

# 茉莉酸甲酯对贮藏花生种子黄曲霉抗性的影响

贺立红<sup>1,2</sup>, 何红卫<sup>1,3</sup>, 宾金华<sup>1</sup>

(1 华南师范大学 生命科学学院, 广东 广州 510631;

2 仲恺农业技术学院 农学系, 广东 广州 510225; 3 暨南大学 华文学院, 广东 广州 510610)

**摘要:**花生 *Arachis hypogaea* 种子(汕油 523、粤油 79、湛油 30)在干燥器中分别用 LiCl、MgCl<sub>2</sub> 饱和溶液隔层储存 1 个月后,种子的含水量(*w*)分别降至 2.82%、4.96%,用 1 mmol/L 茉莉酸甲酯(MJ)处理这些种子,开放式贮存 6 个月,然后接种黄曲霉孢子并培养 9 d,测定种子黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 质量分数及几丁质外切酶、几丁质内切酶和 β-1,3 葡聚糖苷酶的活性.发现 MJ 处理后可降低黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 质量分数,同时,通过提高几丁质外切酶、几丁质内切酶活性来提高花生种子对黄曲霉的抗性.但对 β-1,3-葡聚糖苷酶活性无影响.

**关键词:**花生;黄曲霉;茉莉酸甲酯;贮存

中图分类号:S565.2

文献标识码:A

文章编号:1001-411X(2004)03-0010-04

## Effects of methyl jasmonate on the resistance of peanut seeds to *Aspergillus flavus*

HE Li-hong<sup>1,2</sup>, HE Hong-wei<sup>1,3</sup>, BIN Jin-hua<sup>1</sup>

(1 College of Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631, China;

2 Zhongkai Agrotechnical College, Guangzhou 510225, China;

3 College of Chinese language and culture of Jinan University, Guangzhou 510610, China)

**Abstract:** After storage in the condition made by the saturated LiCl and MgCl<sub>2</sub> solution for 1 month, the water content of seeds was about 2.82%, 4.96%. And then the peanut, *Arachis hypogaea* seeds (Shanyou 523, Yueyou 79, Zhanyou 30) were treated with 1 mmol/L methyl jasmonate (MJ) and stored for 6 months. These seeds were inoculated with spores ( $1 \times 10^6$ /mL) of *Aspergillus flavus* and were cultured 9 days. Some enzymes activity and the aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) content of seeds were detected. The results showed that MJ may promoted peanut seeds resistance to *Aspergillus flavus* by increasing the activities of exochitinase, endochitinase and decreased the content of AFB<sub>1</sub>.

**Key words:** peanut; *Aspergillus flavus*; methyl jasmonate(MJ); storage

自然界中,黄曲霉的分布十分广泛,常见于发霉的花生仁、玉米、谷粒中.一些黄曲霉在生长和代谢过程中,会产生一类代谢物——黄曲霉毒素(aflatoxin, AF),它是剧毒物,其急性毒性为砒霜的 68 倍、氰化物的 10 倍,可在短期内使肝脏严重受损而死亡<sup>[1]</sup>,其中以 B<sub>1</sub> 类黄曲霉毒素产量最高,毒性最大,致癌性最强.花生是我国主要的油料作物之一,在我

国大多数地区都可种植,极易受到黄曲霉的污染.目前 AF 污染已成为花生生产中的一个极为严重的问题.茉莉酸(jasmonic acid, JA)及茉莉酸甲酯(methyl jasmonate, MJ)是一类脂肪酸的衍生物,与植物抵抗病原菌侵染有关<sup>[2,3]</sup>.用茉莉酸或其甲酯处理植株,可以提高农作物抗病虫害及其他抗逆能力<sup>[4]</sup>,是一个不污染环境的非农药保护物质<sup>[5]</sup>.本文探讨了 1

收稿日期:2003-06-24

作者简介:贺立红(1970-),女,讲师,硕士.通讯作者:宾金华(1962-),男,教授,博士.

基金项目:广东省自然科学基金资助项目(990461,31531);广东省教育厅资助项目.

mmol/L MJ 处理对花生种子抗黄曲霉的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

花生 *Arachis hypogaea* 品种为汕油 523、粤油 79 和湛油 30, 购自广东省农业科学院。

黄曲霉 *Aspergillus flavus* 菌株 As3.2890 由广东省农业科学院提供, 黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) 质量浓度大于 100 μg/L。培养基配方为: 硝酸钠 3 g, 磷酸氢二钾 1 g, 硫酸镁 0.5 g, 氯化钾 0.5 g, 硫酸亚铁 0.01 g, 蔗糖 30 g, 琼脂 15 g, 水 1 000 mL。pH = 3.5 ~ 4.5。

荧光分光光度计为 RF-540 型(日本岛津公司产品)。标准 AFB<sub>1</sub> 由广州市卫生防疫站赠送。

### 1.2 方法

花生种子分别在 LiCl、MgCl<sub>2</sub> 饱和溶液维持相对湿度(11.2%、32.4%)的干燥器中贮存 1 个月, 使不同来源的花生种子含水量(*w*)基本一致(分别为 2.8% 和 4.96%)。测定种子几丁质外切酶、几丁质内切酶、β-1,3 葡聚糖苷酶的活性和黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 的质量分数(对照 1)。同时选取经上述处理的健康饱满、大小均匀、没有受伤的种子 100 粒, 置于 *d* = 15 cm 的培养皿中, 每个培养皿加入浓度为 1 mmol/L 的 MJ

2 mL, 轻微摇动培养皿, 使溶液均匀分布于种子表面, 以开放方式贮存 6 个月; 另取种子 100 粒, 加 2 mL 无菌水摇匀, 同样以开放方式贮存 6 个月, 其中 50 粒, 接种 2 mL 含孢子 10<sup>6</sup> ~ 10<sup>7</sup>/mL 的黄曲霉孢子悬浮液(处理 1), 另 50 粒以 2 mL 无菌水处理, 作为对照 2; 对于经过 MJ 处理并贮存 6 个月的花生种子, 取其中 50 粒, 接种 2 mL 含孢子 10<sup>6</sup> ~ 10<sup>7</sup>/mL 的黄曲霉孢子悬浮液(处理 2), 同时另 50 粒以 2 mL 无菌水处理, 作为对照 3, 对照 2、处理 1、对照 3、处理 2 于 28 °C 生化培养箱中存放 9 d 后测定几丁质外切酶、几丁质内切酶、β-1,3 葡聚糖苷酶的活性<sup>[6]</sup> 和 AFB<sub>1</sub> 的质量分数<sup>[7]</sup>。

## 2 结果与分析

与在相对湿度 11.2% (LiCl 饱和溶液) 和 32.4% (MgCl<sub>2</sub> 饱和溶液) 的环境中贮存 1 个月种子的 AFB<sub>1</sub> 质量分数比较, 3 个品种花生的对照 2 和对照 3 的 AFB<sub>1</sub> 质量分数都略有下降, 且对照 3 下降幅度较大。接种黄曲霉后, 3 个花生品种种子的 AFB<sub>1</sub> 质量分数都明显增加, 处理 2 的 AFB<sub>1</sub> 质量分数明显低于处理 1 的质量分数(表 1)。说明 MJ 处理能够降低种子 AFB<sub>1</sub> 的质量分数。

表 1 茉莉酸甲酯对贮藏花生种子黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 质量分数的影响<sup>1)</sup>

Tab.1 Effects of methyl jasmonate on aflatoxin B<sub>1</sub> content in storage peanut seeds

μg·g<sup>-1</sup>

处理 treatment	汕油 523 Shanyou 523		粤油 79 Yueyou 79		湛油 30 Zhanyou 30	
	11.2%	32.4%	11.2%	32.4%	11.2%	32.4%
对照 1 control 1	0.020 0 c	0.028 6 c	0.035 6 c	0.031 3 c	0.022 0 c	0.039 2 c
对照 2 control 2	0.017 8 c	0.008 1 c	0.019 4 c	0.009 2 c	0.008 1 c	0.012 5 c
处理 1 treatment 1	1.120 0 a	0.730 0 a	9.550 0 a	15.200 0 a	2.210 0 a	34.500 0 a
对照 3 control 3	0.016 6 c	0.006 9 c	0.017 2 c	0.007 5 c	0.020 0 c	0.010 8 c
处理 2 treatment 2	0.640 0 b	0.700 0 b	2.710 0 b	3.800 0 b	0.930 0 b	1.500 0 b

1) 同一列数据后具不同字母者表示差异显著(最小显著差数法, *P* < 0.05); 11.2%、32.4% 分别代表在相对湿度 11.2%、32.4% 的环境中贮存 1 个月的种子

从表 2 中可以看到, 种子在相对湿度 11.2% 中贮藏 1 个月后, 对照 1 中汕油 523 和湛油 30 种子的几丁质外切酶活性较高, 粤油 79 的几丁质外切酶活性相对较低; 对照 1 中粤油 79 和湛油 30 种子的几丁质内切酶活性接近, 汕油 523 的几丁质内切酶活性明显高于它们。对照 2、对照 3 的 3 个花生品种种子的几丁质外切酶、内切酶活性都比对照 1 升高, 其中对照 3 比对照 2 的升幅稍大。处理 1 的 3 个花生品种种子的几丁质外切酶、内切酶活性都比对照 2 明显提高。处理 2 的汕油 523 和粤油 79 的几丁质外切酶、内切酶活性比处理 1 提高, 但湛油 30 的下降, 说明在花生种子的含水量低时, MJ 可提高花生几丁质

酶的活性, 但存在种质特异性。

种子在相对湿度 32.4% 中贮藏 1 个月后, 粤油 79 和湛油 30 种子的几丁质外切酶活性较低, 汕油 523 的几丁质外切酶活性明显高于它们; 3 个品种种子的几丁质内切酶活性差异较大。粤油 79 和湛油 30 种子的几丁质内切酶活性比相对湿度 11.2% 贮藏 1 个月的高, 而汕油 523 的几丁质内切酶活性则变化相反, 可能是高含水量有利于激活粤油 79 和湛油 30 种子几丁质内切酶的活性。其他处理结果与相对湿度 11.2% 贮藏 1 个月后的结果相同。但处理 2 中湛油 30 和粤油 79 的几丁质外切酶活性比处理 1 提高, 汕油 523 的几丁质外切酶活性下降; 处理 2 中湛

表2 茉莉酸甲酯对贮藏花生种子几丁质外切酶、内切酶活性的影响<sup>1)</sup>

Tab.2 Effects of methyl jasmonate on exochitinase and endochitinase activities in storage peanut seeds

酶 enzyme	处理 treatment	汕油 523 Shanyou 523		粤油 79 Yueyou 79		湛油 30 Zhanyou 30	
		11.2%	32.4%	11.2%	32.4%	11.2%	32.4%
		$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$					
几丁质外切酶 exochitinase	对照 1 control 1	23.6 e	26.8 c	2.61 e	11.1 d	15.7 e	7.2 e
	对照 2 control 2	42.1 d	15.7 d	28.9 d	19.7 c	40.7 d	26.2 d
	处理 1 treatment 1	96.3 b	172.4 a	134.5 b	130.3 b	259.3 a	244.7 b
	对照 3 control 3	71.3 c	15.8 d	39.8 c	20.1 c	49.0 c	33.6 c
	处理 2 treatment 2	449.2 a	117.4 b	303.8 a	330.4 a	151.0 b	348.2 a
几丁质内切酶 endochitinase	对照 1 control 1	204.1 e	149.9 e	123.8 e	225.1 d	151.8 e	297.0 e
	对照 2 control 2	309.7 d	405.2 d	503.1 b	471.5 c	424.5 c	381.3 d
	处理 1 treatment 1	373.7 c	632.2 a	340.3 d	483.2 b	791.2 a	468.7 b
	对照 3 control 3	489.0 a	600.3 b	586.1 a	491.2 a	533.3 b	446.0 c
	处理 2 treatment 2	458.0 b	418.0 c	358.6 c	473.7 c	380.0 d	489.7 a

1) 同一列数据后具不同字母者表示差异显著(最小显著差数法,  $P < 0.05$ ); 11.2%、32.4% 分别代表在相对湿度 11.2%、32.4% 的环境中贮存 1 个月的种子

油 30 的几丁质内切酶活性比处理 1 高, 汕油 523 和粤油 79 的几丁质内切酶活性降低. 说明在高含水量时, MJ 可提高花生几丁质外切酶、内切酶的活性, 但存在种质特异性.

与未经 MJ 处理的花生种子相比, MJ 处理的花生种子在贮存过程中, 几丁质外切酶、内切酶活性升高, 接种黄曲霉孢子后, 种子的几丁质外切酶、内切酶活性也有升高, 意味着 MJ 可能通过增强花生几丁质外切酶、内切酶活性来提高贮藏花生种子对黄曲霉的抗性, 但与花生种子的含水量有关且存在种质特异性.

种子在相对湿度 11.2% 贮藏 1 个月后, 汕油 523 和粤油 79 种子的  $\beta$ -1,3 葡聚糖苷酶活性接近, 湛油 30 的  $\beta$ -1,3 葡聚糖苷酶活性明显高于它们. 对照 2 中 3 个品种的  $\beta$ -1,3 葡聚糖苷酶活性都比对照 1 下降. 处理 1 中 3 个品种种子的  $\beta$ -1,3 葡聚糖苷酶活性都比对照 2 明显增加. 对照 3 与对照 2 相比, 除粤

油 79 外, 汕油 523 和湛油 30 的  $\beta$ -1,3 葡聚糖苷酶活性略有升高. 处理 2 与处理 1 相比, 除湛油 30 外, 另 2 个品种的  $\beta$ -1,3 葡聚糖苷酶活性略有升高(表 3).

种子在相对湿度 32.4% 中贮藏 1 个月后, 粤油 79 和湛油 30 种子的  $\beta$ -1,3 葡聚糖苷酶活性接近, 汕油 523 的  $\beta$ -1,3 葡聚糖苷酶活性明显高于它们(对照 1). 对照 2 与对照 1 相比, 除湛油 30 外, 其他 2 个品种的  $\beta$ -1,3 葡聚糖苷酶活性都下降. 处理 1 中 3 个品种种子的  $\beta$ -1,3 葡聚糖苷酶活性比对照 2 都有所增加. 对照 3 与对照 2 相比, 3 个品种种子的  $\beta$ -1,3 葡聚糖苷酶活性有升有降. 处理 2 与处理 1 相比, 湛油 30 的  $\beta$ -1,3 葡聚糖苷酶活性明显升高, 另外 2 个品种则下降(表 3). 从这里可以看到, 与未经 MJ 处理的相比, MJ 处理的花生种子在贮存过程中,  $\beta$ -1,3 葡聚糖苷酶活性有升有降, 暗示  $\beta$ -1,3 葡聚糖苷酶与 MJ 提高贮藏花生种子对黄曲霉的抗性可能无关.

表3 茉莉酸甲酯对贮藏花生种子  $\beta$ -1,3 葡聚糖苷酶活性的影响<sup>1)</sup>Tab. 3 Effects of methyl jasmonate on  $\beta$ -1,3-glucanase activities in storage peanut seeds

处理 treatment	汕油 523 Shanyou 523		粤油 79 Yueyou 79		湛油 30 Zhanyou 30	
	11.2%	32.4%	11.2%	32.4%	11.2%	32.4%
对照 1 control 1	2.55 c	3.66 d	2.71 c	2.05 d	5.48 c	1.36 d
对照 2 control 2	2.53 c	3.63 d	2.51 c	1.61 d	3.15 d	5.45 b
处理 1 treatment 1	7.59 a	9.80 a	14.27 b	16.04 a	15.58 a	6.23 b
对照 3 control 3	3.36 b	4.27 c	2.49 c	7.68 c	4.21 d	3.42 c
处理 2 treatment 2	7.83 a	8.91 b	15.49 a	9.42 b	14.25 b	15.76 a

1) 同一列数据后具不同字母者表示差异显著(最小显著差数法,  $P < 0.05$ ); 11.2%、32.4% 分别代表在相对湿度 11.2%、

32.4%环境中贮存1个月的种子

### 3 讨论

花生在收获前以及收获后的储藏和加工过程中都可以受到黄曲霉的侵染并产毒。Pattee 和 Sesson<sup>[8]</sup>报道花生感染黄曲霉后油份减少,花生水解酸败而不能食用。花生 AF 污染的治理问题日益受到人们的重视。本实验中发现在相对湿度 11.2% 和 32.4% 中贮藏 1 个月后,再储存 6 个月的 3 个花生品种的种子接种后与未接种的各自的对照相比,AFB<sub>1</sub> 质量分数明显升高。表明花生种子已经受到黄曲霉侵染并产生毒素。MJ 在花生种子的含水量低和高时可以降低 AFB<sub>1</sub> 质量分数。

几丁质酶和  $\beta$ -1,3 葡聚糖苷酶在体外能水解真菌细胞壁的 2 种主要成分——几丁质和葡聚糖。这 2 种酶同时作用于真菌时,具极强的协同效应。可直接破坏真菌顶端生长平衡而被广泛用于植物抗真菌病<sup>[9]</sup>。病原菌、虫害、非生物因子诱导物如重金属、激素等均可诱导几丁质酶的产生,且几丁质酶的诱导常伴随  $\beta$ -1,3 葡聚糖苷酶及其他病原相关蛋白(pathogenesis related proteins, PRP)的产生和快速积累<sup>[10,11]</sup>,本实验结果与其一致,储存 6 个月的 3 个花生品种的种子接种后与未接种的各自的对照比,几丁质酶、 $\beta$ -1,3 葡聚糖苷酶活性均有升高。

JA 和 MJ 具有植物生长调节物质的功能,而且与抵抗病原侵染有关<sup>[12]</sup>。当植物受到昆虫、病原菌攻击时,体内明显增加,并启动植物体内抗病防御基因的表达,从而调控着植物和器官的一系列连锁防御反应<sup>[12]</sup>。研究表明 JA 能够促进某些特定基因以及几丁质酶及  $\beta$ -葡聚糖苷酶基因表达,这些酶可以促进病原菌细胞壁的降解,起抑制病原菌和保护自身的作用<sup>[4,13]</sup>。本实验发现相对湿度 11.2% 贮藏花生种子 1 个月后,MJ 可以通过提高几丁质内切酶、几丁质外切酶活性而提高贮藏花生种子对黄曲霉的抗性。然而与未经 MJ 处理的相比,MJ 处理的花生种子在贮存过程中, $\beta$ -1,3 葡聚糖苷酶活性有升有降,暗示  $\beta$ -1,3 葡聚糖苷酶可能与 MJ 提高贮藏花生种子

对黄曲霉的抗性无关。实验结果表明 MJ 可以降低 AFB<sub>1</sub> 质量分数,通过提高几丁质外切酶、几丁质内切酶活性来提高花生种子对黄曲霉的抗性。

#### 参考文献:

- [1] 邵世光. 黄曲霉与黄曲霉毒素[J]. 生物学教学,1994,(4):41-42.
- [2] 宾金华,潘瑞焱. 茉莉酸甲酯的生理生化及在植物抗病中的作用[J]. 植物学通报,1995,12(4):17-21.
- [3] CREELMAN R A, MELLUT J E. Biosynthesis and action of jasmonates in plant[J]. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1997, 48:355-381.
- [4] 宾金华,潘瑞焱. 茉莉酸甲酯对烟草幼苗抗炭疽病的影响[J]. 热带亚热带植物学报,1997,5(4):21-26.
- [5] 洪忠,张永忠,陈虎保,等. 天然生理活性物质茉莉酸及其甲酯的生理作用[J]. 化学合成,2000,39(5):8-11.
- [6] 汤章城. 现代植物生理学实验指南[M]. 北京:科学出版社,1999.128-130.
- [7] 肖达人,王圣玉,张洪玲. 花生抗黄曲霉产毒快速鉴定法[J]. 中国油料作物学报,1999,21(3):72-76.
- [8] PATTEE H E, SESSON S L. Relation between *Aspergillus flavus* growth, fat acidity and aflatoxin content in peanut[J]. Journal of the American Oil Chemist's Society, 1967,44:61-63.
- [9] 蓝海燕,田颖川,王长海,等. 表达  $\beta$ -1,3 葡聚糖苷酶及几丁质酶基因的转基因烟草及其抗真菌病的研究[J]. 遗传学报,2000,27(1):70-77.
- [10] 曾艳,赵南明,刘进元. 几丁质酶与植物防卫反应[J]. 生物工程进展,1997,17(4):31-34.
- [11] 蔡应繁,叶鹏盛,张利,等.  $\beta$ -1,3 葡聚糖苷酶及其在植物抗真菌病基因工程中的作用[J]. 西南农业学报,2001,14(2):78-81.
- [12] 江玲,周燮. 茉莉酸类在植物生长发育和对伤害反应中的作用[J]. 生命科学,1998,10(1):18-21.
- [13] 曹宗巽,周阮宝,赵毓桔. 其他植物生长调节物质[A]. 余叔文,汤章城. 植物生理与分子生物学[C],北京:科学出版社,1998.512-535.

【责任编辑 李晓卉】