 肖治柔

贵州大学生命科学学院, 贵州省农畜产品贮藏与加工重点实验室, 贵阳550025

摘要: 采用新鲜的红辣椒接种“花壳”病菌, 观察辣椒的色素变化, 并测定活性氧超氧阴离子(O_2^-)产生速率, 过氧化氢(H_2O_2)和羟自由基($\cdot OH$)含量, 过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)和脂氧合酶(LOX)活性变化。结果表明, 与接种普通病菌及对照比较, “花壳”病菌感染25 d后辣椒的红色完全褪变为黄色或橘黄色; O_2^- 产生速率和 $\cdot OH$ 含量总体呈先下降后显著上升的变化趋势, 出现单个低峰值; H_2O_2 含量先下降后上升, 到达峰值后又下降; CAT和POD活性变化呈先上升后下降趋势, 出现高数值, 而LOX活性显著升高, 无峰值出现。接种F101 (*Irpex lacteus*)和F121 (*Cladosporium cladosporioides*)病菌对辣椒防御酶系统的影响较接种其他病菌显著。可见, “花壳”病菌对辣椒防御酶系统产生显著影响, 导致大量活性氧爆发, 细胞酶系统抗氧化能力下降, 使其对活性氧的清除能力大大降低, 加剧了活性氧的大量积累和对细胞的损伤。

关键词: 辣椒; “花壳”病菌; 活性氧; 防御酶

Effect of Pathogens Causing Discoloration on Defensive System in Red Pepper (*Capsicum annuum* L.)

ZHENG Wen-Yu, DING Zhu-Hong*, LIU Hai, DENG Cheng, XIAO Zhi-Rou

Key Laboratory of Agricultural and Animal Products Store & Processing of Guizhou Province, College of Life Sciences, Guizhou University, Guiyang 550025, China

Abstract: In order to study the effect of pathogens causing discoloration on defensive system in red pepper (*Capsicum annuum*), we detected the changes in superoxide anion (O_2^-) production rate, hydrogen peroxide (H_2O_2) and hydroxyl radical ($\cdot OH$) contents, catalase (CAT), peroxidase (POD) and lipoxygenase (LOX) activities in red pepper infected by pathogens causing discoloration. The results showed that, compared with other pathogens and control group, the pigment in red pepper faded from red to yellow or croci after 25 d infected by the pathogens causing discoloration; the O_2^- production rate, H_2O_2 and $\cdot OH$ contents decreased first and then increased. While CAT and POD activities rose then dropped and LOX activity increased slowly. Among the five strains of pathogens, F101 (*Irpex lacteus*) and F121 (*Cladosporium cladosporioides*) had stronger influences on defensive enzyme system in red pepper than the others. Therefore, the pathogens causing discoloration could affect the defensive enzyme system in red pepper significantly, which leads to a large accumulation of reactive oxygen species, and a decrease in active oxygen scavenging capacity in the pepper, and even damages to cell.

Key words: red pepper (*Capsicum annuum*); pathogens causing discoloration; reactive oxygen species; defensive enzyme

辣椒采后自然干制过程中, 常出现辣椒果肉红色部分减退呈黄白色, 俗称“花壳”、“花皮”、“虎皮”现象, 严重时干辣椒整果红色消退, 呈干燥状黄白色, 甚至肉质消失呈较透明薄片, 完全丧失商品价值(乔存金和李红梅2010; 杨咏鹃2009)。对常见果蔬褪色的研究发现, 褪色是由于组织内抗氧化酶活性下降, 其清除活性氧等功能减弱, 活性氧积累, 引发膜脂质过氧化作用, 从而破坏细胞膜结构的完整性, 对细胞产生伤害, 进一步影响植物的呼吸作用, 加速植物的衰老和颜色褪变(林河通等2002)。孙明心等(2001)、李桂舫等(2008)认为,

病菌感染及采后继续危害是导致辣椒“花壳”的主要原因, 并发现*Acremonium* sp.和*Fusarium* sp.混合感染可引起采前辣椒红色素丧失。我们前期的研究发现, 引起辣椒采后“花壳”的感染病菌与报道的采前感染病菌存在差异, 5株“花壳”病菌是导致辣椒采后产生“花壳”的主导病原菌(刘海等2013), 但“花壳”过程中辣椒氧化防御体系所发生的变化尚

收稿 2012-11-05 修定 2013-03-25

资助 国家自然科学基金(31060228/C200301)。

* 通讯作者(E-mail: gzdxzdzh@163.com; Tel: 0851-8292117)。

未见系统研究和报道。本试验研究“花壳”辣椒抗病反应系统的变化特征,旨在丰富辣椒采后病理的基础理论,为进一步研究“花壳”发生的内在机制以及辣椒采后干制“花壳”的防控提供有价值的理论依据。

材料与方法

1 材料

贵阳市花溪区‘平板椒’品种辣椒(*Capsicum annuum* L.)购于本地市场,运回实验室,挑选无机械损伤、霉变、病虫害,大小均匀,成熟度一致的辣椒作为试材。

供试“花壳”病菌株:细菌组, B3 (*Bacillus subtilis*, 枯草芽孢杆菌)、B5 (*Lysinibacillus sphaericus*, 球形赖氨酸杆菌);真菌组, F3 (*Phanerochaete sordida*, 污原毛平革菌)、F101 (*Irpex lacteus*, 白囊耙齿菌)、F121 (*Cladosporium cladosporioides*, 枝孢样枝孢霉)。普通病菌株: B60和F2 (未鉴定)。以上菌株由本实验从“花壳”辣椒中分离(鉴定)并培养保存。

2 方法

2.1 病菌接种处理

除去新鲜辣椒的果梗,用无菌水冲洗,75%酒精表面消毒,最后用无菌水清洗数遍。辣椒分成2组:(1)对照用微型注射器的无菌针头注入0.5 mL 无菌生理盐水;(2)处理用培养后的病菌菌体悬浮液(用无菌生理盐水配制,浓度为 10^4 CFU·mL⁻¹) 0.5 mL注入组织。两组辣椒分别置于灭菌的培养皿内,每个培养皿用0.015 mm厚的聚乙烯薄膜袋密封包装,在(28±1) °C、相对湿度80%下贮藏。贮藏期间,定期取样,观察辣椒颜色变化情况并测定生理生化指标。

2.2 超氧阴离子(O₂⁻)产生速率、过氧化氢(H₂O₂)和羟基自由基(·OH)含量的测定

O₂⁻产生速率测定参照王爱国和罗广华(1990)的方法。H₂O₂含量测定参照曹建康等(2007)的方法。·OH含量测定参照王爱国和罗广华(1993)的方法并稍加改进:取5.0 g鲜辣椒,加入10 mL提取液(50 mmol·L⁻¹ Na₂HPO₄-NaH₂PO₄缓冲液, pH 7.0),研磨后经纱布过滤,滤液在10 000×g离心10 min。取上清液1 mL置于试管中,加入1 mL反应缓冲液(25 mmol·L⁻¹ Na₂HPO₄-NaH₂PO₄缓冲液, pH 7.0, 含2.5 mmol·L⁻¹ 2-脱氧核糖),35 °C温育1 h后,再加入

1 mL 1%硫代巴比妥酸和1 mL冰醋酸,充分混匀,于沸水浴中30 min,冷却后,测定吸光度值A₅₃₂。结果以吸光值表示。

2.3 脂氧合酶(lipoxygenase, LOX)活性和抗氧化酶活性的测定

LOX活性的测定参照陈昆松等(2003)的方法;过氧化物酶(peroxidase, POD)活性的测定采用愈创木酚氧化法(曹建康等2007);过氧化氢酶(catalase, CAT)活性的测定采用H₂O₂紫外吸收法(曹建康等2007)。

2.4 数据处理

各指标测定均重复3次,用Excel 2003绘图,采用SPSS10.0 for Windows统计软件进行统计分析和Duncan's (邓肯氏)多重差异比较, P<0.05为差异具有显著性。

实验结果

1 接种不同菌株辣椒的色泽变化

将新鲜、健康的红辣椒分别接种5株“花壳”病菌(B3、B5、F3、F101和F121)和2株普通病菌(B60和F2),5 d后,接种“花壳”病菌的辣椒有病害症状,其中接种细菌B3和B5的出现橘黄色斑块,并向周围扩散;接种真菌的初始颜色变化不明显,但在接种后8 d开始出现较大面积的橘黄色斑块。25 d后,接种“花壳”病菌的辣椒大部分明显由红色褪为黄色或橘黄色;接种普通病菌的颜色变化小,为橙红色;对照组颜色几乎无变化(图1)。由此可见,5株“花壳”病菌均导致辣椒采后产生“花壳”现象,普通病菌对辣椒“花壳”致变作用较小。

2 “花壳”病菌对辣椒O₂⁻产生速率的影响

处理组辣椒中O₂⁻产生速率总体呈上升趋势,前期增加较快,而后平缓甚至稍有下降,但后期又

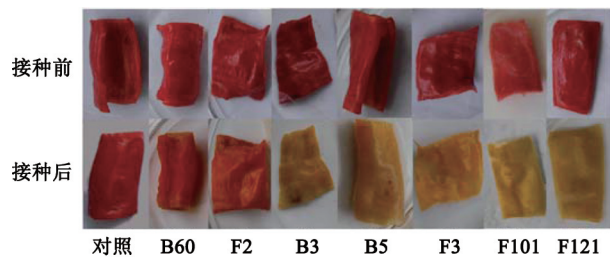


图1 不同菌株处理的辣椒色泽变化
Fig.1 Change in color of red pepper infected by different pathogens

迅速上升,相对于对照组均维持在较高水平,接种“花壳”病菌的比接种普通病菌的整体水平高,而接种“花壳”细菌和真菌对 O_2^- 产生速率的增加没有显著差异($P>0.05$) (图2)。“花壳”病菌中,接种F101的对 O_2^- 产生速率的影响最为明显,在整个贮藏期间 O_2^- 产生速率变化幅度最大。接种B3、B5和F3病菌5 d后, O_2^- 产生速率与对照差异显著($P<0.05$),而接种F101的与对照差异极显著($P<0.01$)。25 d后,除接种B3的 O_2^- 产生速率与对照差异显著($P<0.05$)外,其余均差异极显著($P<0.01$)。上述结果表明,“花壳”病菌侵染显著影响辣椒 O_2^- 产生速率,不同菌株对其影响有差异,前期接种“花壳”真菌的较细菌的影响小,但后期影响强烈。

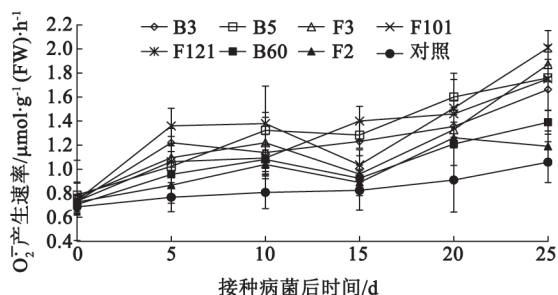


图2 “花壳”病菌侵染对辣椒 O_2^- 产生速率的影响
Fig.2 Effect of pathogens causing discoloration on O_2^- production rate in red pepper

3 “花壳”病菌对辣椒 H_2O_2 含量的影响

从总体趋势看,处理组 H_2O_2 含量变化在接种初期和中期呈先上升后下降再上升趋势,与 O_2^- 产生速率变化趋势相似,但后期部分处理 H_2O_2 含量有所下降;对照的 H_2O_2 含量在整个贮藏期间均有所上升,但变化较为平缓。接种普通病菌的初期 H_2O_2 含量变化较大,后期变化缓慢且含量低。接种“花壳”细菌和真菌对 H_2O_2 含量的影响有较大差异,后者的 H_2O_2 含量初期变化平缓,后期波动剧烈(图3)。接种“花壳”病菌5 d后, H_2O_2 含量达到第一波峰值,处于较高水平,除B3外,接种其他病菌的 H_2O_2 含量均明显高于对照($P<0.01$)。接种真菌F3、F101和F121后15 d左右(侵染中期), H_2O_2 含量变化无显著差异($P>0.05$),其中接种F101的 H_2O_2 含量从染菌开始一直上升,20 d后达到峰值,为 $(21.46\pm 1.42) \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW),且高于其他“花壳”病菌组。结

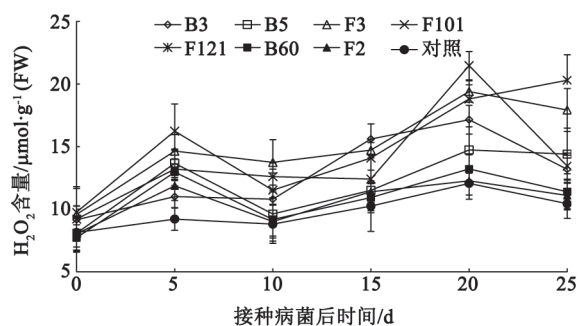


图3 “花壳”病菌侵染对辣椒 H_2O_2 含量的影响
Fig.3 Effect of pathogens causing discoloration on H_2O_2 contents in red pepper

果表明,“花壳”病菌侵染后, H_2O_2 含量变化明显,不同菌株侵染对辣椒中 H_2O_2 含量变化影响不同,其中真菌F3、F101和F121的影响较为突出。

4 “花壳”病菌对辣椒 $\cdot\text{OH}$ 含量的影响

图4显示,对照的 $\cdot\text{OH}$ 含量变化波动较小,总体水平显著低于处理($P<0.05$);接种“花壳”病菌的 $\cdot\text{OH}$ 含量变化幅度较大,且均高于对照($P<0.05$),而接种普通病菌的仅略高于对照,变化幅度较低。接种“花壳”细菌和真菌对 $\cdot\text{OH}$ 含量的影响差异显著($P<0.05$)。不同“花壳”病菌中,接种B3和F121的 $\cdot\text{OH}$ 含量变化出现较大波动,分别在10和15 d后出现低峰值,吸光值为 0.943 ± 0.166 和 1.091 ± 0.153 ,而接种其他“花壳”病菌的 $\cdot\text{OH}$ 含量变化基本一致,均呈不断上升趋势。在整个贮藏期间,真菌F121对 $\cdot\text{OH}$ 含量变化的影响与对照差异极显著($P<0.01$)。可见,“花壳”病菌侵染显著促进辣椒中 $\cdot\text{OH}$ 含量增加,不同菌株侵染的辣椒中 $\cdot\text{OH}$ 含量变化不同,其中B3、F101和F121的影响较为明显。

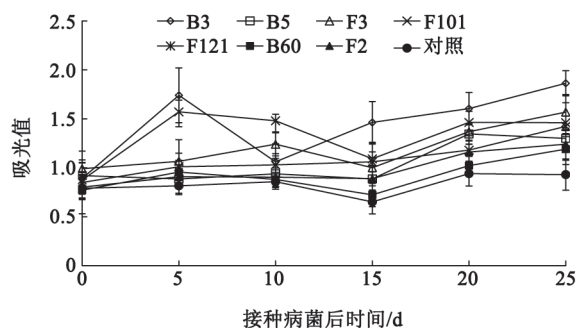


图4 “花壳”病菌侵染对辣椒 $\cdot\text{OH}$ 含量的影响
Fig.4 Effect of pathogens causing discoloration on $\cdot\text{OH}$ contents in red pepper

5 “花壳”病菌对辣椒CAT、POD、LOX活性的影响

由图5-A可见, 接种“花壳”病菌的CAT活性变化与对照有明显差异, 在病菌侵染早期呈上升趋势且明显高于对照, 接种10 d后开始下降; 对照在贮藏初期上升缓慢, 而后几乎不再变化, 处于平稳状态; 接种普通病菌B60和F2的CAT活性呈缓慢上升趋势, 15~20 d小幅下降。在侵染初期, 不同“花壳”病菌对辣椒中CAT活性变化的影响有差异; 接种B3、B5、F3和F101后5 d的CAT活性变化与对照和接种普通病菌的存在极显著差异($P < 0.01$); 接种“花壳”病菌25 d后的CAT活性均明显低于对照和接种普通病菌的($P < 0.01$)。接种真菌F101的

CAT活性变化幅度较大。结果表明, “花壳”病菌侵染显著降低辣椒中的CAT活性。

由图5-B可见, 接种“花壳”病菌的POD活性变化趋势与CAT的变化相似, 接种不同病菌的差异较大, 其中真菌F101对POD活性影响最大。5株“花壳”病菌侵染早期, POD活性迅速上升, 10 d后均达到峰值, 分别为 (102.62 ± 15.31) 、 (118.58 ± 12.18) 、 (105.66 ± 10.10) 、 (146.63 ± 11.98) 、 $(130.10 \pm 13.73) \Delta OD_{470} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ (FW), 而后均开始起伏下降; 对照的POD活性在贮藏期间有所上升但变化平缓。接种普通病菌B60和F2的POD活性在贮藏前期呈缓慢上升趋势, 而后趋于平稳, 后期略有下降。接种除F121外的“花壳”病菌, 5 d后POD活性与对照和接种普通病菌的无显著差异($P > 0.05$), 25 d后明显低于对照和接种普通病菌的($P < 0.05$), 与CAT活性变化趋势一致; 接种F121与接种其他菌株相比, 5 d后对POD活性的影响有显著差异($P < 0.05$), 20 d后有极显著差异($P < 0.01$)。可见, “花壳”病菌侵染显著降低辣椒中的POD活性。

由图5-C可见, 随着贮藏时间的延长, 辣椒中LOX活性呈缓慢增加趋势, 接种“花壳”病菌的LOX活性增加较快, 其中接种F101和F121的15 d后LOX活性均有下降, 但总体仍呈上升趋势。接种普通病菌B60和F2的LOX活性在整个贮藏期间呈上升趋势, 但变化水平明显低于接种“花壳”病菌的。接种“花壳”病菌5和10 d后的LOX活性极显著高于对照和接种普通病菌的($P < 0.01$), 20 d后仍显著高于对照($P < 0.05$)。其中, 接种F121病菌5 d后对LOX活性的影响显著($P < 0.05$)。可见, “花壳”病菌侵染显著提高辣椒中的LOX活性。

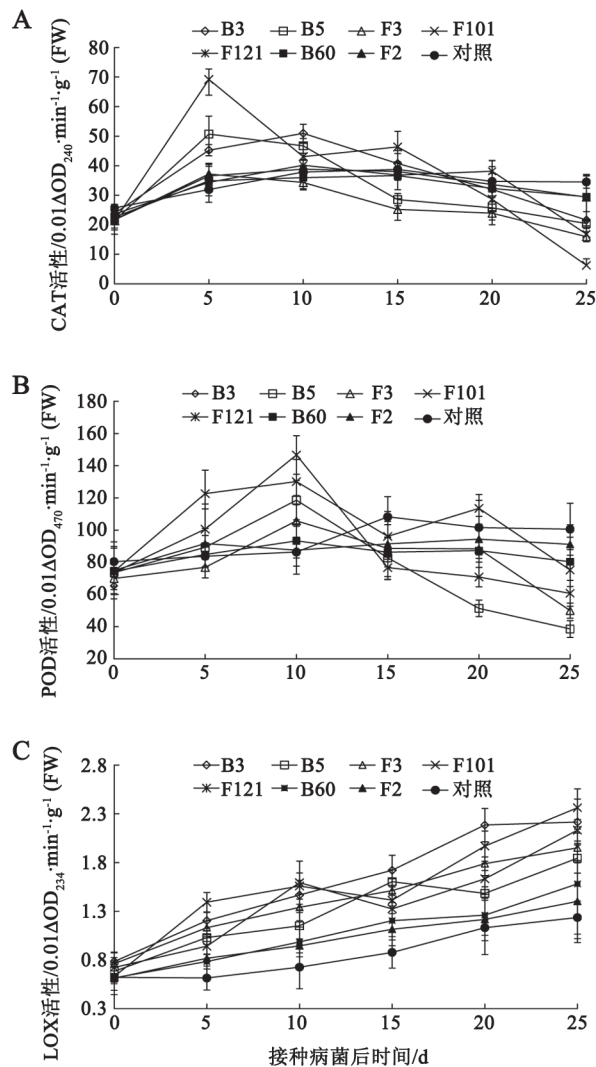


图5 “花壳”病菌侵染对辣椒CAT、POD、LOX活性的影响
Fig.5 Effect of pathogens causing discoloration on CAT, POD and LOX activities in red pepper

讨 论

辣椒采后出现“花壳”, 严重影响辣椒外观品质和商品价值。本研究表明, “花壳”病菌侵染能在短时间内使辣椒颜色褪变而产生“花壳”。其中, B3为腐生菌, 可能在辣椒受其他“花壳”病菌侵染并产生伤害和坏死后, 发生继发性感染, 进而对辣椒色泽产生进一步破坏。

“花壳”病菌使辣椒 O_2^- 产生速率和 H_2O_2 含量在0~5 d内显著增加, 并在贮藏期间处于较高水平, 可能与“花壳”病菌侵染早期产生大量活性氧以抵御

病原菌的侵染有关(Mandal等2008; Desikan等2001); 普通病菌侵染后活性氧含量明显低于“花壳”病菌侵染的。因此,“花壳”病菌侵染早期,辣椒活性氧的大量产生可能是对“花壳”病菌侵染的抗病应激反应。

植物在病原物侵染或诱发物处理后产生的 O_2^- 和 H_2O_2 可通过一系列反应转化为 $\cdot OH$ (陈贵华2009), 而活性氧能杀死细胞, 其中 $\cdot OH$ 的氧化能力最强(Imlay和Linn 1988)。“花壳”病菌侵染后 $\cdot OH$ 含量不断起伏增加, 可能是受到 H_2O_2 含量和 O_2^- 产生速率变化的影响, 从而间接影响到辣椒中 $\cdot OH$ 的形成和含量变化。

当植物处于逆境胁迫或病原菌侵染时, 活性氧代谢失调和积累导致细胞膜过氧化, 膜结构及膜系统功能遭破坏(Boonsiri等2007)。CAT和POD是植物体内重要的活性氧清除酶(左进华等2010)。病原菌侵染可在短期内诱导植株活性氧清除酶活性升高从而降低 H_2O_2 和 O_2^- 等活性氧的积累(Mandal等2008; 陶宗娅等2005; 李浩然2012)。由本试验结果可见, CAT和POD活性在“花壳”病菌侵染后快速升高是对病菌侵染产生大量活性氧的应激反应, 有利于进一步清除活性氧; 在中后期CAT和POD活性显著降低, 而 O_2^- 产生速率和 H_2O_2 含量却较快升高, 可能是由于后期CAT和POD活性下降使其对活性氧清除能力降低, 导致活性氧积累, 从而对细胞膜结构的破坏和组织细胞的损伤。而普通病菌对防御体系的影响相对较弱, 作用效果较慢。

辣椒色素不稳定, 当细胞受损时, 辣椒色素可发生(自)氧化作用而褪色(丁筑红等2010; 吴明光1994)。本试验表明, “花壳”病菌侵染会导致辣椒色素褪变, 引起辣椒中活性氧爆发, 而辣椒细胞酶系统抗氧化能力的逐渐丧失使活性氧清除能力大大降低, 加剧了活性氧的大量积累; 同时引起膜脂发生过氧化作用(LOX活性增强), 引发辣椒细胞结构的破坏和损伤(郭绍东和李合生1995)。而辣椒色素可能在猝发的活性氧作用和受损时外界条件的影响下发生降解、氧化或转化, 最终导致辣椒果实颜色变化产生“花壳”现象, 相关机制还有待进一步证实。

参考文献

- 曹建康, 姜微波, 赵玉梅(2007). 果蔬采后生理生化实验指导. 北京: 中国轻工业出版社, 101~122
- 陈贵华(2009). 甜菜抗根病信号转导机制的研究——着重于SA、 Ca^{2+} 信号分子的研究[学位论文]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学
- 陈昆松, 徐昌杰, 许文平, 吴敏, 张上隆(2003). 猕猴桃和桃果实脂氧合酶活性测定方法的建立. 果树学报, 20 (6): 436~438
- 丁筑红, 韩江雪, 谭书明, 吴梓轩, 吴华贵(2010). 辣椒色素单体组分的分离及其热稳定性研究. 贵州农业科学, 38 (4): 187~190
- 郭绍东, 李合生(1995). 甘薯块根组织脂氧合酶及其在抗病生理中的功能研究. 植物病理学报, 25 (4): 325~329
- 李桂舫, 金静, 傅德峰, 王远路, 蒋雯雯, 刘建萍(2008). 干制辣椒红色素丧失与病原菌的关系. 中国蔬菜, (12): 27~29
- 李浩然(2012). 玉米抵御层出镰刀菌侵染的生理和分子机制[学位论文]. 保定: 河北农业大学
- 林河通, 席巧芳, 陈绍军(2002). 果实贮藏期间的酶促褐变. 福州大学学报(自然科学版), 30: 696~703
- 刘海, 丁筑红, 郑文字, 肖治柔, 邓程, 杨茜(2013). 辣椒“花壳”主要致变细菌的分离及鉴定. 食品科学, 34 (1): 160~165
- 乔存金, 李红梅(2010). 辣椒“虎皮”病的成因及防治措施. 中国果菜, (11): 34
- 孙明心, 杨美芳, 朱瑞华(2001). 辣椒如何防治“花皮子”. 农业科技与信息, (3): 14
- 陶宗娅, 田小凤, 向述莲, 崔盛, 陈蕤(2005). 赤霉菌粗毒素对小麦幼苗活性氧代谢的影响. 西南农业大学学报(自然科学版), 27 (6): 851~854
- 王爱国, 罗广华(1990). 植物的超氧化物自由基与羟胺反应的定量关系. 植物生理学通讯, (6): 55~57
- 王爱国, 罗广华(1993). 羟自由基启动下的脱氧核糖降解及其产物的TBA反应. 生物化学生物物理进展, 20 (2): 150~152
- 吴明光(1994). 食用天然色素——辣椒色素. 厦门科技, (4): 21~23
- 杨咏鹃(2009). 干制技术与干辣椒品质变化相关性研究[学位论文]. 贵阳: 贵州大学
- 左进华, 陈安均, 孙爱东, 罗云波, 朱本忠(2010). 番茄果实成熟衰老相关因子研究进展. 中国农业科学, 43 (13): 2724~2734
- Boonsiri K, Ketsa S, van Doorn WG (2007). Seed browning of hot peppers during low temperature storage. Postharvest Biol Tec, 45 (3): 358~365
- Desikan R, A-H-Mackerness S, Hancock JT, Neill SJ (2001). Regulation of the *Arabidopsis* transcriptome by oxidative stress. Plant Physiol, 127: 159~172
- Imlay JA, Linn S (1988). DNA damage and oxygen radical toxicity. Science, 240: 1302~1309
- Mandal S, Mitra A, Mallick N (2008). Biochemical characterization of oxidative burst during interaction between *Solanum lycopersicum* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Physiol Mol Plant Pathol, 72: 56~61