

1-MCP 诱导苹果采后灰霉病抗性的作用机理

周晓婉, 周会玲, 石亚莉, 唐永萍, 孟妮

(西北农林科技大学园艺学院, 陕西杨凌 712100)

摘要: 为了探讨 1-MCP 对苹果采后灰霉病的影响及其抗性诱导机理, 该文以“红富士”苹果为试材, 采后用 1 $\mu\text{L/L}$ 1-甲基环丙烯 (1-MCP) 熏蒸处理, 以不经 1-MCP 处理的作为对照, 常温 (20 \pm 1) $^{\circ}\text{C}$ 下放置 24 h 后, 分别接种灰葡萄孢菌。结果显示: 采后 1-MCP 处理较对照可显著降低苹果灰霉病的发病率, 抑制病斑的扩张 ($p < 0.05$)。经过 5 d 贮藏, 1-MCP 处理的苹果发病率为 58.24%, 显著低于对照 (90.73%); 贮藏结束时, 处理组发病率不足 70%, 病斑直径为 37.19 mm, 而对照组几乎全部发病且病斑扩展至 50.80 mm, 1-MCP 明显抑制了苹果灰霉病的发展。1-MCP 处理能够诱导果实中苯丙氨酸解氨酶 (PAL)、多酚氧化酶 (PPO)、过氧化物酶 (POD)、 β -1,3-葡聚糖酶 (GLU)、几丁质酶 (CHI) 活性的提高, 增加总酚、类黄酮和木质素的合成与积累, 进而增强果实的抗病性。研究结果为 1-MCP 应用于苹果采后病害的防治研究提供理论依据和技术参考。

关键字: 苹果; 1-MCP; 灰霉; 酚类物质代谢; 病程相关蛋白; 诱导机理

文章编号: 1673-9078(2016)10-211-219

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.10.032

Mechanism of 1-MCP-induced Resistance to Grey Mold in Postharvest

Apples

ZHOU Xiao-wan, ZHOU Hui-ling, SHI Ya-li, TANG Yong-ping, MENG Ni

(College of Horticulture, Northwest A & F University, Yangling 712100, China)

Abstract: The effect of 1-methylcyclopropene (1-MCP) treatment on postharvest gray mold in apples and its mechanism were investigated. “Red Fuji” apples were used as the test materials and treated with 1 $\mu\text{L/L}$ 1-MCP; apples without 1-MCP treatment were used as controls. After being allowed to stand at room temperature for 24 h, the samples were inoculated with a conidial suspension of *Botrytis cinerea*. The results showed that 1-MCP treatment effectively limited the lesion diameter of gray mold rot and significantly reduced the incidence of *Botrytis cinerea* compared to the control. After five days of storage, the disease incidence of 1-MCP-treated apples was only 58.24%, which was significantly lower than that of the controls (90.73%). At the end of storage, the disease incidence in the treatment group was less than 70% and the lesion diameter of gray mold rot was 37.19 mm, while *Botrytis cinerea* occurred in nearly all apples in the control group and the lesion diameter expanded to 50.80 mm. Therefore, 1-MCP effectively inhibited the development of apple gray mold. Moreover, the activities of phenylalanine ammonia-lyase (PAL), polyphenol oxidase (PPO), peroxidase (POD), β -1,3-glucanase, and chitinase of apple fruits were increased remarkably by 1-MCP, and the synthesis and accumulation of total phenolic compounds, flavonoids, and lignin were also increased, thus enhancing the disease resistance in fruits. These findings provide a theoretical basis and technical reference for studies of the application of 1-MCP in control of postharvest diseases of apples.

Key words: apple; gray mold; 1-methylcyclopropene; phenolic metabolism; pathogenesis-related proteins; induction mechanisms

红富士苹果味美多汁, 营养丰富, 深受消费者的青睐。但在采后运输、包装、贮藏过程中, 由于病原菌的潜伏侵染和二次侵染, 引起果实腐烂, 给生产者及消费者带来巨大损失^[1]。苹果灰霉病菌 (*Botrytis*

cinerea) 是通过分生孢子潜伏于果实表面, 待到成熟期或贮藏后期才会发病, 这种方式不易被人察觉, 因此很难得到有效防治。近年来, 利用 UV-C^[2]、热处理^[3-4]、臭氧^[5]、天然提取物^[6]、拮抗菌^[7]等技术, 在一定程度上减轻了苹果采后病害。但减轻苹果采后病害的新型保鲜技术仍然十分迫切。

1-MCP 作为乙烯受体抑制剂, 在苹果采后贮藏中已得到广泛应用。大量研究表明, 1-MCP 能明显抑制乙烯诱导的后熟与衰老进程, 保持果实硬度、Vc 和可滴定酸含量, 提高果实品质并延长货架期^[8-10]。近年

收稿日期: 2015-11-11

基金项目: 国家现代农业(苹果)产业技术体系建设专项(nycy1x-08-05-02)

作者简介: 周晓婉 (1990-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 园艺产品采后处理及贮藏保鲜

通讯作者: 周会玲 (1969-), 女, 博士, 副教授, 主要从事园艺产品采后处理及贮藏保鲜研究

来研究表明, 1-MCP 还可以作为一种激发因子, 减轻果蔬产品的采后病害。Su 等^[11]的研究表明, 1-MCP 处理能够减轻烟草病毒、灰葡萄孢菌以及镰刀菌导致的番茄果实的腐烂程度。徐晓燕等^[12]报道, 1-MCP 处理降低了冷藏期间砀山酥梨黑皮病的发生率, 李梅等^[13]试验结果显示, 1-MCP 处理提高了西洋梨果实的好果率, 降低了采后病菌性腐烂的发生。但对 1-MCP 的抗病机理研究较少, 尤其缺乏对苹果采后灰霉病抗性诱导的研究。

本试验以红富士为材料, 重点探索 1-MCP 处理对苹果采后灰霉病抗性与抗病相关酶苯丙氨酸解氨酶 (PAL)、多酚氧化酶 (PPO) 及过氧化物酶 (POD) 和主要产物总酚、类黄酮、木质素, 以及病程相关蛋白 (β -1,3-葡聚糖酶、几丁质酶) 的关系, 为阐明 1-MCP 诱导苹果采后抗病性提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

红富士苹果 (*Malus domestica* 'Red Fuji'), 于 2014 年 10 月 14 日采自陕西省白水一个管理规范的农家果园。选择大小基本一致, 果形端正, 色泽相近, 成熟度一致的无机械损伤和病虫害的果实, 采摘当天运回实验室。

灰葡萄孢 (*Botrytis cinerea* Pers) 购自西北农林科技大学植物保护学院, 将其在马铃薯葡萄糖琼脂培养基上进行继代培养。

PVC 保鲜袋, 85 cm×70 cm, 由国家农产品保鲜工程技术研究中心提供。

1.2 试验方法

1.2.1 1-MCP 熏蒸处理

将供试苹果放入体积为 175 L 的气调箱内, 先在气调箱盖子的凹槽处注入一定量的水, 确保盖上盖子时是密封的。准确称取一定质量的 1-MCP 粉末置于小烧杯中, 保证气调箱内 1-MCP 浓度为 1 μ L/L, 将小烧杯放入气调箱中, 加入一定体积的水, 立即用玻璃棒搅拌一下, 迅速盖上气调箱盖子, 在 20 $^{\circ}$ C 温室条件下熏蒸处理 24 h, 以放入气调箱中空气处理 24 h 的果实作为对照。开盖通风 0.5 h 后, 分别装入厚度为 50 μ m 的 PVC 保鲜袋中, 室温 (20 $^{\circ}$ C) 下放置 24 h 后进行接种试验。

1.2.2 病原菌及孢子悬浮液的制备

将灰葡萄孢接种于 PDA 培养基上, 25 $^{\circ}$ C 下恒温避光培养 7 d, 然后用体积分数为 0.05% Tween80 的无

菌水制成浓度约为 10^6 个/mL 的孢子悬浮液。采用血球计数板法计数悬浮液孢子。

1.2.3 处理方法

接种前先用 70% 乙醇擦拭苹果表面, 对果皮进行消毒, 然后用直径 3 mm 的灭菌钉沿苹果赤道部位均匀刺 2 个 3 mm 深的伤口, 待伤口处汁液晾干后, 分别接种 20 μ L、 1×10^6 个/mL 灰霉孢子悬浮液。稍作晾干后, 放入 PVC 保鲜袋, 于 20 $^{\circ}$ C, 相对湿度 80%~85% 的恒温培养箱 (LRH-250A) 中平铺贮藏。每天统计果实发病率, 并测量病斑直径, 用于分析 1-MCP 处理的防治效果, 同时, 切取病斑周围 1 cm 内的健康果肉组织, 液氮速冻, 锡箔纸包裹, -80 $^{\circ}$ C 超低温冰箱保存, 用于测定相关抗性生理指标。每处理重复 3 次, 每次重复用果 10 个。

1.3 测定指标及方法

1.3.1 发病率

发病率 = 发病伤口数 / 总伤口数 \times 100%

1.3.2 病斑直径

利用十字交叉法测定, 每个病斑测量 3 次, 计算平均值作为其测量值, 取各处理发病伤口病斑直径的平均值分别作为其病斑直径。

1.3.3 过氧化物酶 (peroxidase, POD) 和多酚氧化酶 (polyphenoloxidase, PPO) 活性测定

愈创木酚法测定 POD 的活性: 取 1 g 左右样品, 加入 5 mL、pH 7.0 的磷酸缓冲液, 冰浴下研磨呈匀浆, 在 4 $^{\circ}$ C、12000 r/min 条件下离心 30 min。愈创木酚与 H_2O_2 均用 pH 5.5 乙酸-乙酸钠缓冲液溶解, 反应体系为: 200 μ L H_2O_2 加 3 mL 的愈创木酚, 再加入 0.5 mL 粗酶液, 混匀后 15 s 在 470 nm 下测定 OD 值。POD 酶活力 [U/(min·g)] = $\Delta OD/t$, (ΔOD 代表光吸收度的变化, t/min 代表反应的时间), 重复 3 次。PPO 酶液的提取方法同 POD, 2 mL、pH 7.0 磷酸缓冲液加 1 mL 邻苯二酚, 再加 0.5 mL 粗酶液, 在 420 nm 下测定 OD 值。酶活性单位 (U) 以每克鲜样每分钟 OD 变化值表示 (U/(min/g)), 重复 3 次。

1.3.4 苯丙氨酸解氨酶 (phenylalanine ammoniolyase, PAL) 活性测定

PAL 活性测定参考姜微波等^[14]方法, 略有改动。称取 1.0 g 左右果肉, 加入 5 mL、0.1 mol/L、pH 8.8 的硼酸提取缓冲液 (含 40 g/L 聚乙烯吡咯烷酮、2 mmol/L 乙二胺四乙酸和 5 mmol/L β -巯基乙醇), 冰浴条件下研磨成匀浆, 于 4 $^{\circ}$ C、12000 r/min 离心 30 min, 取上清液测定。取 2 支试管, 均分别加入 3 mL、50 mmol/L、pH 值为 8.8 硼酸缓冲液和 0.5 mL、20 mmol/L

L-苯丙氨酸, 然后一支试管加入 0.5 mL 粗酶提取液, 另一支加入失活的酶液作为对照。将 2 支试管于 37 °C 温水中保温 60 min, 使生成反式肉桂酸, 结束时均立即加入 0.1 mL、6 mol/L 盐酸以终止反应。290 nm 波长下分别测定反应管和对照管的吸光度值, PAL 活性 (U) 用每分钟每克鲜样生成反式肉桂酸的量来表示 [U/(min·g)], 重复 3 次。

1.3.5 几丁质酶活性测定

取 1.0 g 左右果肉组织, 加入 5.0 mL 预冷的 0.1 mol/L、pH 5.2 乙酸-乙酸钠缓冲液 (1 mmol/L 乙二胺四乙酸和 5 mmol/L β -巯基乙醇) 冰浴条件下研磨, 呈匀浆后于 4 °C、12000 r/min 离心 30 min, 上清液即为粗酶提取液。参考姜微波等^[14]方法, 略有改动。取 2 支试管, 分别加入 0.5 mL、50 mmol/L、pH 5.2 乙酸-乙酸钠缓冲液, 0.5 mL、10 g/L 胶状几丁质悬浮液。然后一支试管加入 0.5 mL 粗酶提取液, 另一支加入失活的酶液作为对照, 混合。于 37 °C 保温 1 h 后加入 0.1 mL、30 g/L 的脱盐蜗牛酶, 混匀, 继续在 37 °C 培养 1 h, 以生成 N-乙酰葡萄糖胺 (Glc-NAc) 单体。保温后取出, 立即加入 0.2 mL、0.6 mol/L 的四硼酸钾溶液, 沸水浴 3 min 后迅速冷却。再加入 2 mL 质量分数 2% 二甲氨基苯甲醛溶液, 在 37 °C 温水中保温 20 min 显色, 最后在 585 nm 波长处测定反应液的吸光度。用煮沸的酶液作对照, 计算 Glc-NAc 的生成量, 以每秒钟每克样品中酶分解胶状几丁质产生的 1×10^{-9} mol Glc-NAc 为 1 个酶活力单位 (U/g), 重复 3 次。

1.3.6 β -1,3-葡聚糖酶 (β -1,3-glucanase, GLU) 活性测定

参考 Cao 等^[40]的测定方法, 以单位时间单位鲜样果肉生成 1 μ mol 葡萄糖的为一个酶活单位 (U/g), 重复 3 次。

1.3.7 总酚和类黄酮含量测定

称取果肉样品 1.0 g 左右, 加入预冷体积分数为 1% HCl-甲醇溶液 5 mL, 冰浴下研磨呈匀浆, 在 4 °C 条件下提取 1 h 后, 于 4 °C、12000 r/min 离心 30 min。取上清液分别在 280 nm 和 325 nm 波长下测定总酚、类黄酮的吸光度值。分别参考 Toor 等^[15]和 González-Aguila 等^[16]方法测定, 以没食子酸、芦丁制作标准曲线, 分别计算总酚和类黄酮的含量 (mg/g), 重复 3 次。

1.3.8 木质素含量的测定

参考周会玲等^[17]方法, 木质素含量以每克鲜重果肉在 280 nm 处的吸光度值表示 (OD_{280g}), 重复 3 次。

1.4 数据处理

采用 Excel 软件进行数据整理, 差异显著性分析采用 SPSS 17.0 软件。

2 结果与分析

2.1 1-MCP 对苹果采后灰霉病的防治效果

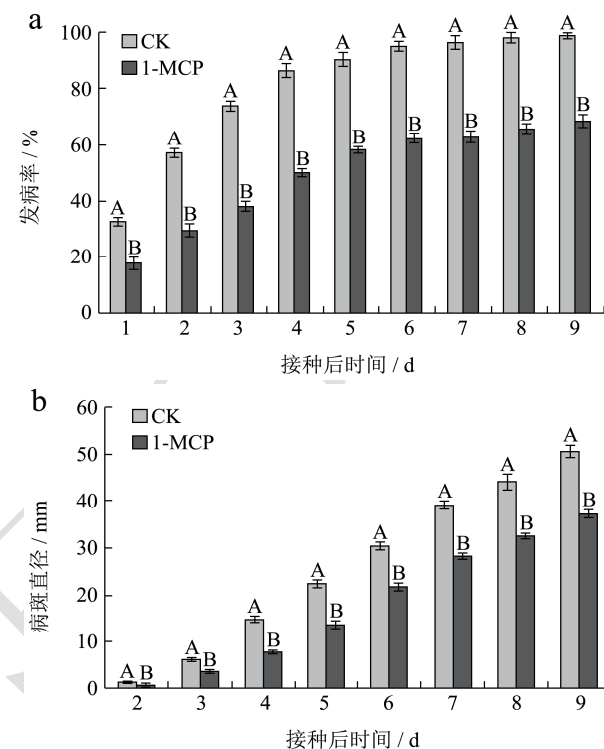


图1 采后1-MCP对红富士苹果采后灰霉病发病率(a)和病斑直径(b)的影响

Fig.1 Effect of postharvest 1-MCP treatment on the incidence rate (a) and lesion diameter of disease spot (*Botrytis cinerea*) of 'Red Fuji' apple fruit (b)

注: 同一组中, 不同字母表示差异显著 ($p < 0.05$)。

关于 1-MCP 延缓果蔬成熟衰老, 改善品质方面已得到广泛研究。1-MCP 对果蔬采后病害防治方面存在特异性, 使用浓度、果蔬种类和病原菌类别不同, 其作用效果各不相同。Jiang 等^[18]在对草莓的研究中发现, 低浓度 1-MCP 处理可降低腐烂率, 而高浓度 1-MCP 处理增加了草莓对病原菌的敏感性, 加快了果实病害的产生; 1-MCP 加速了由青霉引起的柑橘果实采后腐烂^[19]。

本试验发现, 1-MCP 处理对苹果采后灰霉病具有一定程度的抑制作用, 可以明显降低果实的发病率并限制病斑直径的扩展 ($p < 0.05$)。如图 1a 所示, 接种灰葡萄孢菌后, 果实迅速感病, 对照组果实在接种第 1 d, 发病率即达到 32.47%, 之后发病率迅速上升, 接种 5 d 后, 发病率高达 90% 以上, 随后发病率增加缓慢并趋于平缓。1-MCP 处理果实发病率始终

低于对照组,接种3 d后发病率仅为37.92%,显著低于对照组,此后发病率缓慢上升,贮藏结束时发病率不足70%,表现出了明显的抗病性。从图1b可以看出,随接种时间延长,病斑直径迅速扩展,呈直线上升趋势,1-MCP处理可有效抑制病斑直径的扩展,尤其在接种前4 d,1-MCP处理的果实病斑直径扩展缓慢,较对照降低47.46%。随后1-MCP处理果实的病斑直径加速扩展,但始终低于对照,接种9 d后,对照组病斑直径达到50.79 mm,约是1-MCP处理的1.37倍,与对照间差异显著 ($p < 0.05$)。这与1-MCP处理防治枣^[20]、桃^[21]、西洋梨^[22]等果实采后真菌性病害的研究结果相似。

2.2 1-MCP 对苹果采后 POD、PPO 和 PAL 活性的影响

次生代谢在植物抵御病害方面发挥着重要的作用。酚类物质代谢作为一种重要的次生代谢表现形式,与植物的抗病性存在着密切的关系。植物受到病原物侵染时,可以通过调节自身的酚类物质代谢来抵抗病害。POD 催化酚类物质氧化及木质素前体的形成,其活性与植物抗病性呈正相关。不同处理对 POD 的活性变化测定结果表明,接种灰葡萄孢菌后,POD 活性总体上均呈现先升高后降低的趋势,且 1-MCP 处理 POD 活性上升速度较对照组快,说明 1-MCP 处理诱导了苹果采后 POD 的活性。如图 2 所示,在整个观察期内,POD 活性均呈先增高后降低的变化趋势。1-MCP 处理的 POD 活性始终高于对照组,接种第 2 d,1-MCP 处理较对照 POD 活性提高了 71.91%,之后一直处于较高水平 ($p < 0.05$)。处理组和对照组出现峰值时间一致,均在第 5 d 达到最大值,然后开始缓慢下降,至第 9 d 两者差异不显著 ($p < 0.05$)。

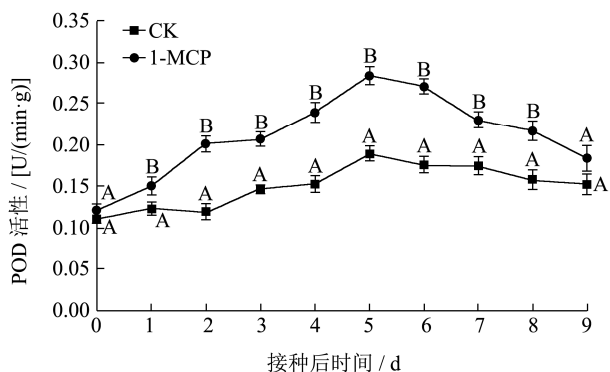


图 2 1-MCP 处理对红富士苹果 POD 活性的影响

Fig.2 Effect of 1-MCP treatment on the POD activity in 'Red Fuji' apple fruits

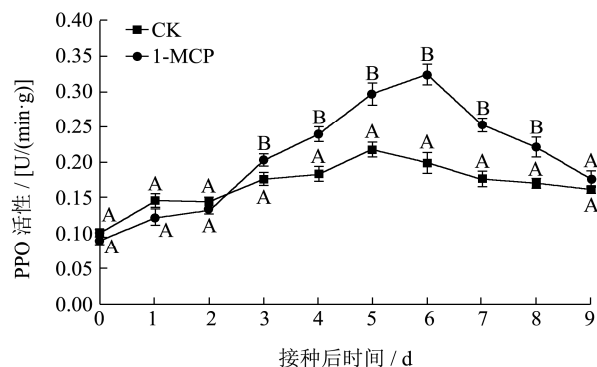


图 3 1-MCP 处理对红富士苹果 PPO 活性的影响

Fig.3 Effect of 1-MCP treatment on the PPO activity in 'Red Fuji' apple fruits

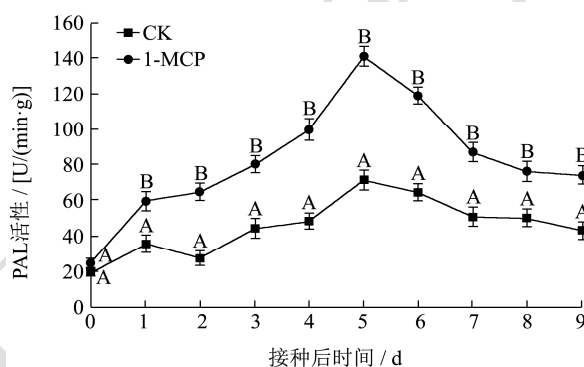


图 4 1-MCP 处理对红富士苹果 PAL 活性的影响

Fig.4 Effect of 1-MCP treatment on the PPO activity in 'Red Fuji' apple fruits

PPO 是植物组织防御反应相关酶,能够把酚类物质氧化成高毒性的醌类,对入侵的病原菌具有杀伤作用。不同处理 PPO 活性变化结果表明,1-MCP 处理一定程度上提高了 PPO 活性。从图 3 可以看出,随着病害的发展,处理组和对照组的 PPO 活性大体上为先上升后下降的变化趋势。接种前 2 d,对照组 PPO 活性大于处理组,但随后处理组 PPO 活性迅速上升,于第 6 d 达到最大值,较对照组提高了 63.30%。对照组 PPO 活性峰值出现在接种后第 5 d,峰值明显低于 1-MCP 处理组,接种第 9 d,1-MCP 处理组与对照的 PPO 活性差异不显著 ($p < 0.05$)。

酚类物质的生物合成始于苯丙烷代谢途径, PAL 是苯丙烷代谢途径的第一个关键酶,也是其他次生代谢产物合成的限速酶,可催化体内 L-苯丙氨酸还原脱氨生成反式肉桂酸,进一步生成类黄酮、木质素等多种与抗病相关的次生代谢产物。1-MCP 处理可以显著提高苹果中 PAL 的活性,如图 4 所示,在接种前期,1-MCP 处理组 PAL 活性呈快速上升趋势,对照组 PAL 活性呈现先升高再降低又升高的趋势,并且都在接种后第 5 d 达到最大值,处理组高出对照组 98.87%。接种后期 PAL 活性均开始下降,但处理组仍高于对照,

并与对照差异显著 ($p<0.05$)。由此表明, 1-MCP 处理诱导了苹果果实 PAL 活性, 使其在整个病害发展期间内维持较高水平。

大量研究结果显示, PAL、PPO 和 POD 活性与果实的抗病性有着紧密的相关性^[23-25], 可以作为判定果实抗病的重要指标。本试验结果表明, 当灰葡萄孢菌入侵后, 果实中 PAL、POD 和 PPO 活性均开始升高, 接菌后第 2 d PAL 和 POD 的活性分别较对照提升了 137.02%、71.91%, 说明 1-MCP 处理对病害前期 PAL 活性的诱导作用更强, PAL 活性的增强有利于酚类、类黄酮和木质素等抗菌物质的合成。PAL 和 PPO 活性均在第 5 d 达到最大值, 而此时 PPO 活性仍继续升高, 最大值比 PAL、POD 的推迟 1 d 出现, 比对照增加了 31.09%, 由此推测 1-MCP 诱导 PPO 活性的提高主要在病害发展中后期发挥作用。经 1-MCP 处理的苹果果实 PAL、POD 和 PPO 活性较对照大幅提升, 由此推测, 1-MCP 是通过调节防御酶的活性来增强苹果采后抗灰霉病的能力, 与 Liu 等^[21]利用 1-MCP 熏蒸处理诱导桃对青霉病的抗性机制相似。此外, 1-MCP 在枣^[20]、梨^[26]等果实上的应用中也有类似报道。

2.3 1-MCP 对苹果总酚、类黄酮和木质素含量的影响

酚类物质具有抗菌杀菌、清除自由基、钝化病原菌毒素等多种作用。植物遭到病原菌侵染后, 酚类物质的快速生成与不断积累是植物重要的抗病机理, 木质素、类黄酮等抗菌物质是通过酚类化合物转化而成的^[27-28]。Matern 和 Kneusal^[29]研究认为, 植物防御病原物侵染的第一步反应就是诱导产生酚类化合物。Dicko 等^[30]的研究结果指出, 植物体内原有的酚含量与其抗病性无关, 总酚含量并不能作为判定植物抗病性的生理指标, 但是与诱导生成的酚含量具有相关性。本研究中发现, 1-MCP 处理诱导了苹果酚类物质的合成, 使其含量在病害观察期间高于对照。如图 5a 所示, 接种前 5 d, 处理组总酚含量迅速上升, 与对照表现出显著差异 ($p<0.05$), 随后总酚含量保持在较高水平。对照组总酚含量在整个观察期内呈锯齿状增长趋势, 但增加趋势不明显, 接种 5 d 后, 对照组总酚含量明显下降, 较对照差异显著, 这与程琳琳等^[31]通过 1-MCP 结合 ClO₂ 处理蟠桃延缓总酚含量的降低从而减少果实腐烂的结果是一致的。

类黄酮具有清除自由基、抗氧化、杀菌抗病毒等多种生物活性, 参与植物抗性反应。采后 1-MCP 处理促进类黄酮的产生, 由图 5b 可见, 接种后 1 d, 处理

组和对照组的类黄酮含量就开始迅速升高, 但对照组的上升速率较处理组缓慢, 于接种后第 6 天达到最大值, 此后开始下降。接种前期, 对照组的类黄酮含量上升速率较处理组缓慢, 但在接种后期, 处理组的类黄酮含量下降速度大于对照组, 在整个过程中, 处理组的类黄酮含量一直显著高于对照组 ($p<0.05$)。许多抗病诱导剂的抗病反应与上述物质的升高相关, 如芦荟提取物诱导苹果对灰霉病的抗性反应伴随总酚、类黄酮含量的增加^[32], 苯并噻重氮(BTH/ASM)处理甜瓜诱导了总酚与类黄酮含量的升高, 增强了抗病性^[33]。

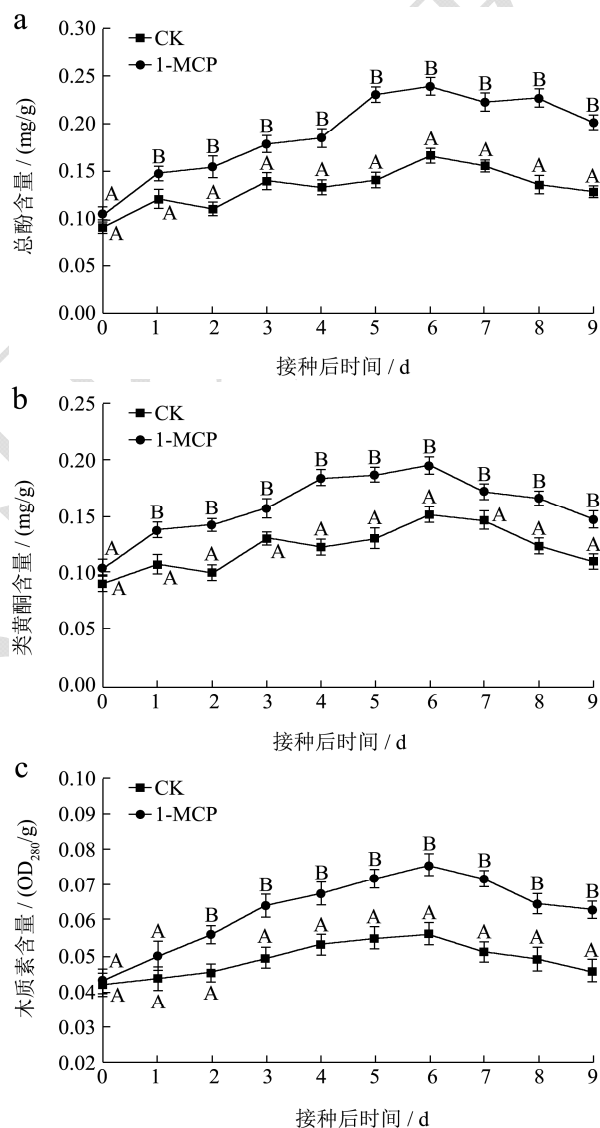


图5 采后 1-MCP 处理对苹果果实总酚 (a)、类黄酮 (b) 和木质素 (c) 含量的影响

Fig.5 Effect of postharvest 1-MCP treatment on the content of total phenols (a), flavonoid (b), and lignin (c) in apple fruits

木质素不仅能够增强细胞壁抗病原菌的能力, 而且它的某些前体及多聚作用产生的游离基具有钝化病原菌的作用。M C Valentines 等^[34]试验表明, 木质素含量的增加提高了金冠苹果对青霉病的抗性。Beatrice

Nafussi 等^[35]研究认为热处理诱导了芒果果实木质素的升高,从而减轻了果实的腐烂程度。如图 5c 所示,1-MCP 处理组与对照组的木质素含量均先升高再降低,与对照相比,处理组木质素含量上升速度要快,在接种后第 6 d,处理组的木质素含量较对照提高了 37.76%,表明 1-MCP 处理可以快速诱导木质素的生成与积累。从第 7 d 开始,两组木质素含量开始下降,但处理组木质素含量仍高于对照,且差异显著 ($p<0.05$)。由此可知,1-MCP 处理显著提高了木质素的含量,从而降低发病率,减小病斑直径扩展。

2.4 1-MCP 对接种苹果 β -1,3-葡聚糖酶和几丁质酶活性的影响

植物在胁迫环境下,体内会诱导合成一种或多种蛋白,称之为病程相关蛋白 (PR)。其中,研究最多的是 β -1,3-葡聚糖酶 (GLU) 和几丁质酶 (CHI),都能分解真菌的细胞壁,破坏病原菌的结构。当植物受到某种刺激时, β -1,3-葡聚糖酶和几丁质酶会被诱导合成,这是植物重要的抗性反应,在柑橘^[36]、桃^[37]、草莓^[38]等多种果实上均有相关报道。

不同处理对 β -1,3-葡聚糖酶和几丁质酶活性测定结果表明,两种酶活性变化整体上呈现先迅速增大再逐渐减弱的趋势。在整个病害观察期间,1-MCP 处理组的 β -1,3-葡聚糖酶和 CHI 活性均高于对照。如图 6a 所示,接种灰葡萄孢后,前 2 d,1-MCP 处理与对照组 GLU 活性上升较慢,二者之间差异不显著,接种 3 d 后,1-MCP 处理组 GLU 活性迅速上升,并于第 5 d 达到最大值,与对照呈显著差异 ($p<0.05$),随后 1-MCP 处理组 GLU 活性迅速降低,下降速率远远大于对照组,但其活性值仍然高于对照组。接种第 9 d,二者之间差异不显著。由图 6b 可见,在第 2 d,1-MCP 处理的 CHI 活性较对照提高了 53.54%,差异达到显著水平 ($p<0.05$)。对照组的 CHI 活性在接种后第 3 d 稍有下降,处理组则平稳上升,说明 1-MCP 处理诱导了果实 CHI 活性的提高。之后两天,CHI 的活性均急剧升高,且与对照出现高峰的时间是一致的,均在第 5 d 达到最大值。之后两组的 CHI 活性都开始降低,最后,处理组的 CHI 活性下降速率减慢,趋势相对趋于平缓,表明 1-MCP 处理不仅提高了几丁质酶的活性,还保持了病害观察期最终的 CHI 活性处于平稳水平。

对大豆的研究发现,GLU 和 CHI 也可能作为一种激发子,诱导其他防卫基因的表达^[39]。Cao 等^[40]试验表明采后 1-MCP 处理可显著提高枇杷 GLU 和 CHI 的活性,增强果实对炭疽病的抵抗能力。香蕉经

1-MCP 处理后,几丁质酶基因 (MaCH11) 上调表达且该酶的活性上升^[41]。本试验发现,1-MCP 处理诱导了 GLU 和 CHI 的活性,增强了苹果的抗病性。本一方面 GLU 和 CHI 破坏灰葡萄孢菌细胞结构,抑制其菌体的生长,另一方面 GLU 和 CHI 可能是诱导其他防御系统启动的一个信号,激发防卫基因的表达或是防御相关酶的合成。特别是 1-MCP 处理对 CHI 的诱导作用,在病害后期其活性仍维持较高水平,表明 1-MCP 处理诱导果实产生抗病相关蛋白的反应中,CHI 发挥了更为重要的作用。此外,几丁质酶的积累还可以降解其它病原菌的细胞壁,进一步生成几丁寡糖,促进苹果果实细胞壁木质素的沉淀和积累,提高果实抗病性。此结果与李辉等用 1-MCP 诱导“油棕”果实 β -1,3-葡聚糖酶和几丁质酶提高进而抑制果实腐烂的报道抑制。

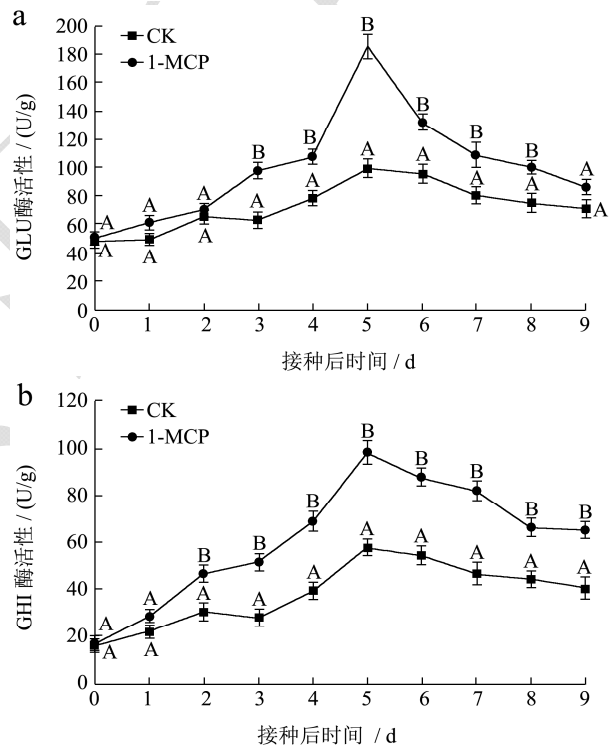


图 6 1-MCP 处理对红富士苹果 GLU (a) 和 CHI (b) 活性的影响
Fig.6 Effect of 1-MCP treatment on the GLU (a) and CHI (b) activities in 'Red Fuji' apple fruits

3 结论

3.1 1 μ L/L 1-MCP 处理可显著降低红富士苹果灰霉病发病率,抑制病斑直径扩展,接种前 4 d,病斑直径较对照降低 47.46%。

3.2 1-MCP 处理可通过增强防御酶 PAL、PPO、POD 活性,提高抗菌物质总酚、类黄酮和木质素含量,活化酚类物质代谢途径,从而增强果实对病原真菌的抵御能力。

3.3 1-MCP 处理提高了病程相关蛋白 CHI 和 GLU 的活性,特别是对 CHI 的诱导作用尤为显著,通过破坏病原菌的结构,激发其他的防卫反应,来提高苹果果实对灰霉病的抗性。

3.4 1-MCP 处理诱导果实抗病性增强是其防治红富士苹果采后灰霉病的作用机理之一,但究竟哪一方面起主导作用,还有待通过分子生物学手段作进一步地研究。

参考文献

- [1] Ramos B, Miller F A, Brandão T R S, et al. Fresh fruits and vegetables-an overview on applied methodologies to improve its quality and safety [J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2013, 20(1): 1-15
- [2] Wenneker M, Joosten N N, Luckerhoff L L P. Use of (pulsed) UV-C light to control spore germination and mycelial growth of storage diseases causing fungi, and effect on control of storage rot in apples and pears [C]// IOBC/wprs bulletin. 2013: 389-393
- [3] Maxin P, Weber R W S, Lindhard Pedersen H, et al. Hot-water dipping of apples to control *Penicillium expansum*, *Neonectria galligena* and *Botrytis cinerea*: effects of temperature on spore germination and fruit rots [J]. European Journal of Horticultural Science, 2012, 77(1): 1-9
- [4] 邵兴锋,屠康,静玮,等.热处理对红富士苹果贮藏期间青霉病的抑制效果[J].园艺学报,2007,34(3):743-746
SHAO Xing-feng, TU Kang, JING Wei, et al. Effect of pre-storage hot air treatment on the blue mold rot of 'Red fuji' apple fruit [J]. Acta Horticulturac Sinica, 2007, 34(3): 743-746
- [5] Miller F A, Silva C L M, Brandão T R S. A review on ozone-based treatments for fruit and vegetables preservation [J]. Food Engineering Reviews, 2013, 5(2): 77-106
- [6] 袁仲玉,周会玲,田蓉,等.芦荟粗提物对苹果采后灰霉病的防治效果与机理[J].农业工程学报,2014,30(4):255-263
YUAN Zhong-yu, ZHOU Hui-ling, TIAN Rong, et al. Effects and mechanism of aloe vera extracts on control of botrytis in postharvest apples [J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2014, 30(4): 255-263
- [7] Navarta L G, Calvo J, Posetto P, et al. Postharvest control of gray mold in apples with lyophilized formulations of *Cryptococcus laurentii*: The effect of cold stress in the survival and effectiveness of the yeast [J]. Food and Bioprocess Technology, 2014, 7(10): 2962-2968
- [8] 朱金薇,冯江涛,延卫,等.1-甲基环丙烯在苹果贮藏保鲜中的应用研究进展[J].北方园艺,2010,20:195-198
ZHU Jin-wei, FENG Jiang-tao, YAN Wei, et al. Progress on application of 1-MCP for the apple storage [J]. Northern Horticultural Ture, 2010 20: 195-198
- [9] Watkins C B. The use of 1-methylcyclopropene (1-MCP) on fruits and vegetables [J]. Biotechnology Advances, 2006, 24(4): 389-409
- [10] 王晓飞,杨艳青,任小林,等.1-MCP 对'粉红女士'苹果果实采后生理及其品质的影响[J].食品科学,2014, 35(18):219-223
WANG Xiao-fei, YANG Yan-qing, REN Xiao-lin, et al. Effects of 1-MCP on postharvest physiology and quality of 'Pink lady' apple fruits [J]. Food Science, 2014, 35(18):219-223
- [11] Su H, Gubler W D. Effect of 1-methylcyclopropene (1-MCP) on reducing postharvest decay in tomatoes (*Solanum lycopersicum* L.) [J]. Postharvest Biology and Technology, 2012, 64(1): 133-137
- [12] 徐晓燕,惠伟.1-MCP、DPA 对砀山酥梨冷藏期间抗氧化能力的影响及与黑皮病发病的关系[J].陕西师范大学学报(自然科学版),2015,43(2):103-108
XU Xiao-yan, HUI Wei. The Effects of 1-MCP and DPA treatments on antioxidant activity of 'Dangshansuli' pear and their relationship with superficial scald development during cold storage [J]. Journal of Shanxi Normal University (Natural Science Edition), 2015, 43(2): 103-108
- [13] 李梅,王贵禧,梁丽松,等.1-甲基环丙烯处理对西洋梨常温贮藏的保鲜效果[J].农业工程学报,2009,25(12):345-350
LI Mei, WANG Gui-xi, LIANG Li-song, et al. Fresh-keeping effects of *Pyrus communis* L. treated by 1-MCP at ambient temperature [J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2009, 25(12): 345-350
- [14] 姜微波,曹健康,赵玉梅.果蔬采后生理生化实验指导[M].北京:中国轻工业出版社,2007
JIANG Wei-bo, CAO Jian-kang, ZHAO Yu-mei. Fruits and vegetables postharvest physiological and biochemical experiment instruction [M]. Beijing: China Light Industry Press, 2007
- [15] Toor R K, Savage G P. Antioxidant activity in different fractions of tomatoes [J]. Food Research International, 2005, 38(5): 487-494
- [16] González-Aguilar G A, Villegas-Ochoa M A, Martínez-Téllez M A, et al. Improving antioxidant capacity of fresh-cut mangoes treated with UV-C [J]. Journal of Food Science, 2007, 72(3): S197-S202

- [17] 周会玲,袁仲玉,吴主莲,等.壳聚糖涂膜对机械伤苹果抗性生理特征的影响[J].西北植物学报,2013,33(7):1415-1420
ZHOU Hui-ling, YUAN Zhong-yu, WU Zhu-lian, et al. Effects of chitosan coating on resistance physiology of mechanical injury apple fruit [J]. Acta Botanica Boreali-occidentalia Sinica, 2013, 33 (7): 1415-1420
- [18] Jiang Y, Joyce D C, Terry L A. 1-Methylcyclopropene treatment affects strawberry fruit decay [J]. Postharvest Biology and Technology, 2001, 23(3): 227-232
- [19] Dou H, Jones S, Ritenour M. Influence of 1-MCP application and concentration on post-harvest peel disorders and incidence of decay in citrus fruit [J]. Journal of Horticultural Science & Biotechnology, 2005, 80(6): 786-792
- [20] Zhang Z, Tian S, Zhu Z, et al. Effects of 1-methylcyclopropene (1-MCP) on ripening and resistance of jujube (*Zizyphus jujuba* cv. Huping) fruit against postharvest disease [J]. LWT-Food Science and Technology, 2012, 45(1): 13-19
- [21] Liu H, Jiang W, Zhou L, et al. The effects of 1-methylcyclopropene on peach fruit (*Prunus persica* L. cv. Jiubao) ripening and disease resistance [J]. International Journal of Food Science & Technology, 2005, 40(1): 1-7
- [22] Spotts R A, Sholberg P L, Randall P, et al. Effects of 1-MCP and hexanal on decay of d'Anjou pear fruit in long-term cold storage [J]. Postharvest Biology and Technology, 2007, 44(2): 101-106
- [23] Liu H, Jiang W, Bi Y, et al. Postharvest BTH treatment induces resistance of peach (*Prunus persica* L. cv. Jiubao) fruit to infection by *Penicillium expansum* and enhances activity of fruit defense mechanisms [J]. Postharvest Biology and Technology, 2005, 35(3): 263-269
- [24] 尹明安,李玉娟,任小林,等.低剂量短波紫外线照射提高采后苹果抗病性[J].农业工程学报,2015,31(2):324-332
YIN Ming-an, LI Yu-juan, REN Xiao-lin, et al. Increasing disease resistance by low dose of UV-C radiation in harvested apple [J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2015, 31(2): 324-332
- [25] 王永琦,张显,咸丰,等.不同品种西瓜接种辣椒疫霉菌后 3 种保护酶活性的变化[J].西北农业学报,2011,20(11):123-128
WANG Yong-qi, ZHANG Xian, XIAN Feng, et al. The changes of the protective enzyme activities in different watermelon cultivars inoculated by *Phytophthora capsici* [J]. Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica, 2011, 20(11): 123-128
- [26] 赵晓梅,李疆,吴玉鹏,等.不同处理对库尔勒香梨萼端黑斑病抗性诱导的研究[J].新疆农业大学学报,2014,4:333-338
ZHAO Xiao-mei, LI Jiang, WU Yu-peng, et al. Research on different treatment in induced resistance to calyx end black spot of korla pear [J]. Journal of Xinjiang Agricultural University, 2014, 4: 333-338
- [27] Gogoi R, Singh D V, Srivastava K D. Phenols as a biochemical basis of resistance in wheat against Karnal bunt [J]. Plant Pathology, 2001, 50(4): 470-476
- [28] 刘瑶瑶,毕阳,李国林,等.热水和壳聚糖处理对厚皮甜瓜采后病害及苯丙烷代谢的影响[J].食品工业科技,2013,34(15): 315-319
LIU Yao-yao, BI Yang, LI Guo-lin, et al. Effect of hot water and chitosan dipping treatments on postharvest diseases control and phenylpropanoid metabolic in muskmelon fruits [J]. Science and Technology of Food Industry, 2013, 34(15): 315-319
- [29] Matern, Kneusel. Phenolic compounds in plant disease resistance [J]. Phytoparasitica, 1988, 16(2): 153-170
- [30] Dicko M H, Gruppen H, Barro C, et al. Impact of phenolic compounds and related enzymes in sorghum varieties for resistance and susceptibility to biotic and abiotic stresses [J]. Journal of Chemical Ecology, 2005, 31(11): 2671-2688
- [31] 程琳琳,肖丽梅,钟梅,等.1-MCP和ClO₂处理对新疆蟠桃采后品质的影响[J].食品科学,2011,32(12):314-319
CHENG Lin-lin, XIAO Li-mei, ZHONG Mei, et al. Combined effect of 1-mcp and ClO₂ on storage quality of Xinjiang flat peaches [J]. Food Science, 2011, 32(12): 314-319
- [32] 袁仲玉,周会玲,田蓉,等.芦荟粗提物对苹果采后灰霉病的防治效果与机理[J].农业工程学报,2014,4:255-263
YUAN Zhong-yu, ZHOU Hui-ling, TIAN Rong, et al. Effects and mechanism of aloe vera extracts on control of botrytis in postharvest apples [J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2014, 4: 255-263
- [33] Liu Y Y, Ge Y H, Bi Y, et al. Effect of postharvest acibenzolar-S-methyl dipping on phenylpropanoid pathway metabolism in muskmelon (*Cucumis melo* L.) fruits [J]. Scientia Horticulturae, 2014, 168: 113-119
- [34] Valentines M C, Vilaplana R, Torres R, et al. Specific roles of enzymatic browning and lignification in apple disease resistance [J]. Postharvest Biology and Technology, 2005, 36(3): 227-234
- [35] Nafussi B, Ben-Yehoshua S, Rodov V, et al. Mode of action of hot-water dip in reducing decay of lemon fruit [J]. Journal

- of Agricultural and Food Chemistry, 2001, 49(1): 107-113
- [36] Luo Y, Zeng K, Ming J. Control of blue and green mold decay of citrus fruit by *Pichia membranefaciens* and induction of defense responses [J]. Scientia Horticulturae, 2012, 135(24): 120-127
- [37] Liu J, Sui Y, Wisniewski M, et al. Effect of heat treatment on inhibition of *Monilinia fruticola* and induction of disease resistance in peach fruit [J]. Postharvest Biology and Technology, 2012, 65(1): 61-68
- [38] Shao X, Wang H, Xu F, et al. Effects and possible mechanisms of tea tree oil vapor treatment on the main disease in postharvest strawberry fruit [J]. Postharvest Biology and Technology, 2013, 77(1): 94-101
- [39] 左豫虎,康振生,杨传平,等. β -1,3-葡聚糖酶和几丁质酶活性与大豆对疫霉根腐病抗性的关系[J].植物病理学报,2009, 39(6):600-607
ZUO Yu-hu, KANG Zhen-sheng, YANG Chuan-ping, et al. Relationship between activities of β -1,3-glucanase and chitinase and resistance to phytophthora root rot in soybean [J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2009, 39(6): 600-607
- [40] Cao S, Zheng Y. Effect of 1-methylcyclopropene on anthracnose rot caused by *Colletotrichum acutatum* and disease resistance in loquat fruit [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2010, 90(13): 2289-2294
- [41] 刘菊华,徐碧玉,张建斌,等.香蕉一个III类酸性几丁质酶基因与果实成熟关系的研究[J].西北植物学报,2010,30 (10): 2022-2027
LIU Ju-hua, XU Bi-yu, ZHANG Jian-bin, et al. A Class III acidic chitinase gene was closely correlated with postharvest banana fruit ripening [J]. Acta Botanica Boreali-occidentalia Sinica, 2010, 30(10): 2022-2027
- [42] 李辉,林毅雄,林河通,等.1-甲基环丙烯控制采后‘油(木奈)’果实腐烂与抗病相关酶诱导的关系[J].热带作物学报,2015, 36(4):786-791
LI Hui, LIN Yi-xiong, LIN He-tong, et al. The relationship between inhibition of decay and induction of disease defense-related enzymes in harvested ‘younai’ plum fruit by 1-methylcyclopropene (1-MCP) [J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2015, 36(4): 786-791