

网络出版日期:2016-12-29
网络出版地址:http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1220.S.20161229.1008.030.html

不同葡萄品种对灰霉病菌胁迫的响应

姜彩鸽¹, 王国珍¹, 张 怡¹, 邵鹏梅²
(1. 宁夏农林科学院 植物保护研究所, 银川 750002;
2. 银川市西夏区镇北堡镇人民政府农技服务中心, 银川 750021)

摘 要 为了解贺兰山东麓不同主栽葡萄品种对灰霉病的感病程度, 依据不同品种抗性不同的分布特点制定相应的防治措施, 提高防治效果。对各葡萄品种的内含物—花青素、酚类物、糖分、总抗坏血酸(或维生素C)及维生素E分别采用锦葵色素标准品法、Arnow试剂法、直接滴定法、荧光法(或2,6-二氯酚滴定法)、高效液相色谱法进行检测。结果表明:发病果实的花青素等物质的质量分数与健康果实存在明显差异, 证明葡萄灰霉病的发生和花青素等物质有密切关系, 质量分数较高抗病性较强, 反之则弱; 依不同葡萄品种被灰霉病菌侵染后各内含物的降幅进行比较判断, 其抗病性强弱依次为‘赤霞珠’>‘梅鹿辄’>‘西拉’>‘雷司令’>‘霞多丽’>‘白诗楠’。由此可见, 室内检测结果与田间发病表现一致, 田间防治应以白色品种为重点。

关键词 葡萄; 灰霉病菌; 内含物监测; 抗病性
中图分类号 S436.631.1⁺9 **文献标志码** A **文章编号** 1004-1389(2017)02-0262-12

葡萄灰霉病是制约葡萄产业发展的一大障碍, 是常见、也是危害最大的病害之一^[1], 更是保护地葡萄生产和葡萄贮藏期最为重要的病害种类之一, 在中国南方地区和北方温室葡萄生产中发生尤为严重^[2], 每年该病造成巨大的经济损失。葡萄灰霉病带来的危害是双重性的: 一方面, 由于果穗的减少而导致产量的降低。有些感病品种如遇持续高湿阴雨, 花穗会严重受害, 病穗率可达70%以上^[3-4]。葡萄灰霉病在贮藏过程中发病是毁灭性的, 每年因灰霉病造成的葡萄产后损失在20%~30%左右, 最高可达50%^[5-6]。另一方面, 它还给葡萄酒带来不良味感, 同时使葡萄酒不耐陈酿, 降低葡萄酒的质量^[7]。随着葡萄种植面积不断扩大, 葡萄灰霉病也逐渐成为宁夏葡萄生产中的主要病害之一, 造成成熟期果实腐烂, 病情一旦发生即发展迅速且难以控制^[8-10], 已影响到该地区葡萄的产量和品质。

目前, 对于葡萄灰霉病的防治仍以化学防治为主^[11-14], 引发环境污染、农药抗药性、破坏生态平衡、农药残留等严重问题, 对人们的健康极为不

利。为此, 本研究通过分析灰霉病与葡萄中花青素等物质的相关性, 了解贺兰山东麓不同的主栽葡萄品种对灰霉病的感病程度, 以期品种的合理布局制定相应的防治措施, 为提高葡萄优质高产及可持续发展等奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

在葡萄果实膨大期(6月28日)、转色期(8月21日)、成熟期(9月4日)于宁夏玉泉营农场采集‘赤霞珠’‘梅鹿辄’‘西拉’‘霞多丽’‘雷司令’‘白诗楠’的果实。每个品种采集2份各1 kg, 1份健康果穗作为对照, 另1份在室内进行灰霉病菌接种。

1.2 接种方法

样品经自来水冲洗3遍, 蒸馏水冲洗3遍, $\varphi=75\%$ 的酒精浸泡消毒1 min, 无菌水冲洗3遍后, 用消毒接种针在葡萄果实上刺小伤口, 将果穗浸入孢子数密度为 10^6 mL⁻¹菌悬液中1 h, 使分生孢子充分发生作用, 再分别转入干燥器上层, 干

燥器底层注入 1 000 mL 稀释的菌悬液(饱和水)以保湿,上下分开以防果实腐烂。放入 21 ℃ 人工气候箱内培养 1 d 后进行检测。孢子悬浮液的制备方法参照文献[15],即配制菌悬液时可放入 $\varphi=0.05\%$ 的 Tween-20,再加入质量浓度为 0.005 g/mL 的葡萄糖和 0.008 g/mL 的磷酸二氢钾以刺激分生孢子引起侵染。

1.3 各内含物质量分数检测方法

依采集品种内含物的不同所需测定的指标也不同,深色品种进行花青素、酚类物、糖分、总抗坏血酸及维生素 E 检测(维生素 C 测定法不适用于深色样品,因此深色品种检测总抗坏血酸),白色品种则进行酚类物、糖分及维生素 C、E 检测(白色品种的花青素质量分数很低,不予检测)。

1.3.1 花青素测定 花青素提取液的制备:先对葡萄果实进行预处理,用自来水和蒸馏水洗净,晾干表面水分后,粉碎、匀浆冷冻,备用。参照 Chiriboga 和 Francis 的试验方法并作改进提取花青素,取样品 10 g,提取溶剂为含 $\varphi=2\%$ 盐酸的无水甲醇,料液比 1:10(质量与体积之比),提取温度 60 ℃,提取时间 1 h。提取次数为 2 次,葡萄提取液在 8 000 r/min 离心 10 min 后,收集上清液,备用以检测花青素质量分数。

参考文献[16]的方法进行配比:精密称取定量锦葵色素标准品溶液至 10 mL 容量瓶中,用

$\varphi=2\%$ 的盐酸甲醇溶解,并定容到刻度,即得到 0.1 mg/mL 的锦葵色素标准品溶液,以 $\varphi=2\%$ 的盐酸甲醇溶液为空白,通过紫外可见分光光度计的全波长扫描,确定花青素的_{最大吸收波长}为 546 nm。

配制 0.1 mg/mL 的锦葵色素标准品母液(表 1)。分别精密移取上述溶液 0、0.4、0.8、1.2、1.6、2.0、2.4 mL 到 10 mL 容量瓶中,用 $\varphi=2\%$ 的盐酸甲醇定容至刻度,即得到锦葵色素标准品的质量浓度分别为 0、4、8、12、16、20、24 $\mu\text{g/mL}$ 。用 $\varphi=2\%$ 的盐酸甲醇作空白,在 546 nm 处测定其吸光度值,以 3 次平均值为数据进行回归处理得回归方程,并作标准曲线。

对果实中的花青素质量分数进行测定,平行测定 3 次,取平均值。从样品提取液 V_2 中精密称定 V_3 到容量瓶 V_1 中, $\varphi=2\%$ 的盐酸甲醇溶解并定容到刻度。 $\varphi=2\%$ 的盐酸甲醇作空白。在 546 nm 处测定其吸光度值。花青素质量分数按下列公式计算:

花青素质量分数 $= (A/K) \times V_1 \times (V_2/V_3) \times (10^{-6}/W) \times 100\%$

式中, A 为最大吸收峰位置处的吸光度; K 为标准曲线斜率; V_1 为供试液体积(mL); V_2 为提取液总体积(mL); V_3 为吸取 V_2 中用于检测的提取液体积(mL); W 为样品的初始质量(g)。

表 1 花青素标准曲线制作中所用到的溶液配比

Table 1 Solution ratio used in the production of anthocyanin standard curve								
配比溶液 Proportioning solution		配比吸取量 Suction amount						
母液吸取量/mL Liquor consumption	0	0.4	0.8	1.2	1.6	2.0	2.4	
$\varphi=2\%$ 的盐酸甲醇加入量/mL $\varphi=2\%$ hydrochloric acid methanol	10	9.6	9.2	8.8	8.4	8.0	7.6	
定容后的质量浓度/($\mu\text{g/mL}$) Constant volume concentration	0	4	8	12	16	20	24	

1.3.2 酚类物质 采用 Arnow 试剂法进行测定^[17]。取 18 只 1.8 cm×18 cm 的试管,按表 2 加液,每质量浓度重复 3 次。当 NaOH 液加入不久,管中溶液变为橙红色。在 721 分光光度计 515 nm 处测 OD 值,以 3 次平均值作标准曲线。

采集样品果实 2 g 进行预处理,研磨待测定。称取样品 0.5 g,加 10 mL 无水乙醇进行匀浆,洗入大试管中(用少许无水乙醇洗匀浆器,洗液并入试管中),在 90 ℃ 恒温水浴中提取(试管加盖),10 min 后取出,冷却。再在 3 000 r/min 离心 10 min。取上清液倒入 50 mL 容量瓶中,沉淀再重复提取 2 次。合并上清液,用无水乙醇定容至

50 mL 即为样品液。吸取样品液 1 mL 于试管中,其余步骤同标准曲线的测定。以 1 mL $\varphi=95\%$ 的乙醇作对照,样品与对照各重复 3 次,测定样品中总酚质量分数。以 3 次重复的平均值查标准曲线,求样品中总酚质量分数。

每克鲜组织中总酚质量分数=查标准曲线所得值(μg) / 样品质量(0.5 g)

1.3.3 可溶性总糖 总糖测定方法均是先利用酸水解法使没有还原性的双糖和多糖彻底水解成有还原性的单糖,利用还原糖的测定方法来测总糖的质量分数。可溶性总糖质量分数按照 GB/T 5009.7-2008^[18]直接滴定法进行测定。

试样处理:称取粉碎后的样品果实 2.5~5 g,置 250 mL 容量瓶中,加 50 mL 水,慢慢加入 5 mL 乙酸锌溶液及 5 mL 亚铁氰化钾溶液,加水至刻度,混匀,静置 30 min,用干燥滤纸过滤,弃去初滤液,取续滤液,备用。

标定碱性酒石酸铜溶液:吸取 5.0 mL 碱性酒石酸铜甲液及 5.0 mL 碱性酒石酸铜乙液,置于 150 mL 锥形瓶中,加水 10 mL,加入玻璃珠 2 粒,从滴定管滴加约 9 mL 葡萄糖或其他还原糖

标准溶液,控制在 2 min 内加热至沸,趁热以每 2 s加 1 滴的速度继续滴加葡萄糖或其他还原糖标准溶液,直至溶液蓝色刚好褪去为终点,记录消耗葡萄糖或其他还原糖标准溶液的总体积,同时平行操作 3 份,取其平均值,计算每 10 mL(甲、乙液各 5 mL)碱性酒石酸铜溶液相当于葡萄糖的质量或其他还原糖的质量(mg)[也可以按上述方法标定 4~20 mL 碱性酒石酸铜溶液(甲、乙液各半)来适应试样中还原糖的质量浓度变化]。

表 2 Arnow 法标准曲线的测定
Table 2 Determination of Arnow standard curve

管号 Tube number	1	2	3	4	5	6
标准溶液/mL Standard solution	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1
HCL/mL	2	1.8	1.6	1.4	1.2	1
Arnow 试剂/mL Arnow reagent	1	1	1	1	1	1
1 mol/L NaOH/mL	10	10	10	10	10	10
蒸馏水/mL Distilled water	2	2	2	2	2	2

试样溶液预测:吸取 5.0 mL 碱性酒石酸铜甲液及 5.0 mL 碱性酒石酸铜乙液,置于 150 mL 锥形瓶中,加水 10 mL,加入玻璃珠 2 粒,控制在 2 min 内加热至沸,保持沸腾,以先快后慢的速度从滴定管中滴加试样溶液,并保持溶液沸腾状态,待溶液颜色变浅时,以每 2 s 加 1 滴的速度滴定,直至溶液蓝色刚好褪去为终点,记录样液消耗体积。当样液中还原糖质量浓度过高时,应适当稀释后再进行正式测定,使每次滴定消耗样液的体积控制在与标定碱性酒石酸铜溶液时所消耗的还原糖标准溶液的体积相近,约 10 mL 左右,结果按下式(1)计算。当质量浓度过低时则采取直接加入 10 mL 样品液,免去加水 10 mL,再用还原糖标准溶液滴定至终点,记录消耗的体积与标定碱性酒石酸铜溶液时消耗的还原糖标准溶液体积之差相当于 10 mL 样液中所含还原糖的量,结果按下式(2)计算。

试样溶液测定:吸取 5.0 mL 碱性酒石酸铜甲液及 5.0 mL 碱性酒石酸铜乙液,置于 150 mL 锥形瓶中,加水 10 mL,加入玻璃珠 2 粒,从滴定管滴加比预测体积少 1 mL 的试样溶液至锥形瓶中,在 2 min 内加热至沸,保持沸腾继续以每 2 s 加 1 滴的速度滴定,直至蓝色刚好褪去为终点,记录样液消耗体积,同法平行操作 3 份,得出平均消耗体积。

试样中还原糖的质量分数(以某种还原糖计)按式(1)进行计算:

$$X=m_1/(m\times V/250\times 1\,000)\times 100\tag{1}$$

式中: X 为试样中还原糖的质量分数(以某种还原糖计), m_1 为碱性酒石酸铜溶液(甲、乙液各半)相当于某种还原糖的质量, m 为试样质量, V 为测定时平均消耗试样溶液体积。

当质量浓度过低时试样中还原糖的质量分数(以某种还原糖计)按式(2)进行计算:

$$X=m_2/(m\times 10/250\times 1\,000)\times 100\tag{2}$$

式中: X 为试样中还原糖的质量分数(以某种还原糖计), m_2 为标定时体积与加入样品后消耗的还原糖标准溶液体积之差相当于某种还原糖的质量, m 为试样质量。

还原糖质量分数 ≥ 10 g/100 g 时计算结果保留 3 位有效数字;还原糖质量分数 < 10 g/100 g 时,计算结果保留 2 位有效数字。

1.3.4 总抗坏血酸 按照 GB/T 5009.86-2003 中荧光法^[19]测定。

试剂:(1)抗坏血酸标准溶液(1 mg/mL)(临用前配制)。准确称取 50 mg 抗坏血酸,用偏磷酸一乙酸溶液溶于 50 mL 容量瓶中,并稀释至刻度。(2)抗坏血酸标准使用液(100 μ g/mL)。取 10 mL 抗坏血酸标准液,用偏磷酸一乙酸溶液稀释至 100 mL,定容前试 pH,如其 pH > 2.2 时,则应用偏磷酸一乙酸一硫酸溶液稀释。(3)0.4 mg/mL 的百里酚蓝指示剂溶液。称取 0.1 g 百里酚蓝,加 0.02 mol/L 氢氧化钠溶液,在玻璃研钵中研磨至溶解,氢氧化钠的用量约为 10.75

mL,磨溶后用水稀释至 250 mL。变色范围:pH=1.2,红色;pH=2.8,黄色;pH>4,蓝色。

试样的制备:称取 100 g 鲜样,加 100 mL 偏磷酸-乙酸溶液,倒入捣碎机内打成匀浆,用百里酚蓝指示剂调试匀浆酸碱度。如呈红色,即可用偏磷酸-乙酸溶液稀释,若呈黄色或蓝色,则用偏磷酸-乙酸-硫酸溶液稀释,使其 pH 为 1.2。匀浆的取量需根据试样中抗坏血酸的质量浓度而定。当试样液质量浓度为 40~100 $\mu\text{g/mL}$ 时,一般取 20 g 匀浆,用偏磷酸-乙酸溶液稀释至 100 mL,过滤,滤液备用。

测定:(1)氧化处理。分别取试样滤液及标准使用液各 100 mL 于 200 mL 带盖三角瓶中,加 2 g 活化过的活性炭,用力振摇 1 min,过滤,弃去最初数毫升滤液,分别收集其余全部滤液,即试样氧化液和标准氧化液,待测定。(2)各取 10 mL 标准氧化液于 2 个 100 mL 容量瓶中,分别标明“标准”及“标准空白”。(3)各取 10 mL 试样氧化液于 2 个 100 mL 容量瓶中,分别标明“试样”及“试样空白”。(4)于“标准空白”及“试样空白”溶液中各加 5 mL 硼酸-乙酸钠溶液,混合摇动 15 min,用水稀释至 100 mL,在 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中放置 2~3 h,取出备用。(5)于“试样”及“标准”溶液中各加 5 mL 500 g/L 乙酸钠溶液,用水稀释至 100 mL,备用。

标准曲线的制备:取上述“测定(5)”中“标准”溶液(抗坏血酸质量浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$)0.5、1.0、1.5 和 2.0 mL 标准系列,取双份分别置于 10 mL 带盖试管中,再用水补充至 2.0 mL。

荧光反应:取“测定(4)”中“标准空白”溶液、“试样空白”溶液及“测定(5)”中“试样”溶液各 2 mL,分别置于 10 mL 带盖试管中。在暗室迅速向各管中加入 5 mL 邻苯二胺溶液,振摇混合,在室温下反应 35 min,于激发光波长 338 nm、发射光波长 420 nm 处测定荧光强度。标准系列荧光强度分别减去标准空白荧光强度为纵坐标,对应的抗坏血酸质量浓度为横坐标,绘制标准曲线或进行相关计算,其直线回归方程供计算使用。

计算公式见式(3):

$$X=c \cdot V / m \times F \times 100 / 1\,000 \quad (3)$$

式中: X 为试样中抗坏血酸及脱氢抗坏血酸总质量分数, c 为由标准曲线查得或由回归方程算得试样溶液质量浓度, m 为试样的质量, V 为荧光反应所用试样体积, F 为试样溶液的稀释倍数。

计算结果表示到小数点后 1 位。

精密性:在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 10%。

1.3.5 维生素 C 按照 GB 6195-86 中 2,6-二氯酚酚滴定法^[20]测定。此方法不适用于深色样品。

抗坏血酸标准溶液(1 mg/mL):称取 100 mg (准确至 0.1 mg)抗坏血酸,溶于浸提剂中并稀释至 100 mL。现配现用。

2,6-二氯酚(2,6-二氯酚酚吡酚钠盐)溶液:称取碳酸氢钠 52 mg 溶解在 200 mL 热蒸馏水中,然后称取 2,6-二氯酚 50 mg 溶解在上述碳酸氢钠溶液中。冷却定容至 250 mL,过滤至棕色瓶内,保存在冰箱中。每次使用前,用标准抗坏血酸标定其滴定度。即吸取 1 mL 抗坏血酸标准溶液于 50 mL 锥形瓶中,加入 10 mL 浸提剂,摇匀,用 2,6-二氯酚溶液滴定至溶液呈粉红色 15 s 不褪色为止。同时,另取 10 mL 浸提剂做空白试验。

滴定度按式(4)计算:

$$T=(C \cdot V) / (V_1 - V_2) \quad (4)$$

式中: T 为每毫升 2,6-二氯酚溶液相当于抗坏血酸的毫克数; C 为抗坏血酸的浓度, V 为吸取抗坏血酸的体积, V_1 为滴定抗坏血酸溶液所用 2,6-二氯酚溶液的体积, V_2 为滴定空白所用 2,6-二氯酚溶液的体积。

样液制备:称取样品 100 g,放入组织捣碎机中,加 100 mL 浸提剂,迅速捣成匀浆。称 10~40 g 浆状样品,用浸提剂将样品移入 100 mL 容量瓶,并稀释至刻度,摇匀过滤。若滤液有色,可按每克样品加 0.4 g 白陶土脱色后再过滤。

滴定:吸取 10 mL 滤液放入 50 mL 锥形瓶中,用已标定过的 2,6-二氯酚溶液滴定,直至溶液呈粉红色 15 s 不褪色为止。同时做空白试验。

结果按式(5)计算:

$$\text{维生素 C 质量分数} = [(V - V_0) \cdot T \cdot A] / W \times 100 \quad (5)$$

式中: V 为滴定样液时消耗染料溶液的体积, V_0 为滴定空白时消耗染料溶液的体积, T 为 2,6-二氯酚染料滴定度, A 为稀释倍数, W 为样品质量。

平行测定的结果用算术平均值表示,取 3 位有效数字,含量低的保留小数点后 2 位数字。平行测定结果的相对相差,在维生素 C 质量分数大

于 20 mg/100 g 时,不得超过 2%,小于 20 mg/100 g 时,不得超过 5%。

1.3.6 维生素 E 按照 GB/T 5009.82-2003 中高效液相色谱法^[21]测定。

维生素 E 标准液:α-生育酚(纯度 95%),γ-生育酚(纯度 95%),δ-生育酚(纯度 95%)。用脱醛乙醇分别溶解以上 3 种维生素 E 标准品,使其浓度大约为 1 mL 相当于 1 mg。临用前用紫外分光光度计分别标定此 3 种维生素 E 溶液的准确浓度。

内标溶液:称取苯并[e]苌(纯度 98%),用脱醛乙醇配制成每 1 mL 相当 10 μg 苯并[e]苌的内标溶液。

试样处理:(1)皂化。准确称取 1~10 g 试样(含维生素 E 各异构体约为 40 μg)于皂化瓶中,加 30 mL 无水乙醇,进行搅拌,直到颗粒物分散均匀为止。加 5 mL 100 g/L 抗坏血酸,苯并[e]苌标准液 2.00 mL,混匀。10 mL 氢氧化钾(1+1),混匀。于沸水浴回流 30 min 使皂化完全。皂化后立即放入冰水中冷却。(2)提取。将皂化后的试样移入分液漏斗中,用 50 mL 水分 2~3 次洗皂化瓶,洗液并入分液漏斗中。用约 100 mL 乙醚分两次洗皂化瓶及其残渣,乙醚液并入分液漏斗中。如有残渣,可将此液通过有少许脱脂棉的漏斗滤入分液漏斗。轻轻振摇分液漏斗 2 min,静置分层,弃去水层。(3)洗涤。用约 50 mL 水洗分液漏斗中的乙醚层,用 pH 试纸检验直至水层不显碱性(最初水洗轻摇,逐次振摇强度可增加)。(4)浓缩。将乙醚提取液经过无水硫酸钠(约 5 g)滤入与旋转蒸发器配套的 250~300 mL 球形蒸发瓶内,用约 100 mL 乙醚冲洗分液漏斗及无水硫酸钠 3 次,并入蒸发瓶内,并将其接至旋转蒸发器上,于 55 ℃水浴中减压蒸馏并回收乙醚,待瓶中剩下约 2 mL 乙醚时,取下蒸发瓶,立即用氮气吹掉乙醚。立即加入 2.00 mL 乙醇,充分混合,溶解提取物。(5)将乙醇液移入一小塑料离心管中离心 5 min(5 000 r/min)。上清液供色谱分析。如果试样中维生素含量过少,可用氮气将乙醇液吹干后,再用乙醇重新定容。并记下体积比。

标准曲线的制备:先标定维生素 E 标准浓度,采用内标法^[21]定量绘制标准曲线。

高效液相色谱分析:色谱条件确定。

试样分析:取试样浓缩液 20 μL,待绘制出色

谱图及色谱参数后,再进行定性和定量。(1)定性,用标准物色谱峰的保留时间定性。(2)定量,根据色谱图求出某种维生素峰面积与内标物峰面积的比值,以此值在标准曲线上查到其质量浓度。或用回归方程求出其质量浓度。

计算公式见式(6):

$$X=c/m \times V \times 100/1\ 000 \quad (6)$$

式中: X 为维生素的质量分数, c 为由标准曲线上查到某种维生素质量浓度, V 为试样浓缩定容体积, m 为试样质量。计算结果表示到 3 位有效数字。

精密度:在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 10%。

1.4 数据分析方法

对试验数据采用 Excel 及 DPS 软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 不同葡萄品种中花青素等物质的动态质量分数变化

将采集的不同葡萄品种及接种灰霉病菌后花青素等物质的质量分数变化进行检测,数据汇总、统计分析及柱形图如表 3、图 1~图 6。

从图 1~图 6 中可看出:(1)从随着葡萄生育期的发展其内含物变化的水平看,除酚类物质质量分数呈现先下降后有所缓升的趋势,与李杨昕等^[22]的研究相一致,果实中总酚质量分数在浆果生长期开始下降,至浆果成熟期达最低点,之后有小幅度的上升;花青素、可溶性总糖、维生素 C、总抗坏血酸及维生素 E 质量分数均呈现上升趋势,符合生长规律。(2)从健康果实和接种发病后果实其内含物变化的水平看,同一品种的果实在接种发病后的花青素、酚类物、维生素 C、总抗坏血酸的质量分数均比健康果实有所降低,而可溶性总糖和维生素 E 质量分数在接种发病后深色葡萄品种表现升高、白色品种表现下降,说明灰霉病菌均对这些内含物产生一定影响,且有规律可循。同时经方差分析结果表明(表 3),大多数发病果实的花青素等物质的质量分数与健康果实存在一定差异,这就证明葡萄灰霉病的发生和花青素等物质有密切关系,质量分数较高抗病性较强,反之则弱。(3)深色品种各内含物质量分数基本上均较白色品种高,且接种后仍高于白色品种。

表 3 不同葡萄品种及接种灰霉病菌后花青素等物质的质量分数

Table 3 Mass fraction changes of anthocyanin and other material in different grape varieties and after inoculated with *Botrytis cinerea*

品种 Cultivar	各指标质量分数/(mg/g) Various index mass fraction					
	花青素 Anthocyanin	酚类物 Phenols	可溶性总糖 Total soluble sugar	维生素 C Vitamin C	总抗坏血酸 Total ascorbic acid	维生素 E Vitamin E
赤霞珠 Cabernet	2.35±0.39 a	5.84±0.50 a	102.87±51.35 ab	/	0.11±0.01 a	0.004±0.002 abc
赤霞珠(病) Cabernet(disease)	2.03±0.29 ab	5.03±0.50 ab	116.17±57.94 a	/	0.11±0.01 a	0.005±0.003 a
梅鹿辄 Merlot	2.06±0.06 ab	4.98±0.90 abc	122.93±58.22 a	/	0.11±0.00 a	0.003±0.002 abc
梅鹿辄(病) Merlot(disease)	1.72±0.01 b	4.23±0.83 bcd	124.50±61.52 a	/	0.09±0.00 b	0.004±0.002 ab
西拉 Syrah	1.67±0.19 b	4.32±0.35 bcd	103.83±47.68 ab	/	0.08±0.01 b	0.003±0.001 abc
西拉(病) Syrah(disease)	1.16±0.16 c	3.58±0.30 de	101.30±47.52 ab	/	0.06±0.01 c	0.004±0.001 abc
霞多丽 Chardonnay	/	5.17±0.35 ab	119.73±57.95 a	0.04±0.03 a	/	0.004±0.002 abc
霞多丽(病) Chardonnay(disease)	/	3.80±0.11 d	110.27±56.47 ab	0.03±0.02 a	/	0.003±0.001 abc
白诗楠 White Shinan	/	3.86±0.60 cd	99.67±48.12 ab	0.04±0.02 a	/	0.002±0.001 bc
白诗楠(病) White Shinan(disease)	/	2.34±0.28 f	88.40±45.19 b	0.02±0.01 a	/	0.002±0.001 c
雷司令 Riesling	/	2.70±0.13 ef	113.53±54.36 ab	0.04±0.02 a	/	0.003±0.001 abc
雷司令(病) Riesling(disease)	/	2.13±0.08 f	106.07±53.05 ab	0.04±0.02 a	/	0.003±0.001 bc

注：数据为“平均值±标准误”，同列不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。下同。

Note: Data in the table means mean±SE, different small letters within a column showed significant difference ($P<0.05$). The same as below.

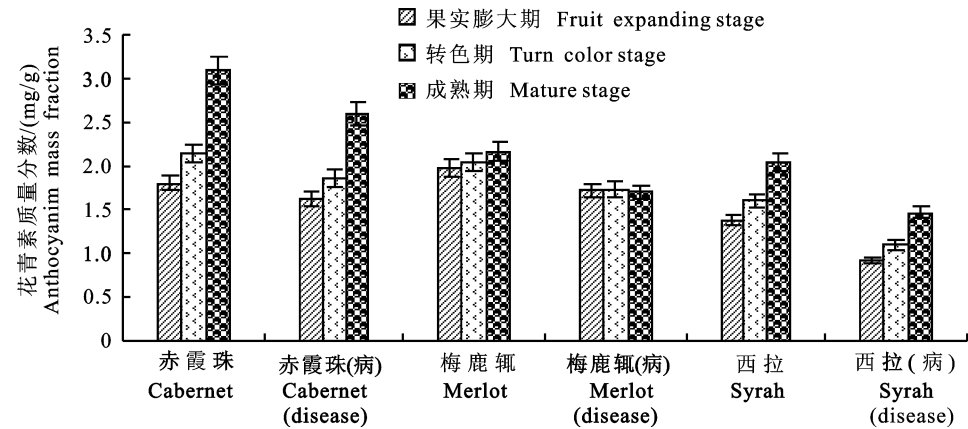


图 1 深色葡萄品种中花青素的质量分数

Fig. 1 Anthocyanin mass fraction in dark grape varieties

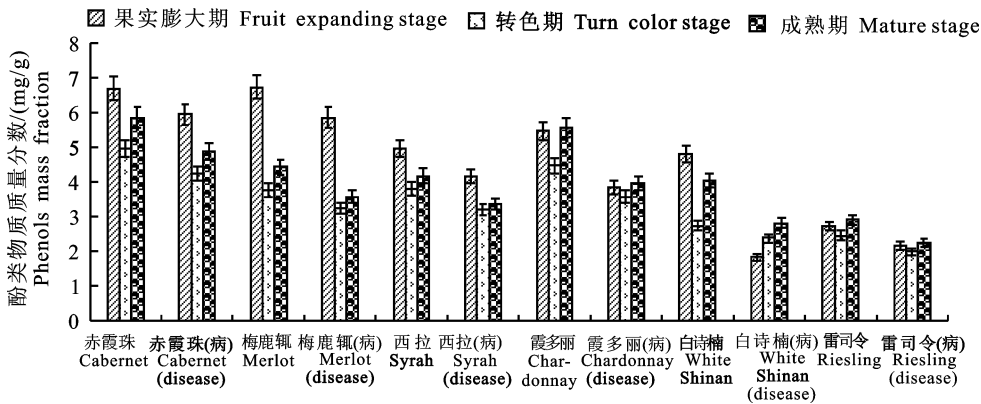


图 2 不同葡萄品种中酚类物质的质量分数

Fig. 2 Phenols mass fraction in different grape varieties

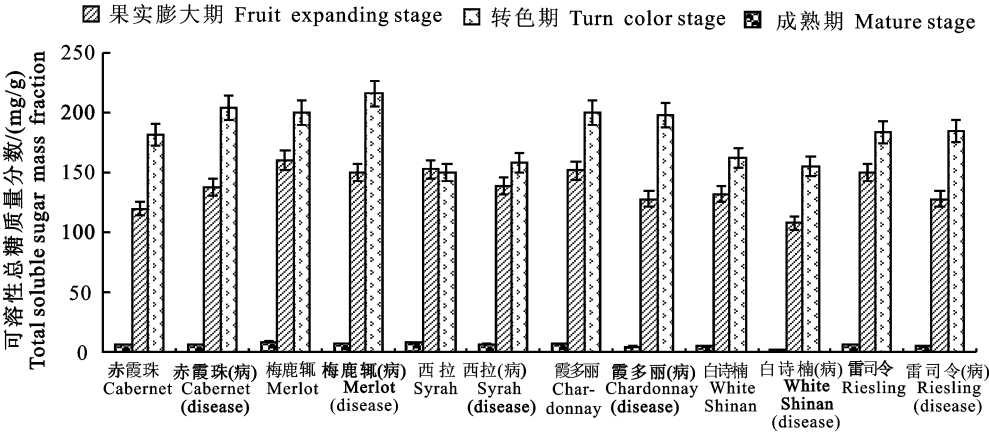


图 3 不同葡萄品种中可溶性总糖的质量分数

Fig. 3 Total soluble sugar mass fraction in different grape varieties

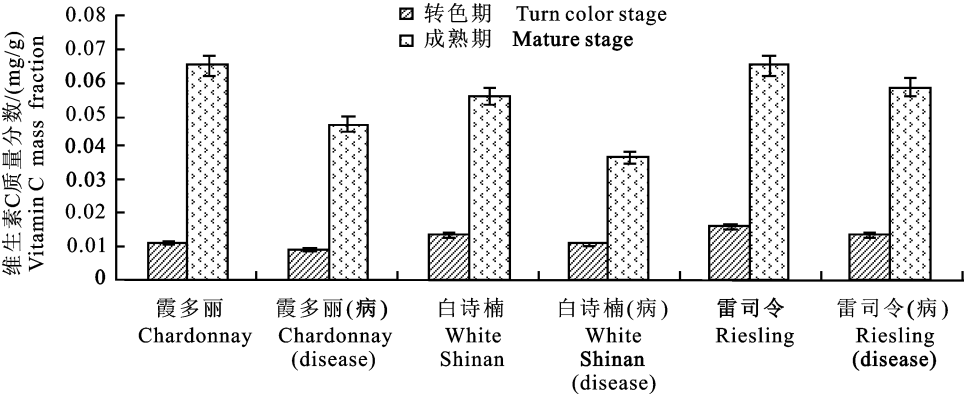


图 4 白色葡萄品种中维生素 C 的质量分数

Fig. 4 Vitamin C mass fraction in white grape varieties

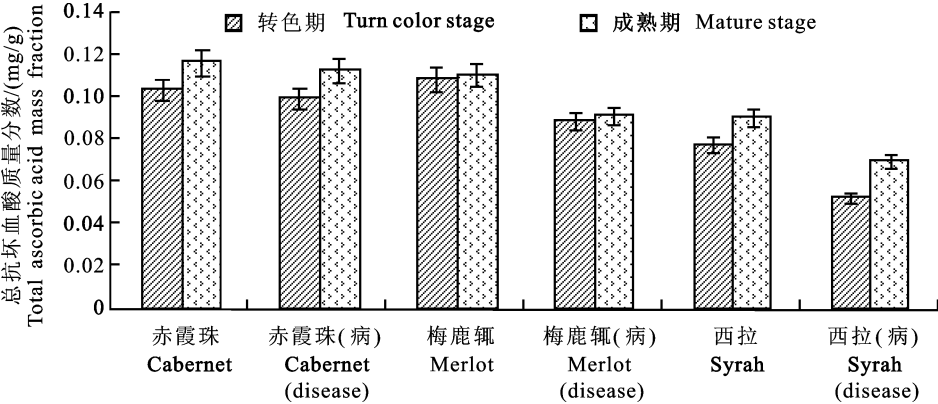


图 5 深色葡萄品种中总抗坏血酸的质量分数

Fig. 5 Total ascorbic acid mass fraction in dark grape varieties

2.2 贺兰山东麓不同葡萄品种抗灰霉病差异

从图 7~12 可看出：在葡萄灰霉病菌侵染后，不同葡萄品种中花青素、酚类物、糖分、维生素 C、总抗坏血酸及维生素 E 的降幅较一致，均为‘赤霞珠’<‘梅鹿辄’<‘西拉’<‘雷司令’<‘霞

多丽’<‘白诗楠’，降幅越小，说明葡萄灰霉病菌对该品种的影响越小，其抗病性越强，反之越易感病。由此可知，深色品种由于含有较高抗氧化能力较强的花青素、酚类物等物质，且接种后仍高于白色品种，灰霉病菌对其影响较小，从而较白色品

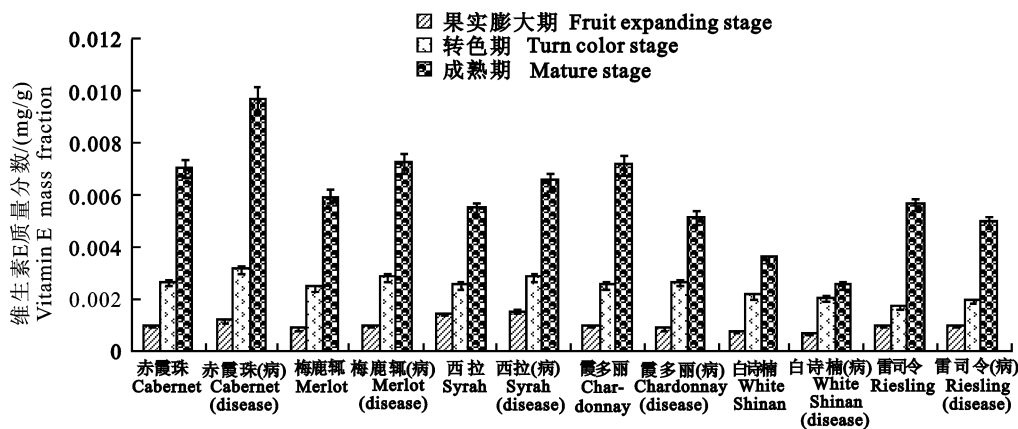


图 6 不同葡萄品种中维生素 E 的质量分数

Fig. 6 Vitamin E mass fraction in different grape varieties

种具有很高的抗病性,尤其以‘赤霞珠’为最,其次为‘梅鹿辄’;白色品种以‘白诗楠’最易感病,其次是‘霞多丽’。

2.3 不同葡萄品种各内含物与灰霉病发生情况的相关性分析

从表 4 可以看出,不同葡萄品种大田果穗发病率和室内接种后果粒发病率的发生规律与其相应的各内含物平均降幅高低相一致,呈正相关。比较抗灰霉病的品种(深色品种),各内含物平均降幅较小,品种之间无明显差异;比较易感病的品种(白色品种),各内含物平均降幅较大,品种之间无明显差异。而白色品种与深色品种相比差异明显。

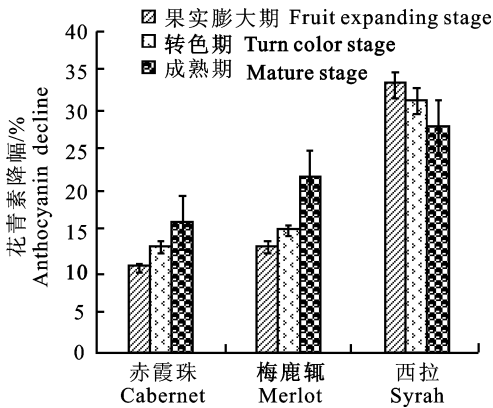


图 7 深色葡萄品种中花青素对葡萄灰霉病菌的响应

Fig. 7 Response of anthocyanin in dark grape varieties to *Botrytis cinerea*

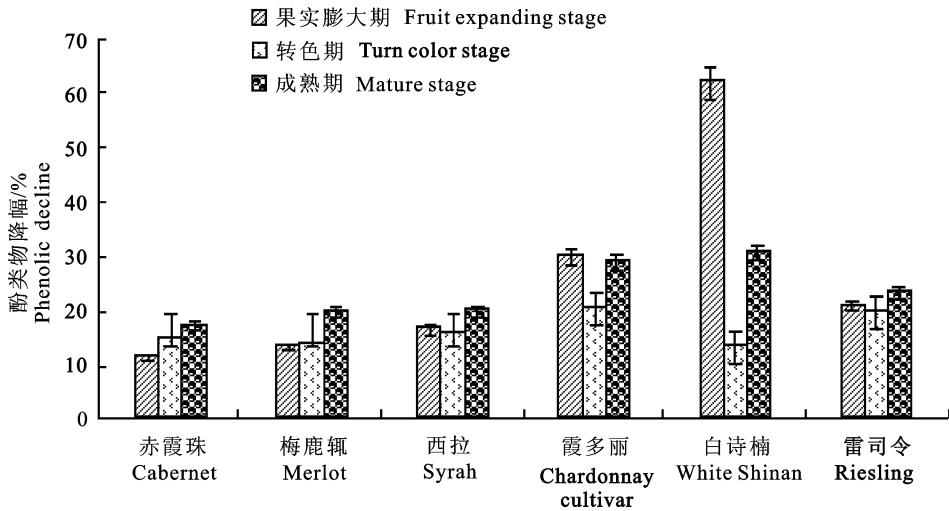


图 8 不同葡萄品种中酚类物对葡萄灰霉病菌的响应

Fig. 8 Response of phenolic in different grape varieties to *Botrytis cinerea*

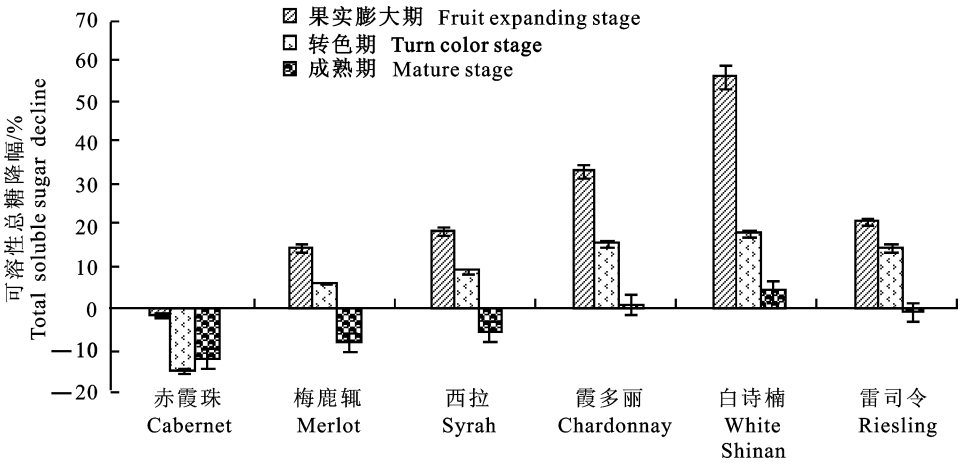


图 9 不同葡萄品种中可溶性总糖对葡萄灰霉病菌的响应

Fig. 9 Response of total soluble sugar in different grape varieties to *Botrytis cinerea*

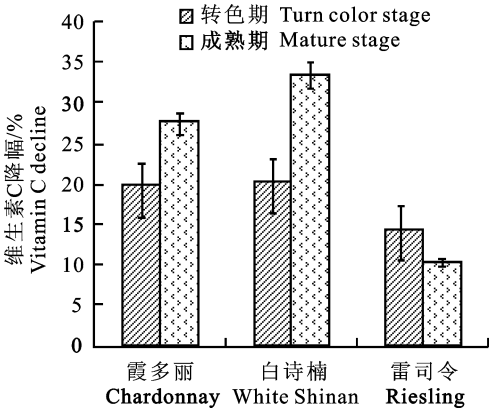


图 10 白色葡萄品种中维生素 C 对葡萄灰霉病菌的响应

Fig. 10 Response of vitamin C in white grape varieties to *Botrytis cinerea*

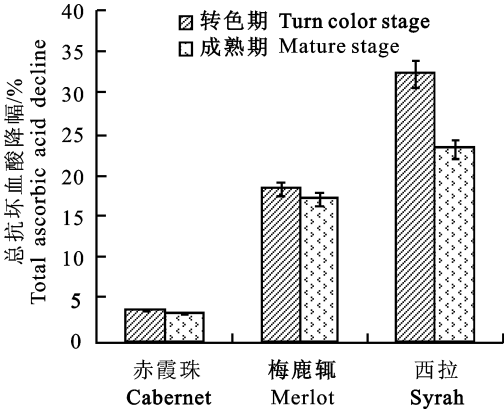


图 11 深色葡萄品种中总抗坏血酸对葡萄灰霉病菌的响应

Fig. 11 Response of total ascorbic acid in dark grape varieties to *Botrytis cinerea*

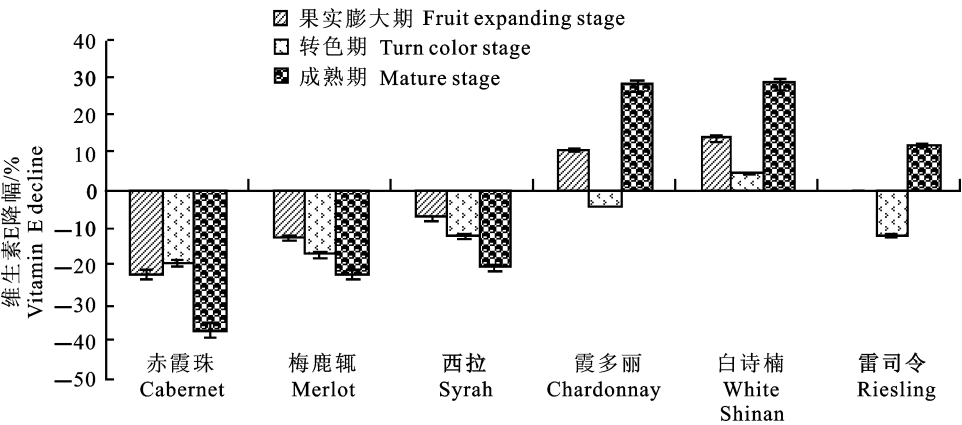


图 12 不同葡萄品种中维生素 E 对葡萄灰霉病菌的响应

Fig. 12 Response of vitamin E in different grape varieties to *Botrytis cinerea*

表 4 不同葡萄品种各内含物平均降幅与灰霉病发生情况

Table 4 Average decline of contents in different grape varieties and incidence of gray mold

品 种 Varieties	大田果穗 发病率/% Incidence of ear in the field	室内接种后 果粒发病率/% Incidence rate of fruit after indoor inoculation	平均降幅/% Average decline					
			花青素 Anthocyanin	酚类物质 Phenols	可溶性总糖 Total soluble sugar	维生素 C Vitamin C	总抗坏血酸 Total ascorbic acid	维生素 E Vitamin E
赤霞珠 Cabernet	1.00	20.76	13.24±1.15 b	14.14±1.69 b	−9.50±4.09 c	/	3.67±0.22 b	−26.20±5.54 c
梅鹿辄 Merlot	1.00	35.18	16.66±1.82 b	15.29±2.07 ab	4.34±6.64 bc	/	17.90±0.62 ab	−17.07±2.76 bc
西拉 Syrah	3.33	61.14	30.84±1.11 a	17.05±1.32 ab	7.55±7.02 b	/	27.90±4.57 a	−13.17±3.86 bc
雷司令 Riesling	5.71	69.97	/	21.04±1.04 ab	11.78±6.44 ab	12.18±1.93 a	/	0.25±7.01 ab
霞多丽 Chardonnay	9.43	72.23	/	26.20±3.07 ab	16.71±9.35 ab	23.68±3.85 a	/	11.76±9.29 a
白诗楠 White Shinan	10.86	82.57	/	35.18±14.29 a	26.17±15.44 a	26.67±6.67 a	/	15.87±6.92 a

3 结论与讨论

3.1 葡萄灰霉病与酚类物质质量分数的关系

葡萄中含有的酚类物质主要有类黄酮类物质、缩和单宁(即原花色素)、花色素和酚酸等。本试验中从果实膨大期到转色期,再到成熟期,不同葡萄品种的酚类物质质量分数呈现先下降后有所缓升的趋势,与李杨昕等^[22]的研究相一致,果实中总酚质量分数在浆果生长期开始下降,至浆果成熟期达最低点,之后有小幅上升。可能是由于随着果实的成熟,果粒内部发生一系列复杂的生化变化:含糖量急剧增加,含酸量下降,果皮内芳香物质逐渐形成,单宁则不断减少等;同时,种子由绿色变为棕褐色,种皮变硬。此时,果皮和果肉内的总酚质量分数降低至最低点,可能与此时的酚类物质大量向种子运输有关。这与《葡萄学》(贺普超,1999)中关于葡萄果实发育和茎叶的生长特点相符合,为进一步深入阐明次生物质代谢途径提供一定试验数据。

3.2 不同葡萄品种抗灰霉病菌的差异

在葡萄灰霉病菌侵染后,不同葡萄品种中花青素、酚类物、糖分、维生素 C、总抗坏血酸及维生素 E 的降幅较一致,均为‘赤霞珠’<‘梅鹿辄’<‘西拉’<‘雷司令’<‘霞多丽’<‘白诗楠’,降幅越小,说明葡萄灰霉病菌对该品种的影响越小,其抗病性越强,反之越易感病。由此可知,所测深色品种中以‘赤霞珠’最为抗病,其次为‘梅鹿辄’;白色品种以‘白诗楠’最易感病,其次是‘霞多丽’。

3.3 有利葡萄灰霉病的发病条件及防治

低温、高湿、伤口是葡萄灰霉病流行的主要因素,一般在葡萄较为敏感的花期及坐果期遇到这些条件,极易诱发病害流行。但在本研究中发现,葡萄灰霉病的防治还应注意两点:一是在转色期即浆果即将成熟时和果实成熟期也是病菌易侵染的时期,应适时通过减少菌源、农业措施、药剂

防治,以控制其大发生,降低损失。二是根据不同品种的抗性不同有针对性的进行防治,如易感染的白色品种‘白诗楠’、‘霞多丽’可进行重点防治,抗性较强的深色品种‘赤霞珠’、‘梅鹿辄’可根据环境条件进行灵活预防,减少投入与污染。

3.4 存在问题

随着不同葡萄品种对灰霉病菌胁迫响应的深入研究,不断有新的疑问和问题有待解决,如除果实外其他部位的内含物变化是否与灰霉病有相关?在大田环境下接种后的研究结果是否会和实验室内接种研究结果一致?大田环境下怎样实现有效接种?这些工作都还需进一步研究论证。

参考文献 Reference:

[1] CAPPELIMI R A, CEPONIS M J, LIGHTNER G W. Disorders in table grape shipments to the New York market [J]. *Plant Disease*, 1986, 70: 1075-1079.

[2] 张 鹏. 葡萄灰霉病发生规律及防治技术研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2011.

ZHANG P. Study on occurring regularity and control techniques of grape grey mould[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2011 (in Chinese with English abstract).

[3] 王信远, 周绪元, 贾忠金, 等. 木霉菌防治大棚黄瓜药效试验 [J]. *北方园艺*, 1996(6): 31-32.

WANG X Y, ZHOU X Y, JIA ZH J, *et al.* Efficacy test of the control of cucumber gray mold of in greenhouse [J]. *Northern Horticulture*, 1996(6): 31-32 (in Chinese).

[4] WISIEWSKI M E, WILSON C L. Biological control of post-harvest disease of fruits and vegetables [J]. *Recent Advances Hortiscience*, 1992, 27(2): 94-98, 425-441.

[5] 刘三军, 蒯传化. 我国葡萄病害发生趋势与防治工作中应注意的若干问题 [J]. *果农之友*, 2007(2): 4-5.

LIU S J, KUAI CH H. Some problems in the occurrence and control of grape diseases in China [J]. *Fruit Growers' Friend*, 2007(2): 4-5 (in Chinese).

[6] 郭小侠, 唐周怀, 陈 川, 等. 我国葡萄几种主要病害的研究现状 [J]. *陕西农业科学*, 2002(11): 18-21.

GUO X X, TANG ZH H, CHEN CH, *et al.* Research status

- of several main diseases of grape in China[J]. *Shaanxi Agricultural Sciences*, 2002(11):18-21(in Chinese).
- [7] 李 华. 葡萄灰霉病(*Botrytis cinerea*)及其合理防治[J]. 中外葡萄与葡萄酒, 2003(6):41-42.
LI H. *Botrytis cinerea* and its reasonable control[J]. *Sino-Overseas Grapevine & Wine*, 2003(6):41-42(in Chinese).
- [8] 王国珍, 麻冬梅, 樊仲庆, 等. 不同杀菌剂对葡萄灰霉病的药效评价[J]. 中外葡萄与葡萄酒, 2006(2):29-30, 33.
WANG G ZH, MA D M, FAN ZH Q, *et al.* The resistance evaluation of different fungicides on *Botrytis cinerea* [J]. *Sino-Overseas Grapevine & Wine*, 2006(2):29-30, 33(in Chinese).
- [9] 雷百战, 李国英, 石在强. 葡萄灰霉病原鉴定和生物学特性研究[J]. 石河子大学学报(自然科学版), 2004(22):145-149.
LEI B ZH, LI G Y, SHI Z Q. Identification and biological characteristics of the pathogen of *Botrytis cinerea* on grape [J]. *Journal of Shihezi University (Natural Science Edition)*, 2004 (22): 145-149 (in Chinese with English abstract).
- [10] 陈宇飞, 文景芝, 李立军. 葡萄灰霉病研究进展[J]. 东北农业大学学报, 2006, 37(5):693-699.
CHEN Y F, WEN J ZH, LI L J. Research advance of grape grey mould[J]. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2006, 37(5):693-699(in Chinese with English abstract).
- [11] 张 鹏, 刘长远, 梁春浩, 等. 7 种杀菌剂对葡萄灰霉病的室内抑菌活性测定[J]. 园艺与种苗, 2012(1):61-64.
ZHANG P, LIU CH Y, LIANG CH H, *et al.* Antibacterial activity determination of 7 different fungicides on grape *Botrytis cinerea* Pers[J]. *Horticulture & Seed*, 2012(1):61-64(in Chinese with English abstract).
- [12] 陈宏州, 杨敬辉, 肖 婷, 等. 12 种杀菌剂对葡萄灰霉病菌的毒力测定[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(1):124-127.
CHEN H ZH, YANG J H, XIAO T, *et al.* Virulence determination of 12 kinds of fungicides against grape *Botrytis cinerea* Pers [J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2015, 43(1):124-127(in Chinese).
- [13] 陈月凤, 马丽敏, 高豫汝, 等. 几种新型杀菌剂对葡萄灰霉病的防治效果[J]. 南京农专学报, 2002(2):39-40, 56.
CHEN Y F, MA L M, GAO Y R, *et al.* Control effect of several new types fungicide on *Botrytis cinerea* Pers[J]. *Journal of Nanjing Agricultural Technology College*, 2002(2):39-40, 56(in Chinese with English abstract).
- [14] 董金皋. 农业植物病理学(第二版)[M]. 北京:中国农业出版社, 2007:322-335.
DONG J G. *Agricultural Plant Pathology*(Second Edition) [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2007:322-335 (in Chinese).
- [15] 李淑菊, 马德华, 霍振荣. 外源刺激物对黄瓜灰霉病菌分生孢子致病力的影响[J]. 天津农业科学, 1996, 2(2):21-22.
LI SH J, MA D H, HUO ZH R. Effects of exogenous stimuli on the pathogenicity of cucumber gray mold[J]. *Tianjin Agricultural Sciences*, 1996, 2(2):21-22 (in Chinese).
- [16] 王二雷, 林松毅, 刘静波, 等. 笃斯越桔中花青素含量分析[J]. 食品科学, 2007, 28(10):460-463.
WANG E L, LIN S Y, LIU J B, *et al.* Study on content analysis of Anthocyanidin in *Vaccinium uliginosum* L. [J]. *Food Science*, 2007, 28(10):460-463(in Chinese with English abstract).
- [17] 田香华, 杨 军, 宋纪真, 等. 几丁低聚糖诱导烟草幼苗抗黑胫病与木质素及酚类物质含量变化的关系[C]//中国植物病理学会 2007 年学术年会:植物抗病性. 陕西杨凌:西北农林科技大学出版社, 2007:334-339.
TIAN X H, YANG J, SONG J ZH, *et al.* The relationship between resistance of chitooligosaccharide induced tobacco seedlings against black shank and content changes of phenolics and lignin[C]//China Society of Plant Pathology, 2007 academic annual meeting: Plant disease resistance. Yangling Shaanxi: Northwest Agriculture and Forestry University Press, 2007:334-339(in Chinese).
- [18] 中华人民共和国卫生部. GB/T 5009. 7-2008 食品中还原糖的测定[S]. 北京:中国标准出版社, 2008.
Ministry of Health of the People's Republic of China. GB/T 5009. 7-2008 Determination of Reducing Sugar in Foods [S]. Beijing: China Standard Press, 2008(in Chinese).
- [19] 中华人民共和国卫生部. GB/T 5009. 86-2003 蔬菜、水果及其制品中总抗坏血酸的测定(荧光法和 2,4-二硝基苯法)[S]. 北京:中国标准出版社, 2003.
Ministry of Health of the People's Republic of China. GB/T 5009. 86-2003 Determination of Total Ascorbic Acid in Fruits, Vegetables and Derived Products — Fluorometric Method and Colorimetric Method [S]. Beijing: China Standard Press, 2003(in Chinese).
- [20] 中华人民共和国国家标准局. GB 6195-86 水果、蔬菜维生素 C 含量测定法(2,6-二氯酚滴定法)[S]. 北京:中国标准出版社, 1986.
National Bureau of Standards of the People's Republic of China. GB 6195-86 Determination of Vitamin C in Vegetables and Fruits(2,6-dichloro-indophenol titration method) [S]. Beijing: China Standard Press, 1986(in Chinese).
- [21] 中华人民共和国卫生部. GB/T 5009. 82-2003 食品中维生素 A 和维生素 E 的测定[S]. 北京:中国标准出版社, 2003.
Ministry of Health of the People's Republic of China. GB/T 5009. 82-2003 Determination of Retinol and Tocopherol in Foods[S]. Beijing: China Standard Press, 2003 (in Chinese).
- [22] 李杨昕, 张元湖, 田淑芬, 等. 玫瑰香葡萄生长期酚类物质含量及抗氧化活性的变化[J]. 园艺学报, 2007, 34(5):1093-1097.
LI Y X, ZHANG Y H, TIAN SH F, *et al.* Dynamic changes of polyphenols and their relationship with antioxidant capacity in the muscat hamburg grapevine[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2007, 34(5):1093-1097 (in Chinese with English abstract).

Response of Different Grape Cultivars to *Botrytis cinerea* Stress

JIANG Caige¹, WANG Guozhen¹, ZHANG Yi¹ and SHAO Pengmei²

- (1. Institute of Plant Protection, Ningxia Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Yinchuan 750002, China;
2. Agricultural Technology Service Center of Zhenbeibao Township in Xixia District of Yinchuan, Yinchuan 750021, China)

Abstract In order to investigate the susceptibility of various leading grape cultivars to *Botrytis cinerea* in the eastern foot of Helan Mountain, and to propose the corresponding control measures based on the distribution characteristics of various cultivars with different resistances, the contents of inclusions in various grape cultivars, namely, anthocyanins, phenols, sugar, total ascorbic acid (vitamin C) and vitamin E were detected using malvidin standard method, Arnow method, direct titration method, fluorescence method (or 2,6-two chlorine indophenol titration method) and HPLC detection respectively. The results showed that the mass fractions of various substances in the pathogenetic fruit were significantly different from those of the healthy fruit. It was proved that the incidence of *Botrytis cinerea* was closely related to the grape inclusions, the higher the mass fraction, the stronger the disease resistance, and the weaker in the opposite. Judging by the decreasing amplitude of the inclusions of different grape cultivators infected by *Botrytis cinerea*, the disease resistances of various grape cultivators were in following sequence: ‘Cabernet’ > ‘Merlot’ > ‘Syrah’ > ‘Riesling’ > ‘Chardonnay’ > ‘White Shinnan’. The lab detecting results were consistent with the field incidence, and the field control should be focused on white cultivars.

Key words Grape; *Botrytis cinerea*; Inclusion investigation; Disease resistance

Received 2015-09-06 **Returned** 2016-07-27

Foundation item Key Sci-tech Project of the “12th 5-Year-Plan” of China (No. 2013BAD09B02); Special Fund for the Technical System of Modern Agricultural Industry (No. CARS-30); Natural Science Foundation of Ningxia (No. NZ1168); Science and Technology Innovation Pilot Project of Ningxia Academy of Agriculture and Forestry Sciences (No. NKYQ-15-05).

First author JIANG Caige, female, master, assistant research fellow. Research area: grape diseases and pests. E-mail: jiangcaige168@126.com

Corresponding author ZHANG Yi, male, master, research fellow. Research area: prevention and control of diseases and pests in agriculture and forestry. E-mail: nxzhy0951@163.com

(责任编辑:郭柏寿 **Responsible editor:** GUO Baishou)