

外源一氧化氮对苹果采后黑斑病的控制

王迪,李永才*,毕阳,余晓燕,唐瑛,潘静宇,王婷,张溪桐
(甘肃农业大学食品科学与工程学院,甘肃兰州 730070)

摘要:在离体条件下研究了NO供体硝普钠(sodium nitroprusside,SNP)对苹果黑斑病菌互隔交链孢(*Alternaria alternata*)生长、菌落形态及其超微结构的影响,并在体内条件下研究了其对苹果黑斑病的治愈作用。结果表明SNP处理能显著的抑制*A. alternata*的孢子萌发和菌丝生长,存在浓度依赖效应,当浓度为1 g/100 mL SNP,与对照相比,其对菌丝生长和孢子萌发的抑制率分别达到70%和75.9%;扫描电镜和透射电镜观察发现SNP处理的*A. alternata*菌丝表面粗糙,粗细不均匀,部分出现塌陷;孢子细胞受到不同程度的破坏,细胞膜发生破裂。同时发现外源SNP处理对损伤接种的苹果黑斑病具有治愈作用,其中0.5 g/100 mL SNP处理效果最佳。可见外源NO作为代替化学合成药物的防腐剂在采后病害控制中具有潜在的应用前景。

关键词:苹果,黑斑病,一氧化氮,采后病害,互隔交链孢

Control over exogenous NO on black spot of apple

WANG Di, LI Yong-cai*, BI Yang, YU Xiao-yan, TANG Ying, PAN Jing-yu, WANG Ting, ZHANG Xi-tong

(College of Food Science and Engineering, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China)

Abstract: Effect of nitric oxide (NO) donor sodium nitroprusside (SNP) on the growth, colonial morphology and microstructure of *Alternaria alternata* were studied *in vitro*, and its curative and preventative effect for apple black spot control were also evaluated. The results showed that SNP could significantly inhibit spore germination and mycelia growth of *A. alternata* and the effect was in dose dependent manner. The inhibitory ratios of spore germination and mycelia growth reached to 70%, and 75.9% respectively when treated with 1 g/100 mL SNP. Rough surfaces, uniform thickness, distorted cell and ruptured cell membrane were observed after treatment with SNP by scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM). Meanwhile, SNP treatment not only could cure the black rot on inoculated apple, but also induce the increase of fruit resistance to prevent disease development, the optimum inhibitory concentration was 0.5 g/100 mL SNP. Results suggested that NO, as a safe preservative alternative to synthesis fungicide, might have potential application for postharvest disease control.

Key words: apples; black spot; nitric oxide (NO); postharvest diseases; *Alternaria alternata*

中图分类号: TS255.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2015)18-0358-04

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2015.18.064

苹果属蔷薇科水果,富含丰富营养,深受消费者喜爱。苹果在常温条件下贮藏期较长,但在贮藏后期易受到真菌侵染而造成腐败变质,其主要病害为由扩展青霉(*Penicillium expansum*)和互隔交链孢(*Alternaria alternata*)引起青霉病和黑斑病,尤其*A. alternata*在采前和采后商品化处理中均可侵染果实,贮藏后期在果实表面产生褐色至黑褐色的病斑,并使果肉变腐软,对贮藏、运输和销售造成影响,引起巨大经济损失^[1]。目前多用人工合成杀菌剂对病害进行控制,尽管合成杀菌剂能有效的控制采后病害,但其会对人体健康与环境产生危害,并使病原菌产生耐药性。因此,研究安全、高效、无公害的防腐保鲜

技术已成为必然趋势^[2]。

NO作为一种重要的细胞内信号分子,在植物体内参与许多生理过程,如植物的生长发育、成熟衰老、胁迫响应等^[3-5]。一般低含量NO促进细胞生长繁殖,但是高水平的NO可能会抑制细胞生长、促进细胞衰老和死亡^[6]。近年来研究表明NO对病原菌有潜在的抑菌作用,Wills^[7]发现NO通过抑制霉菌生长而延长草莓的采后寿命。Lazar^[8]研究报道短期暴露在低含量的NO气体中能抑制黑曲霉(*Aspergillus niger*)、桃褐腐病菌(*Monilinia fructicola*)、扩展青霉(*Penicillium italicum*)的生长。同样,Thomas^[9]研究发现在NO供体化合物存在下马铃薯炭疽病菌(*Colletotrichum*

收稿日期:2015-01-30

作者简介:王迪(1989-),女,硕士研究生,研究方向:采后果蔬贮藏与保鲜,E-mail:wd237@sina.com。

*通讯作者:李永才(1972-),男,博士,副教授,研究方向:采后果蔬贮藏病害控制,E-mail:liyongcai@gsau.edu.cn。

基金项目:甘肃省高校研究生导师科研项目(1102-01);甘肃省农牧厅生物技术专项(GNSW-2011-11)。

coccodes) 分生孢子的萌发延缓, 添加NO抑制剂后孢子萌发恢复并加快。此外NO处理也能诱导果实的抗病性, Manjunatha^[10]报道NO供体硝普钠(SNP)可提高珍珠粟(*Pennisetum glaucum*)对由栗白发菌(*Sclerospora graminicola*)引起的霜霉病的抗性。Lai^[11]证实1 mmol/L SNP可增强番茄对由灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*)引起的霜霉病的抗性。然而, 关于NO对果蔬采后*A. alternata*的抑制及作用机制研究却鲜有报道。因此本文通过体内和离体实验, 系统的研究了NO供体硝普钠(sodium nitroprusside, SNP)对互隔交链孢的抑菌作用及苹果黑斑病的控制效果, 以期NO在苹果采后病害控制中的应用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

供试“长富二号”苹果 于2014年10月购于甘肃省景泰县条山农场, 用纸箱包装后运抵实验室, 于冷库中2~4 °C贮藏待用; 葡萄糖、琼脂粉 分析纯, 均购于天津市大茂化学试剂厂; NO供体硝普钠(SNP)分析纯, 天津市光复精细化工研究所。

LDZX-30KBS型立式压力蒸汽灭菌锅 上海申安医疗器械厂; SW-CJ-2FD型洁净工作台 苏净集团苏州安泰空气技术有限公司; DHP-9052型电热恒温培养箱 上海一恒科学仪器有限公司; CX21FS1C型生物显微镜 奥林巴斯(广州)工业有限公司; S3400N型扫描电子显微镜 日本日立高新技术有限公司; H-7650型透射电子显微镜 日本日立高新技术有限公司; 打孔器 8 mm; 接种针 2 mm。

1.2 实验方法

1.2.1 互隔交链孢的提取及纯化

1.2.1.1 互隔交链孢(*Alternaria alternata*)分离 参照李永才^[12]的方法, 由感病苹果果实病健交界处分离纯化得到, 接种在PDA培养基于4 °C下保藏。为确保其活性, 用前反接于果实, 再将其分离纯化备用。

1.2.1.2 互隔交链孢孢子悬浮液的制备 参照Bi等^[13]的方法。取在PDA培养基上培养7 d的互隔交链孢, 用无菌蒸馏水配制孢子悬浮液, 用血球计数板计数, 调整孢子悬浮液最终浓度为 1×10^6 个/mL。

1.2.2 NO供体SNP对互隔交链孢菌丝生长的影响

参照Yao等^[14]的方法。将PDA培养基灭菌后, 晾至60 °C左右, 加入浓度分别为0.25、0.5、1 g/100 mL的SNP, 不加SNP的培养基作为对照。将0.8 cm的互隔交链孢菌饼接种在凝固后的培养基中心, 于28 °C黑暗条件培养, 7 d后用十字交叉法测量菌落直径, 每个处理3次重复。

1.2.3 NO供体SNP对互隔交链孢孢子萌发的影响

打孔器采用酒精灯火焰灭菌后打取水琼脂饼, 置于无菌载玻片上, 向水琼脂饼上滴加10 μL浓度分别为0.25、0.5、1 g/100 mL的SNP溶液, 再在其上加10 μL振荡均匀的孢子悬浮液, 于25 °C在光学显微镜下连续数小时镜检孢子萌发率, 直至对照组完全萌发, 每个处理3次重复。

1.2.4 NO供体SNP对互隔交链孢菌落形态及菌丝超微结构的影响 参照高向阳等^[15]的方法。将含有1 g/

100 mL SNP培养基上生长7 d的菌丝块(0.5 cm×0.5 cm)及对照菌丝块用2%戊二醛(v/v)固定, 于4 °C放置2 h; 经乙醇系列梯度(50%、70%、95%、100%)处理10 min, 醋酸异戊酯置换乙醇20 min。脱水样品进行临界点干燥, 真空喷金。在扫描电镜下观察制好的样品并拍照。

将1 g/100 mL SNP培养基上生长7 d的菌丝块(0.5 cm×0.5 cm)及对照菌丝块用2%戊二醛(v/v)固定, 于4 °C放置2 h; 经乙醇系列梯度(10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%)处理10 min, 后进行Epon818树脂包埋, 超薄切片混和染色。在透射电镜下观察制好的样品并拍照。

1.2.5 NO供体SNP处理对损伤接种苹果黑斑病的抑制 参照毕阳^[16]的方法并修改。取在PDA培养基上培养7 d的互隔交链孢, 用无菌蒸馏水配制浓度为 1×10^6 个/mL孢子悬浮液。选取无病虫害, 大小一致的苹果果实, 自来水清洗后于2%次氯酸钠溶液浸泡2 min, 晾干后用75%乙醇擦拭苹果果实表面消毒。接种针经酒精灯火焰灭菌并晾凉, 在每个果实赤道部位刺2 mm大小均匀的孔3个, 并在孔内接种20 μL孢子悬浮液。将接种后的果实于0.25、0.5、1 g/100 mL SNP溶液和无菌水(对照组)中浸泡2 min, 晾干后单果PE袋包装并置于室内无菌处, 每7 d观察1次, 十字交叉法测量病斑直径并记录发病情况, 每个处理重复3次。

1.3 数据统计分析

数据为3个或3个以上样本平均值, 利用SPSS 19.0软件对数据进行统计分析, 用Duncan's检验进行差异显著性分析, $p < 0.05$ 时为差异显著。

2 结果与分析

2.1 NO供体SNP对互隔交链孢菌丝生长的影响

由图1可知, 不同浓度的SNP对互隔交链孢菌落均有显著地抑制作用($p < 0.05$), 且随着处理浓度的增加, 其抑菌作用越明显, 其中1 g/100 mL的SNP抑菌效果最好, 培养7 d后其病斑直径仅为31.6 cm, 为对照的70%。

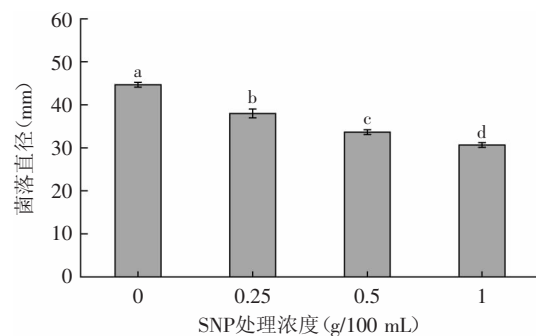


图1 SNP对互隔交链孢菌丝生长的影响

Fig.1 Effect of SNP on mycelial growth of *A. alternata*

注: 不同小写字母表示差异显著($p < 0.05$); 图4同。

2.2 NO供体SNP对互隔交链孢孢子萌发的影响

结果见图2。互隔交链孢孢子萌发率随培养时间的延长逐渐增加, SNP处理后互隔交链孢的孢子萌发率在各时间段内均低于对照, 但低浓度SNP(< 0.5 g/100 mL)

处理互隔交链孢的孢子萌发抑制效果不明显,0.25 g/100 mL与0.5 g/100 mL SNP处理后孢子萌发率较对照组降低,但二者无显著差异($p>0.05$)。6 h时,对照组孢子萌发率已经高达87.7%,而1 g/100 mL SNP处理组其孢子萌发率仅为66.5%,较对照组显著降低($p<0.05$)。

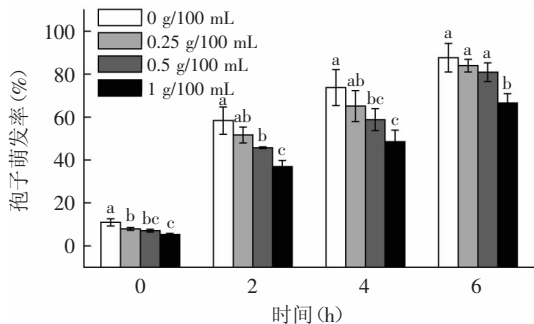


图2 SNP对互隔交链孢孢子萌发的影响

Fig.2 Effect of NO on spore germination of *A. alternata*

注:不同小写字母表示相同时间下不同组间差异显著($p<0.05$)。

2.3 NO供体SNP处理对互隔交链孢菌丝形态和超微结构的影响

在扫描电镜下观察发现对照组的菌丝表面光滑,粗细均匀,没有出现不规则分支、塌陷等现象(图3a),1 g/100 mL的SNP处理过的互隔交链孢菌丝表面粗糙,出现不规则分支,粗细不均匀,折叠扭曲盘绕,部分出现塌陷变形现象(图3b)。

通过透射电镜进一步观察,对照组孢子横切面及纵切面可以看到细胞结构基本正常,细胞器完好且整齐排列,细胞没有发生溶解、破损等现象(图3c,

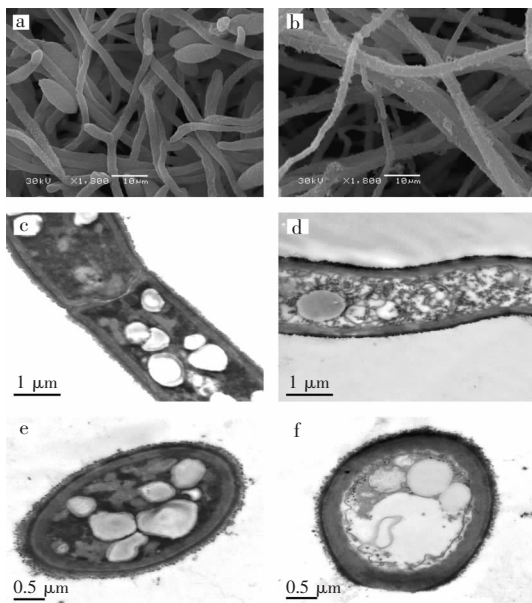


图3 NO对互隔交链孢菌丝生长形态和超微结构的影响

Fig.3 Effect of NO on mycelial growth form and hyphae ultrastructure of *Alternaria alternata*

注:a.CK($\times 1800$);b.NO处理($\times 1800$);c.CK($\times 15000$);d.NO处理($\times 15000$);e.CK($\times 20000$);f.NO处理($\times 20000$)。

图3e),NO处理过的孢子细胞受到严重破坏,细胞内出现空腔,细胞结构凌乱且胞内物质减少,细胞发生破裂、变形、溶解等现象(图3d,图3f)。

2.4 NO供体SNP处理对损伤接种苹果发病率的影响

用不同浓度NO供体SNP处理损伤接种互隔交链孢的苹果结果由图4可见,其控制效果随浓度增加呈现先增加后降低的趋势,其中0.5 g/100 mL的抑菌效果最好,病斑直径为对照的57%,而1 g/100 mL的SNP其控制效果反而降低,实际处理中苹果果实表面大面积产生了棕褐色斑点,这可能是由于高浓度SNP产生的药害,降低了果实组织的防御能力,使病原菌易侵染^[17]。

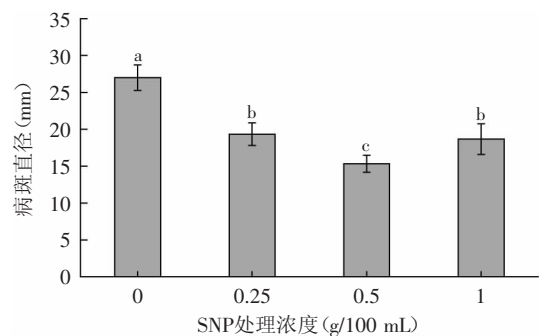


图4 NO处理对损伤接种苹果发病率的影响

Fig.4 The effect of NO on incidence of inoculated apple fruit

3 讨论与结论

本研究中发现不同浓度NO对互隔交链孢的抑制效果存在浓度依赖效应,1 g/100 mL在体外能显著抑制其的菌丝生长及孢子萌发($p<0.05$)。这与Wills等^[8]关于NO对黑曲霉(*Aspergillus niger*)、桃褐腐病菌(*Monilinia fructicola*)、扩展青霉(*Penicillium italicum*)、马铃薯炭疽病菌(*Colletotrichum coccodes*)作用的报道结果一致。近几年还表明NO在真菌中作为信号分子发挥作用^[18]。其参与了灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*)与其寄主相互作用^[11],并作用于马铃薯炭疽病菌(*Colletotrichum coccodes*)分生孢子形成^[9],并可介导茄病镰刀菌(*Fusarium eumartii*)孢子的细胞凋亡^[19]。电镜观察表明NO对互隔交链孢形态结构和超微结构没有产生明显的破坏作用,由此推测可能是NO进入菌体细胞内进而与细胞器发挥作用,Carreras^[20]的研究也发现类似结论,NO胁迫下的孢子一定时间内其ATP含量显著降低,且细胞电子传递链上的部分酶(如线粒体NADH脱氢酶,细胞色素氧化酶等)活性受到抑制,表明NO通过作用于病原物线粒体,抑制线粒体的呼吸造成能量代谢紊乱,从而导致病原物细胞凋亡。

0.5 g/100 mL SNP能明显降低接种前后苹果果实的病斑直径,这表明NO供体对病害具有治愈作用。赖童飞^[21]研究表明外源NO对扩展青霉的发育有显著抑制效果,且浓度越高抑制效果越好。王倩^[22]在灰葡萄孢中也得到了相似的结果。

本实验研究结果表明,外源NO可通过直接抑制病原物生长及诱导果实防御性来有效控制苹果的黑

斑病,但由于其作用机理较为复杂,还需进一步从分子水平上阐明外源NO作为信号分子对病原菌的抑制和寄主抗性诱导的调控机制。

参考文献

- [1] 刘瑾瑾,李永才,刘昌宁. 采后纳米氧化锌对苹果黑斑病青霉病的控制[J]. 食品工业科技,2014,35(4):327-330.
- [2] 李鹏霞,张兴,王炜,等. 30种精油对采后油桃防腐保鲜活性的初步研究[J]. 江苏农业科学,2008(6):246-248.
- [3] 段学武,邹如意,蒋跃明,等. NO对采后龙眼常温贮藏效果的影响[J]. 食品科学,2007,28(2):327-329.
- [4] Millar A H, Day D A. Nitric oxide inhibits the cytochrome oxidase but not the alternative oxidase of plant mitochondria[J]. FEBS letters,1996,398(2):155-158.
- [5] Caro A, Puntarulo S. Nitric oxide generation by soybean embryonic axes. Possible effect on mitochondrial function [J]. Free radical research,1999,31:S205-S212.
- [6] Thomas D D, Ridnour L A, Isenberg J S, et al. The chemical biology of nitric oxide: implications in cellular signaling[J]. Free Radical Biology and Medicine,2008,45(1):18-31.
- [7] Wills R B H, Ku V V, Leshem Y Y. Fumigation with nitric oxide to extend the postharvest life of strawberries[J]. Postharvest Biology and Technology,2000,18(1):75-79.
- [8] Lazard E E, Wills R B H, Ho B T, et al. Antifungal effect of gaseous nitric oxide on mycelium growth, sporulation and spore germination of the postharvest horticulture pathogens, *Aspergillus niger*, *Monilinia fructicola* and *Penicillium italicum*[J]. Letters in applied microbiology,2008,46(6):688-692.
- [9] Wang J, Higgins V J. Nitric oxide has a regulatory effect in the germination of conidia of *Colletotrichum coccodes*[J]. Fungal Genetics and Biology,2005,42(4):284-292.
- [10] Manjunatha G, Nniranjan-raj S, Prasnanth G N, et al. Nitric oxide is involved in chitosan-induced systemic resistance in pearl millet against downy mildew disease[J]. Pest management science,2009,65(7):737-743.
- [11] Lai T, Wang Y, Li B, et al. Defense responses of tomato fruit to exogenous nitric oxide during postharvest storage[J]. Postharvest Biology and Technology,2011,62(2):127-132.
- [12] 李永才, 毕阳. 苹果梨黑斑病菌潜伏侵染的组织学研究[J]. 甘肃农业大学学报,2005,40(4):516-520.
- [13] Yao H J, Tian S P. Effects of a biocontrol agent and methyl jasmonate on postharvest diseases of peach fruit and the possible mechanisms involved[J]. Journal of Applied Microbiology,2005,98(4):941-950.
- [14] Bi Y, Tian S P, Guo Y R, et al. Sodium silicate reduces postharvest decay on Hami melons: induced resistance and fungistatic effects[J]. Plant disease,2006,90(3):279-283.
- [15] 高向阳,林碧润,姚汝华,等. 新抗生素万隆霉素对黄瓜疫病病菌抑菌形态学研究[J]. 华南农业大学学报,2004,25(4):27-29.
- [16] 毕阳,张维一. 感病甜瓜果实的呼吸,乙烯及过氧化物酶变化的研究[J]. 植物病理学报,1993,23(1):69-73.
- [17] 陈学红,郑永华,杨震峰,等. 高氧处理抑制草莓果实采后腐烂与抗病性诱导的关系[J]. 农业工程学报,2007,22(10):208-211.
- [18] Samalova M, Johnson J, Illes M, et al. Nitric oxide generated by the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* drives plant infection [J]. New Phytologist,2013,197(1):207-222.
- [19] Terrile M C, Mansilla A Y, Albertengo L, et al. Nitric-oxide-mediated cell death is triggered by chitosan in *Fusarium eumartii* spores[J]. Pest management science,2015,71(5):668-674.
- [20] Carreras M C, Franco M C, Peralta J G, et al. Nitric oxide, complex I, and the modulation of mitochondrial reactive species in biology and disease[J]. Molecular aspects of medicine,2004,25(1):125-139.
- [21] 赖童飞,刘毅,任梦,等. 外源一氧化氮对果蔬采后病害 *Penicillium expansum* 发育的影响[J]. Journal of Agricultural Biotechnology,2013,21(3):253-262.
- [22] 王倩,高丽朴,杨娜,等. 一氧化氮对果蔬采后灰霉菌生长发育及致病性的影响[J]. 植物保护学报,2013,40(3):243-248.
- [6] 于森. 农产品冷链发展或将进入爆发期[J]. 物流时代,2014(3):25.
- [7] 王丹,孙蕾,孙家正,等. 蓝莓果实的冻结特性及影响因素分析初报[J]. 江西农业大学学报,2013,35(5):940-944.
- [8] 吴欣,徐俐,李莉莉,等. 保鲜剂对蓝莓贮藏效果及相关酶活性的影响[J]. 食品科技,2013,38(2):26-31.
- [9] 屈海泳,刘连妹,张旻倩,等. 冷藏温度对蓝莓果实品质的影响[J]. 安徽农业大学学报,2014,41(5):871-874.
- [10] 王芳,刘华,陈文荣,等. 贮藏温度对蓝莓活性成分及抗氧化活性的影响[J]. 宁夏大学学报:自然科学版,2011,32(2):172-175.
- [11] 朱志强,张平,任朝晖,等. 国内外冰温保鲜技术研究与应用[J]. 农产品加工学刊,2011(3):4-6.
- [12] 张璇,孙娅,王毓宁,等. 不同品种黄桃的冰点温度及其影响因素分析[J]. 食品科学技术学报,2013,31(4):37-41.
- [13] 申春苗,汪良驹,王文辉. 12个梨品种果实冰点温度的测定与影响因素分析[J]. 南京农业大学学报,2011,34(1):35-40.
- [14] 王颖,李里特,丹阳. 果蔬冰点同可溶性固形物含量关系的研究[J]. 制冷学报,2005,26(1):14-18.
- [15] 钟志友,张敏,杨乐,等. 果蔬冰点与其生理生化指标关系的研究[J]. 食品工业科技,2011(2):76-78.
- [16] 罗云波,蔡同一. 园艺产品贮藏加工学[M]. 北京:中国农业大学出版社,2001:79.

(上接第357页)

- [6] 于森. 农产品冷链发展或将进入爆发期[J]. 物流时代,2014(3):25.
- [7] 王丹,孙蕾,孙家正,等. 蓝莓果实的冻结特性及影响因素分析初报[J]. 江西农业大学学报,2013,35(5):940-944.
- [8] 吴欣,徐俐,李莉莉,等. 保鲜剂对蓝莓贮藏效果及相关酶活性的影响[J]. 食品科技,2013,38(2):26-31.
- [9] 屈海泳,刘连妹,张旻倩,等. 冷藏温度对蓝莓果实品质的影响[J]. 安徽农业大学学报,2014,41(5):871-874.
- [10] 王芳,刘华,陈文荣,等. 贮藏温度对蓝莓活性成分及抗氧化活性的影响[J]. 宁夏大学学报:自然科学版,2011,32(2):172-175.
- [11] 朱志强,张平,任朝晖,等. 国内外冰温保鲜技术研究与应用[J]. 农产品加工学刊,2011(3):4-6.
- [12] 张璇,孙娅,王毓宁,等. 不同品种黄桃的冰点温度及其影响因素分析[J]. 食品科学技术学报,2013,31(4):37-41.
- [13] 申春苗,汪良驹,王文辉. 12个梨品种果实冰点温度的测定与影响因素分析[J]. 南京农业大学学报,2011,34(1):35-40.
- [14] 王颖,李里特,丹阳. 果蔬冰点同可溶性固形物含量关系的研究[J]. 制冷学报,2005,26(1):14-18.
- [15] 钟志友,张敏,杨乐,等. 果蔬冰点与其生理生化指标关系的研究[J]. 食品工业科技,2011(2):76-78.
- [16] 罗云波,蔡同一. 园艺产品贮藏加工学[M]. 北京:中国农业大学出版社,2001:79.