

外源绿原酸对苹果自身绿原酸合成及灰霉病抗性的影响

王大将, 刘洪冲, 张梦宇, 岳正洋, 周会玲*

(西北农林科技大学园艺学院 陕西杨凌 712100)

摘要 为了探讨外源绿原酸对苹果灰霉病抗性及其自身绿原酸合成的影响,用 300 $\mu\text{g/mL}$ 绿原酸溶液处理富士苹果 30 min, 1 d 后接种灰霉菌,以清水处理作为对照组(CK),统计病斑直径和发病率,测定绿原酸合成相关酶基因表达量及酶活性变化。结果表明:用 300 $\mu\text{g/mL}$ 绿原酸处理后,苯丙烷代谢途径上游关键酶 PAL、C4H、4CL 活性显著增加,相应的基因表达量在接种灰霉菌 6 h 后均达到高峰,分别为 CK 组的 10.5、2.5 倍。同时,下游合成基因羟肉桂酸-CoA 酸酯/奎宁酸羟肉桂酸转移酶(HCT/HQT)48 h 时处理组基因表达量达到峰值,约是 CK 组的 3 倍;对香豆酸 3'-羟化酶(C3H)处理组在 6 h 和 12 h 时有两个较高的基因表达量,分别约为 CK 组基因表达量的 3 倍和 5 倍,刺激绿原酸合成量增加,从而诱导果实抗性增强,有效降低苹果灰霉病的发病率,减缓病斑扩张。结论:外源绿原酸处理能够诱导苯丙烷代谢途径酶类的响应,提高苹果体内自身的绿原酸水平,有效抑制苹果灰霉病。

关键词 绿原酸; 苹果; 灰霉病; 苯丙烷代谢; 抗性反应

文章编号 1009-7848(2023)03-0309-09 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.03.032

灰霉病是苹果果实采后的主要病害之一^[1]。过去主要使用化学农药来防治灰霉病,然而这些措施不仅效率低下,而且会造成食品安全和环境污染等问题^[2-4]。近年来,随着现代生物学的发展,人们对植物自身防御机制研究的不断深入,开始利用物理、化学或者生物的方法调控植物体内某种代谢途径,使其产生局部或系统的抗性^[5]。这种方法与其它方法相比更安全、环保、高效。植物体内最重要的一条次生代谢途径就是苯丙烷代谢途径,由这一途径产生的酚类物质,在植物抗病过程中扮演着重要角色^[6]。绿原酸作为植物中主要的酚类化合物,可以提高植物对病原物侵染的抵抗力^[7-10]。Ariel 等^[11]研究发现,植物细胞内含有的绿原酸及其衍生物有清除超氧阴离子及自由基的作用,并可以减少细胞膜的损伤,延缓细胞的衰老凋亡,最终达到提高植物抗病性的目的。Jiao 等^[12]在研究绿原酸处理对水蜜桃青霉病的影响时发现,绿原酸

处理后的水蜜桃可以较好地保持硬度,提高可溶性固形物含量,降低可滴定酸,使 pH 值等品质指标可以维持在较高的水平。然而,外源绿原酸作为诱导因子是否能够增加苹果体内自身绿原酸合成量,能否提高苹果果实对灰霉病的抗性并不清楚。

绿原酸(CGA)在植物体内通过苯丙烷代谢途径合成:苯丙氨酸解氨酶(PAL)将苯丙氨酸催化生成肉桂酸,之后苯丙烷代谢途径中的肉桂酸 4-羟化酶(C4H)和 4-香豆酸辅酶 A 连接酶(4CL)将肉桂酸羟化和甲基化,由此产生 p -香豆酸,然后,通过羟肉桂酸-CoA 酸酯/奎宁酸羟肉桂酸转移酶(HCT/HQT)途径,最终经由对香豆酸 3'-羟化酶(C3H)合成 CGA^[10]。多项研究表明,苯丙烷途径代谢中的 PAL 基因、C4H 基因、4CL 基因、HCT/HQT 基因和 C3H 基因的过表达,可以显著提高细胞体内的绿原酸含量^[13-15]。同时研究发现 PAL、C4H、4CL 是苯丙烷途径代谢中的重要节点酶,其活性与植物的抗病能力密切相关^[16]。本研究通过外源绿原酸处理,分析果实中绿原酸合成相关酶基因表达量和苯丙烷代谢途径关键酶的活性变化,自身绿原酸含量变化及对灰霉病抑制作用,探究该处理对苹果自身绿原酸合成及灰霉病抗性的响应机制,为绿原酸在苹果抗病性中的应用提供理论依据。

收稿日期: 2022-03-06

基金项目: 国家现代农业产业体系项目 (nycytx-08-05-02); 陕西省苹果产业重大专项研究课题 (2020zdzx03-05-01); 陕西省自然科学基金项目 (2021JZ-15)

第一作者: 王大将,男,硕士生

通信作者: 周会玲 E-mail: zhouhuiling@nwsuaf.edu.cn

1 材料与方法

1.1 材料

以西北农林科技大学白水试验站5年生富士苹果为材料。选择中等大小、成熟度和着色一致,无机械损伤和病虫害的果实,运回实验室,备用。灰霉菌(*Botrytis cinerea Pers*)分离纯化过程参考文献[17]和[18]方法。

1.2 仪器与设备

AUY220分析天平、LC2010液相色谱仪,日本岛津公司;UV-1800紫外-可见分光光度计,科大中佳公司;QuantStudio®5实时荧光定量PCR仪,美国ABI公司;SW-CJ-LB型无菌操作台,苏净集团安泰公司;BCD-236DT型冰箱,青岛海尔股份有限公司;A11型液氮研磨仪,德国ika公司;5810R型高速冷冻离心机,德国Eppendorf公司;HH-6数显恒温水浴锅,常州国华电器有限公司;KQ-500DB数控超声波清洗器,昆山。

1.3 方法

1.3.1 试验处理 设置PDA培养基中绿原酸质量浓度分别为0(对照,CK),100,200,300 μg/mL和500 μg/mL,之后每个处理分别接种20 μL 10⁵个/mL灰葡萄孢悬浮液。在黑暗、25℃环境下的培养箱中定期观察灰霉菌生长情况。以菌落直径为参考,确定绿原酸处理的最适抑菌质量浓度。试验

重复3次,最终确定其最佳抑菌质量浓度为300 μg/mL。

苹果果实分为处理和CK两组,每组60个果实,均用70%酒精表面消毒。处理组用300 μg/mL绿原酸浸泡30 min,CK组用清水浸泡。浸泡后取出,在通风条件下自然风干,等待24 h。选取果实赤道位置,用消毒铁钉在苹果阴、阳面均匀刺出深度与大小约为3 mm的伤口。处理和CK组苹果伤口处均接种20 μL 10⁵个/mL灰葡萄孢悬浮液,晾干后用聚乙烯塑料薄膜(厚0.01 mm)覆盖保湿,贮藏于室温(22±2)℃、相对湿度85%~90%的条件下。处理组和CK组均预留出25个果实,以统计果实的病斑直径和发病情况。剩余苹果分别在0,6,12,24 h,2,3,5,7,9 d的同一时刻取发病部位外60~120 mm内的健康果肉,保存至-80℃超低温冰箱,用于测定试验相关指标。

1.3.2 测定指标

1.3.2.1 总RNA提取及qPCR分析 采用CTAB法提取总RNA,使用TaKaRa试剂盒按公司产品说明书操作合成cDNA。按照文献[19]找到目的基因的MDP号,并在GDR(www.rosaceae.org)中找到相关酶的碱基序列,利用Primer premier 5.0软件设计相关基因的特异性实时荧光定量引物,交由奥科鼎盛生物试剂公司合成。

表1 用于RT-PCR的引物序列

Table 1 Primer sequences for RT-PCR

基因	正向引物(5'-3')	反向引物(5'-3')
肌动蛋白 <i>PAL</i>	CTCCGTGGTGGTTTTTAAGT GGAGTCCCAGCTGTGCATTA	GGAGGCAGAAACAGTACCAT AGCCACTAGACCCCAGTTCA
<i>C4H</i>	ACCCGAAACGTCGTCTTTGA	GACGGTGAACACCATGTCTCT
<i>4CL</i>	TTGACATCAGCCCAGACGAC	ACCCTTGTGCGTTAGCATCA
<i>HQT/HCT</i>	AACGTGGACCTGGTGATTCC	CTCCAGGGTTGGAGCGAAAT
<i>C3H</i>	ACAGAGCTTGCAAAGGAGGT	CGTCCCTGCTAAACTTTGCG

按照 TaKaRa SYBR® Prime EX TaqTm II 试剂盒说明进行 qRT-PCR 反应。PCR 反应体系为 10 μL, 包括:5 μL 荧光染料,1 μL cDNA 模板,正、反向引物各 0.4 μL,3.2 μL 无菌去离子水。PCR 的循环扩增过程以及反应体系如下:95℃预变性 3 min,95℃变性 15 s,58℃复性 20 s,72℃延伸 20 s,40 次循环。将每个样品的转录水平与 CK 样品(0 h)进行比较,并根据 2^{-ΔΔCt} 方法计算。

1.3.2.2 苹果灰霉病抗性相关酶活力的测定 苯丙氨酸解氨酶(PAL)的测定:参考 Han C 等^[19]的方法。肉桂酸-4-羟化酶(C4H)的测定:参考 Liu Y 等^[20]方法。4-香豆酰辅酶 A 连接酶(4-CL)的测定:参照 Takshak 等^[21]的方法。

1.3.2.3 绿原酸(CGA)含量测定 参考 Chen 等^[22]的方法并稍作改动。将 1 g 新鲜组织在含有 2 mL 70%甲醇和 2%甲酸的预冷研钵中研磨,匀浆,

转移到试管中,于 4 °C、10 000×g 条件下离心 15 min,取上清液,用注射器过滤(0.45 μm),然后用配有二极管阵列检测器的 LC2010 液相色谱仪分析。Inert Sustain AQ-C18 分离色谱柱(5.0 μm 粒径,4.6 mm×250 mm,日本 GL Sciences Inc.),ODS-3 保护柱(5.0 μm 粒径,4.0 mm×10 mm)。溶剂 A 由溶于水中的 10%甲酸(11.36%,88%甲酸)组成,而溶剂 B 包括 10%甲酸和 1.36%水(11.36%,88%甲酸)的乙腈溶液(HPLC 级,纯度 99.9%)。梯度为 95%A(0 min),85%A(25 min),95%A(30 min)。在 30 °C 柱温箱中流速为 1.0 mL/min。与标准品的保留时间和紫外光谱比较确定峰,根据峰面积和相应的标准品的校准曲线确定绿原酸物的浓度。

1.3.2.4 病斑直径 菌落及病斑直径测量方法参考文献[17]、[18]方法。

发病率确定方法参考王大将等^[18]方法。

1.4 数据分析

分析方法:所有指标在 ANOVA 下用 LSD 分析法。

统计软件:SPSS26.0。

用 Excel 2007 作图。 $P<0.05$, $P<0.01$ 分别表示两组数据间有显著性差异及极显著差异。图中*、**表示显著差异及极显著差异。

2 结果与分析

2.1 外源绿原酸处理对苹果绿原酸合成途径关键酶基因的影响

由图 1a 可知,接种灰霉菌后外源绿原酸处理组和 CK 组的 *PAL* 基因表达量在整个观测期间均呈先增加后降低的趋势,外源绿原酸处理组在接种灰霉菌 6 h 后基因表达量达到高峰,表达量为 CK 组的 10 倍,双方呈现极显著差异($P<0.01$)。CK 组在 120 h 达到最大表达量。整个观测期间,对于 *PAL* 基因表达量,处理组始终高于 CK 组。上述表明通过绿原酸处理能够提高 *PAL* 基因的表达量。

由图 1b 可以看出,CK 组 *C4H* 基因表达量在整个观测期间波动不大,随着时间的推移,*C4H* 基因表达量逐渐降低。处理组接种灰霉菌 6 h 后其 *C4H* 基因出现表达高峰,约为 CK 组表达量的 5 倍,差异极显著($P<0.01$)。6 h 后处理组基因表达

量开始降低,直到观测末期处理组 *C4H* 基因表达量仍高于 CK。

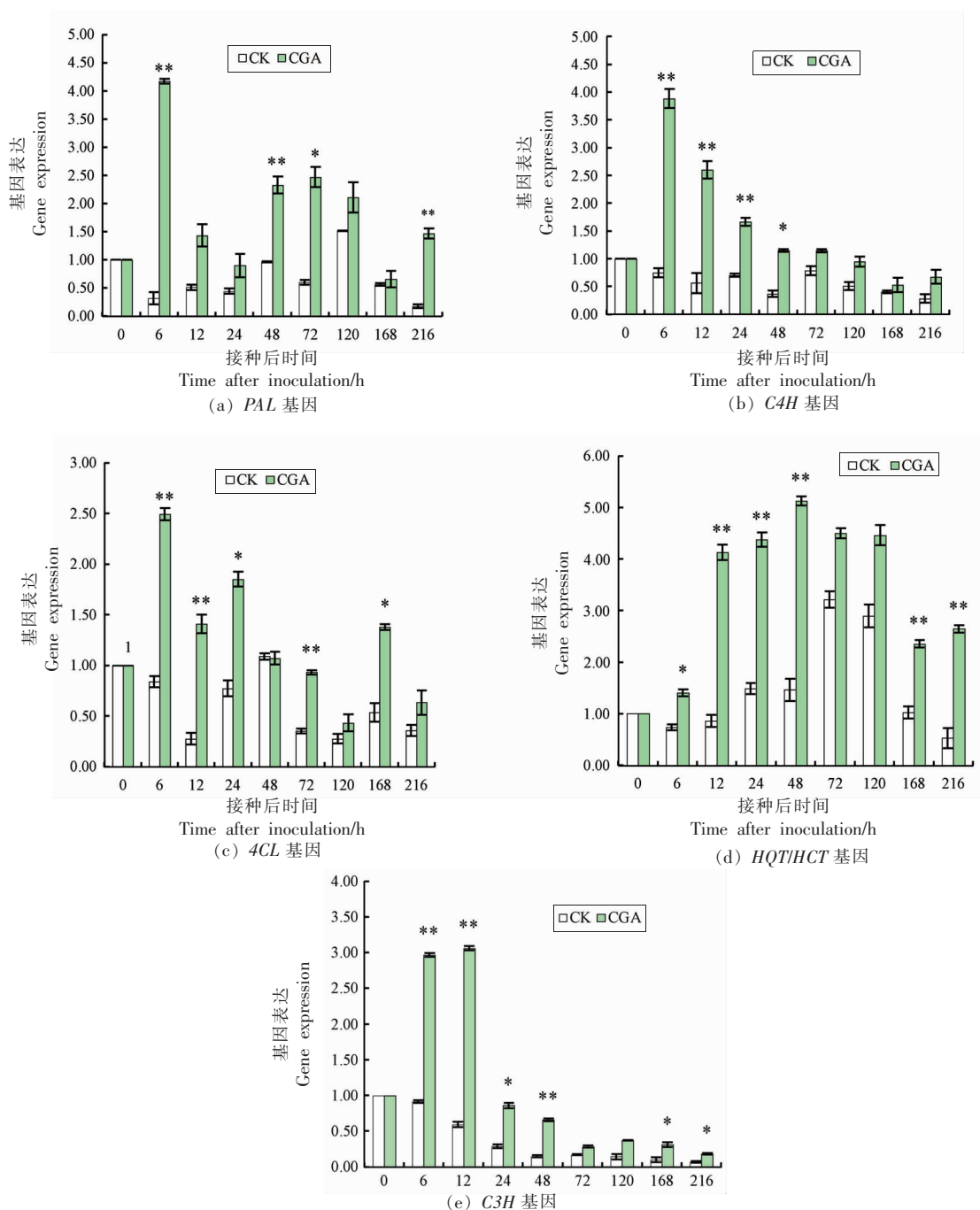
由图 1c 可知,处理组和 CK 组 *4-CL* 基因表达量在整个观测期间均呈先增加后降低的趋势。与 CK 组不同的是,处理组在 6 h 有一个表达高峰,约是 CK 组的 2.5 倍,二者差异极显著($P<0.01$)。6 h 后处理组基因表达量的变化趋势与 CK 组类似。从基因表达量来说,处理组一直高于 CK 组。

由图 1d 可知,CK 组和处理组 *HCT/HQT* 基因表达量变化趋势总体上相同,均呈现先增长后降低的趋势。48 h 时处理组基因表达量达到峰值,约是 CK 组的 3 倍,二者差异极显著($P<0.01$),而 CK 组基因表达量在 72 h 达到峰值。可见,与 CK 组相比,绿原酸处理不仅提高基因表达量,还调节基因的表达时间。

由图 1e 可知,接种灰霉菌后,CK 组 *C3H* 基因表达在整个观测期都呈逐渐降低的趋势,至观测末期 CK 组 *C3H* 基因仅有微弱的表达量,可见接种灰霉菌并未促进 *C3H* 基因的表达。与 CK 组相比,处理组在 6 h 和 12 h 时有两个较高的基因表达量,分别约为 CK 组基因表达量的 3 倍和 5 倍,差异极显著($P<0.01$)。12 h 后处理组表达量迅速降低,变化趋势与 CK 组类似。从 *C3H* 基因表达量来看,处理组始终高于 CK 组。上述可知,与 CK 组相比,使用绿原酸处理能够提高苹果在灰霉病反应机制中 *C3H* 基因的表达量。

2.2 外源绿原酸处理对接种苹果体内绿原酸含量的影响

由图 2 可以看出,接种后果实中绿原酸合成量迅速增加,整个观测期内处理组绿原酸含量均显著高于 CK。处理 0 h,绿原酸含量较高的原因可能是外源绿原酸处理所致,随后外源绿原酸很快被稀释,于 6 h 恢复到与 CK 在同一水平。6 h 后 CK 组和处理组绿原酸含量都开始增加,处理组的增加速度明显高于 CK 组,差异极显著($P<0.01$)。168 h 后两组果实绿原酸含量均有所降低,且处理组降幅大于 CK,这可能是由于绿原酸作用于病原菌,消耗量大于合成量,导致内源绿原酸含量减少。从整体上来看,处理组果实内源绿原酸含量高于 CK 组,从而使处理组果实抗病性强于 CK 组。



注: *、** 表示显著差异及极显著差异。

图1 苹果果实处理后 *PAL*(a)、*C4H*(b)、*4CL*(c)、*HQT/HCT*(d)和 *C3H*(e)基因相对表达水平的变化

Fig.1 Change of relative expression level of *PAL* (a), *C4H* (b), *4CL* (c), *HQT/HCT* (d) and *C3H* (e) genes of fruit after treatment in apple fruit

可见,与CK组相比,绿原酸处理下果实感染病原菌后自身绿原酸的合成量会增加。

2.3 外源绿原酸处理对苹果抗性相关酶活力的影响

PAL 是苯丙烷途径代谢中的关键酶,由此产生一系列抗性物质,在提高植物抗病侵染方面发挥重要作用。由图3a可知,接种灰霉菌后,*PAL*酶活性先升高后降低。处理组 *PAL* 在 24 h 酶活性

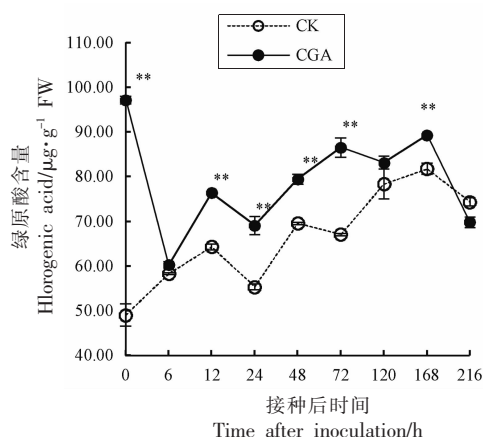


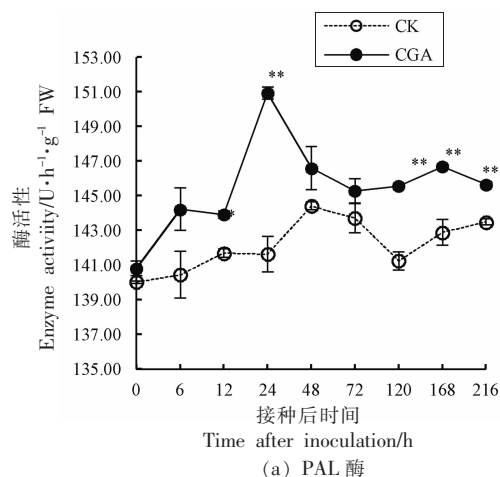
图 2 绿原酸处理对接种苹果绿原酸含量的影响

Fig.2 Effect of chlorogenic acid treatment on chlorogenic acid content of inoculated apple

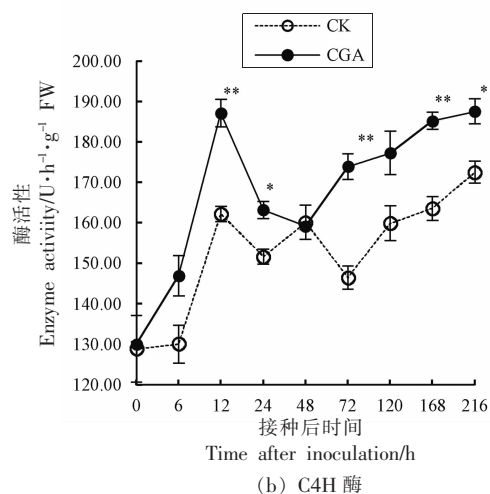
增到最大值,与 CK 组酶活性相比极显著提高 7% ($P<0.01$)。而 CK 组 PAL 酶活性的升高较平缓,在 48 h 时其活性达到最大值。整个 PAL 酶活性变化过程中,处理组 PAL 酶活性始终高于 CK 组。

由图 3b 可知,在接种灰霉菌后处理组和 CK 组 C4H 酶活性变化均呈先升高后降低再升高的趋势。处理组和 CK 组 C4H 酶活性均在 12 h 时达到最大值,且处理组 C4H 酶活性比 CK 组极显著高出 15% ($P<0.01$)。之后,从 72 h 一直到试验后期处理组和 CK 组 C4H 酶活性均升高。到试验后期,处理组 C4H 酶活性仍显著高于 CK 组 ($P<0.05$)。综上,通过外源绿原酸处理可使果实体内 C4H 在苹果苯丙烷代谢途径中产生响应,并由此增强果实的抗性反应。

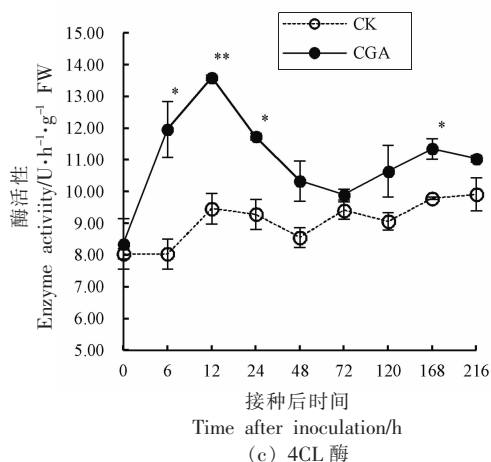
4CL 是苹果苯丙烷代谢途径中的关键限速酶,与总酚、类黄酮、木质素等相关抗性物质的合成速度息息相关。通常 4CL 作为苹果抗病性强弱的参考指标。由图 3c 可知,CK 组和处理组 4CL 酶活性变化趋势略有不同。接种灰霉菌后 CK 组 4CL 活性几乎都呈增长趋势,而 CK 组酶活性没有出现明显的增长高峰。绿原酸浸泡处理组苹果接种灰霉菌后 4CL 酶活性出现两个较为明显的增长峰,12 h 时处理组酶活性极显著高出 CK 组 40% ($P<0.01$),此时,处理组与 CK 组酶活性差距最大。48 h 后处理组酶活性虽仍高于 CK 组,但两者间的差异不显著。综上,在绿原酸处理对苹果灰霉病抗性反应机制中,处理组 4CL 酶活性显著



(a) PAL 酶



(b) C4H 酶



(c) 4CL 酶

图 3 绿原酸处理对接种灰霉菌苹果中 PAL(a)、C4H(b)和 4CL(c)活性的影响

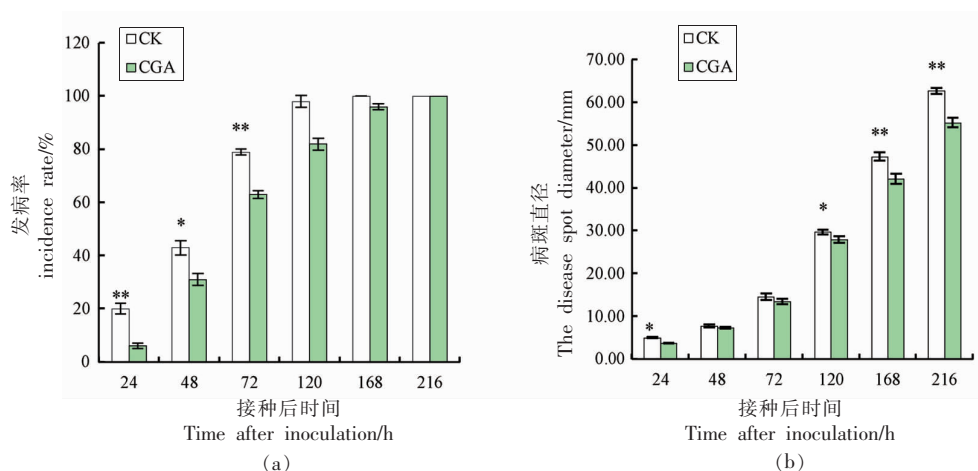
Fig.3 Effect of chlorogenic acid treatment on PAL(a), C4H(b) and 4CL(c) activity from apples inoculated with *B. cinerea*

升高,在试验前期这种促进作用更为显著。

2.4 外源绿原酸处理对苹果灰霉病的抑制作用

在苹果抗病试验中,发病率和病斑直径通常作为确定果实发病严重与否的重要参考指标。从图4a可以看出,试验前期,处理组与CK组果实均快速发病。处理组果实发病率显著低于CK组,试验72h时更是极显著低于CK组($P<0.01$),之后发病率缓慢升高。试验末期,处理组与CK组发

病率全部发病。从病斑直径来看,试验前期72h内两组病斑直径都较小,CK组在120h时病斑直径迅速扩大,与CK组比较,处理组病斑直径增加的趋势缓慢($P<0.05$)。试验末期,CK组病斑已扩散至整个果面,此时处理组病斑相对较小,与CK差异极显著($P<0.01$)。用绿原酸处理后,前期主要抑制发病率,后期控制病斑直径扩展,从而有效抑制灰霉病发生。



注: CGA 为 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的绿原酸溶液处理组。

图4 绿原酸处理对苹果灰霉病发病率(a)和病斑直径(b)的影响

Fig.4 Effect of chlorogenic acid treatment on the incidence(a) and lesion diameter(b) caused by *B. cinerea* in apple fruits

3 讨论

研究表明,植物体内 *PAL*、*C4H*、*4CL* 等基因可被外源因子诱导过表达^[23]。*PAL* 通过催化苯丙氨酸产生肉桂酸,是整个合成途径的起始酶,为整个反应提供所需底物。本试验发现,接种灰霉菌后处理组 *PAL* 基因表达量在 6 h 出现一个表达峰值,随后其基因表达量变化趋势与酶活性的一致,都高于 CK 组。作为 CGA 生物合成途径中的关键调控因子 *HCT/HQT* 基因表达量变化趋势呈先增加后降低的趋势,与果实内绿原酸含量变化趋势相似,整体上都显著高于 CK 组。处理组果实因外源绿原酸渗入而导致接种 0 h 时其含量高于正常水平,6 h 后因自身吸收及各种消耗又降到与 CK 组同一水平,168 h 后两组果实内绿原酸含量均开始降低。由此推测,绿原酸处理可以促进 *PAL*、*C4H*、*4CL*、*HCT/HQT* 和 *C3H* 等节点酶基因表达上调,对果实自身绿原酸的合成量产生影响。

苯丙烷代谢是高等植物体内重要的次生代谢途径,*PAL* 在苯丙烷代谢途径上游参与调控,并由此产生一系列酚类物质,将苯丙氨酸催化生成肉桂酸,其对植物木质素、酚类以及抗毒素的生物合成具有调节作用^[23]。*C4H* 是苯丙烷代谢途径中重要的一个节点酶,可以促进肉桂酸反应生成 4-香豆酸^[24]。*4CL* 在苯丙烷代谢途径中参与调控,其反应生成的对香豆酸辅酶 A 是参与下游代谢多个途径的母体,既能反应生成绿原酸等酚类物质,又可形成多种类黄酮类物质^[25-27]。*PAL*、*C4H* 和 *4CL* 在苯丙烷代谢途径中发挥重要的作用,它们共同协作,相互促进^[28]。经外源绿原酸处理的果实在接种灰葡萄孢后,*PAL*、*C4H*、*4CL* 活性显著升高,*C4H*、*4CL* 在接种 12 h 后达到活性峰值,与 CK 组差异极显著($P<0.01$)。处理组 *PAL* 酶活性虽在 48 h 达到峰值,但其达到峰值 1 的时间早于 CK 组,并在整个观测期间其活性高于 CK 组。由此可见,外源

绿原酸处理后, 苯丙烷代谢途径中参与调控的 PAL、C4H、4CL 酶活性均在较短时间内就提到一个较高的活性水平。在外源绿原酸作用下, 果实可加速发生反应并生成抑制灰霉菌的抗性物质, 从而提高植物的抗病性。

本试验中, 处理组果实发病率与病斑直径均小于 CK 组, 并在接种 24 h 后处理组的发病率极显著低于 CK 组 ($P < 0.01$), 病斑直径也显著小于 CK 组 ($P < 0.05$)。在试验末期, 处理组发病率与 CK 组的差异逐渐缩小, 可能是随着病原菌孢子的繁殖生长, 外源绿原酸不再起作用。随着病害的发展, 处理组病斑直径与 CK 组差异加大, 可能是由于内源绿原酸含量增加, 果实自身抗病能力提高, 对灰葡萄孢产生抑制作用, 从而抑制病斑扩散。Kaltenbach 等^[9]也得出相同的结论。李珊珊等^[29]研究表明, 绿原酸对西瓜枯萎病菌有较强的离体抑制作用, 且随着浓度的升高, 其抑菌活性呈增强的趋势。

4 结论

外源绿原酸处理可以诱导果实内部绿原酸合成密切相关的 PAL、C4H、4CL 等基因过量表达, 提高相应酶的活性, 同时增加直接控制绿原酸合成的 HCT/HQT 和 C3H 基因的表达量, 提高果实自身绿原酸的合成量。从抑制苹果灰霉菌活性角度来说, 外源绿原酸处理诱导苯丙烷代谢途径关键酶类的响应, 通过提高苹果体内自身的绿原酸含量来有效抑制苹果灰霉病的感染。

参 考 文 献

- [1] FILLINGER S, ELAD Y. Botrytis - the fungus, the pathogen and its management in agricultural systems [M]. Switzerland: Springer, Cham., 2016: 413-486.
- [2] TESTEMPASIS S, TANOU G, MINAS I, et al. Unraveling interactions of the necrotrophic fungal species *Botrytis cinerea* with 1-methylcyclopropene or ozone-treated apple fruit using proteomic analysis [J]. Front Plant Sci, 2021(12): 644255.
- [3] DEAN R, KAN J A, PRETORIUS Z A, et al. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology[J]. Mol Plant Pathol, 2012, 13(7): 414-430.
- [4] LIAO Y, ZENG L, RAO S, et al. Induced biosynthesis of chlorogenic acid in sweetpotato leaves confers the resistance against sweetpotato weevil attack [J]. J Adv Res, 2020, 24(2): 513-522.
- [5] QZA B, CX A, SL A, et al. In vitro antagonism and biocontrol effects of *Paenibacillus polymyxa* JY1-5 against *Botrytis cinerea* in tomato [J]. Biol Control, 2021, 160: 104689
- [6] ZHANG M, WANG D, GAO X, et al. Exogenous caffeic acid and epicatechin enhance resistance against *Botrytis cinerea* through activation of the phenylpropanoid pathway in apples [J]. Scientia Horticulturae, 2020, 268: 109348.
- [7] 周晓婉, 唐永萍, 石亚莉, 等. 1-MCP 对低温贮藏苹果灰霉病抗性的诱导作用 [J]. 食品科学, 2016, 37(12): 254-260.
- [8] ZHOU X W, TANG Y P, SHI Y L, et al. Induction of 1-MCP on resistance to gray mildew in apples stored at low temperature [J]. Food Science, 2016, 37(12): 254-260.
- [9] MA L J, HE J H, LIU H, et al. The phenylpropanoid pathway affects apple fruit resistance to *Botrytis cinerea* [J]. Journal of Phytopathology, 2017, 166(3): 206-215.
- [10] KALTENBACH T, FRIEDLAND S, MAHESHWARI A, et al. Short- and long-term outcomes of standardized EMR of nonpolyploid (flat and depressed) colorectal lesions ≥ 1 cm (with video) [J]. Gastrointest Endosc, 2007, 65(6): 857-65.
- [11] 孙阳黄, 胡焱. 绿原酸提取纯化方法的研究进展 [J]. 化学试剂, 2017, 39(3): 45-50.
- [12] SUN Y H, HU Y. Progress in extraction and purification of chlorogenic acid [J]. Chemical Reagents, 2017, 39(3): 45-50.
- [13] ARIEL V, ALINAS M, TEN A, et al. Chlorogenic acid, anthocyanin and flavan-3-ol biosynthesis in flesh and skin of Andean potato tubers (*Solanum tuberosum* subsp *Andigena*) [J]. Food Chemistry, 2017, 229(15): 837-846.
- [14] JIAO W, LI X, WANG X, et al. Chlorogenic acid induces resistance against *Penicillium expansum* in peach fruit by activating the salicylic acid signaling pathway [J]. Food Chemistry, 2018, 260(4): 274-282.
- [15] DIXON R A, ACHNINE L, KOTA P, et al. The phenylpropanoid pathway and plant defence - A ge-

- nomics perspective [J]. *Molecular Plant Pathology*, 2002, 3(5): 371–390.
- [14] KIM D S, HWANG B K. An important role of the pepper phenylalanine ammonia-lyase gene (PAL1) in salicylic acid-dependent signaling of the defense response to microbial pathogens[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2014, 65(9): 2295–2306.
- [15] 张静茹, 吴敏琳, 李卫东, 等. 金银花 *HQT* 基因在真核植物细胞中对绿原酸生物合成的调控[J]. *中草药*, 2016, 47(20): 3683–3687
- ZHANG J R, WU M L, LI W D, et al. Regulation of chlorogenic acid biosynthesis by *HQT* gene of Honeysuckle in eukaryotic plant cells[J]. *Chinese Herbal Medicine*, 2016, 47(20): 3683–3687
- [16] D CHAGNÉ, KRIEGER C, RASSAM M, et al. QTL and candidate gene mapping for polyphenolic composition in apple fruit[J]. *BMC Plant Biology*, 2012, 12(1): 12.
- [17] 贺军花. 根皮苷和阿魏酸对苹果灰霉病抗性防御系统的影响[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2018.
- HE J H. Effects of rhizoptin and ferulic acid on the resistance and defense system of gray mold in apple [D]. Yangling: Northwest A & F University, 2018.
- [18] 王大将, 张梦宇, 岳正洋, 等. 绿原酸对苹果采后灰霉病抗性的影响[J]. *食品科学*, 2021, 42(9): 177–183.
- WANG D J, ZHANG M Y, YUE Z Y, et al. Effect of chlorogenic acid on postharvest gray mold resistance of apple[J]. *Food Science*, 2021, 42(9): 177–183.
- [19] HAN C, LI J, JIN P, et al. The effect of temperature on phenolic content in wounded carrots[J]. *Food Chemistry*, 2017, 215(7): 116–23.
- [20] LIU Y, GE Y, BI Y, et al. Effect of postharvest acibenzolar-S-methyl dipping on phenylpropanoid pathway metabolism in muskmelon (*Cucumis melo* L.) fruits[J]. *Scientia Horticulturae*, 2014, 168(1): 113–119.
- [21] TAKSHAK S, AGRAWAL S B. Secondary metabolites and phenylpropanoid pathway enzymes as influenced under supplemental ultraviolet-B radiation in *Withania somnifera* Dunal, an indigenous medicinal plant[J]. *Journal of Photochemistry and Photobiology Biology*, 2014, 140(8): 332–343.
- [22] CHEN C S, ZHANG D, WANG Y Q, et al. Effects of fruit bagging on the contents of phenolic compounds in the peel and flesh of ‘Golden Delicious’, ‘Red Delicious’, and ‘Royal Gala’ apples[J]. *Scientia Horticulturae*, 2012, 142(5): 68–73.
- [23] LI S, LIU L, LI M, et al. Antifungal activity of chlorogenic acid from *L. on f. sp. niveum*[J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2018, 32(1): 104–111.
- [24] HU M, YANG D, HUBER D J, et al. Reduction of postharvest anthracnose and enhancement of disease resistance in ripening mango fruit by nitric oxide treatment[J]. *Postharvest Biology & Technology*, 2014, 97(11): 115–122.
- [25] HE J G, CHENG Y D, GUAN J F, et al. Changes of chlorogenic acid content and its synthesis-associated genes expression in Xuehua pear fruit during development[J]. *Journal of Integrative Agriculture*, 2017, 16(2): 471–477.
- [26] HENRY K, REBECCAA K, AANDRE M, at al. Transcriptional analysis of apple fruit proanthocyanidin biosynthesis[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2012, 63(15): 5437–5450.
- [27] HUANG J, GU M, LAI Z, et al. Functional analysis of the arabidopsis *PAL* gene family in plant growth, development, and response to environmental stress[J]. *Plant Physiology*, 2010, 153(4): 1526–1538.
- [28] HOFFMANN L, MAURY S, MARTZ F, et al. Purification, cloning, and properties of an acyltransferase controlling shikimate and quinate ester intermediates in phenylpropanoid metabolism [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(1): 95–103.
- [29] 李珊珊, 刘琳, 李猛, 等. 苘蒿中绿原酸抑制西瓜枯萎病菌活性研究[J]. *核农学报*, 2018, 32(1): 104–111.
- LI S S, LIU L, LI M, et al. Study on the inhibition activity of chlorogenic acid against fusarium oxysporum fusarium oxysporum in chrysanthemum coronarium[J]. *Journal of Nuclear Agricultural sciences*, 2018, 32(1): 104–111.

Effects of Exogenous Chlorogenic Acid on Resistance to Gray Mold of Apple and Its Own Chlorogenic Acid Synthesis

Wang Dajiang, Liu Hongchong, Zhang Mengyu, Yue Zhengyang, Zhou Huiling*

(College of Horticulture, Northwest A & F University, Yangling 712100, Shaanxi)

Abstract In order to investigate the effect of exogenous chlorogenic acid on apple gray mold resistance and its own chlorogenic acid synthesis, Fuji apple was treated with 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ chlorogenic acid solution for 30 min, and then inoculated with gray mold after 1 d, and treated with water as the control group (CK), the spot diameter and incidence were counted, and the changes in gene expression and enzyme activity of enzymes related to chlorogenic acid synthesis were determined. The results showed that after treatment with 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ chlorogenic acid, the activities of PALC4H and 4CL, the key enzymes upstream of the phenolpropane metabolic pathway, increased significantly, and the corresponding gene expressions all reached the peak after 6 h of inoculation with gray mold, which were 10, 5 times and 2.5 times of the CK group, respectively. Meanwhile, the gene expression of the downstream synthesis gene hydroxycinnamic acid-CoA acid ester/quinic acid hydroxycinnamic acid transferase (HCT/HQT) reached a peak at 48 h in the treated group, which was about 3 times higher than that in the CK group, and there were two higher gene expressions at 6 h and 12 h in the treated group for coumaric acid 3'-hydroxylase (C3H), which were about 3 times and 5 times higher than that in the CK group, respectively, stimulating chlorogenic acid synthesis. This stimulated the increase of chlorogenic acid synthesis, which induced the increase of fruit resistance, effectively reduced the incidence of apple gray mold and slowed down the expansion of spots. Conclusion: Exogenous chlorogenic acid treatment can induce the response of enzymes of the phenolpropane metabolic pathway, increase the level of chlorogenic acid in apples, and effectively suppress apple gray mold.

Keywords chlorogenic acid; apple; gray mold; phenolic metabolism; induced resistance