灰霉菌侵染对红提葡萄表皮蜡质结构和 化学组分的影响

韩彤,于姝莉,江英*

(石河子大学食品学院,石河子 832003)

摘 要:目的 探讨灰霉菌侵染对红提葡萄表皮蜡质结构和化学组分的影响。**方法** 红提葡萄采后分别用灰 霉菌孢子悬浮液与无菌水处理,于0、6和15d采用扫描电子显微镜(scanning electron microscope, SEM)和气 相色谱-质谱法(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)对果实表皮蜡质微观结构和化学组分进行分析, 通过差量法计算蜡质总量。**结果** 随着贮藏时间延长,蜡质总量逐渐降低,接菌果实蜡质总量始终低于对照果 实;通过 SEM 观察到红提葡萄表皮蜡质呈现堆叠的片状结构。贮藏后期,堆叠的蜡质结构出现塌陷,与对照 果实相比,灰霉菌侵染后蜡质表面被分生孢子和菌丝所覆盖,蜡质逐渐溶解减少;GC-MS 表明红提葡萄表皮 蜡质包括脂肪酸和醇类各9种、烃类11种、酯类6种、萜类2种、醛类和其他成分各5种。其中,主要成分 为脂肪酸(38.82%)和酯类(29.04%)。与对照果实相比,接菌果实蜡质成分中的脂肪酸、酯类和醛类相对含量在 贮藏中期逐渐增加,烃类、醇类、萜类和其他成分相对含量逐渐降低。**结论** 灰霉菌侵染对葡萄表皮蜡质总 量、微观结构和化学组分均具有明显的影响,但其影响机制尚需进一步研究。 **关键词:** 红提葡萄;表皮蜡质;灰霉菌

Effects of *Botrytis cinerea* infection on waxy structure and chemical components of Red Globe Grape epidermis

HAN Tong, YU Shu-Li, JIANG Ying*

(Food College, Shihezi University, Shihezi 832003, China)

ABSTRACT: Objective To investigate the effects of *Botrytis cinerea* infection on the waxy structure and chemical composition of Red Globe Grape epidermis. **Methods** Red Globe Grapes were treated with spore suspension of *Botrytis cinerea* and sterile water respectively after harvest. The microstructure and chemical components in the peel were analyzed by scanning electron microscope (SEM) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) on the 0, 6 and 15 days, and the total wax was calculated by difference method. **Results** As the storage time prolonged, the total wax content gradually decreased, and the total wax content in the inoculated fruit was consistently lower than that in the control fruit; it was observed by SEM that the cuticular wax of Red Globe Grape presented a stacked sheet structure. At the end of storage, the stacked wax structure collapsed. Compared with the control fruit, the wax surface was covered by conidium and hyphae after the infection of gray mold, and the wax gradually dissolved and

*通信作者: 江英, 博士, 教授, 主要研究方向为果蔬加工与贮藏。E-mail: 715jy@sohu.com

基金项目: 国家自然科学基金地区科学基金项目(32160590)

Fund: Supported by the National Natural Science Foundation Regional Science Foundation Project (32160590)

^{*}Corresponding author: JIANG Ying, Ph.D, Professor, Research Center for Preservation of Fruits and Vegetables, College of Food, Shihezi University, Shihezi 832003, China. E-mail: 715jy@sohu.com

decreased; GC-MS indicated that the cuticular waxes of Red Globe Grape included 9 kinds of fatty acids and alcohols, 11 kinds of hydrocarbons, 6 kinds of esters, 2 kinds of terpenes, and 5 kinds of aldehydes and other components. Among them, the main components were fatty acids (38.82%) and esters (29.04%). Compared with the control fruit, the relative content of fatty acids, esters, and aldehydes in the wax components of the inoculated fruit gradually increased during the middle storage period, while the relative content of hydrocarbons, alcohols, terpenoids, and other components gradually decreased. **Conclusion** The infection of *Botrytis cinerea* has obvious effects on the total amount, microstructure and chemical components of grape epicuticular wax, but its mechanism needs further study.

KEY WORDS: Red Globe Grape; cuticle wax; Botrytis cinerea

0 引 言

葡萄因其丰富的营养物质、抗氧化和经济价值而在全世界各地广泛种植。新疆葡萄品种繁多,主要鲜食葡萄以 红提、木纳格和巨峰为主。红提葡萄为最富有新疆特色的 中晚熟耐贮藏葡萄品种。然而,葡萄在高温多雨的夏季成 熟,采收后容易受到灰霉菌、黑曲霉、赤星病菌的感染^[1]。 灰霉菌是一种葡萄常见的低温高湿型病菌,其病原体是灰 葡萄孢(Botrytis cinerea)。当气温在 4℃或更高时,灰葡萄 孢会萌发,并在 7~20℃时产生大量孢子^[2]。当葡萄被感染 后,果皮表面出现褐色的坑斑,导致果实腐烂,完全失去 葡萄的商业价值。而且灰霉菌一旦感染葡萄,发展迅速, 难以控制^[3]。

许多水果表面覆盖着一层天然蜡质,它是水果抵抗 生物和非生物胁迫的天然屏障。表皮蜡质主要由脂肪族化 合物和环状化合物组成。脂肪族化合物包含烷烃、醛类、 酯类、醇类和脂肪酸,环状化合物主要以三萜类和甾醇类 为主^[4-5]。果实表皮蜡质结构、含量和组成与其对病原菌的 抗性有一定的相关性。研究表明,蜡质的结构和成分会影 响果实的水分蒸发,防止昆虫和微生物的入侵^[6];葡萄表 皮蜡含量与果实对灰霉菌的抗性成正相关,表皮蜡含量越 多,灰霉菌对果实表皮的黏附力越低^[7];有报告证实柑橘 果实的表皮蜡质会影响指状青霉的菌落扩张^[8];表皮蜡质 中的正构烷烃和三萜类化合物被认为在限制病原菌入侵苹 果梨果实中发挥了重要的作用^[9];葡萄表皮蜡质中的 n-脂 肪醇,可能会抵御灰霉菌的入侵^[10]并显著影响葡萄蛾的产 卵^[11]。目前,有关灰霉菌侵染红提葡萄后表皮蜡质的微观 结构和组分变化的报道很少。

因此,为了探究灰霉菌侵染红提葡萄过程中蜡质的变化,本研究采用扫描电子显微镜对红提葡萄表皮蜡质结构进行观察,采用气相色谱-质谱法(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)测定分析红提葡萄表皮蜡的组成和含量,通过对比葡萄接种与未接种灰霉病菌,观察蜡质结构与组分的改变,探讨葡萄表皮蜡质在抵抗灰霉菌侵染过程中起到的作用,以期为探索蜡质与果实耐贮性的关系奠定基

础,也为今后开发合成蜡而延长果蔬贮藏期提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

红提葡萄购买于新疆石河子市金马市场。

灰霉菌(Botrytis cinerea):由石河子大学食品学院葡萄与葡萄酒研究中心提供。

二氯甲烷、正己烷(分析纯,山东盛泽化工有限公司); 三氟化硼-甲醇溶液(14%)、正二十四烷(色谱纯,北京奥博 星生物技术有限公司);正庚烷(色谱纯,济南金晟新材料 有限公司);氯化钠、无水硫酸钠(分析纯,上海跃腾生物技 术有限公司);石英毛细管色谱柱 HP-5 (30 m×0.25 mm, 0.25 μm)(杭州纽蓝科技有限公司)。

1.2 仪器与设备

RE-3000 旋转蒸发仪(郑州生化仪器有限公司); Trace-DSQ气相色谱-质谱联用仪(美国安捷伦公司); BZY-1 电子分析天平(*d*=0.01 g, 上海拓希电子科技有限公司); SU8010 场发射扫描电子显微镜(日本日立公司); LGJ-12A 冷冻干燥机(上海博登生物科技有限公司); JET3-TZ200 离 子溅射仪(深圳市德龙讯科技有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 样品前处理

挑选无机械损伤无病害、大小一致的果实。将筛选后 的葡萄果实,随机分成两组,用 75%酒精喷洒消毒,然后 用蒸馏水清洗 2 次,风干后进行如下处理: (1)对照组:无 菌水喷洒表面; (2)接菌组:喷洒 1×10⁶ cfu/mL 灰霉菌孢子 悬浮液。晾干后在常温(25℃)下贮藏。分别在 0、6、15 d 对葡萄进行蜡质微观结构和成分含量的观察与测定。每次 实验重复 3 次。

在马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose aga, PDA)平板 上制备真菌培养物,在25℃光照交替(每12h)条件下培养 7d,制备灰霉菌分生孢子。用无菌蒸馏水小心冲洗平板收获 分生孢子,然后用4层无菌纱布过滤。用血球计数板在光学 显微镜下计数,将分生孢子悬浮液稀释至1×10⁶ cfu/mL,用 于进一步实验。

1.3.2 蜡质微观结构的观察

随机选取3粒葡萄,用锋利刀片从果实赤道部位切下 5 mm×5 mm的组织薄片,切后先置于-80°C冰箱中预冷12 h, 随后在冷冻干燥机中干燥 6 h^[12]。干燥后的样品放入离子 溅射仪镀金膜 160 s,镀膜后立即用扫描电子显微镜观察 微观结构,选取代表性视野拍照分析。

1.3.3 蜡质提取及含量的测定

参照王雨菲等^[13]方法,用二氯甲烷与正己烷混合 溶剂(3:1,*V:V*)来提取蜡质,液料比 2:1 (mL/g),提取时 间 7.5 min。挑选无任何机械损伤的葡萄果实,从果穗上将 果粒剪下,保留 3~5 mm 的果梗。将称量的葡萄果实置于 烧杯内(500 mL),在注入提取剂后进行计时。当葡萄在浸泡 时,应使用玻璃棒不断地轻柔搅动,以保证果实的所有部分 均接触到提取溶剂。在浸泡过程结束后,用镊子小心地夹出 葡萄果粒。为充分得到蜡质提取物,应通过旋转蒸发仪实现 浓缩,然后将浓缩后的溶液转移至玻璃培养皿内。最后,将 培养皿置于通风橱中进行自然挥发,直至恒重。

根据差量法计算蜡质提取量,其计算公式为式(1):

蜡质提取量/(mg/100 g)= $\frac{m1 - m2}{M} \times 100\%$ (1)

式中: m1 表示培养皿及所提蜡质的重量, mg; m2 表示空培养皿的重量, mg; M表示葡萄果粒重量, g。

1.3.4 GC-MS 测定蜡质前的甲酯化处理

参照李珍慈等^[14]和王月^[15]的方法,略有修改,具体 如下:称取 50 mg 蜡质粉末,放置于 50 mL 圆底磨口瓶中, 再加入 5 mL 三氟化硼-甲醇溶液(14%)和 100 μL 正二十四 烷(1 μg/μL)。冷凝回流 5 min 后从冷凝器上端加入正庚烷 (5 mL),继续冷凝回流 2 min。取出圆底磨口瓶,冷却至室 温。加入饱和氯化钠溶液(5 mL)静置分层,吸取上清液并 将其移至闭塞管中(含 0.4 g 无水硫酸钠)。最后,在进行 GC-MS 检测前,闭塞管的上清液需通过有机微孔膜(直径 0.22 μm)后注入样品瓶中。表皮蜡质成分定性参照 NIST17.L(谱库/数据库),以正二十四烷(C₂₄H₅₀)为内标物, 采用内标法进行定量分析,且利用峰面积归一化法计算蜡 质成分的相对质量分数。

1.3.5 气相色谱条件

石英毛细管色谱柱 HP-5 (30 m×0.25 mm, 0.25 µm); 载气: He; 载气流速: 1.1 mL/min, 线速率 40 cm/s; 进样量: 1.0 µL, 不分流; 进样口温度: 250℃; 检测室温度: 300℃; 程序升温: 初始温度 80℃, 以 4℃/min 升温至 290℃, 恒温 30 min。

1.3.6 质谱条件

电离方式为电子电离(electronic ionization, EI), 离子 源温度: 230℃; 传输线温度 220℃; 四极杆温度 150℃; 电子轰击能量: 70 eV; 质量扫描范围 35~600 *m/z*。

1.4 数据处理

所有实验指标在每个周期重复测量 3 次,使用 DPS 7.05 对实验数据进行统计和分析,数据以平均值±标准偏 差表示,采用 Origin 2019 软件作图。

2 结果与分析

2.1 灰霉菌侵染对葡萄蜡质总量的影响

由图 1 可得,不论是对照组还是接菌组,两组的蜡质总量都随着贮藏时间的延长而下降,对照组在贮藏 15 d时由 0.58 mg/g (0 d)下降至 0.32 mg/g,接菌组则下降至 0.13 mg/g,对照组含量比接菌组含量高 59.38%,二者差异显著(P<0.05),说明灰霉菌侵染葡萄后,可能会分泌角质酶加快蜡质降解。



注:不同字母表示同一贮藏时间下组间差异显著(P<0.05),图4~9同。 图 1 接菌组和对照组中葡萄蜡质总量的变化

Fig.1 Changes in total wax content of grapes in the inoculation group and control group

2.2 灰霉菌侵染对葡萄蜡质结构的影响

采后衰老通常以果实表面微观结构的改变为特征。 在贮藏衰老之后,表面微观结构或晶体发生变化。此前曾 研究发现柑橘中的蜡质结构从扁平血小板变为小颗粒晶 体^[16]、苹果表皮变得油腻^[17]以及西葫芦^[18]和香蕉^[19]在贮 藏期间的纳米脊边缘塌陷变为平坦。本研究通过扫描电子 显微镜观察到红提葡萄表皮呈现边缘不规则的片状蜡质形 态(图 2A)。随着时间的延长,对照组葡萄在贮藏后期蜡质 结构出现塌陷和蜡融化现象(图 2B、D、F)。这种蜡部分融 化的自然现象在柑橘类果实贮藏中也曾被发现^[20]。根据图 2C,可以观察到接菌组果实在第 0 d 便有分生孢子黏附在 表皮蜡质表面。第 6 d 时,分生孢子增多,其周围的蜡质溶 解消失;15 d 时蜡质表面覆盖大量菌丝(图 2E、J)。果实表 面微观结构的变化可能是由于贮藏过程中持续的机械损 伤、自身衰老及病原体感染。灰霉病菌在侵染葡萄时,会 分泌角质酶来降解表皮蜡,导致蜡质溶解速度加快,从而 使其分生孢子更好地附着在蜡质表面并形成菌丝体。这种 蜡质层被真菌病原体降解的现象也出现在其他植物中^[21]。



注: A 为红提葡萄蜡质微观结构; B、D、F 分别为 0、6、15 d 对照组 葡萄蜡质形态; C、E、J 分别为 0、6、15 d 接菌组葡萄蜡质形态。
图 2 接菌组和对照组的葡萄表皮蜡质形态的变化
Fig.2 Morphological changes of cuticular wax in grape of inoculation group and control group

2.3 灰霉菌侵染对葡萄蜡质组分的影响

结合图 3 及表 1 可知,通过 GC-MS 在红提葡萄表皮 蜡中共检测出 47 种化学成分,包括:脂肪酸和醇类各 9 种、烃类 11 种、酯类 6 种、萜类 2 种、醛类和其他成分各 5 种。其中,主要成分为脂肪酸(38.82%)和酯类(29.04%), 烃类和醇类占比分别为 13.14%和 8.13%,醛(4.04%)和萜 (4.47%)含量较低。其他成分(2.36%)中主要由 2,6-二叔丁基 对甲酚、含氧环烷烃组成。红提葡萄蜡质的化学组分与其 他果实检测出的化学组分类似,如蓝莓蜡质中含有的萜类 物质、烷烃和醇类^[22];苹果中的脂肪酸、萜类、醛类^[23];荔 枝中的长链脂肪酸、伯醇、醛类^[24];金桔中的脂肪酸和醛 类^[25]等。综上,大多数果实表皮蜡质成分主要由脂肪酸及 其衍生物组成。不同果实所含的主要蜡质成分会有差异。 2.3.1 灰霉菌侵染对脂肪酸相对含量的影响

由图 4 可得, 贮藏第 6 d 时, 接菌组果皮蜡质中脂肪酸的相对含量略高于对照组果实。灰霉菌侵染使葡萄果实中的脂肪酸相对含量从第 0 d 时的 38.82%降低到 27.49% (6 d), 在第 15 d 时降至 15.94%。表皮蜡质中长链脂肪酸的主要成分十六酸(C16:0)在侵染第 6 d、15 d 后从第 0 d 时的 7.36%分别降至 5.36%和 3.29%。十四酸(C14:0)则从 5.54% 分别降至 4.37%和 2.16%。通过表 1 可以发现红提葡萄表 皮蜡质中的脂肪酸是长链脂肪酸(C12~C22), 具有偶数个 碳原子数,在木纳格葡萄^[13]和库尔勒香梨^[15]中也有同样 的结果。本研究结果表明葡萄果实在受到灰霉菌侵染后, 长链脂肪酸含量增加,长链脂肪酸与蜡质的合成有关,脂 肪酸含量的增加导致蜡质含量增加,从而有助于果实更好 地抵御病原菌的侵染^[26],这一结果在蓝莓受到灰霉菌^[27] 侵染时也被检测到。

2.3.2 灰霉菌侵染对酯类相对含量的影响

酯类是蜡质含量中的第二主要成分。由图 5 可知, 贮 藏第 6 d, 接菌组果实中的酯类相对含量显著高于对照组 果实(P<0.05)。由表 1 可得, 红提葡萄中酯类成分主要是壬 二酸二甲酯(6.14%)和戊酸甲酯(5.82%) (0 d), 在果实受到 病原菌侵染后, 在第 6 d 时这两种成分分别降至 4.04%和 4.49%。本研究发现在灰霉菌侵染中期, 葡萄蜡质中的酯类 含量增加, 而酯类与蜡质的转运密切相关^[28], 这表明果实 会产生更多的蜡质参与转运过程, 从而产生更多的蜡质去 抵御病原菌的侵染, 而在蓝莓^[27]受到灰霉菌侵染时, 酯类 含量变化无明显差异, 可能是由于贮藏天数的不同和品种 差异所导致。



保留时间/min

Fig.3 GC-MS total ion flow diagram of waxy components of grape epidermis

图 3 葡萄表皮蜡质组分的 GC-MS 总离子流图

		相对含量/%		
	万丁式-	0 d	6 d	15 d
脂肪酸				
十二酸(月桂酸)	$C_{12}H_{24}O_2$	4.82	3.22	1.23
十四酸(肉豆蔻酸)	$C_{14}H_{28}O_2$	5.54	4.37	2.16
十六酸(棕榈酸)	$C_{16}H_{32}O_2$	7.36	5.36	3.29
十八酸(硬脂酸)	$C_{18}H_{36}O_2$	4.83	3.41	2.31
二十酸(花生酸)	$C_{20}H_{40}O_2$	4.31	3.55	1.33
二十二酸(山嵛酸)	$C_{22}H_{44}O_2$	4.54	3.36	1.79
9,12-十八碳二烯酸	$C_{18}H_{28}O_2$	2.82	2.15	1.19
顺式-9-十六碳烯酸(棕榈油酸)	$C_{16}H_{30}O_2$	2.13	1.04	1.24
顺式-9-十八碳烯酸(油酸)	$C_{18}H_{34}O_2$	2.47	1.03	1.40
烃类				
正十一烷	$C_{11}H_{24}$	2.94	2.03	1.88
正十二烷	$C_{14}H_{30}$	1.22	1.05	0.73
正十四烷	C15H32	1.27	0.81	0.69
2,2,4,4-四甲基辛烷	$C_{12}H_{26}$	1.23	0.95	0.78
正十九烷	$C_{19}H_{40}$	1.26	0.74	0.67
1,1-二甲氧基壬烷	C_8H_{18}	1.27	0.75	0.53
2,6,10-三甲基十二烷	$C_{15}H_{32}$	0.24	0.19	0.15
3,3-二甲基己烷	C_8H_{18}	0.59	0.46	0.29
2,3-二甲基癸烷	$C_{12}H_{26}$	1.79	1.12	0.92
3,5,5-三甲基-1-己烯	C_9H_{18}	0.58	0.26	0.17
2-甲基-1-辛烯	C_9H_{18}	0.75	0.38	0.22
醇类	,			
十六醇	C ₁₆ H ₃₄ O	1.32	1.05	0.79
十九烷醇	$C_{19}H_{40}O$	1.24	1.19	0.87
1-二十醇	$C_{20}H_{42}O$	1.45	1.23	0.89
11-甲基十二烷醇-d7	$C_{13}H_{28}O$	1.12	0.65	0.40
2-乙基-1-癸醇	$C_{12}H_{26}O$	1.27	0.61	0.46
2-丁基-1-辛醇	$C_{12}H_{26}O$	0.64	0.32	0.28
6-甲基-1-辛醇	$C_9H_{20}O$	0.35	0.21	0.19
2-辛基十二醇	$C_{20}H_{42}O$	0.48	0.21	0.17
2-(十八氧基)乙醇	$C_{20}H_{42}O_2$	0.26	0.13	0.06
酯类				
戊酸甲酯	$C_6H_{12}O_2$	5.82	4.49	2.64
邻苯二甲酸二甲酯	$C_{10}H_{10}O_4$	5.08	4.62	2.36
壬二酸二甲酯	$C_{11}H_{20}O_4$	6.14	4.04	2.79
3-(3,5-二叔丁基-4-羟基苯基)丙酸甲酯	$C_{18}H_{28}O_3$	5.17	4.33	2.35
9,10-亚甲基十六酸甲酯	$C_{18}H_{34}O_2$	2.49	2.04	1.06
(Z)-油酸甲酯	$C_{19}H_{36}O_2$	4.34	3.94	1.05
醛类				
十五醛	$C_{15}H_{30}O$	1.92	1.57	1.17
丁醛二丁基乙缩醛	$C_{12}H_{26}O_2$	1.45	0.74	0.56
壬醛二甲缩醛	$C_{11}H_{24}O_2$	0.37	0.25	0.17
13-甲基十四醛	$C_{15}H_{30}O$	0.14	0.12	0.10
反式-2-壬醛	$C_9H_{16}O$	0.16	0.09	0.03
萜类				
β-紫罗酮	$C_{13}H_{20}O$	2.11	1.56	0.85
4-(二甲氧基甲基)-1-环己烯	$C_9H_{16}O_2$	2.36	0.58	0.21
其他				
2.6-二叔丁基对甲酚	$C_{15}H_{24}O$	1.51	1.35	0.74
1,2-环氧十八烷	$\mathrm{C_{18}H_{36}O}$	0.23	0.16	0.11
十八烷基乙烯基醚	$\mathrm{C}_{20}\mathrm{H}_{40}\mathrm{O}$	0.19	0.12	0.08
1,2,4,5-四乙苯	$C_{30}H_{22}$	0.11	0.04	0.02
3,4-环氧辛烷-2-酮	$C_8H_{14}O_2$	0.24	0.10	0.08

表 1 灰霉菌侵染后表皮蜡质相对含量的变化

 Table 1
 Changes in the relative content of epidermal wax after infection with gray mold



图 4 接菌组和对照组中葡萄的脂肪酸相对含量的变化 Fig.4 Changes of relative content of fatty acids of grapes in the inoculation group and control group





2.3.3 灰霉菌侵染对烃类相对含量的影响

与脂肪酸和酯类相比, 烃类的相对含量较低。由图 6 可以看出, 两组果蜡中烃类含量随着时间的增加而逐渐降 低。接菌组果实从第 0 d 时的 13.14%降至 8.74% (6 d), 在 15 d 时略微下降至 7.03%。贮藏第 6 d 和第 15 d, 接菌组果 实烃类含量低于对照组果实。果实表皮蜡中存在从 3,3-二 甲基己烷(C8)到正十九烷(C19)的 9 种烷烃, 其碳链长度以 奇数多于偶数为主。主要烷烃正十一烷(2.94%)在接菌 6 d 后相对含量下降, 降至 2.03%, 最终降至 15 d 的 1.88%。有 研究表明烷烃具有保水性, 有利于延缓果实失水, 在葡萄生 长过程中, 水分缺失则会刺激长链脂肪族化合物的合成^[26]。 烷烃的含量与果实开裂也有关系^[29], 其含量的增多有助于 防止葡萄在贮藏期间发生开裂, 从而进一步避免病原菌的 侵入, 更好地延长果实贮藏时间。



图 6 接菌组和对照组中葡萄的烃类相对含量的变化 Fig.6 Changes of relative content of hydrocarbons of grapes in the inoculation group and control group

2.3.4 灰霉菌侵染对醇类相对含量的影响

由图 7 可得, 无论是接菌组果实还是对照组果实, 两 者蜡质中的醇类相对含量均随着时间延长而降低, 对照组 果实在第 6 d 时降至 6.14%, 15 d 时降至 5.38%, 接菌组果 实在第 6 d 和 15 d 时分别降至 5.60%和 4.11%。在贮藏中 期, 对照组果实的醇类含量始终高于接菌组果实。研究表 明醇类具有偶数碳链大于奇数碳链长度的优势^[30], 1-二十醇 (C20)和十六醇(C16)在葡萄蜡质中相对含量较高。有研究表 明, 醇类的增加有助于提高果实的光泽感, 果实受到病菌侵 染后, 光泽度下降有可能与醇类物质含量降低有关^[30]。



图 7 接菌组和对照组中葡萄的醇类相对含量的变化 Fig.7 Changes of relative content of alcohols of grapes in the inoculation group and control group

2.3.5 灰霉菌侵染对醛类相对含量的影响

由图 8 可得, 与第 0 d 相比, 对照组果实和接菌组果 实在第 6 d 和第 15 d 时醛类相对含量均呈现下降趋势, 接 菌后的果实在第 6 d 时醛类相对含量(2.77%)要高于对照组 果实(2.57%)。在第 15 d时则是接菌组果实(1.63%)低于对 照组果实(2.03%)。由表 1 可得, 醛类中十五醛占比最大, 为 1.92%, 其次是丁醛二丁基乙缩醛, 为 1.45%。这两种成 分均在果实受到灰霉菌侵染后逐渐降低。醛类可以增强果 实的保水能力,有效缓解细胞壁变化,保持果实硬度^[31]。 红提葡萄受到灰霉菌侵染后醛类含量的增加有助于防止果 实进一步失水皱缩。



图 8 接菌组和对照组中葡萄的醛类相对含量的变化 Fig.8 Changes of relative content of aldehydes of grapes in the inoculation group and control group

2.3.6 灰霉菌侵染对萜类相对含量的影响

由图 9 可知,随着贮藏时间增加,萜类含量逐渐降低 且接菌组果实萜类相对含量要显著低于对照组果实 (P<0.05)。由表 1 可得,萜类只检测出两种化学成分,分别 为 β-紫罗酮和 4-(二甲氧基甲基)-1-环己烯,这两种物质含 量都随着侵染时间的增加而降低。与第 0 d 相比,第 15 d 时接菌组果实的这两种成分的相对含量分别下降 59.72%



图 9 接菌组和对照组中葡萄的萜类相对含量的变化 Fig.9 Changes of relative content of terpenoids of grapes in the inoculation group and control group

和 91.10%, 这表明灰霉菌侵染加速了萜类化合物的降解。 在 JIANG 等^[27]研究的灰霉菌侵染蓝莓过程中, 在对照组 果实中, 萜类呈现先上升后下降的趋势, 接菌组果实则是 先下降后上升, 中前期萜类化合物的增加能够更好地抑制 灰葡萄孢的生长; 在 LIU 等^[32]研究中也有类似的结果, 蓝 莓蜡质中的熊果酸(五环三萜类化合物)可以通过破坏细胞 膜的完整性来抑制灰葡萄孢的生长。本研究萜类含量一直 呈下降趋势, 这种差异可能是品种不同、贮藏和处理条件 不同所导致。后期由于贮藏时间过长, 病菌繁殖过多从而 影响蜡质中萜类的合成。

3 结 论

实验结果表明,葡萄在受到灰霉菌侵染时,表皮蜡质 总量不断减少。红提葡萄表皮蜡质结构为片状,在受到病 原菌侵染时, 蜡质结构出现塌陷并伴有溶解现象。经 GC-MS 检测分析, 葡萄表皮蜡质共鉴定出 47 种化学成分, 其中脂肪酸和醇类各9种、烃类11种、酯类6种、萜类2 种、醛类和其他成分各5种。脂肪酸是红提葡萄表皮蜡中 最主要的成分。与对照组果实相比,在贮藏中期,灰霉菌 侵染会引起果实表皮蜡中的脂肪酸、酯类和醛类相对含量 增加, 烃类、醇类、萜类和其他未定义成分相对含量逐渐 降低。本研究为探讨表皮蜡质如何响应病原菌感染,进一 步开发合成蜡从而延长果实贮藏期提供了理论依据。对之 后葡萄果实的合成蜡的生产提供参考,并为之后在分子水 平的研究提供一定的理论基础。灰霉菌侵染葡萄影响其表 皮蜡质的形态和组分,但其侵染后对果实采后生理指标的 影响是否与蜡质成分变化有关以及潜在的分子机制仍需进 一步探索。

参考文献

 南米娜,辛雪燕,薛华丽,等.葡萄及其制品中赭曲霉毒素A的污染现状及检测技术研究进展[J].食品安全质量检测学报,2023,14(3): 122-130.

NAN MN, XIN XY, XUE HL, *et al.* Research progress on pollution status and detection technology of ochratoxin A in grapes and its products [J]. J Food Saf Qual, 2023, 14(3): 122–130.

- [2] 张国珍, 钟珊. 草莓灰霉病研究进展[J]. 植物保护, 2018, 44(2): 1-10.
 ZHANG GZ, ZHONG S. Research progress of strawberry gray mold [J].
 Plant Protect, 2018, 44(2): 1-10.
- [3] LI, BQ, ZHANG. Aquaporin regulates cellular development and reactive oxygen species production, a critical component of virulence in *Botrytis cinerea* [J]. New Phytol, 2016, 209: 1668–1680.
- [4] HEGEBARTH D, JETTER R. Cuticular waxes of *Arabidopsis thaliana* shoots: Cell-type-specific composition and biosynthesis [J]. Plants, 2017, 6(3): 27.
- [5] LEE SB, SUH MC. Recent advances in cuticular wax biosynthesis and its regulation in arabidopsis [J]. Mol Plant, 2013, 6(2): 246–249.
- [6] LEWANDOWSKA M, KEYL A, FEUSSNER I. Wax biosynthesis in response to danger: Its regulation upon abiotic and biotic stress [J]. New Phytol, 2020, 227(3): 698–713.

- [7] GZBLER FM, SMILANICK JL, MANSOUR, M, et al. Correlations of morphological, anatomical, and chemical features of grape berries with resistance to *Botrytis cinerea* [J]. Phytopathology, 2003, 93: 1263–1273.
- [8] ZHU M, JI J, WANG M, et al. Cuticular wax of mandarin fruit promotes conidial germination and germ tube elongation, and impairs colony expansion of the green mold pathogen, *Penicillium digitatum* [J]. Postharvest Biol Technol, 2020, 169: 111296.
- [9] YIN Y, BI Y, CHEN SJ, et al. Chemical composition and antifungal activity of cuticular wax isolated from Asian pear fruit (cv. Pingguoli) [J]. Sci Hortic, 2011, 129(4): 577–582.
- [10] SILVA-MORENO E, BRITO-ECHEVERIA J, LOPEZ M, et al. Effect of cuticular waxes compounds from table grapes on growth, germination and gene expression in *Botrytis cinerea* [J]. Mircen J Appl Microbiol Biotechnol, 2016, 32: 1–6.
- [11] RID M, MARKHEISER A, HOFFMANN C, et al. Waxy bloom on grape berry surface is one important factor for oviposition of European grapevine moths [J]. J Pest Sci, 2018, 91: 1225–1239.
- [12] 赵晓敏. 库尔勒香梨采后衰老过程中蜡质层结构及组分变化的研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2015.
 ZHAO XM. Study on the change of wax layer structure and composition during postharvest senescence of Korla fragrant pear [D]. Urumqi: Xinjiang Agricultural University, 2015.
- [13] 王雨菲, 吕云皓, 宋昕昕, 等. 木纳格葡萄表皮蜡质提取工艺优化及其 成分分析[J]. 食品工业科技, 2023, 44(3): 221–229.
 WANG YF, LV YH, SONG XX, *et al.* Optimization of extraction technology and composition analysis of cuticle wax of Mu Na Ge grape [J]. Food Ind Sci Technol, 2023, 44(3): 221–229.
- [14] 李珍慈, 江英, 秦婕, 等. 库尔勒香梨表皮蜡质提取条件研究及成分分析[J]. 中国酿造, 2016, 35(4): 158–162.
 LI ZC, JIANG Y, QIN J, *et al.* Study on extraction conditions and composition analysis of cuticle wax of Korla fragrant pear [J]. China Brew, 2016, 35(4): 158–162.
- [15] 王月.不同温湿度条件下香梨蜡质的变化及与耐贮性关系的研究[D]. 石河子:石河子大学,2021.
 WANG Y. Study on the change of wax content of fragrant pear under different temperature and humidity conditions and its relationship with storage resistance [D]. Shihezi: Shihezi University, 2021.
- [16] DING S, ZHANG J, YANG L, et al. Changes in cuticle components and morphology of 'Satsuma' Mandarin (*Citrus unshiu*) during ambient storage and their potential role on *Penicillium digitatum* infection [J]. Molecules, 2020. DOI: 10.3390/molecules25020412
- [17] YANG Y, ZHOU B, ZHANG J, et al. Relationships between cuticular waxes and skin greasiness of apples during storage [J]. Postharvest Biol Technol, 2017, 131: 55–67.
- [18] MORENO FC, CEGRI AC, MUNOZ RJ, et al. Changes in morphology, metabolism and composition of cuticular wax in zucchini fruit during postharvest cold storage [J]. Front Plant Sci, 2021. DOI: 10.3389/ fpls.2021.778745
- [19] HUANG H, WANG L, QIU D, et al. Changes of morphology, chemical compositions, and the biosynthesis regulations of cuticle in response to chilling injury of banana fruit during storage [J]. Front Plant Sci, 2021, 12: 792384.
- [20] YANG L, QIIU L, LIU D, et al. Changes in the crystal morphology, chemical composition and key gene expression of 'Suichuan' kumquat cuticular waxes after hot water dipping [J]. Sci Hortic, 2022, 1: 293.

- [21] DAVIES KA, LORONO ID, FOSTER SJ, et al. Evidence for a role of cutinase in pathogenicity of *Pyrenopeziza brassicae* on brassicas [J]. Physiol Mol Plant Pathol, 2000, 57(2): 63–75.
- [22] CHU W, GAO H, CAO S, et al. Composition and morphology of cuticular wax in blueberry (*Vaccinium* spp.) fruits [J]. Food Chem, 2018, 253: 322–322.
- [23] CHAI Y, LI A, SU CW, et al. Cuticular wax composition changes of 10 apple cultivars during postharvest storage [J]. Food Chem, 2020, 324: 126903.
- [24] HUANG H, WANG L, XIANG X, et al. Morphological, chemical, and biosynthetic changes in pericarp waxes in response to the browning of litchi fruit during storage [J]. Postharvest Biol Technol, 2022, 1: 111968.
- [25] YANG L, HU W, LIU D, et al. Comparative analysis of the crystal morphology, chemical composition and key gene expression between two kumquat fruit cuticular waxes during postharvest cold storage [J]. Postharvest Biol Technol, 2023, 206: 112550.
- [26] DIMOPOULOS N, TINDJAU R, WONG DCJ, et al. Drought stress modulates cuticular wax composition of the grape berry [J]. J Exp Bot, 2020, 71(10): 3126–3141.
- [27] JIANG B, LIU RL, FANG XJ, et al. Botrytis cinerea infection affects wax composition, content and gene expression in blueberry fruit [J]. Postharvest Biol Technol, 2022, 192: 112020.
- [28] LIU GS, LI HL, PENG ZZ, et al. Composition, metabolism and postharvest function and regulation of fruit cuticle: A review [J]. Food Chem, 2023: 135449.
- [29] LI N, FU L, SONG Y, et al. Wax composition and concentration in jujube (Ziziphus jujuba Mill.) cultivars with differential resistance to fruit cracking [J]. J Plant Physiol, 2020, 255: 153294.
- [30] DONG XQ, RAO JP, HUBER DJ, et al. Wax composition of 'Red Fuji' apple fruit during development and during storage after 1-methylcyclopropene treatment [J]. Hortic Environ Biotechnol, 2012, 53(4): 288–297.
- [31] WANG JQ, HAO HH, LIU RS, et al. Comparative analysis of surface wax in mature fruits between Satsuma mandarin (*Citrus unshiu*) and 'Newhall' navel orange (*Citrus sinensis*) from the perspective of crystal morphology, chemical composition and key gene expression [J]. Food Chem, 2014, 153: 177–185.
- [32] LIU RL, ZHANG LP, XIAO SY, et al. Ursolic acid, the main component of blueberry cuticular wax, inhibits *Botrytis cinerea* growth by damaging cell membrane integrity [J]. Food Chem, 2023, 415: 135753.

(责任编辑: 于梦娇 韩晓红)



为果蔬加工与贮藏。 E-mail: 1477627884@qq.com

韩 彤,硕士研究生,主要研究方向

