

硫化氢熏蒸对无核白葡萄采后 细胞壁及病害的影响

张琼琼¹, 魏佳², 张健², 张磊³, 吴斌^{2,*}

(1.新疆农业大学食品科学与药学学院, 新疆乌鲁木齐 830052;

2.新疆农业科学院农产品贮藏加工研究所, 新疆乌鲁木齐 830091;

3.赣州市产品质量监督检验所, 江西赣州 341000)

摘要:为了研究硫化氢(H₂S)熏蒸对无核白葡萄采后细胞壁相关酶活性及其基因表达的影响,以新疆吐鲁番的无核白葡萄为试材,筛选出500 μL/L H₂S对无核白葡萄进行熏蒸。在常温下放置24 h后,进行黑曲霉损伤接种。定期取样分析测定葡萄果实细胞壁相关酶及其基因表达。结果表明:在整个贮藏期间,500 μL/L H₂S熏蒸可以延缓原果胶含量、β-1,3葡聚糖酶活性和几丁质酶活性的下降;H₂S可以抑制病斑的扩大、病情指数、果胶酶活性和相对电导率的上升;诱导葡萄果实中*VvPR-4*和*VvGLU*基因的上调表达,可以诱导前期*VvCHT*基因的上调表达。表明H₂S熏蒸能够保护细胞壁的完整性,增强其抗病性,从而延长贮运期。

关键词:硫化氢,无核白葡萄,细胞壁,酶活性,病害

Effect of Hydrogen Sulfide Fumigation on Cell Wall and Disease of Postharvest Thompson Seedless Grape

ZHANG Qiong-qiong¹, WEI Jia², ZHANG Jian², ZHANG Lei³, WU Bin^{2,*}

(1.College of Food Science and Pharmacy, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China;

2.Institute of Agro-products Storage and Processing, Xinjiang Academy of Agricultural Science, Urumqi 830091, China;

3.Institute of Ganzhou Product Quality Supervision and Inspection, Ganzhou 341000, China)

Abstract: In order to study the effect of hydrogen sulfide(H₂S) fumigation on the cell wall-related enzyme activities and gene expression of post-harvest grape, the Thompson seedless of Turpan in Xinjiang was used as test material, 500 μL/L H₂S was used to fumigate the grapes every day for 5 times in all. After being placed at room temperature for 24 h, the grapes were inoculated by aspergillus niger. Regular sampling and analysis were carried out to determine the cell wall-related enzyme activities and gene expression of grape fruit. The results showed that 500 μL/L H₂S fumigation could delay the decrease of pectin content, β-1,3 glucanase activity and chitinase activity during the whole storage period. H₂S could inhibit the increase of the enlargement of diseased spots, disease index, pectinase activity and relative conductance as well. The expression of *VvPR-4* and *VvGLU* genes and the early expression of *VvCHT* gene in grape fruit could be induced by H₂S. It indicated that H₂S fumigation could protect the integrity of the cell wall and enhance its disease resistance, thus prolonging the storage and transportation period of postharvest grapes.

Key words: hydrogen sulfide; Thompson seedless; cell wall; enzyme activities; disease

中图分类号: TS 文献标识码: A 文章编号: 1002-0306(2020)13-0277-07

doi:10.13386/j.issn1002-0306.2020.13.044

引文格式: 张琼琼, 魏佳, 张健, 等. 硫化氢熏蒸对无核白葡萄采后细胞壁及病害的影响[J]. 食品工业科技, 2020, 41(13): 277-283.

无核白葡萄(*Vitis vinifera* L. cv *Thompson Seedless*)是新疆吐鲁番地区的主栽品种。果实呈椭圆形,黄绿色。因其含大量的糖、有机酸、蛋白质、矿物质及维生素等多种营养物质,具有很高的营养和

食疗价值,深受消费者喜爱。但无核白葡萄皮薄汁多,在采后贮藏中易受到机械损伤和病原菌侵染,贮运不当,会引起果实大量腐烂,造成巨大的经济损失^[1]。无核白葡萄果实采后贮藏中出现的问题,可能

收稿日期:2019-09-03

作者简介:张琼琼(1995-),女,硕士研究生,研究方向:果蔬采后生理及贮藏技术,E-mail:2538852568@qq.com。

*通讯作者:吴斌(1973-),男,博士,研究员,研究方向:农产品贮藏与加工,E-mail:42042615@qq.com。

基金项目:国家自然科学基金(31860460)。

是由于果实细胞壁在外界环境的刺激下引起的。

细胞壁反映了细胞形态的变化,细胞壁物质降解及其结构破坏都会导致果实软化^[2]。果蔬采后的贮藏寿命及食用品质与其细胞壁组成的变化密切相关。在贮藏前期,葡萄果实中水分含量较高,原果胶与细胞壁紧密结合,细胞膨压较高,果实组织较坚硬。到了后期,果胶酶将原果胶分解成可溶性果胶并在渗透压作用下进入细胞液,而水分不断流失,细胞膨压下降,导致果实软化^[3]。果实细胞壁结构和组成的变化是多种水解酶共同作用的结果^[4-5]。软化后的果实易受到机械损伤和病原菌侵染,大大缩短贮藏时间^[6]。因此,分析果实细胞壁在贮藏期间的变化十分必要。

硫化氢(Hydrogen sulfide, H₂S)是近年来备受关注的一种与一氧化氮(Nitric oxide, NO)和一氧化碳(Carbon monoxide, CO)相似的新型气体信号分子^[7]。H₂S能够参与调节植物生长发育、增强植物生物和非生物抗逆性、延缓植物衰老等多种生理功能^[8]。汪伟等^[9]发现H₂S处理延长了桃果实的贮藏品质,延缓了相对电导率的上升和硬度的下降,抑制了果胶酯酶(Pectin esterase, PE)、多聚半乳糖醛酸酶(Polygalacturonase, PG)活性,从而延缓果实成熟衰老和软化。H₂S还能延缓猕猴桃营养物质的降解,保持较低的PG活性,从而延缓果实的成熟衰老进程^[10]。H₂S处理多采用液体或化学反应方式进行保鲜处理,操作过程比较复杂,不易规模化应用。采用H₂S气体熏蒸方式可以精准控制熏蒸浓度、易规模化应用。然而H₂S气体熏蒸对采后细胞壁相关酶活性及其基因在葡萄组织中表达的研究鲜有报道。

因此,本实验研究了H₂S熏蒸对无核白葡萄采后抗病过程中细胞壁代谢及其基因的影响,以期为H₂S在果蔬贮藏保鲜中的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

无核白葡萄 2018年7月25日采摘于吐鲁番,挑选大小均一、无机械损伤、无病虫害的葡萄果实,采后立即运往(0±1)℃实验室冷库,预冷24 h; **丙酮、乙醇** 天津市北联精细化学品开发有限公司; **昆布多糖、羧甲基纤维素钠、3,5-二硝基水杨酸、蜗牛酶、甲壳素** 上海源叶生物科技有限公司; **羟胺盐酸** 天津市致远化学试剂有限公司; H₂S(气体纯度99.99%) 广州视源气体有限公司。

DELTA320分析天平 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司; **SIM-F140ADL制冰机** 日本松下电器; **UV-2600型分光光度计** 日本岛津; **DW-86L626 80℃超低温冰箱** 青岛海尔特种电器有限公司; **Centrifuge 5810 R型高速冷冻离心机** 德国Eppendorf公司; **UVITEC Firereadear 凝胶成像系统** 英国UVITEC Firereadear公司; **DYY-6D核酸电泳仪** 北京市六一仪器厂; **Biometra PCR仪** 德国耶拿分析仪器公司; **Lightcyler® 96 荧光定量仪** 罗氏公司; **LDZX-50KBS压力蒸汽灭菌器** 上海申安医疗器械有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 样品处理 参考张磊等^[11]的方法。将葡萄随机分成6份,每份约重0.5 kg,置于30 L的熏蒸装置中。在课题组前期实验的基础上,选择适宜的H₂S熏蒸浓度500 μL/L。在常温下采用500 μL/L H₂S熏蒸3 h后取出,每隔24 h熏蒸一次,共熏蒸5次。同时以熏蒸装置中不充入H₂S气体为对照。每次熏蒸结束后,将处理后的葡萄果实置于25℃、相对湿度(RH)95%条件下贮藏。放置24 h后,每盒随机选取15颗葡萄进行黑曲霉损伤接种。接种后将葡萄果粒分装到有6个孔(直径1 cm)的PE包装盒中,盒内上下衬吸水纸,密闭后套上保鲜袋置于25℃下贮藏6 d(果实在第6 d腐烂严重,故取样至第5 d),每24 h观测果粒的病情指数和病斑直径。同时避开果实病斑,取健康果肉样品,切碎混匀呈块状,用液氮速冻并置于-80℃保存待测,每处理重复3次,取平均值。

1.2.2 病情指数和病斑直径的测定 果粒的病情指数参照吴斌^[12]的方法。果粒的病斑直径使用游标卡尺进行十字交叉法测定。

$$\text{病情指数 DI} = \frac{\sum \text{相应级别病果的个数} \times \text{病情级数}}{\text{最高级数} \times \text{果实总个数}}$$

1.2.3 可溶性果胶、原果胶含量的测定 果肉中可溶性果胶含量、原果胶含量的测定参照硫酸咔唑比色法^[13]。可溶性果胶的提取:取0.5 g样品置于研钵中,向其加入乙醇(25 mL 95%),研磨成匀浆,转入离心管。再用沸水浴加热30 min,取出冷却至室温,离心(8000 r/min 15 min),倒去上清液,保留沉淀物。向其加入20 mL蒸馏水,在50℃水浴中放置30 min,溶解果胶。待其取出冷却至室温后,8000 r/min离心15 min,将上清液移入100 mL容量瓶中,用少量蒸馏水洗涤沉淀,离心后,转入到容量瓶中,加蒸馏水至刻度,为可溶性果胶。原果胶的提取:向提取可溶性果胶后,保留在离心管的沉淀物中,加入25 mL 0.5 mol/L硫酸溶液,在沸水浴中加热1 h,水解原果胶。加热到时间,取出冷却至室温后,在8000 r/min条件下离心15 min,将上清液移入100 mL容量瓶中,并用蒸馏水定容至刻度。反应体系包括:1.0 mL提取液、6.0 mL浓硫酸、0.2 mL 0.15% 咔唑-乙醇溶液。根据溶液吸光度值,在标准曲线上查出相应的半乳糖醛酸微克数,按以下公式计算果蔬组织中果胶含量:

$$\text{可溶性果胶含量}(\%) = \frac{C \times V}{V_s \times W \times 10^6} \times 100$$

$$\text{原果胶含量}(\%) = \frac{C \times V}{V_s \times W \times 10^6} \times 100$$

式中:C:从标准曲线查得半乳糖醛酸量,μg; V:样品提取液总体积,mL; V_s:测定时所取样品提取液体积,mL; W:样品重量,g。

1.2.4 果胶酶、纤维素酶活性的测定 参照曹建康等^[13]的方法。果胶酶的测定:随机称取5 g样品,加入20 mL经预冷的95%乙醇,在冰浴条件下研磨匀浆。转移到离心管中,低温放置10 min,在4℃、12000×g离心20 min。保留沉淀物,向其再加入

10 mL预冷的80%乙醇,振荡,低温放置10 min,然后在相同条件下离心。再倒去上清液,向沉淀物中加入5 mL经预冷的提取缓冲液,于4℃放置提取20 min,再经过离心后收集上清液即为酶提取液。反应体系包括:1.0 mL 50 mmol/L、醋酸钠缓冲液(pH5.5),0.5 mL 1%多聚半乳糖醛酸溶液,0.5 mL酶提取液和1.5 mL 3,5-二硝基水杨酸试剂。然后测定反应混合液在540 nm处的OD值。纤维素酶的提取方法同果胶酶,反应体系包括:1.5 mL 1% CMC溶液,0.5 mL酶提取液,1.5 mL 3,5-二硝基水杨酸试剂。然后测定反应混合液在540 nm处的OD值。纤维素酶活性以每小时每克鲜重(FW)果蔬组织样品在37℃催化羧甲基纤维素水解形成还原糖的微克数表示,即 $\mu\text{g}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}\text{FW}$ 。

1.2.5 β -1,3葡聚糖酶、几丁质酶活性的测定 β -1,3葡聚糖酶参照 Mauch 等^[14]的方法,略有改动。 β -1,3葡聚糖酶的测定:总反应液体积为250 μL :酶溶液、0.5 mg昆布多糖、5 μmol 醋酸钠缓冲液(pH5.5)和50 μg 牛血清白蛋白。在37℃保温20 min后,测定已释放的还原糖量。

几丁质酶的测定:参照曹建康等^[13]的方法。结果以每秒钟每克鲜重样品中酶分解胶状几丁质产生 $1\times 10^{-9}\text{mol}$ N-乙酰葡萄糖胺为一个几丁质酶活性单位(U), $U=1\times 10^{-9}\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}\text{FW}$ 表示。

1.2.6 相对电导率的测定 参照许静等^[15]的方法并修改。选取大小一致的果粒60 g($\pm 0.5\text{g}$),放在500 mL烧杯中,往其中加200 mL蒸馏水,在常温下浸泡12 h,用电导仪测定电导率值 P_0 ;然后沸水浴加热30 min,冷却至室温后,测定总电导率值 P_1 。相对电导率($\%$)= $(P_0/P_1)\times 100$ 。

1.2.7 相关基因的表达分析

1.2.7.1 葡萄总RNA的提取 无核白葡萄组织部位中总RNA的提取参考 Zhang 等^[16]和 Zou 等^[17]的方法,略有改动。

1.2.7.2 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 取8 μL RNA溶液加入2 μL 6 \times loading buffer,混匀。点入1.0%琼脂糖凝胶中,在120 V,25 min条件下鉴定RNA的完整性。

1.2.7.3 总RNA的完整性检测 取1 μL RNA溶液稀释50倍,置于核酸蛋白测定仪中,分别测定RNA在230、260和280 nm处的吸光值。

1.2.7.4 第一链cDNA的合成 a.将提取的葡萄果肉RNA作为模板,使用天根公司的“TIANScrip RT Kit”试剂盒合成第一链cDNA。方法如表1:

表1 反转录体系

试剂	用量(μL)
RNA 溶液	4
Spure dNTPs Mixture(2.5 mmol/L each)	2
Oligo(dT) ₁₅ Primer	2
Rnase Free ddH ₂ O	6.5
5 \times First-strand Buffer	4
RNase Inhibitor(40 U/ μL)	0.5
M-MLV Reverse Transcriptase	1
Total	20

b.42℃反应50 min,转入95℃水浴5 min终止反应。将合成的第一链cDNA于-80℃保存。

1.2.7.5 葡萄抗病酶相关基因cDNA片段扩增 采用 DNAMAN 6.0 根据 GeneBank 中上传的 *VvGLU*、*VvCHT*、*VvPR-4*、氨基酸保守序列设计引物,送往生物公司合成。所用引物均用 DEPC-H₂O 溶解,稀释至10 mmol/L。

PCR 扩增体系如表3:

表3 PCR 扩增反应体系

试剂	用量(μL)
10 \times Taq Buffer	4
dNTP(2.5 mmol/L each)	2
ddH ₂ O	15.75
Forward primer	0.5
Reverse primer	0.5
cDNA	2
Taq DNA Polymerase(2.5 U/ μL)	0.25
Total	25

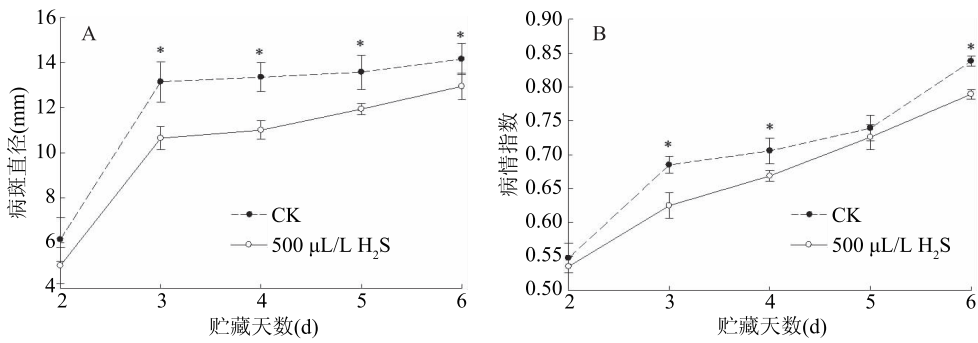
1.2.7.6 葡萄抗病酶相关基因荧光定量表达 以适当稀释后的各贮藏天数葡萄组织cDNA为模板,具体反应体系如表4:

点样时,每组3个平行、3个对照。每个体系反应完成后得到一个Ct值,目的基因相对于参照基因 *Actin* 的转录表达量,计算公式为 $X=2^{-\Delta\Delta\text{Ct}[18]}$ 。

表2 无核白葡萄抗病酶相关基因引物序列

Table 2 Primer sequences of disease-free enzyme-related genes in grape

基因	登录号	名称	引物序列(5'-3')	退火温度(℃)
<i>VvGLU</i>	NM_001281224.1	<i>GLU-F</i>	TGCTGTTFACTCGGCACCTTG	55
		<i>GLU-R</i>	CTGGGGATTTCCTGTTCTCA	
<i>VvCHT</i>	NM_0012809621	<i>CHT-F</i>	GACAGCCTTCTGGTTCTGGATGAC	59
		<i>CHT-R</i>	CTGCTGACCTATCTGCACCTGATG	
<i>VvPR-4</i>	XM_002264611.4	<i>PR-4-F</i>	CATGGTGGCGGTGCTGCTATC	59
		<i>PR-4-R</i>	GCCGTTGTTCCGCAGTAGCC	
<i>VvActin</i>	XM_002279636.3	<i>Actin-F</i>	GATTCTGCTGATGCTGTGAGT	
		<i>Actin-R</i>	GACAATTTCCCGTTCAGCAGT	

图1 H₂S处理对葡萄病斑直径(A)和病情指数(B)的影响Fig.1 Effect of H₂S treatment on grape lesion diameter(A) and disease index(B)

注: *表示相同贮藏时间下差异显著($P < 0.05$), **表示极显著($P < 0.01$)。图2~图6同。

表4 qPCR反应体系

Table 4 qPCR reaction system

试剂	用量(μL)
FastStart Essential DNA Green Master	12.5
H ₂ O	9.5
Forward primer	0.5
Reverse primer	0.5
cDNA	2
Total	25

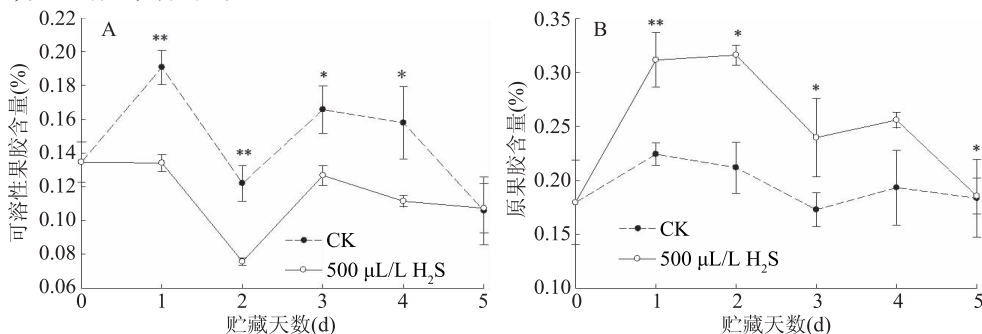
1.3 数据处理

使用Sigma Plot 12.0软件作图,SPSS 19.5进行数据方差分析并利用Duncan法进行均值比较。 $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著。

2 结果与分析

2.1 H₂S处理对葡萄果实病斑直径和病情指数的影响

如图1A所示,在贮藏过程中,H₂S处理组果实的病斑直径始终低于对照果实。在25℃条件下贮藏至第3d,H₂S处理组和对照组葡萄果实的病斑直径分别为11.0和13.4 mm($P < 0.05$)。说明H₂S处理可显著抑制果实病斑的扩大。如图1B所示,在贮藏期间,葡萄果实的病情指数呈不断上升趋势。H₂S处理的病情指数始终低于对照组。在25℃条件下贮藏6d后,H₂S处理组果实病情指数为0.79,显著低于对照组的0.83($P < 0.05$)。说明H₂S处理能够有效抑制病情指数的上升。可能是由于H₂S维持了细胞壁的完整性,从而增强其抗性。

图2 H₂S处理对葡萄可溶性果胶(A)和原果胶含量(B)的影响Fig.2 Effect of H₂S treatment on the content of soluble pectin(A) and raw pectin(B) in grape

2.2 H₂S处理对葡萄果实可溶性果胶和原果胶含量的影响

在贮藏过程中,细胞壁酶可以水解果胶和细胞壁物质,生成水溶性果胶,导致果实硬度下降^[19]。果实软化过程中,会出现原果胶降解的现象,从而引起果实软化^[20]。由图2A可知,整个贮藏过程中,H₂S处理组可溶性果胶含量始终低于对照组,H₂S处理组第一次高峰出现在贮藏第1d,随后可溶性果胶含量快速下降。在贮藏3d时,对照组和H₂S处理组可溶性果胶含量都达到峰值。同时,对照组果实中的可溶性果胶含量比H₂S处理组高23.53% ($P < 0.05$)。因此,H₂S处理可以加速可溶性果胶的水解。由图2B可知,随着贮藏时间的延长,葡萄果实中原果胶含量总体呈先上升后下降趋势。对照组在整个贮藏期间,葡萄果实原果胶含量基本保持稳定,而H₂S处理组在贮藏初期,葡萄果实中原果胶含量迅速增加,随后呈下降趋势。在整个贮藏期间,H₂S处理组原果胶的含量始终高于对照组,在贮藏至1~2d时,H₂S处理组的原果胶含量分别是对照果实的1.41和1.52倍。说明H₂S处理可以延缓葡萄果实贮藏过程中原果胶含量的下降,并使其维持较高状态。与张群等^[21]对葡萄的研究结果一致。

2.3 H₂S处理对葡萄果实果胶酶、纤维素酶活性的影响

由图3A可知,在贮藏期间,对照组果胶酶活性呈先上升后下降的趋势,而H₂S处理组果胶酶活性基本保持稳定。与朱丹实等^[22]在巨峰葡萄上的研究

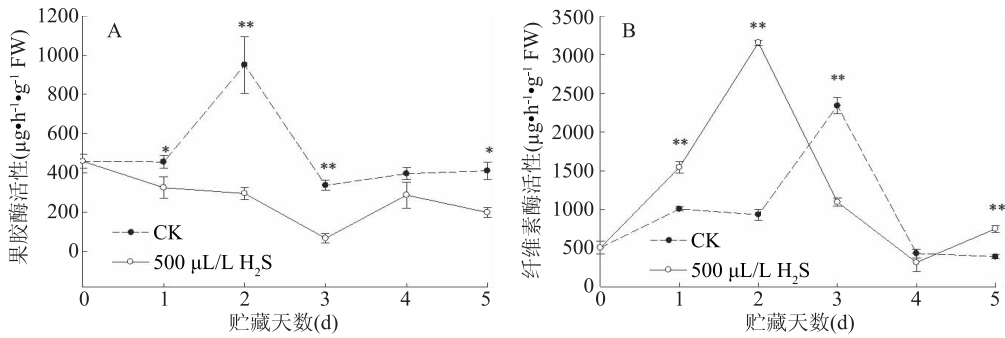


图3 H₂S处理对葡萄果胶酶(A)和纤维素酶活性(B)的影响

Fig.3 Effect of H₂S treatment on grape pectinase(A) and cellulase activities (B)

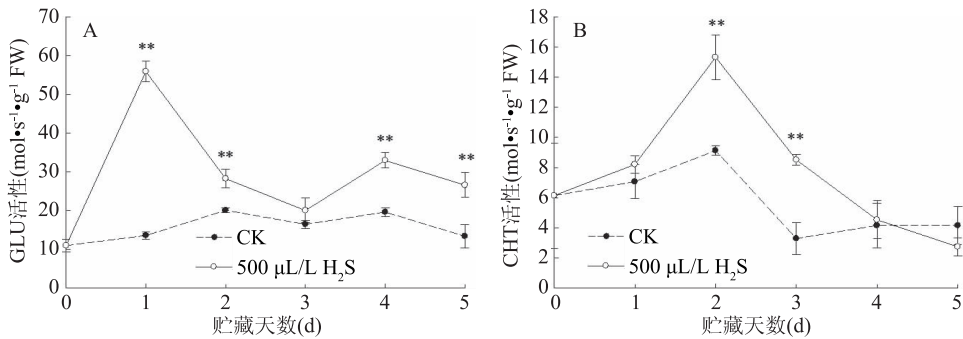


图4 H₂S处理对葡萄GLU(A)和CHT(B)活性的影响

Fig.4 Effect of H₂S treatment on grape GLU(A) activity and CHT(B) activity

结果相同。在第2 d时,对照组果胶酶活性快速上升,而H₂S处理组酶活性略微下降。此时对照组酶活性为H₂S处理组的3.21倍($P < 0.01$)。在整个贮藏期间,H₂S处理组果胶酶活性始终低于对照组,表明H₂S处理可以抑制葡萄果实果胶酶活性的上升。

纤维素酶(Cx)在不同种类果实的软化过程中起着不同的作用。研究发现在青梅^[23]等果实软化中起主要作用。王秀^[24]在对蓝莓采后细胞壁代谢酶活性变化与软化关系的研究中发现,Cx是引起蓝莓果实软化的关键酶,对其贮藏后期软化有促进作用。如图3B所示:贮藏前2 d,H₂S处理组纤维素酶活性极显著高于对照组($P < 0.01$),随后,对照组纤维素酶活性开始上升,而H₂S处理组酶活性迅速下降。贮藏至第3 d时,对照组和H₂S处理组纤维素酶活性分别为2339.96和1095.02 $\mu\text{g}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$,对照组酶活性是H₂S处理组的2.14倍($P < 0.01$)。第5 d时,H₂S处理组纤维素酶活性仍高于对照组,表明H₂S处理对葡萄纤维素酶活性的抑制作用不明显。可能是由于病原菌能大量产细胞壁降解酶,一经侵染葡萄就能快速降解葡萄细胞壁,破坏葡萄防御能力,造成葡萄腐烂。

2.4 H₂S处理对葡萄果实 β -1,3-葡聚糖和几丁质酶活性的影响

β -1,3-葡聚糖酶(GLU)和几丁质酶(CHT)能水解病原菌细胞壁中的 β -1,3-葡聚糖和几丁质,从而破坏病原菌细胞壁,杀死病原菌,防止对植物的侵染能力^[25]。如图4A所示,在贮藏期间,对照组 β -1,3-葡聚糖酶(GLU)活性变化较为平稳。H₂S处理组GLU活性在接菌后第1 d达到最高峰55.89 $\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$,是

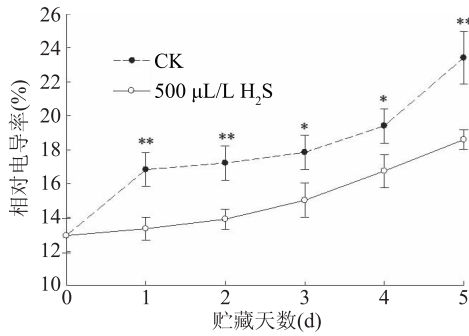
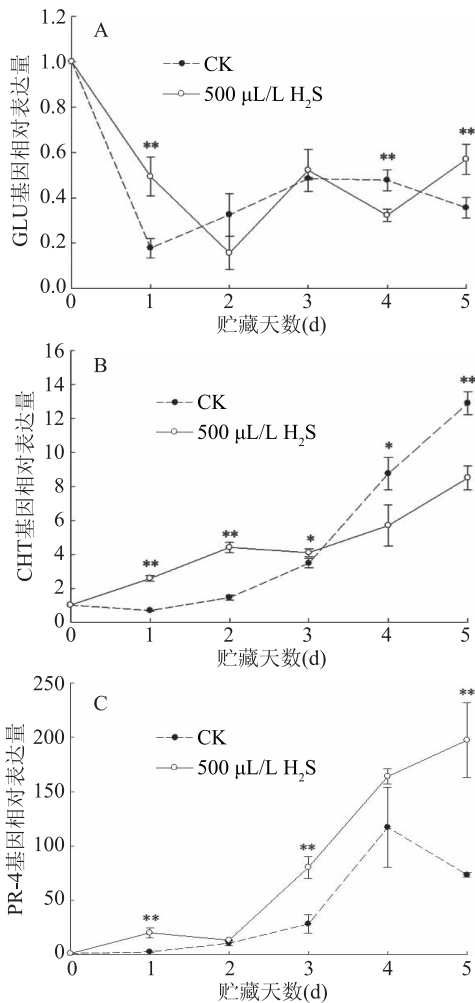
对照组的4.12倍($P < 0.01$),随后H₂S处理组GLU活性迅速下降,至病害观察后期,H₂S处理组GLU活性依然远远高出对照。整体趋势与黄锐^[26]在热处理对葡萄的研究结果相似。如图4B所示,各处理几丁质酶(CHT)活性均呈先升高后降低的趋势,2 d达到最大值,其中H₂S处理组的最大值为15.31 $\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$,是对照的1.68倍($P < 0.01$)。说明H₂S处理可提高葡萄果实CHT的活性。整体趋势与张畅^[27]对桃、王凤超^[28]对无核白葡萄的研究结果相同。

2.5 H₂S处理对葡萄果实相对电导率的影响

相对电导率的高低表示果肉组织膜透性的大小^[29]。随着果实的软化,细胞膜透性扩大。由图5可知,在整个贮藏过程中,H₂S处理组的相对电导率始终低于对照组,在第4~5 d时,对照组相对电导率分别是H₂S处理组的1.16和1.26倍。试验结果与汪伟^[9]对桃,许静等^[15]用氧化亚氮(N₂O)在木纳格葡萄中的研究结果相同。说明H₂S可能在一定程度上抑制了果实的自身氧化,避免细胞的自我损伤,减少了细胞膜的离子渗透,从而保护了细胞膜的完整性。

2.6 H₂S处理对葡萄果实VvGLU、VvCHT、VvPR-4基因荧光表达量的影响

如图6A所示,果实熏蒸处理后,VvGLU基因相对表达量开始下降。贮藏至1 d时,H₂S处理组VvGLU基因的相对表达量极显著高于对照组($P < 0.01$)。贮藏至2~3 d时,对照组VvGLU基因的相对表达量与H₂S处理组无明显差异。贮藏至4 d时,对照组VvGLU基因的相对表达量高于H₂S处理组。可见在2~4 d,H₂S对葡萄GLU基因调控效果并不明

图5 H₂S处理对葡萄相对电导率的影响Fig.5 Effect of H₂S treatment on relative conductivity of grapes图6 H₂S处理对葡萄VvGLU(A)、VvCHT(B)、VvPR-4(C)基因荧光表达量的影响Fig.6 Effect of H₂S treatment on the fluorescence expression of VvGLU(A), VvCHT(B) and VvPR-4(C) genes in grape

显。但在贮藏至第5 d时, H₂S处理组GLU基因相对表达量是对照组的1.6倍($P < 0.01$)。如图6B所示, 经H₂S处理后的葡萄果实中VvCHT基因上调表达。贮藏1~3 d时, H₂S处理组VvCHT基因的相对表达量显著高于对照组($P < 0.05$)。但贮藏至第4、5 d时, 对照组VvCHT基因的相对表达量显著高于H₂S处理组($P < 0.05$)。说明后期H₂S对葡萄VvCHT基因调

控效果并不明显。如图6C所示, 整个贮藏期间, H₂S处理组VvPR-4基因的表达量始终高于对照组。贮藏至第1、3、5 d时, H₂S处理组VvPR-4基因的表达量极显著高于对照组($P < 0.01$)。说明H₂S处理诱导了VvPR-4基因的上调表达。以上试验结果与韦莹莹^[20]发现绿熟期樱桃番茄中PR蛋白基因LeCHT和LeGLU的上调表达, 提高了果实抗病防御酶活性, 从而增强果实的抗病性研究结果相类似。

3 结论

在25℃的温度条件下, 采用500 μL/L H₂S对无核白葡萄间歇熏蒸, 可以加速可溶性果胶的水解、抑制原果胶含量、β-1,3葡聚糖酶活性、几丁质酶活性的下降, 抑制病斑直径的扩大、病情指数、果胶酶活性、相对电导率的上升, 诱导VvPR-4、VvGLU基因的上调表达; 同时诱导前期VvCHT基因的上调表达。通过以上研究表明, 500 μL/L H₂S熏蒸处理有利于保持无核白葡萄的细胞壁的完整性, 提高其抗病性, 从而延长了采后的贮藏期, 为H₂S在果蔬贮藏保鲜中的应用提供了一定的理论依据。然而H₂S处理对无核白葡萄采后抗病的分子机制需进一步研究。

参考文献

- [1] 兰杰, 李学文, 杨婷婷, 等. 1-MCP结合ClO₂处理对无核白葡萄短期冷藏及货架期品质的影响[J]. 食品工业科技, 2014, 35(14): 347-350.
- [2] 朱丹实. 葡萄采后软化机制及风味劣变的研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2014.
- [3] Ali Z M, Chin L H, Lazan H. A comparative study on wall degrading enzymes, pectin modifications and softening during ripening of selected tropical fruits[J]. Plant Science, 2004, 167(2): 317-327.
- [4] Barnavon L, Doco T, Terrier N, et al. Analysis of cell wall neutral sugar composition, β-galactosidase activity and a related cDNA clone throughout the development of *Vitis vinifera* grape berries[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2000, 38(4): 289-300.
- [5] Ortiz A, Seymour G B, Tucker G A, et al. Cell wall disassembly during the melting phase of softening in 'Snow Queen' nectarines[J]. Postharvest Biology and Technology, 2010, 58(2): 88-92.
- [6] 朱树华, 刘孟臣, 周杰. 一氧化氮熏蒸对采后肥城桃果实细胞壁代谢的影响[J]. 中国农业科学, 2006, 39(9): 1878-1884.
- [7] 郭鸿鸣, 肖天宇, 谢彦杰. 气体信号分子硫化氢在植物中的生理功能及作用机制[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2016, 32(5): 488-495.
- [8] 汪伟, 张伟, 朱丽琴, 等. 植物硫化氢生理效应及机制研究进展[J]. 中国农学通报, 2013, 29(31): 78-82.
- [9] 汪伟. NO和H₂S抑制采后桃果实软化机理研究[D]. 南昌: 江西农业大学, 2014.
- [10] 李智荣. 硫化氢和乙烯调节果蔬成熟衰老的信号机制研究[D]. 合肥: 合肥工业大学, 2016.

- [11] 张磊, 魏佳, 张政, 等. 硫化氢(H₂S)熏蒸对损伤接种黑曲霉的抑制和葡萄采后品质的影响[J]. 现代食品科技, 2018, 34(7): 95-102.
- [12] 吴斌. 小分子气体对几种南方水果采后品质劣变的调控作用及其机理[D]. 广州: 华南农业大学, 2011.
- [13] 曹建康, 姜微波, 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.
- [14] Mauch F, Mauchmani B, Boller T. Antifungal hydrolases in pea tissue: II. inhibition of fungal growth by combinations of chitinase and beta-1,3-glucanase[J]. Plant Physiology, 1988, 88(3): 936-942.
- [15] 许静, 张磊, 魏佳, 等. 氧化亚氮(N₂O)熏蒸对木纳格葡萄贮藏品质的影响[J]. 现代食品科技, 2018, 34(5): 56-61, 46.
- [16] Zhang Y, Zhang J, Song T, et al. Low medium pH value enhances anthocyanin accumulation in malus crabapple leaves[J]. Plos One, 2014, 9(6): e97904.
- [17] Zou X, Song E, Peng A, et al. Activation of three pathogen-inducible promoters in transgenic citrus (*Citrus sinensis* Osbeck) after *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* infection and wounding[J]. Plant Cell Tissue & Organ Culture, 2014, 117(1): 85-98.
- [18] Kenneth J, Livak T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} method[J]. Method, 2001(25): 402-408.
- [19] 张海新, 宁久丽, 及华. 果实采后品质和生理变化研究进展[J]. 河北农业科学, 2010, 14(2): 54-56.
- [20] 韦莹莹. 热空气结合罗伦隐球酵母处理诱导樱桃番茄果实采后抗病性的研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2016.
- [21] 张群, 周文化, 谭欢, 等. 葡萄果肉组织的能量水平和细胞壁代谢对其自溶软化的影响[J]. 食品科学, 2018, 39(1): 264-272.
- [22] 朱丹实, 梁洁玉, 曹雪慧, 等. 巨峰葡萄低温贮藏过程中主要多糖降解酶活性变化的研究[J]. 食品工业科技, 2014, 35(4): 333-335, 339.
- [23] 陆胜民, 席玛芳, 张耀洲. 梅果采后软化与细胞壁组分及其降解酶活性的变化[J]. 中国农业科学, 2003, 36(5): 595-598.
- [24] 王秀. 蓝莓果实采后软化与细胞壁代谢关系研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2014.
- [25] 白羽嘉, 张培岭, 黄伟, 等. 链格孢菌侵染采后甜瓜果肉组织几丁质酶和β-1,3-葡聚糖酶基因表达分析[J]. 食品科学, 2018, 39(2): 185-191.
- [26] 黄锐. 热处理对葡萄采后保鲜效果及其机理的研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2009.
- [27] 张畅. 硫化物对桃果实抗病性和成熟衰老的调控作用研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2016.
- [28] 王凤超. 二氧化硫处理对鲜食葡萄贮藏病害及生理的影响[D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2013.
- [29] 曹永庆, 曹艳平, 李壮, 等. 采前喷钙对溶质桃采后贮藏品质及后熟软化的影响[J]. 中国农业大学学报, 2008(6): 31-36.

(上接第 276 页)

- [24] 张森, 张楚楚, 彭晶, 等. 微波处理对全麦粉及全麦生面团中 PPO 和微生物的抑制研究[J]. 中国粮油学报, 2014, 29(3): 7-10, 15.
- [25] Asenstorfer R E, Appelbee M J, Mares D J. Physical-chemical analysis of non-polyphenol oxidase darkening in yellow alkaline noodles[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009 57(12): 5556-5562.
- [26] 朱科学, 李洁, 李曼. 生鲜面和半干面的保鲜与品质调控研究进展[J]. 粮食加工, 2011, 36(1): 54-56.
- [27] 孙桐, 李华, 陆启玉, 等. 花色面条的加工与研究进展[J]. 粮食与油脂, 2017, 30(7): 9-12.
- [28] Li M, Zhu K X, Sun Q J, et al. Quality characteristics, structural changes and storage stability of semi-dried noodles induced by moderate dehydration: Understanding the quality changes in semi-dried noodles[J]. Food Chemistry, 2016, 194(194): 797-804.
- [29] 陈媛媛. 生鲜面条的贮藏保鲜技术研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2017.
- [30] 李运通. 生鲜面保鲜技术研发及应用[D]. 天津: 天津科技大学, 2017.

《食品工业科技》目前已被美国《化学文摘》CA、英国《食品科技文摘》FSTA、日本科学技术振兴机构数据库 JST、中国科学论文统计源 CSTPCD、北大核心期刊、RCCSE 中国核心学术期刊、中国生物医学文献服务系统 SinoMed 收录期刊、中国农业核心期刊、中国科技论文在线、中国知网、万方数据、重庆维普、超星、博看等国际、国内重要检索系统或数据库收录。

在 2019 年 9 月发布的《中国学术期刊影响因子年报(自然科学与工程技术·2019 版)》中, 期刊的影响力指数(CI 值)在全国“食品科学技术”51 种期刊中排名第 2; 在 2019 年 11 月发布的《中国科技核心期刊指标检索报告》中核心综合评价总分排名第 3。