

DOI:10.3969/j.issn.1003-5060.2024.12.014

梨果皮花青素合成通路响应病原菌侵染机制研究

马琳, 赵玉琪, 李闯, 张华, 胡康棣

(合肥工业大学 食品与生物工程学院, 安徽 合肥 230601)

摘要:花青素是果实中的常见色素,在果实应答病原菌侵染中的作用尚不清楚。文章利用黑曲霉的野生型菌株、抗氧化酶缺失相关菌株 $\Delta cpeA$ 、 $\Delta sodB$ 和 $\Delta sodC$ 侵染砀山酥梨和红星梨,发现富含花青素的红星梨对黑曲霉具有较高的抵抗力。因此,分别用体积分数为 0%、5%、10% 红星梨提取的花青素处理大肠杆菌和黑曲霉,结果发现体积分数为 5%、10% 的花青素对大肠杆菌和黑曲霉都有不同程度的抑制作用。利用黑曲霉侵染红星梨,通过实时荧光定量聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)技术,分析梨侵染病变部位与花青素相关的基因表达量变化,发现 P_yMYB10 、 $P_yMYB114$ 、 P_ybHLH3 、 P_yDFR 、 P_yANS 和 P_yUFGT 表达量上调,结果表明,梨果实可能通过上调花青素合成通路抑制采后病原真菌黑曲霉的侵染。

关键词:梨;花青素;抑菌;黑曲霉;大肠杆菌

中图分类号:Q948.122.3;Q936

文献标志码:A

文章编号:1003-5060(2024)12-1675-05

Study on the mechanism of pear peel anthocyanin synthesis pathway in response to pathogen infection

MA Lin, ZHAO Yuqi, LI Chuang, ZHANG Hua, HU Kangdi

(School of Food and Biological Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230601, China)

Abstract: Anthocyanin is a common pigment in fruit, and its role in fruit response to pathogen infection is unclear. In this paper, the wild type (WT) strains of *Aspergillus niger* (*A. niger*) and the related strains with deletion of antioxidant enzymes $\Delta cpeA$, $\Delta sodB$ and $\Delta sodC$ were used to infect Dangshan pear and Starkrimson pear. Anthocyanin-rich Starkrimson pears were found to be highly resistant to *A. niger*. Therefore, the anthocyanins of Starkrimson pear were extracted, and *Escherichia coli* (*E. coli*) and *A. niger* were treated with 0, 5% and 10% anthocyanins, respectively, and it was found that 5% and 10% anthocyanins showed different inhibitory effects on both *E. coli* and *A. niger*. The Starkrimson pears were infected by *A. niger*, and the expression changes of anthocyanin-related genes in the infected lesions of pears were analyzed by RT-qPCR. The expression levels of P_yMYB10 , $P_yMYB114$, P_ybHLH3 , P_yDFR , P_yANS and P_yUFGT were up-regulated, indicating that pear fruit may inhibit the infection of the postharvest pathogenic fungus *A. niger* by up-regulating the anthocyanin synthesis pathway.

Key words: pear; anthocyanidin; bacteriostasis; *Aspergillus niger* (*A. niger*); *Escherichia coli* (*E. coli*)

花青素广泛存在于果实、蔬菜、花卉中,是一种水溶性色素,文献[1-3]报道了花青素合成、抑

制因子以及 pH 值影响花青素的合成,从而赋予植物组织器官不同的颜色。花青素属于类黄酮化

收稿日期:2022-08-10;修回日期:2022-10-14

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31970312)

作者简介:马琳(1997—),女,河南新乡人,合肥工业大学硕士生;

张华(1973—),男,江苏徐州人,博士,合肥工业大学教授,博士生导师;

胡康棣(1984—),女,安徽宿州人,博士,合肥工业大学副教授,硕士生导师,通信作者, E-mail: kangdihu@hfut.edu.cn.

合物^[4],是由 3 个 C 键相连的 2 个苯环构成,稳定性较差,游离花青素在植物中几乎检测不到,它主要以糖苷的形式普遍存在于植物中,例如黑葡萄、桑葚、樱桃等深色植物都富含花青素^[5]。

关于花青素的抗菌活性一直以来是学者们研究的热点,黑莓中的花青素可以提高其抗真菌能力从而延缓黑莓采后真菌的生长^[6];黑豆皮花青素对大肠杆菌、短小芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌均有显著的抑制作用,且抑菌性随花青素浓度增大而增强^[7];葡萄籽原花青素通过抑制变形链球菌的生物膜和致龋毒力因子抑制其产糖、产酸能力^[8]。当紫胡萝卜中的花青素质量浓度为 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌程度达到最大^[9]。以上研究结果表明,花青素能够提高植物应对病原微生物等生物胁迫方面的抗性。

本文用黑曲霉和大肠杆菌分别侵染红茄梨和砀山酥梨,以从体内探究花青素对病原微生物的抗感染能力;将黑曲霉和大肠杆菌分别接种到体积分数为 0.5%、10%花青素的培养基上,以从体外探究花青素对病原微生物的抗感染能力;最后阐明花青素在抵抗植物病原微生物感染中的作用机制。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

砀山酥梨购于大润发超市;红茄梨购于山东省果树研究所;黑曲霉 *Aspergillus niger* MA70.15 ($\Delta kusA$, $pyrG^-$)野生型(wild type, WT)对照组菌株来自 Arthur F J Ram 教授(荷兰莱顿大学分子微生物学实验室);黑曲霉缺失体 $\Delta catA$ 、 $\Delta cpeB$ 、 $\Delta sodC$ 、 $\Delta cpeB-\Delta catA$ 和 $\Delta cpeB-\Delta sodC$ 均由实验室构建,其中 $catA$ 、 $cpeB$ 和 $sodC$ 基因直接影响黑曲霉的致病力。

1.2 实验方法

1.2.1 水浸提取法提取梨果皮花青素

采用水浸提取法用 5 倍体积蒸馏水浸泡梨果皮 50.0 g,在恒温、恒压摇床上避光浸泡提取 12 h,12 000 r/min 离心 5 min 后将上清转移到新的离心管中,沉淀继续用 5 倍体积蒸馏水浸泡提取 12 h,重复 3 次,将收集的上清混合后用真空冷冻干燥机干燥后即获得梨果皮花青素。

1.2.2 梨果皮花青素质量比的测定

取梨果皮 0.2 g 在液氮中充分研磨成粉末状,加入 1 mL 的 0.1%盐酸甲醇,在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下避光

放置 24 h,12 000 r/min 离心 20 min,将上清转移到新的离心管中,利用酶标仪在 530、620、650 nm 处测定吸光度值,利用公式 $w_{\text{OD}} = (A_{530} - A_{620}) - 0.1(A_{650} - A_{620})$ 计算花青素的质量比。

1.2.3 大肠杆菌菌悬液配置

将保存的大肠杆菌在 Luria-Bertani (LB) 固体培养基上划线进行活化,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中倒置培养,待长出单菌落后用枪头挑取单菌落到无菌管中,用无菌水重悬即可。

1.2.4 黑曲霉菌悬液配置

将黑曲霉野生型及各缺失体菌种接种于含尿苷的马铃薯葡萄糖琼脂固体培养基(PDA-Uri)上,放于 28 $^{\circ}\text{C}$ 倒置培养,将野生型和各缺失体孢子置于尿苷溶液中,用无菌擦镜纸处理孢子溶液,最后在显微镜下用血细胞计数法计算孢子悬浮液密度为 10^6 个/mL。

1.2.5 梨抗侵染能力检测

用大小、颜色、生长状态一致的砀山酥梨和红茄梨进行黑曲霉的侵染实验。将挑选好的梨用自来水洗净,再用 75%的乙醇对梨子表皮消毒,利用枪头在梨上打 4 个孔后注射黑曲霉菌悬液,将梨子果实放进无菌框中用保鲜膜密封后置于 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱暗处理,每 24 h 观察菌落直径大小,将病变部位取样保存。每个实验组重复 3 次。

1.2.6 RNA 提取及反转录

取 0.05 g 病变部位的梨果皮,按照 RNA 提取试剂盒提取果皮 RNA,取适量 RNA 按照反转录试剂盒的反转体系合成 cDNA。

1.2.7 实时荧光定量聚合酶链式反应

将已报道的若干与花青素相关的基因进行特异性引物设计,使用实时荧光定量聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)试剂盒进行检测,检测反应体系(10 μL)为: $2 \times \text{SYBR}^{\circledR}$ Green Pro Taq HS Premix 5 μL , cDNA 0.8 μL , F 引物 0.2 μL , R 引物 2 μL , RNase free water 3.8 μL 。反应程序采用两步法,具体如下:95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s;95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,40 个循环。Actin-F/R 作为内参引物按照 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 方法,计算待测基因的相对表达量。

2 结果与分析

2.1 不同品种梨抗黑曲霉侵染能力分析

本文选取砀山酥梨和红茄梨作为研究对象,分析不同品种梨抵抗黑曲霉侵染的能力,结果如图 1 所示。

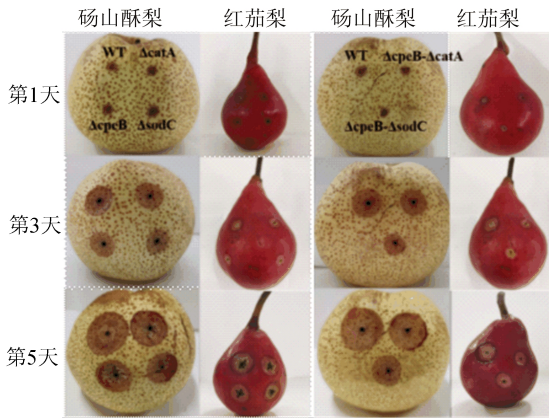


图 1 黑曲霉对砧山酥梨和红茄梨果实的侵染能力分析

从图 1 可以看出,随着侵染时间的累积,所有黑曲霉注射部位的梨子菌斑直径均不断增大,但黑曲霉 $\Delta catA$ 、 $\Delta cpeB$ 、 $\Delta sodC$ 、 $\Delta cpeB\Delta catA$ 、 $\Delta cpeB\Delta sodC$ 的菌落直径相比于野生型黑曲霉的菌落直径较小,结果表明,与抗氧化代谢相关的 $catA$ 、 $cpeB$ 、 $sodC$ 基因参与了黑曲霉对果实的侵染力^[10]。

此外,砧山酥梨的病变直径大于红茄梨的病变直径,且该差异性在第 3 天和第 5 天时的黑曲霉 $\Delta cpeB$ 、 $\Delta sodC$ 、 $\Delta cpeB\Delta sodC$ 侵染部位表现尤为明显,结果表明, $\Delta cpeB$ 、 $\Delta sodC$ 、 $\Delta cpeB\Delta sodC$ 菌株对花青素更加敏感,红茄梨对黑曲霉的侵染具有更强的抵抗力。

2.2 不同品种梨花青素质量比的测定

为探究不同品种梨对黑曲霉敏感性机制,提取砧山酥梨和红茄梨果皮的花青素,其质量比如图 2 所示。图 2 中, ** 表示 $P < 0.01$ 差异显著,下同。红茄梨果皮颜色深于砧山酥梨,表明红茄梨果皮中含有丰富的花青素。因此使用水浸法提取红茄梨中的花青素,真空冷冻干燥后用作后续实验。

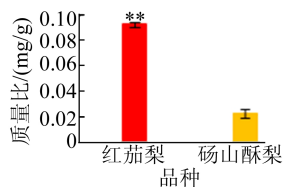


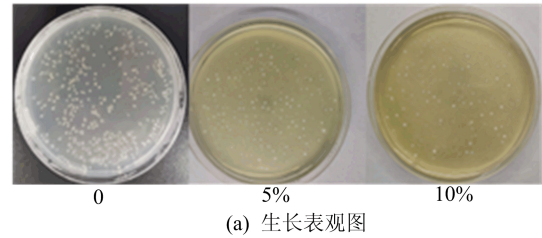
图 2 花青素质量比测定结果

2.3 梨果皮中花青素的体外平板抗菌实验

为探究花青素在抵抗大肠杆菌中的作用,设置 0%、5%、10% 花青素体积分数梯度来研究其对抑菌作用的影响,如图 3 所示。

由图 3a 可知:在不含花青素的固体培养基上大肠杆菌的菌落数目较多,且菌落直径较大;在花

青素体积分数为 5% 的固体培养基上大肠杆菌的菌落数目明显减少,且菌落直径较小;在花青素体积分数为 10% 固体培养基上的大肠杆菌的菌落数目显著减少。



(a) 生长表观图

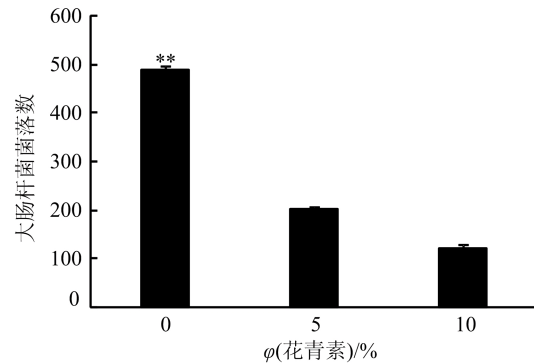


图 3 不同体积分数的花青素对大肠杆菌的抑制作用

由图 3b 可知,与不加花青素的固体培养基相比,花青素体积分数为 5% 时的抑菌率在 60%,而体积分数为 10% 时的抑菌率达到 75%,表明花青素能够抑制大肠杆菌的生长。

为探究花青素在抵抗黑曲霉中的作用,本实验通过黑曲霉及其各缺失体在花青素体积分数为 0%、5%、10% 的固体培养基上生长直径大小研究花青素的抑菌作用,其生长状态表型如图 4 所示。

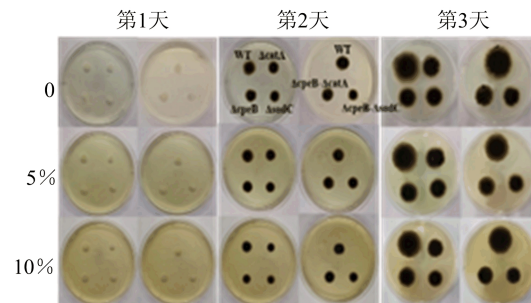


图 4 不同体积分数花青素下黑曲霉的生长状态表型

从图 4 可以看出:第 1 天,黑曲霉野生型菌落 WT 和黑曲霉 $\Delta catA$ 、 $\Delta cpeB$ 、 $\Delta sodC$ 、 $\Delta cpeB\Delta sodC$ 、 $\Delta cpeB\Delta catA$ 菌落大小以及形态没有差异,生长状态保持一致;第 2 天,在相同体积分数

花青素的固体培养基上,各缺失体菌落直径小于野生型菌落直径,在含有不同体积分数花青素的培养基上,花青素体积分数越高,菌落直径越小;在第 3 天出现了更明显的与上述结果相同的菌落生长状态。通过测量上述菌落直径发现,不同缺失体对花青素的敏感程度是不同的。

黑曲霉 WT、 $\Delta catA$ 、 $\Delta cpeB\Delta cat$ 、 $\Delta cpeB$ 、 $\Delta sodC$ 、 $\Delta cpeB\Delta sodC$ 病变直径如图 5 所示。由

图 5 可知:WT 菌株、黑曲霉 $\Delta catA$ 和 $\Delta cpeB\Delta catA$ 菌株在不同体积分数花青素的培养基上直径都相差不大,没有显著性,表明对花青素敏感性较弱;但黑曲霉 $\Delta cpeB$ 、 $\Delta sodC$ 和 $\Delta cpeB\Delta sodC$ 尤其在第 3 天时菌落直径在不同体积分数花青素的固体培养基上有较大的差异,结果表明,黑曲霉 $\Delta cpeB$ 、 $\Delta sodC$ 和 $\Delta cpeB\Delta sodC$ 对花青素具有较强的敏感性。

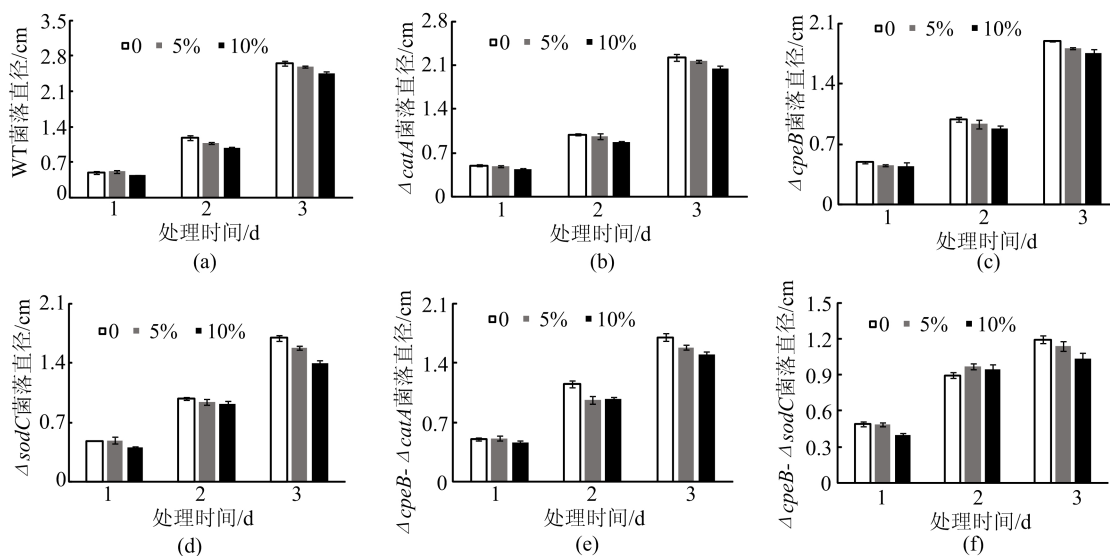


图 5 黑曲霉 WT、 $\Delta catA$ 、 $\Delta cpeB\Delta catA$ 、 $\Delta cpeB$ 、 $\Delta sodC$ 、 $\Delta cpeB\Delta sodC$ 病变直径

2.4 花青素合成相关基因的表达量分析

为研究与花青素合成相关基因的表达量在黑曲霉侵染后的变化,用黑曲霉 $\Delta cpeB$ 、 $\Delta sodC$ 和 $\Delta cpeB\Delta sodC$ 侵染的红柿梨果皮作为实验组,未注射部位的梨子果皮作为对照组进行实时荧光定

量 PCR 验证。转录因子 P_yMYB10 、 $P_yMYB114$ 、 P_ybHLH3 , 结构基因 P_yDFR 、 P_yANS 、 P_yUFGT 是花青素合成的关键基因,因此利用实时荧光定量 PCR 来验证这些基因的表达量,结果如图 6 所示。

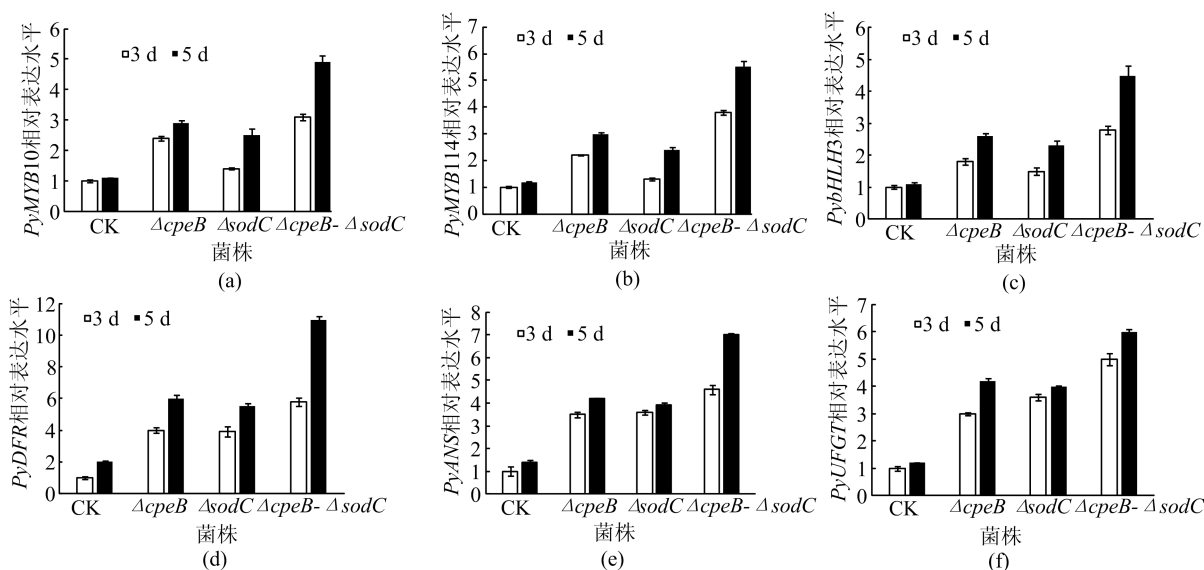


图 6 花青素合成相关基因在果实病变部位的表达水平

从图 6 可以看出:与对照组相比,黑曲霉 $\Delta cpeB$ 、 $\Delta sodC$ 和 $\Delta cpeB-\Delta sodC$ 侵染的红茄梨, P_yMYB10 、 $P_yMYB114$ 、 P_yDFR 、 P_yANS 和 P_yUFGT 的相对表达水平显著上升;还发现侵染 5 d 的红茄梨基因表达量明显高于 3 d 的红茄梨基因表达量,表明随着侵染时间的延长,病变范围变大,与花青素合成相关的基因表达量也随之增加。

从图 6 还可以看出,与 $\Delta cpeB$ 相比, $\Delta sodC$ 对花青素相关的基因激活效应较弱,但在对花青素的激活效应上 $\Delta cpeB-\Delta sodC$ 明显强于 $\Delta sodC$ 和 $\Delta cpeB$ 菌株。

3 结 论

本文从体内、体外 2 个方面探究花青素在抵抗病原微生物中发挥的作用,发现随着花青素体积分数的增加抑菌作用越来越强。在花青素体积分数为 0、5%、10% 的固体培养基上,大肠杆菌菌落数目随着花青素体积分数的增加显著减少,野生型黑曲霉、 $\Delta catA$ 、 $\Delta cpeB$ 、 $\Delta sodC$ 、 $\Delta cpeB-\Delta sodC$ 、 $\Delta cpeB-\Delta catA$ 随着花青素体积分数的增加菌落直径显著减小。

同时实时荧光定量 PCR 分析结果表明,花青素合成关键基因 P_yMYB10 、 $P_yMYB114$ 、 $P_y-bHLH3$ 、 P_yDFR 、 P_yANS 和 P_yUFGT 随着侵染时间累积表达量显著上调,表明花青素能够抑制病原微生物的生长。

通过测量黑曲霉及其缺失体直径大小,发现黑曲霉 $\Delta cpeB$ 、 $\Delta sodC$ 和 $\Delta cpeB-\Delta sodC$ 对花青素具有较强的敏感性,实时荧光定量 PCR 表明, $\Delta cpeB$ 对花青素相关基因激活效应强于 $\Delta sodC$ 、 $\Delta cpeB-\Delta sodC$ 强于 $\Delta cpeB$ 和 $\Delta sodC$ 。结果表明,梨果实可能通过上调花青素合成通路,进而抑制

采后病原真菌黑曲霉的侵染。

[参 考 文 献]

- [1] 赵海菲,王天娅,余坤江,等. MYB 转录因子调控植物花青素生物合成的研究进展[J]. 山地农业生物学报, 2022, 41(3):49-56.
- [2] 乔世豪,王强,胡露丹,等. 花青素在食品质量指示中的应用进展[J]. 包装工程, 2022, 43(17):49-58.
- [3] LIU J, WANG Y X, ZHANG M H, et al. Color fading in lotus (*Nelumbo nucifera*) petals is manipulated both by anthocyanin biosynthesis reduction and active degradation[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2022, 179:100-107.
- [4] 王志杰,张明月,刘国栋,等. 黑米中酚酸、花青素和 γ -氨基丁酸的组成、生物合成及其影响因素[J]. 中国粮油学报, 2023, 38(4):170-180.
- [5] 张辉,刘奕廷,张宏林,等. 16 种含花青素植物经济价值评估[J]. 吉林中医药, 2019, 39(7):944-948.
- [6] BEATRIZ R S, ELENA A, FRANCISCO J G M, et al. Bacterial bioeffectors delay postharvest fungal growth and modify total phenolics, flavonoids and anthocyanins in blackberries[J]. LWT-Food Science and Technology, 2015, 61(2):437-443.
- [7] 苏适,李月,董立强,等. 黑豆皮花青素的提取及体外抗菌活性研究[J]. 哈尔滨商业大学学报(自然科学版), 2020, 36(5):532-536.
- [8] 汪晶,汪辉. 葡萄籽原花青素对变形链球菌的体外抗菌活性研究[J]. 南京中医药大学学报, 2017, 33(2):173-176.
- [9] 张俊程,卫东,史学伟,等. 紫胡萝卜花青素提取工艺及其体外抗菌活性研究[J]. 中国调味品, 2016, 41(11):140-144, 151.
- [10] 李闯. WRKY26-*bHLH3* 共促进红皮梨花青苷合成及花青苷抑制黑曲霉侵染的分子机制研究[D]. 合肥:合肥工业大学, 2020.

(责任编辑 闫杏丽)