

## 外源褪黑素对苹果采后灰霉病的防效及防御酶活性的影响

曹晶晶\*, 于子超\*, 张颖\*, 李保华, 梁文星, 王彩霞\*\*

青岛农业大学植物医学学院, 山东省植物病虫害综合防控重点实验室, 山东青岛266109

**摘要:** 以‘富士’果实为材料, 采用刺伤接种法, 研究外源褪黑素对苹果采后灰霉病的防效及其防病机制, 结果表明外源褪黑素处理后再接种灰霉病菌, 病斑面积显著降低, 0.2 mmol·L<sup>-1</sup>褪黑素处理后间隔72 h以上接种病原菌的处理, 防效高达83%以上。0.1~0.4 mmol·L<sup>-1</sup>褪黑素对灰霉病菌分生孢子萌发和菌丝生长均无明显的抑制作用, 但褪黑素可显著提高果实内过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)、超氧化物歧化酶(SOD)、多酚氧化酶(PPO)和苯丙氨酸解氨酶(PAL)活性, 其峰值是对照的1.86~8.73倍, 且在测定时间内始终显著高于对照。表明外源褪黑素通过持续提高果实内防御酶活性诱导苹果对灰霉病的抗性。

**关键词:** 褪黑素; 苹果; 灰霉病菌; 防御酶; 诱导抗性

由灰葡萄孢菌(*Botrytis cinerea*)引起的灰霉病是苹果采后贮藏期间的主要病害之一, 该病害在苹果采后运输、贮藏等各个环节均可发生, 造成严重经济损失(Shao等2010; 尹明安等2015)。果实感病后在表面形成圆形或近圆形的水渍状软腐病斑, 后期病斑上产生鼠灰色霉状物和分生孢子。由于灰葡萄孢具有很强的耐低温能力, 即使在冷藏条件下也可导致果实腐烂, 并且存在接触传染(张晓晓等2015)。有效控制灰霉病对于提高苹果采后贮藏保鲜具有重要意义。

目前, 生产上防治果实采后灰霉病的传统方法主要是依赖化学杀菌剂(Romanazzi等2016), 但是化学杀菌剂的药剂残留、病原菌易对其产生抗性和环境污染严重等问题已日趋严重, 多种杀菌剂已被限制或禁止使用(范青等2001; 袁仲玉等2014)。因此, 寻求可替代化学杀菌剂的安全有效防治措施已成为苹果采后贮藏中亟待解决的问题。大量研究表明, 生物防治因其高效和无污染的特点, 是解决农业可持续发展的有效途径, 有的生防制剂已在生产中得到应用(Droby等1998; Usall等2001; Cao等2013; Zhang等2016)。

褪黑素又称松果体素, 是一种吲哚胺类物质, 广泛存在于植物的果实组织中(Lei等2013; 王蕊等2016)。Hernández-Ruiz等(2004)和Kim等(2016)先后研究发现, 褪黑素可在植物组织内自由移动, 能够清除自由基且具有抗氧化作用, 被认为是一种新的植物生长调节剂。内源褪黑素含量增加可缓解病原物、害虫等生物因子以及干旱、重金属、低温等环境胁迫对植物造成的损伤(Tan等2012; Reiter等2015)。利用外源褪黑素处理, 可显著诱导

苹果叶片对褐斑病菌(*Diplocarpon mali*)的抗性(Yin等2013), 最近, Aghdam和Fard (2017)发现外源褪黑素处理可降低草莓的采后腐烂并维持草莓的营养品质。

外源褪黑素在苹果防腐保鲜中的研究和应用尚未见报道, 本研究拟以‘富士’果实为材料, 测定外源褪黑素对苹果采后灰霉病的防效, 对病原菌是否存在抑制作用, 及其对果实防御酶活性的影响, 探讨外源褪黑素防治果实灰霉病的作用机制, 旨在为苹果采后灰霉病的防治提供新途径, 并为褪黑素在苹果采后保鲜中的应用提供理论依据。

## 材料与方法

### 1 供试材料

供试材料为健康成熟‘富士’苹果(*Malus domestica* Borkh. cv. Fuji), 采集自山东莱阳商品苹果园, 选择大小一致的健康果实于低温保存备用。灰霉病菌菌株分离自表现出典型灰霉病症状的苹果果实, 单孢分离后于本实验室保存。褪黑素(分析纯)购买自Sigma公司, 酶活性测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所有限公司。

灰霉病菌培养采用马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基: 马铃薯200.0 g、葡萄糖20.0 g、琼脂20.0 g, 蒸馏水定容至1 000 mL。

收稿 2017-05-18 修定 2017-08-11

资助 现代农业产业技术体系建设专项资金(CARS-28)、国家级大学生创新训练项目(200610435005)、国家自然科学基金(31272001)和山东省“泰山学者”建设工程专项经费。

\* 共同第一作者

\*\* 通讯作者(E-mail: cxwang@qau.edu.cn)。

## 2 方法

### 2.1 灰霉病菌孢子悬浮液的制备

灰霉病菌LXS0101由本实验室分离并保存,于PDA培养基上活化培养2 d,在菌落边缘打取直径6 mm的菌饼,再次接种在新的PDA培养基上,于25°C条件下恒温避光诱导产孢。培养7 d后,用0.05% Tween 20将菌丝上的分生孢子冲洗下来,过滤后用血球计数板计数,并将分生孢子浓度调整为 $10^6$ 个·mL<sup>-1</sup>,现配现用。

### 2.2 外源褪黑素对果实灰霉病的防效

挑选大小适中、色泽相近、无病虫害、果形端正、成熟度一致的‘富士’苹果,流水洗净后用75%的酒精擦拭表面,晾干(雍道敬等2014)。用无菌接种针沿苹果赤道造成3处伤口,每处针刺8下深约1 mm,伤口均匀分布在直径6 mm的圆形区域,待伤口晾干后分别滴入20 μL不同浓度的褪黑素溶液(0.1~0.4 mmol·L<sup>-1</sup>),以无菌水处理作对照。于25°C恒温处理72 h后,每伤口接种20 μL灰霉病菌孢子悬浮液( $10^6$ 个·mL<sup>-1</sup>)。接种后果实置于密封保鲜盒中,于25°C培养,定期统计果实发病率,测量病斑直径,计算病斑面积和防治效果。防治效果=(对照组病斑面积-处理组病斑面积)/对照组病斑面积×100%。

选取防效最佳的褪黑素浓度,采用上述刺伤方法,于外源褪黑素处理不同时间6、12、24、48、72、96和120 h后,接种 $1 \times 10^6$ 个·mL<sup>-1</sup>的灰霉病菌孢子悬浮液。定期观察果实发病和病斑扩展情况,测定病斑面积并计算防治效果,确定褪黑素的最好处理时间。每处理接种3个果实,以上试验重复3次。

### 2.3 外源褪黑素对灰霉病菌孢子萌发和菌丝生长的影响

采用玻片法观察褪黑素对灰霉病菌孢子萌发的影响(王彩霞等2012),用1%葡萄糖溶液制备灰霉病菌孢子悬浮液。用不同浓度0.1~0.4 mmol·L<sup>-1</sup>褪黑素将孢子悬浮液稀释至 $10^6$ 个·mL<sup>-1</sup>,各取25 μL滴在凹玻片中央,并置于铺有湿滤纸的培养皿中于25°C恒温保湿,以不加褪黑素的葡萄糖液作对照。每隔12 h显微镜下观察孢子萌发情况,每个处理5个玻片。

采用平板法测定褪黑素对灰霉病菌菌丝生长

的影响,制备含不同浓度褪黑素(0.1~0.4 mmol·L<sup>-1</sup>)的PDA培养基,接种活化的灰霉病菌菌饼,以未加褪黑素的PAD作对照。于25°C恒温暗培养,定期观察菌落生长并测量菌落直径,每个处理接种3个平皿。

### 2.4 外源褪黑素处理后果实内防御酶活性测定

按2.2中方法选取苹果后,将其分别进行如下处理:(1)无菌水处理作对照(Control);(2)外源褪黑素处理(MT);(3)接种灰霉病菌(Pathogen);(4)褪黑素处理72 h后接种灰霉病菌(MT+Pathogen)。每组处理接种12个苹果,每个果实刺伤3个点,接种病原菌后定期观察发病情况,以接种点为中心取病健交界处果肉组织,于-80°C冰箱保存备用(Zhang等2016)。每处理随机选取2个果实,以接种点的混合样作为1个重复,以上试验重复3次。

取2 g果肉组织,液氮充分研磨后,加入8 mL含1% PVP的0.1 mol·L<sup>-1</sup>磷酸缓冲液(pH 5.5~8.8),于4°C、10 000×g离心20 min,得上清液即为酶粗提取液(朱学明等2015)。用南京建成试剂盒测定过氧化物酶(peroxidase, POD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)和超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)的活性,其中CAT活性测定采用钼酸铵法,POD和SOD活性测定分别采用愈创木酚法和黄嘌呤氧化酶法,具体方法参考试剂盒说明书。苯丙氨酸解氨酶(phenylalanine ammonia lyase, PAL)活性的测定参考Youssef等(2014)的方法,多酚氧化酶(polyphenol oxidase, PPO)活性的测定采用邻苯二酚法(雍道敬等2014)方法。酶活性以每克果肉组织鲜重表示[U·g<sup>-1</sup> (FW)]。

### 2.5 数据分析

采用Microsoft Excel 2010作图,用SPSS 19.0软件进行数据统计分析。

## 实验结果

### 1 外源褪黑素对苹果灰霉病的防效

#### 1.1 外源褪黑素浓度对防治灰霉病效果的影响

外源褪黑素预处理苹果果实后再接种灰霉病菌孢子悬浮液,相比无菌水处理的对照,病斑面积显著降低,但不同浓度褪黑素对灰霉病的防治效果存在明显差异(图1)。接种灰霉病菌后3 d,病斑开始明显扩展,此时高浓度褪黑素的防效最差仅

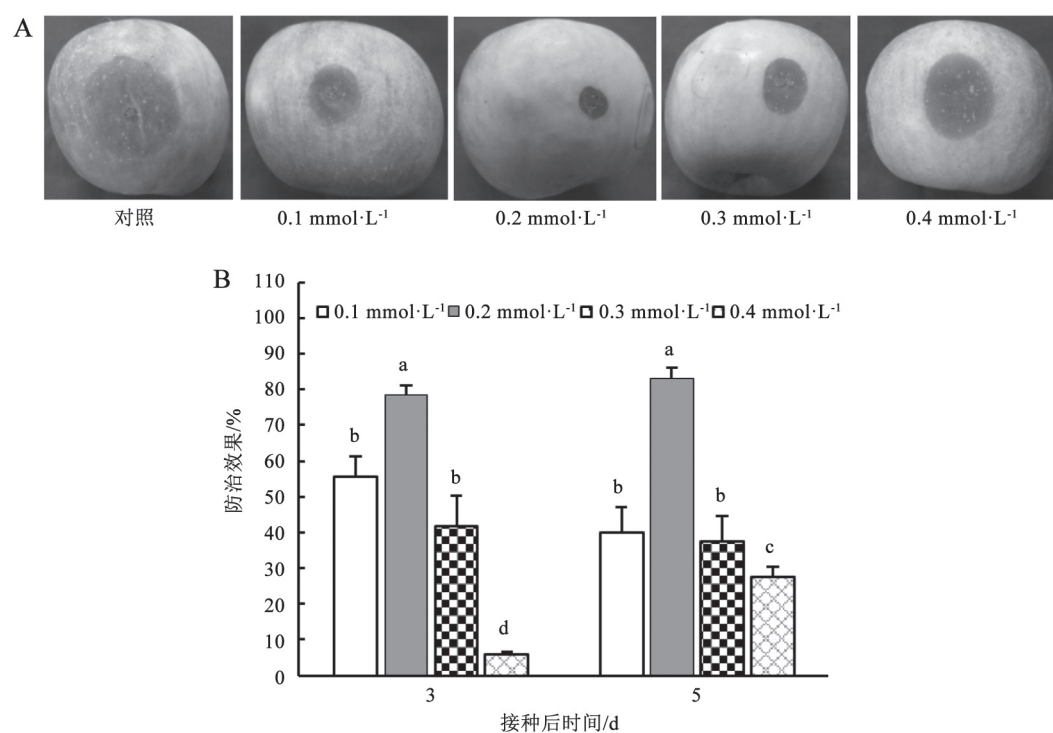


图1 不同浓度外源褪黑素对苹果灰霉病的防治效果

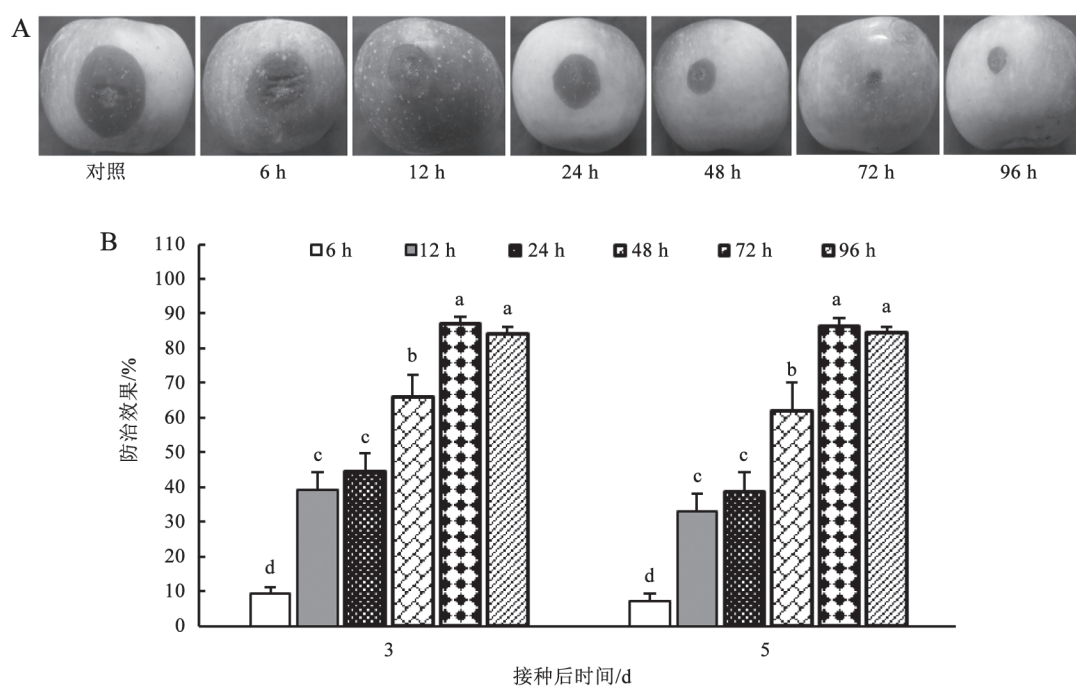
Fig.1 Control efficiency of exogenous melatonin at different concentrations against *B. cinerea* in apple fruit图中不同字母表示经Duncan氏新复极差法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著, 图2和图3同此。

图2 褪黑素处理不同间隔时间对苹果灰霉病的防治效果

Fig.2 Control efficiency of melatonin with different treatment time against *B. cinerea* in apple fruit

为5.86%, 显著低于其他3个浓度, 其中0.1 mmol·L<sup>-1</sup>褪黑素的防效为55.58%, 与0.3 mmol·L<sup>-1</sup>褪黑素的防效相当, 但均显著低于0.2 mmol·L<sup>-1</sup>褪黑素的防效。随接种时间延长, 对照果实病斑扩展迅速, 而褪黑素处理后, 病斑扩展缓慢, 接种后5 d时, 仅0.1和0.3 mmol·L<sup>-1</sup>褪黑素处理的防效略有下降, 但与3 d时的防效无显著差异; 0.4 mmol·L<sup>-1</sup>褪黑素的防效明显升高为27.71%, 此时0.2 mmol·L<sup>-1</sup>褪黑素的防效仍显著高于其他3个浓度, 达83.01%。

### 1.2 间隔时间对褪黑素防治灰霉病效果的影响

褪黑素处理后接种病原菌的不同间隔时间, 对灰霉病的防治效果也存在明显差异。图2结果显示, 间隔时间在6~72 h内, 随间隔时间的延长, 对灰霉病的防效逐渐升高, 但随接种病原菌时间的延长, 其防效没有显著变化。褪黑素处理后间隔6 h接种灰霉病菌, 其防治效果最低不足10%, 间隔12 h和24 h的处理防效相当, 均显著低于间隔时间48 h的处理; 间隔时间为72 h时, 对灰霉病的防效最高达86%以上。间隔时间为96 h时, 其对灰霉病的防效略有降低, 但与间隔72 h的防效差异不显著。

### 2 外源褪黑素对灰霉病菌孢子萌发和菌丝生长的影响

灰霉病菌分生孢子在未添加褪黑素的葡萄糖溶液中的萌发率为97.77%, 随添加褪黑素浓度的升高, 孢子萌发率略有变化, 从97.43%逐渐降低至96.03%, 但与对照相比均无显著差异(图3-A)。利用平板法测定了不同浓度褪黑素对灰霉病菌菌丝生长的影响, 图3-B结果显示, 灰霉病菌在添加不同浓度褪黑素的PDA平板上培养3 d后, 菌落直径无明显差别, 均在6.80 cm以上, 且与不添加褪黑素的对照相比均不存在显著差异。以上结果表明, 不同浓度褪黑素对灰霉病菌的孢子萌发和菌丝生长均无明显的抑制作用。

### 3 外源褪黑素处理后苹果果实内防御酶活性的时序变化

#### 3.1 POD、CAT和SOD抗氧化酶活性

各处理果实内POD活性相比喷施无菌水的对照均显著升高, 但不同处理诱导的酶活性变化趋势存在明显差异(图4-A)。接种灰霉病菌的处理, 1 d后POD活性开始显著升高, 于接种后3 d达到峰值, 是对照酶活性的2.20倍, 随后酶活性水平快速

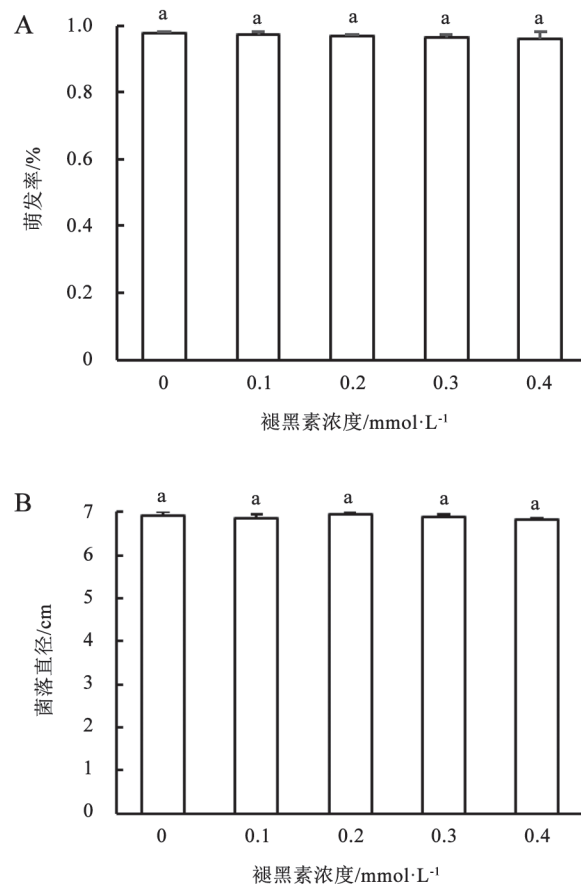


图3 不同浓度褪黑素对灰霉病菌孢子萌发和菌丝生长的影响  
Fig.3 Effect of melatonin at different concentrations on conidial germination (A) and mycelial growth (B) of *B. cinerea*

降低至对照水平。褪黑素(MT)单独处理和MT预处理后再接种灰霉病菌的处理, 12 h后POD活性水平已显著升高, 前者于处理后3 d酶活性最高为对照的3.16倍, 随后酶活性缓慢下降, 但始终显著高于对照; 后者于接种后1 d即到达酶活性高峰, 是对照的3.94倍, 在接种后3 d时到达另一个活性高峰, 随后酶活性略有降低, 但接种后5 d时酶活性水平仍为对照的2.59倍。

由图4-B可见, 相比对照, 各处理均显著提高了果实内CAT活性, 但酶活性变化存在明显差异。MT处理后12 h, CAT活性开始快速升高, 于4 d达到最大值, 为对照的2.04倍, 随后酶活性快速降低。接种灰霉病菌和MT预处理后再接种病原菌的处理, CAT活性分别于接种后3和4 d达到高峰, 分别为对照的1.76和2.57倍; 前者酶活性随后急剧下降, 在接种后5 d时, 已降低至对照水平, 而后者自接种

后1 d开始, 酶活性始终维持在较高水平, 接种后5 d时仍为对照的2.50倍。

果实经无菌水处理后SOD活性没有明显变化, 但其他处理酶活性均显著升高(图4-C)。接种灰霉病菌的处理, SOD活性变化趋势与CAT和POD类似, 呈现先升高后降低的单峰曲线, 接种后2 d达到峰值为7.65 U·g<sup>-1</sup> (FW), 随后酶活性快速降低至对照水平。MT处理后12 h, SOD活性开始显著升高,

于1 d达到活性高峰为8.63 U·g<sup>-1</sup> (FW), 随后酶活性缓慢下降; MT预处理后再接种灰霉病菌的处理, SOD活性呈现先升高后降低再升高的双峰曲线, 于接种后12 h即达到活性高峰为10.20 U·g<sup>-1</sup> (FW), 随后酶活性有所降低, 于接种后3 d到达另一活性高峰9.57 U·g<sup>-1</sup> (FW)。上述结果表明, 外源褪黑素提高‘富士’果实对灰霉病的抗性, 与其诱导果实内抗氧化酶活性升高密切相关。

### 3.2 PAL和PPO的活性

‘富士’果实经无菌水处理后, PAL活性无明显变化, 但其他3个处理均显著提高了PAL活性(图5-A)。MT处理后接种或不接种灰霉病菌的处理, 果实内PAL活性变化趋势一致, 于12 h后酶活性开始显著升高, 于3~4 d后到达活性高峰, 分别是对照的3.40和3.23倍, 随后酶活性始终维持在较高水平, 5 d时酶活性仍为对照的2.7倍以上; 单独接种灰霉

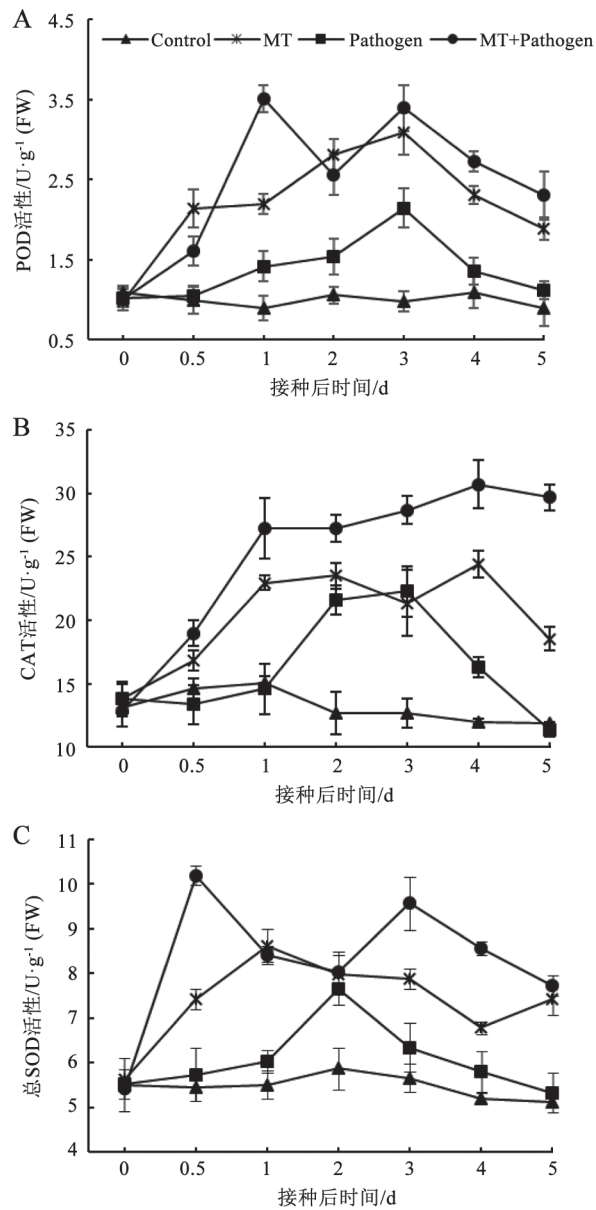


图4 褪黑素处理对苹果果实中POD、CAT和SOD活性的影响  
Fig.4 Effect of melatonin treatment on POD, CAT and SOD activities in apple fruit

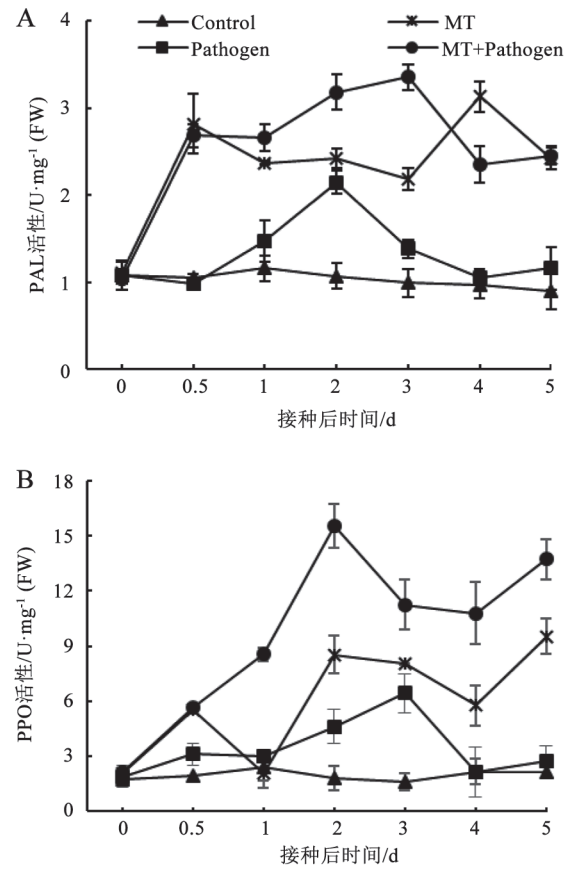


图5 褪黑素处理对苹果果实中PAL和PPO活性的影响  
Fig.5 Effect of melatonin treatment on PAL and PPO activities in apple fruit

病菌的处理, 酶活性于接种后2 d达到活性峰值, 为对照的2.01倍, 但随后酶活性快速降低, 接种后4 d时已与对照无显著差异。

相比对照, 各处理均可显著提高果实内PPO活性(图5-B)。单独接种灰霉病菌的处理, 于接种后3 d酶活性水平最高, 为对照的3.96倍, 但随后酶活性急剧下降至对照水平; MT处理后, PPO活性于12 h显著升高, 但1 d时酶活性降低至对照水平, 随后酶活性显著升高并始终维持在较高水平, 5 d时酶活性为 $9.52 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$  (FW); MT预处理后再接种灰霉病菌的处理, 酶活性于接种后2 d到达峰值, 是对照的8.73倍, 随后酶活性略有降低, 但接种后5 d时仍高达 $13.74 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$  (FW)。由此可见, 褪黑素可显著提高‘富士’果实PAL和PPO活性, 以抑制灰霉病菌的侵染和扩展。

## 讨 论

褪黑素在植物组织内广泛存在, 具有特殊的生物学功能, 且利用植物自身的物质进行病害防控已成为目前研究的新趋势(黄小兰等2016; 王蕊等2016)。本研究结果显示, 外源褪黑素对苹果灰霉病具有显著的防治效果,  $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 褪黑素预处理后间隔72 h以上接种灰霉病菌, 5 d后防效高达83%以上。防病机制研究发现,  $0.1 \sim 0.4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 褪黑素对灰霉病菌分生孢子萌发和菌丝生长均无明显的抑制作用, 但褪黑素可显著提高果实内防御酶活性诱导果实对灰霉病菌的抗性。表明外源褪黑素对果蔬采后病害防治具有重要意义。

苹果果实受到病原菌侵染后, 最初的防御反应与活性氧的积累密切相关, 活性氧不仅可直接杀死真菌, 而且可进一步激活果实的防御体系, 但活性氧长期过量积累可导致果实细胞膜过氧化, 膜结构及整个膜系统遭受严重破坏(Shao等2010; Zhang等2016)。大量研究已证实, 褪黑素具有极强抗氧化能力, 可显著减少植物体内积累的活性氧含量, 并且能够激活相关基因的表达, 提高植物体内防御酶活性(Yin等2013; 王伟香等2016)。POD、CAT和SOD是植物体内重要的抗氧化酶, 具有清除自由基的功能, 三者协同作用以维持植物体内活性氧的正常代谢(朱学明等2015)。本研究中, 外源褪黑素处理和接种灰霉病菌均可提高果

实内3种防御酶活性, 但不同处理诱导的酶活性时序变化趋势存在显著差异。接种病原菌的处理, POD、SOD和CAT活性增幅最小, 且到达活性高峰时间较晚, 于接种后2~3 d到达峰值, 随后酶活性快速下降与对照无显著差异。而褪黑素预处理后再接种病原菌的处理, POD和SOD分别于接种后1 d和12 h到达活性高峰, 随后酶活性仅略有降低; CAT虽接种后4 d时活性最高, 但该处理中接种后1~5 d酶活性变幅较小并无显著差异, 始终维持在较高水平。结合果实接种灰霉病菌后的病斑扩展情况, 对照果实病斑扩展迅速, 接种后5 d时病斑面积达 $12.64 \text{ cm}^2$ , 而外源褪黑素处理后病斑扩展缓慢, 病斑面积仅为 $2.14 \text{ cm}^2$ 。表明外源褪黑素处理可通过持续提高果实内POD、SOD和CAT活性, 维持其抗氧化能力和活性氧代谢平衡, 从而诱导果实的抗病性。

此外, POD还参与细胞壁的交联过程, 如促进酚类物质的氧化、细胞壁木栓化或木质化作用等, 其活性升高可有效抑制病原菌的侵染和扩展(郑文字等2013)。Yin等(2013)报道外源施加褪黑素后, 苹果叶片中POD活性显著升高, 可有效阻止苹果褐斑病菌的侵入与扩展。本研究中, 外源褪黑素处理后再接种灰霉病菌, POD活性于接种后1 d到达峰值, 最大酶活性是对照的3.94倍, 且测定时间内一直维持在较高水平, 这与雍道敬等(2014)和Zhang等(2016)利用生防菌A-1诱导苹果果实抵抗轮纹病菌侵染的研究结果一致。

诸多研究表明, PPO和PAL活性变化是植物抗病性的重要生理指标, PAL是苯丙烷代谢途径的第一个关键酶, 对于参与植物抗病性酚类物质的合成至关重要; PPO是植保素合成、酚类物质氧化成醌、木质素积累等过程的关键酶, 可促使细胞壁木质化, 减少病原菌侵染对植物造成的损伤(Dixon等2002; Mishra等2012; Nikraftar等2013)。Aghdam和Fard (2017)研究发现, 外源褪黑素处理后, 草莓果实内PAL活性相比对照显著升高, 从而提高了草莓的抗病性降低了果实采后腐烂; Zhang等(2016)报道生防菌A-1显著提高了果实内PPO和PAL活性, 对苹果的诱导抗病性有显著影响。本研究中, 接种灰霉病菌后2 d, 果实内PPO和PAL活性开始明显升高, 但增幅较小且持续时间短, 接种后4 d时酶活

性已降低至对照水平; 而外源褪黑素处理后12 h, 果实内两种酶活性已显著升高, 最大酶活性是对照的3.40~8.73倍, 且始终维持在较高水平, 表明外源褪黑素的诱导作用不仅能够阻止灰霉菌对果实的早期侵染, 同时具有一定的持效性可显著降低病原菌在果实内的扩展。

总之, 外源褪黑素对苹果采后灰霉病具有显著的防治效果, 其防病机制与抑菌作用无关, 而是诱导果实的抗病性, 与果实内防御酶活性的时序变化密切相关, 但褪黑素诱导植物抗病的分子机制尚需深入研究。可见, 利用外源褪黑素防治果蔬采后病害具有持续时间长、抗病谱广及不污染环境等优点, 符合现代农业减少农药使用量, 降低食品农药残留的发展战略, 必将成为植物病害安全有效防控的新策略和可行途径。

### 参考文献

- Aghdam MS, Fard JR (2017). Melatonin treatment attenuates postharvest decay and maintains nutritional quality of strawberry fruits (*Fragaria × ananassa* cv. Selva) by enhancing GABA shunt activity. *Food Chem*, 221: 1650–1657
- Cao J, Zhang HY, Yang QY, Ren R (2013). Efficacy of *Pichia caribbica* in controlling blue mold rot and patulin degradation in apples. *Int J Food Microbiol*, 162: 167–173
- Dixon RA, Achnine L, Kota P, Liu CJ, Mss R, Wang L (2002). The phenylpropanoid pathway and plant defence--a genomics perspective. *Mol Plant Pathol*, 3 (5): 371–390
- Droby S, Cohen L, Daus A, Weiss B, Horev B, Chalutz E, Shachnai A (1998). Commercial testing of Aspire: a yeast preparation for the biological control of postharvest decay of citrus. *Biol Control*, 12 (2): 97–101
- Fan Q, Tian SP, Xu Y (2001). Effects of *Trichosporon* sp. on biocontrol efficacy of grey and blue mold on postharvest apple. *Sci Agric Sin*, 34 (2): 163–168 (in Chinese with English abstract) [范青, 田世平, 徐勇(2001). 丝孢酵母对苹果采后灰霉病和青霉病抑制效果的影响. *中国农业科学*, 34 (2): 163–168]
- Hernández-Ruiz J, Cano A, Arnao MB (2004). Melatonin: a growth-stimulating compound present in lupin tissues. *Planta*, 220 (1): 140–144
- Huang XL, Gai ZX, Wang RK, He MY, Han L, Zhou L (2016). Mechanism and inhibitory effect of *p*-hydroxybenzoic acid on anthracnose in postharvest citrus. *Food Machin*, 32 (9): 121–125, 208 (in Chinese with English abstract) [黄小兰, 盖智星, 王日葵, 贺明阳, 韩冷, 周炼(2016). 对羟基苯甲酸处理对采后柑橘炭疽病的抑制及机理研究. *食品与机械*, 32 (9): 121–125, 208]
- Kim M, Seo H, Park C, Park WJ (2016). Examination of the auxin hypothesis of phyto-melatonin action in classical auxin assay systems in maize. *J Plant Physiol*, 190: 67–71
- Lei Q, Wang L, Tan DX, Zhao Y, Zheng XD, Chen H, Li QT, Kong J (2013). Identification of genes for melatonin synthetic enzymes in 'Red Fuji' apple (*Malus domestica* Borkh. cv. Red) and their expression and melatonin production during fruit development. *J Pineal Res*, 55 (4): 443–451
- Mishra BB, Gautam S, Sharma A (2012). Purification and characterisation of polyphenol oxidase (PPO) from eggplant (*Solanum melongena*). *Food Chem*, 134 (4): 1855–1861
- Nikraftar F, Taheri P, Rastegar FM, Tarighi S (2013). Tomato partial resistance to *Rhizoctonia solani* involves antioxidative defense mechanisms. *Physiol Mol Plant Pathol*, 81 (4): 74–83
- Reiter RJ, Tan DX, Zhou Z, Cruz MHC, Fuentes-Broto L, Galano A (2015). Phytomelatonin: assisting plants to survive and thrive. *Molecules*, 20 (4): 7396–7437
- Romanazzi G, Smilanick JL, Feliziani E, Droby S (2016). Integrated management of postharvest gray mold on fruit crops. *Postharvest Biol Tec*, 113: 69–76
- Shao X, Tu K, Tu S, Su T, Zhao Y (2010). Effects of heat treatment on wound healing in Gala and Red Fuji apple fruits. *J Agr Food Chem*, 58 (7): 4303–4309
- Tan DX, Hardeland R, Manchester LC, Korkmaz A, Ma S, Rosales-Corral S, Reiter RJ (2012). Functional roles of melatonin in plants, and perspectives in nutritional and agricultural science. *J Exp Bot*, 63 (2): 577–597
- Usall J, Teixido N, Torres R, de Eribe XO, Viñas I (2001). Pilot tests of *Candida sake* (CPA-1) applications to control postharvest blue mold on apple fruit. *Postharvest Biol Tec*, 21 (2): 147–156
- Wang CX, Zhang QM, Li GF, Dong XL, Li BH (2012). Identification of the antagonistic bacteria BJI and its antifungal activity against *Valsa ceratosperma*. *Acta Phytophy Sin*, 39 (5): 431–437 (in Chinese with English abstract) [王彩霞, 张清明, 李桂舫, 董向丽, 李保华(2012). 苹果树腐烂病拮抗细菌菌株BJI的鉴定及其抑菌作用. *植物保护学报*, 39 (5): 431–437]
- Wang R, Yang XL, Xu H, Li TL (2016). Research progress of melatonin biosynthesis and metabolism in higher plants. *Plant Physiol J*, 52 (5): 615–627 (in Chinese with English abstract) [王蕊, 杨小龙, 须晖, 李天来(2016). 高等植物褪黑素的合成和代谢研究进展. *植物生理学报*, 52 (5): 615–627]
- Wang WX, Zhang RM, Sun Y, Liu JL (2016). Effect of exogenous melatonin on the antioxidant system of cucumber seedlings under nitrate stress. *Acta Hort Sin*, 43 (4): 695–703 (in Chinese with English abstract) [王伟香, 张锐敏, 孙艳, 刘建龙(2016). 外源褪黑素对硝酸盐胁迫条件下黄瓜幼苗抗氧化系统的影响. *园艺学报*, 43 (4): 695–703]
- Yin LH, Wang P, Li MJ, Ke XW, Li CY, Liang D, Wu S, Ma XL, Li C, Zou YG (2013). Exogenous melatonin improves *Malus* resistance to Marssonina apple blotch. *J Pineal Res*, 54: 426–434
- Yin MA, Li YJ, Ren XL (2015). Increasing disease resistance by low dose of UV-C radiation in harvested apple. *Trans Chin Soc Agric Eng*, 31 (2): 324–332 (in Chinese with English abstract) [尹明安, 李玉娟, 任小林(2015). 低剂量短波紫外线照射提高采后苹果抗病性. *农业工程学报*, 31 (2): 324–332]
- Yong DJ, Wang CX, Li GF, Li BH (2014). Control efficiency of endophytic actinomycetes A-1 against apple fruit ring rot and its influence on the activity of defense-related enzymes. *Acta Phy-*

- tophy Sin, 41 (3): 335–341 (in Chinese with English abstract) [雍道敬, 王彩霞, 李桂舫, 李保华(2014). 内生放线菌A-1对苹果果实轮纹病的防效及防御性酶活性的影响. 植物保护学报, 41 (3): 335–341]
- Youssef K, Sanzanib SM, Ligorib A, Ippolitob A, Terry LA (2014). Sodium carbonate and bicarbonate treatments induce resistance to postharvest green mould on citrus fruit. *Postharvest Biol Tec*, 87: 61–69
- Yuan ZY, Zhou HL, Tian R, Zhang XX, Pan YX (2014). Effects and mechanism of *Aloe vera* extracts on control of botrytis in post-harvest apples. *Trans Chin Soc Agric Eng*, 30 (4): 255–263 (in Chinese with English abstract) [袁仲玉, 周会玲, 田蓉, 张晓晓, 潘钰雪(2014). 芦荟粗提物对苹果采后灰霉病的防治效果与机理. 农业工程学报, 30 (4): 255–263]
- Zhang QM, Yong DJ, Zhang Y, Shi XP, Li BH, Li GF, Liang WX, Wang CX (2016). *Streptomyces rochei* A-1 induces resistance and defense-related responses against *Botryosphaeria dothidea* in apple fruit during storage. *Postharvest Biol Tec*, 115: 30–37
- Zhang XX, Zhou HL, Tian R, Zhou XW, Fan S (2015). Effects and mechanism of UV-C treatments on control of *Botrytis cinerea* in postharvest apples. *Food Sci*, 36 (2): 242–249 (in Chinese with English abstract) [张晓晓, 周会玲, 田蓉, 周晓婉, 樊胜(2015). 短波紫外线照射对苹果采后灰霉病抗性诱导作用. 食品科学, 36 (2): 242–249]
- Zheng WY, Ding ZH, Liu H, Deng C, Xiao ZR (2013). Effect of pathogens causing discoloration on defensive system in red pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Physiol J*, 49 (4): 357–361 (in Chinese with English abstract) [郑文字, 丁筑红, 刘海, 邓程, 肖治柔(2013). ‘花壳’病菌对辣椒防御系统的影响. 植物生理学报, 49 (4): 357–361]
- Zhu XM, Shi XP, Yong DJ, Zhang Y, Li BH, Liang WX, Wang CX (2015). Induction of resistance against *Glomerella cingulata* in apple by endophytic actinomycetes Strain A-1. *Plant Physiol J*, 51 (6): 949–954 (in Chinese with English abstract) [朱学明, 史祥鹏, 雍道敬, 张颖, 李保华, 梁文星, 王彩霞(2015). 内生放线菌A-1诱导苹果对炭疽叶枯病的抗性. 植物生理学报, 51 (6): 949–954]

## Control efficiency of exogenous melatonin against postharvest apple grey mold and its influence on the activity of defensive enzymes

CAO Jing-Jing\*, YU Zi-Chao\*, ZHANG Ying\*, LI Bao-Hua, LIANG Wen-Xing, WANG Cai-Xia\*\*

Key Lab of Integrated Crop Pest Management of Shandong, College of Plant Health and Medicine, Qingdao Agricultural University, Qingdao, Shandong 266109, China

**Abstract:** In the present study, apple fruit (*Malus domestica*) ‘Fuji’ was used to investigate the control efficiency and biocontrol mechanism of exogenous melatonin against postharvest apple grey mold caused by *Botrytis cinerea* with the wound inoculation. The results showed that exogenous melatonin pretreatment significantly reduced the lesion areas compared with the treatment only inoculated with *B. cinerea*. When pretreated with 0.2 mmol·L<sup>-1</sup> melatonin for more than 72 h, followed by *B. cinerea* inoculation, the control efficiency was up to 83%. Melatonin at different concentrations (0.1 to 0.4 mmol·L<sup>-1</sup>) had no significant inhibitory effect on conidial germination and mycelial growth of *B. cinerea*. However, the activities of defensive enzymes such as peroxidase (POD), catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), polyphenol oxidase (PPO) and phenylalanine ammonialyase (PAL) were significantly increased in exogenous melatonin treated fruit, which were all significantly higher than the control in the determination time. The activity peaks of POD, CAT, SOD, PPO and PAL in fruit treated with melatonin were 1.86 to 8.73 times higher than those of controls. The results suggested that exogenous melatonin could induce apple fruit resistance against *B. cinerea* infection via increasing the activities of defensive enzymes.

**Key words:** melatonin; apple; *Botrytis cinerea*; defensive enzymes; induced resistance

Received 2017-05-18 Revised 2017-08-11

This work was supported by the Chinese Modern Agricultural Industry Technology System (Grant No. CARS-28), the National Undergraduate Innovative Training Program (Grant No. 200610435005), the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 31272001) and the Taishan Scholar Construction Foundation of Shandong Province.

\*Co-first author.

\*\*Corresponding author (E-mail: cxwang@qau.edu.cn).