

# 花生种皮蜡质和角质层与黄曲霉侵染和产毒的关系

梁炫强 周桂元 潘瑞炽

(1. 广东省农业科学院作物研究所, 广东广州 510640; 2. 华南师范大学生物系, 广东广州 510631)

**摘要:** 黄曲霉侵染花生的研究表明, 种皮破损的黄曲霉毒素含量显著高于种皮完整的, 种皮对黄曲霉侵染和产毒起着重要的屏障作用。采用氯仿去除种皮蜡质, 用 KOH 或角质酶去除种皮角质层后, 种子黄曲霉感染率和黄曲霉毒素含量显著提高。种皮蜡质和角质层同时去除的与种皮破损的黄曲霉感染率和毒素含量差异不显著, 表明种皮的抗性成份主要是蜡质和角质层。种皮蜡质含量测定和种皮表面扫描电镜观察表明, 蜡质的含量和角质层的厚度与品种的抗性有关。抗性品种种皮蜡质含量显著高于感病品种。种皮蜡质提取物在体外抑菌效果不显著, 说明蜡质的抗性作用主要是物理性阻止黄曲霉菌的穿透。

**关键词:** 花生; 黄曲霉毒素; 种皮; 蜡质; 角质层

中图分类号: S435.652

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2003)01-0011-04

## Wax and Cuticle of Peanut Seed Coat in Relation to Infection and Aflatoxin Production by *Asperillus flavus*

LIANG Xuan-qiang ZHOU Gui-yuan PAN Rui-chi

(1. Crops Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China;

2. Biology Department, South China Normal University, Guangzhou 510631, China)

**Abstract:** The effects of wax and cuticle of peanut seed coat on reducing the infection and aflatoxin production by *Aspergillus flavus* were studied. Experiments showed that when the wax on seed coat was removed with chloroform or/and cuticle removed with KOH (or cutinase), fungal infection rate and aflatoxin content in the seeds were significantly increased. Aflatoxin content in seeds with wounded seed coat was higher than that in intact seeds after being inoculated with *A. flavus*. Scanning electron microscopic observation on seed coat revealed that most of resistant seeds were rough in appearance and had abundant wax deposits on seed surfaces. It is indicated that the wax and cuticle play an important role in preventing fungal penetration.

**Key words:** Peanut; Seed coat; Aflatoxin; Wax; Cuticle

花生在收获、贮藏和加工过程中极易受黄曲霉 (*Aspergillus flavus* Link) 侵染并产生黄曲霉毒素, 从而影响花生生产、加工和出口贸易, 危害人们的健康。培育抗黄曲霉花生品种是解决花生黄曲霉感染最有效和最经济的途径。自美国和国际半干旱作物研究所等筛选出抗黄曲霉侵染的花生种质资源以来, 有关抗性机制和培育抗侵染品种成为花生研究的热点<sup>[1,2]</sup>。

剥壳后的花生食品在加工、运输和贮藏过程

中, 易受外源病菌 (特别是大气中黄曲霉) 的侵袭, 因此种皮成为保护种子的第一道屏障。

已有一些研究认为玉米种子的种皮结构与抗黄曲霉侵染有关<sup>[3-6]</sup>。花生种皮由表面蜡质、角质层、一层厚壁色素细胞、4-5 层薄壁组织和萎缩的外胚乳组成, 因此人们推测花生种皮在抗黄曲霉侵染和产毒中也应起作用<sup>[1,7]</sup>。但迄今尚未有实验证实。

本研究主要是通过①比较花生种子在人工针刺破损前后, 蜡质和角质层去除前后黄曲霉感染率和黄曲霉毒素的变化情况, 探讨种皮的抗性机制; ②通过种皮蜡质含量的测定、种皮蜡质超显微结构观察、去除蜡质和角质层试验和蜡质体外抑菌试

收稿日期: 2002-03-25; 接受日期: 2002-06-24

基金项目: 国家“863”计划 (2001AA241153), 广东省自然科学基金项目 (010113) 资助

验,探讨抗黄曲霉侵染花生品种固有的抗性机制和标记,为选育抗性品种提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 供试材料

共 9 个,其中 5 个抗黄曲霉侵染的花生品种为 J-11, VRR245, PI337494, UF71513 和 湛秋 48, 4 个高感染花生品种粤油 5, 粤油 114, 湛油 30 和汕油 523。按常规种植,收获种子及时清洗,在 35–40℃ 下风干,置 4℃ 下保存,不用任何杀虫剂、杀菌剂和染色剂处理。

黄曲霉菌株 As.2890 引自中国科学院微生物研究所,该菌株在察氏培养基中 28℃ 下黑暗培养。接种时用无菌水收集培养 7–8 d 的孢子,10 000 × g 离心 5 min,无菌水重悬,并调整孢子液浓度为  $1 \times 10^8$  孢子  $\text{ml}^{-1}$ 。

### 1.2 实验方法

**接种** 荚果手工去壳,每个品种选取饱满、大小均匀无损种子 50 粒,用 5% 次氯酸钠消毒 5 min,无菌水冲洗 3 次,并使种子含水量达 20%,置灭菌培养皿中。每培养皿中加入 1 ml 黄曲霉孢子悬浮液 ( $1 \times 10^8$  孢子  $\text{ml}^{-1}$ ),搅拌,使每粒种子均匀粘上黄曲霉孢子,另设无菌水处理为对照组,28℃ 下作恒温、恒湿(RH100%)暗培养,3 次重复。第 7 天统计感染种子数和感染率。种子含水量采用 AD-4715 红外快速水分测定仪测定。

**种子黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 含量的测定** 采用酶联(ELISA)方法检测,黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 测试盒购自江苏省微生物研究所。将接种后培养第 7 天的 9 个品种的种子用 70% 乙醇表面消毒,于 115℃ 下烘干,粉碎过 20 目筛。每个品种分别准确称取 2 g 样品置于磨口试管中,并按测试盒使用说明检测每份样品黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 含量。三次重复。

**种皮蜡质含量的测定** 参照 Russin<sup>[6]</sup>方法,选取饱满,大小均匀和无损种子,小心剥取种皮。每个品种准确称取种皮 50 g,浸在氯仿中 60 s,取出种皮,氯仿蒸发后测定种皮蜡质的残留量,并据此推算每个品种种皮的蜡质含量 ( $\mu\text{g mg}^{-1}$  种皮)。

**种皮蜡质体外抑菌鉴定** 按 Russin<sup>[6]</sup>方法,每个品种取 100 g 种子浸在氯仿中 60 s,取出种子,氯仿蒸发至干后,残留的蜡质用 3 ml 的氯仿再溶,加入已配制好的 45℃ 察氏培养基中,并调整每品种蜡质的含量为  $1 \text{ mg ml}^{-1}$ ,倒入培养皿中,在无菌箱中放置 2 h,让氯仿挥发。在培养皿中心加入  $10 \mu\text{l}$  黄曲霉孢子液 ( $10^6$  个孢子  $\text{ml}^{-1}$ ),置于 28℃ 下黑暗培养,2 d 后测量黄曲霉菌落的直径。以不加氯仿的察氏培养基为对照,3 次重复。

**种皮角质层和蜡质抗黄曲霉的测定** 参照 Guo<sup>[9]</sup>方法,种子在 0.1 mol/L KOH 液中浸 30 min 去除角质层后,蒸馏水冲洗 3 次,35–40℃ 风干。参照 Russin<sup>[6]</sup>方法,种子在氯仿中浸 60 s 去除蜡质,氯仿自然挥发后,1/3 种子直接接种;1/3 种子在 0.1 mol/L KOH 中浸 30 min 去除角质层,蒸馏水冲洗 3 次,35–40℃ 风干;1/3 种子在室温下用角质层酶 ( $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) 处理 2 h,蒸馏水冲洗 3 次,35–40℃ 风干。

去除种子的角质层和蜡质后,按 1.2 方法测定种子感染率。

**种皮蜡质结构和分布的观察** 种子在 35℃ 下风干 3 d,每个品种选发育程度一致的种仁 10 个,在相同的部位取  $1 \text{ mm}^2$  种皮,置于铝柱上,喷上金钼 ( $20 \text{ nm}$  厚),进行扫描电镜观察。

## 2 结果和分析

### 2.1 黄曲霉的感染率和黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 含量

9 个参试花生品种接种 7 d 后,黄曲霉平均感染率和产生的黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 含量见表 1。按国际花生黄曲霉感染测试标准,广东地方农家种“湛秋 48”和印度花生品种“J-11”的平均感染率低于 20%,属高抗侵染品种;美国品种“UF71513”,“VRR245”和“PI337494F”感染率低于 30%,属中抗侵染品种,其它 4 个品种感染率超过 70%,属高感品种。

所有品种接种后均检测到黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>,但抗侵染品种的 B<sub>1</sub> 含量明显比感病品种低,通常低 4–10 倍。抗性品种“UF71513”最低 (45.8 ppb),而感病品种“粤油 5 号”最高,达 398.1 ppb (表 1)。

表 1 接种黄曲霉后不同花生品种种子的平均感染率和黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 的含量  
Table 1 Infection rate and aflatoxin B<sub>1</sub> content in peanut seeds of various cultivars inoculated with *Aspergillus flavus* after 7 days

	Zhanqiu 48	J-11	UF71513	VRR245	PI337494F	Zhanyou 30	Shanyou 523	Yueyou 114	Yueyou 5
感染率 Infection rate (%)	13.89	17.08	20.19	28.55	29.11	57.66	79.95	96.79	99.18
黄曲霉毒素 Aflatoxin B <sub>1</sub> (ppb)	72.9	56.8	45.8	47.9	36.8	264.4	289.5	284.1	398.1

经方差分析, 抗 - 感品种之间黄曲霉平均感染率和黄曲霉毒素含量达极显著水平, 表明抗 - 感品种对黄曲霉侵染和产毒的抗性存在显著的遗传差异。

### 2.2 种皮蜡质含量与蜡质提取物

采用氯仿处理花生干种子 60 s 后, 经电镜扫描观察 (图版 I: K), 可发现种皮表面原有的蜡质层已不存在, 表明用氯仿处理可完全去除种皮上的蜡质。

抗 - 感品种种皮蜡质含量测定, 经方差分析, 抗 - 感品种种皮蜡质的含量存在显著的差异 (表 2)。所有抗性品种种皮蜡质的含量均比感病品种高, 而且达显著水平。其中以 “J-11” 种皮蜡质含量最高, 达 26.53  $\mu\text{g mg}^{-1}$ 。

表 2 花生种皮蜡质对体外抑菌的影响  
Table 2 The effect of wax in peanut seed coat on the resistance to *A. flavus* tested *in vitro*

品种 Cultivars	蜡质含量 Wax content ( $\mu\text{g mg}^{-1}$ )	菌落生长直径 (cm) <i>A. flavus</i> colony diameter
J-11	26.53a*	1.30
UF71513	18.198ab	1.18
Zhanqiu 48	16.978ab	0.97
VRR245	16.715ab	1.10
PI 337494F	15.558ab	1.16
Yueyou 114	14.152ab	1.24
Yueyou 5	11.000b	1.30
Shanyou 523	9.325b	1.19
Zhanyou 30	7.539b	1.21
对照 Control		1.38

\* 新复极差测验 Duncan's test,  $\alpha=0.05$  显著水平, 具有相同字母表示差异不显著。Means in the column followed by the same letter are not significantly different according to Duncan's test ( $\alpha=0.05$ )

在含有蜡质的培养基中, 黄曲霉菌落生长直径越小, 抑制效果越明显。从表 2 可见, 黄曲霉在含有 9 个品种种皮蜡质提取物的培养基中产生的菌落直径大小有一定差异, 但经方差分析, 品种之间, 品种与对照之间的差异不显著。表明花生种皮蜡质提取物对抑制黄曲霉的生长并不明显, 且抗 - 感品种的差异不显著。

### 2.3 去除蜡质或角质层对花生种仁黄曲霉感染和产毒的影响

采用  $\Phi 1\text{ mm}$  针头将种皮刺破后, 所有品种黄曲霉感染率和黄曲霉毒素  $B_1$  含量均显著增加, 表明种皮是抗黄曲霉侵染和产毒的重要屏障。

用氯仿去除种皮的蜡质后, 所有参试品种的种子萌发率没有发生变化, 但黄曲霉感染率和黄曲霉毒素  $B_1$  含量均显著增加, 这表明去蜡能显著地提高种子对黄曲霉感染率和产毒的敏感性 (表 3)。抗性品种感染率平均增加 1 倍, 黄曲霉毒素  $B_1$  含量平均增加 6.2 倍; 而感病品种感染程度略增加, 黄曲霉毒素  $B_1$  含量平均仅增加 1.3 倍。这表明抗性品种种皮蜡质在抗黄曲霉侵染和产毒中发挥的作用较感病品种要大。

用 KOH 处理去角质层后, 9 个品种黄曲霉毒素  $B_1$  的累积量较未处理组平均高 5.8 倍, 比去蜡处理组平均高 2.6 倍 (表 3), 表明角质层在种皮抗性中发挥的作用比蜡质大。种皮去角质层后, 抗性和感病品种的黄曲霉毒素  $B_1$  累积量分别比未处理组增加 7.1 和 5.5 倍, 表明抗性品种角质层的抗黄曲霉

表 3 氯仿、KOH、角质酶处理后花生种子黄曲霉感染率 (IR) 和黄曲霉毒素  $B_1$  含量 (A) 的变化  
Table 3 Changes in infection rate (IR) and aflatoxin  $B_1$  content (A) after treatment with chloroform, KOH and cutinase for peanut seeds

品种 Cultivars	完整种子 Intact seeds	氯仿 Chloroform	氢氧化钾 KOH	氯仿 + 氢氧化钾 Chloroform + KOH	氯仿 + 角质酶 Chloroform + cutinase	损伤种子 Wounded seeds
PI337494F	IR (%)	29.1	48.6	43.8	62.7	78.0
	A (ppb)	36.8	329.5	408.9	784.1	847.4
UF71513	IR (%)	20.1	43.2	48.7	54.9	67.6
	A (ppb)	45.8	268.2	279.2	627.0	684.1
VRR245	IR (%)	28.5	59.0	47.1	58.1	70.0
	A (ppb)	47.9	162.7	258.4	831.1	901.8
J-11	IR (%)	17.0	32.7	38.1	49.5	67.0
	A (ppb)	56.8	378.2	387.4	904.1	967.4
Zhanqiu 48	IR (%)	13.9	34.8	41.2	59.7	64.5
	A (ppb)	72.9	498.0	538.5	951.4	1045.8
Shanyou523	IR (%)	79.9	91.2	92.5	100	100
	A (ppb)	289.5	419.4	1587.0	2884.5	2912.5
Yueyou 5	IR (%)	99.1	100	100	100	100
	A (ppb)	398.1	471.2	1438.5	2700.7	2691.0
Yueyou 114	IR (%)	96.7	100	100	100	100
	A (ppb)	284.1	402.4	1914.6	2818.4	2904.5
Zhanyou 30	IR (%)	57.6	100	100	100	100
	A (ppb)	264.4	347.0	1862.7	2887.6	2726.1

能力比感病品种强。

如同时去除蜡质和角质层,即用氯仿处理去蜡质后,再用 KOH 或角质酶处理去角质层,黄曲霉感染率和黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 含量均显著增加(表 3)。用氯仿 +KOH 处理和用氯仿 + 角质酶处理所获的效果差异不显著。感病品种处理后黄曲霉感染率和黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 含量与种子破损处理的差异不显著;而抗性品种的差异达显著水平,表明抗性品种除种皮外还存在其它的抗性机制。

#### 2.4 各品种的种皮蜡质超显微结构的差异

在电镜下,种皮表面的蜡质呈白色。从图版 I 可见,花生种皮蜡质呈不均匀和不规则分布,大部分品种种皮的蜡质分布于种皮气孔周围,品种间种皮的蜡质结构和分布存在较大差异。

从图版 I: A-D 可见,感病品种种皮的蜡质很少,且稀薄。而抗性品种的蜡质较多,且较厚,大部分蜡质分布于种皮气孔周围,并将气孔封闭(图版 I: E-L),阻止病原菌丝的侵入。

### 3 结语

本研究表明花生种皮在抗黄曲霉侵染和产毒中发挥机械性阻碍作用,而起作用的主要成份是种皮的蜡质和角质层。品种抗黄曲霉侵染能力与种皮表面所覆盖的蜡质的多少、角质层厚度有关。种皮表面蜡质和角质层厚度可作为花生抗黄曲霉育种的辅助标记之一。

#### 参考文献

- [1] Liang X Q (梁炫强), Pan R C (潘瑞炽), Bin J H (宾金华). Factors affecting preharvest aflatoxin production in peanut [J].

Chin J Oil Crops Sci (中国油料作物学报), 2000, 22 (4):72-78. (in Chinese)

- [2] Liang X Q (梁炫强), Pan R C (潘瑞炽), Bin J H (宾金华). Advance in the mechanism of resistance to aflatoxin contamination in peanut (*Arachis hypogae* L.) [J]. Chin J Oil Crops Sci (中国油料作物学报), 2000, 22 (3):77-80. (in Chinese)
- [3] Bianchi G J, Avato P. Surface waxes from grain, leaves, and husks of maize (*Zea mays* L.) [J]. Cereal Chem, 1984, 68:1577-1584.
- [4] Guo B Z, Russin J S, Cleveland T E. The role of the pericarp of corn kernels to reduce infection and aflatoxin production by *Aspergillus flavus* [J]. Phytopathol, 1993, 83: 1417-1418.
- [5] Guo B Z, Russin J S, Thomas E. Wax and cutin layers in maize kernels associated with resistance to aflatoxin production by *Aspergillus flavus* [J]. J Food Prot, 1995, 58 (3):296-300.
- [6] Russin J S, Guo B Z, Tubajika K M. Comparison of kernel wax from corn genotypes resistant or susceptible to *Aspergillus flavus* [J]. Phytopathol, 1997, 87:529-533.
- [7] Liang X Q, Pan R C. Studies on the mechanism of resistance to aflatoxin contamination and development of host resistance in peanut [A]. In: Shandong Peanut Research Institute. New Millennium International Groundnut Workshop [C]. Qingdao: 2001. 66-70.

#### 图版说明

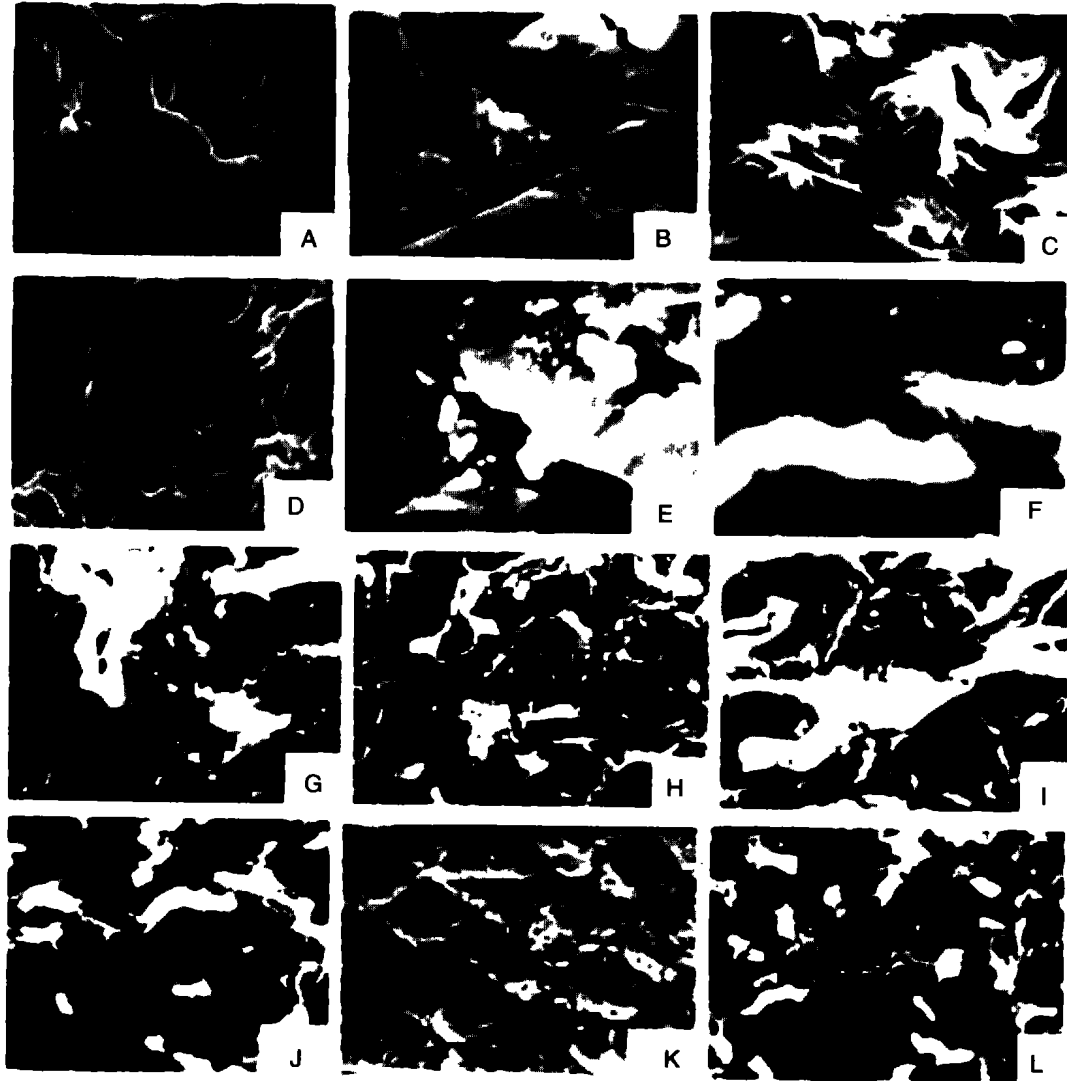
图版 I 花生种皮表面蜡质电镜扫描图

A. 粤油 5 号; B. 湛油 30; C. 粤油 114; D. 汕油 523; E. PI337494F; F. J-11; G. VRR245; H. UF71513; I. 湛秋 48; J. J-11; K. J-11 氯仿处理; L. VRR245. A-I, K, × 3 000; J, L, × 2 000.

#### Explanation of plate

Plate I SEM of wax on seed coat surfaces of peanut cultivars

A. Yueyou 5; B. Zhanyou 30; C. Yueyou 114; D. Shanyou 523; E. PI 337494F; F. J-11; G. VRR245; H. UF71513; I. Zhanqiu 48; J. J-11; K. J-11 treated with chloroform; L. VRR245. Ato I and K, × 3 000; J and L, × 2 000.



See explanation at the text