

葡萄汁有孢汉逊酵母对采后草莓灰霉病抗性诱导机理研究

窦国霞¹, 蒋春号², 郭虹娜¹, 刘佳¹, 贺沁玉¹, 肖红梅^{1,*}

(¹南京农业大学食品科技学院, 南京 210095; ²南京农业大学植物保护学院, 南京 210095)

摘要:以采后‘红颜’草莓果实为试验材料,通过接种葡萄汁有孢汉逊酵母(*Hanseniaspora uvarum*)、灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*)、先接种 *H. uvarum* 后挑战接种 *B. cinerea* 来探究 *H. uvarum* 对草莓采后灰霉病的生防效果及对草莓抗性诱导的相关机理。结果显示, *H. uvarum* 可短时间内在果实伤口部位定殖并大量繁殖,对草莓灰霉病有较好的防治效果,果实病斑直径显著减小。基因表达结果显示,先接种 *H. uvarum* 后挑战接种 *B. cinerea* 处理草莓果实的水杨酸(Salicylic acid)信号通路相关基因 *PR1*、*PR5*、*GLU*、*WRKY1*、*NPR1* 和 *PAL* 表达丰度在接种后 12~24 h 内显著上调,并高于 *H. uvarum* 和 *B. cinerea* 单独处理,但对茉莉酸(Jasmonic acid)信号通路标志基因 *PDF1* 和 *JAR1* 无影响;先接种 *H. uvarum* 后挑战接种 *B. cinerea* 处理可以短时间内提升草莓果实抗性相关酶 SOD、APX、CAT 和 PAL 的活性;接种 *H. uvarum* 可以延缓果实冷藏期间的劣变速度,维持较高的品质。

关键词: 草莓; 灰霉病; 采后; 葡萄汁有孢汉逊酵母; 诱导抗病性; 水杨酸信号通路

中图分类号: S 668.4

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2019) 07-1290-13

Studies on the Resistance Induction of *Hanseniaspora uvarum* to Postharvest Gray Mold in Strawberry

DOU Guoxia¹, JIANG Chunhao², GUO Hongna¹, LIU Jia¹, HE Qinyu¹, and XIAO Hongmei^{1,*}

(¹College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; ²College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: In this experiment, ‘Hongyan’ strawberry fruits were used as the experimental materials to explore the biocontrol efficacy and mechanism of inducing strawberry resistance by inoculation with *Hanseniaspora uvarum*, *Botrytis cinerea*, *H. uvarum* challenged with *B. cinerea*. The results showed that *H. uvarum* can compete for nutrition and space in the wound by large reproduction, having good biocontrol effect on the gray mold of strawberry, and the lesion diameter of strawberry decreased significantly in *H. uvarum* treatment. Results of gene expression abundance indicated that the *WRKY1*, *NPR1*, *PAL*, *PR1*, *PR5*, *GLU* were up-regulated within 12 h to 24 h of *H. uvarum* + *B. cinerea* treatment, which are the marker genes of SA signaling pathway, and the up-regulation was higher than that of *H. uvarum* or *B. cinerea* treatment alone. But the *PDF1* and *JAR1* genes of JA signaling pathway were not accumulated in

收稿日期: 2019-05-16; 修回日期: 2019-06-10

基金项目: 国家自然科学基金项目(31701829); 江苏高校优势学科建设工程资助项目

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: xhm@njau.edu.cn)

each treatment. *H. uvarum* challenged with *B. cinerea* treatment can increase the SOD, APX, PAL and CAT enzyme activity in a short time, which are involved in plant defense. The *H. uvarum* treatment also can delay the deterioration of fruit and maintain high quality during the cold storage period.

Keywords: strawberry; gray mold; postharvest; *Hanseniaspora uvarum*; induced resistance; salicylic acid signaling pathway

由灰葡萄孢 (*Botrytis cinerea*) 引起的灰霉病是草莓 (*Fragaria × ananassa*) 采后的主要真菌性病害 (Wildermuth et al., 2001; 丁玥 等, 2010)。生物防治因绿色安全有效成为果蔬采后病害控制的研究热点 (Amilruiz et al., 2011; Jiang et al., 2015), 多种微生物可防治草莓采后灰霉病 (Wang et al., 2013a, 2013b; Lian et al., 2017; Gao et al., 2018), 其中酵母菌因不产生毒素、遗传稳定、生长繁殖能力强、可与化学物质结合等特点而成为研究热点 (Zhang et al., 2008; Wei et al., 2014)。拮抗酵母菌防治果蔬采后病害的作用机理除直接营养空间竞争 (周海莲, 2012)、重寄生 (戴忠良和高克祥, 2018)、分泌次生代谢物质 (司琳媛, 2015) 外, 诱导寄主产生抗性也是一个重要作用机制 (产祝龙, 2006)。

诱导抗性主要指外界刺激因子通过一定的信号传递, 激活植物体内的应答信号从而使植物对外界胁迫产生广谱持久抗性 (Pieterse et al., 2014)。系统获得性抗性 (Systemic acquired resistance, SAR) 和诱导系统抗性 (Induce systemic resistance, ISR) 是诱导寄主抗性的两种基本形式。SAR 依赖水杨酸 (Salicylic acid, SA) 信号通路, SA 作为信号物质通过诱导病程相关蛋白 (Pathogen-related proteins, PR) 基因表达介导 SAR 信号转导 (薛耀碧 等, 2015); 而 ISR 依赖于茉莉酸 (Jasmonic acid, JA) 信号通路, 与 PR 无关。目前关于激发子诱导果实抗性的相关研究主要围绕 PR 基因开展, 如在葡萄 (侯丽霞 等, 2012)、番茄 (Wang et al., 2011)、梨 (Faize et al., 2004) 等果实上均得到相关结论。当果蔬受到外源因子刺激后, 通过 SA 信号转导途径激活防卫反应, 诱导病程相关蛋白表达抵御病原菌的侵染 (Somssich & Hahlbrocj, 1998)。拮抗酵母菌作为生物激发子, 可诱导果实 PR 的表达, 提高抗性, 如提前 24 h 接种海洋拮抗酵母 (*Rhodosporidium paludigenum*) 可以诱导梨果实病程相关基因 *PR1-like* 和 *PR4* 的上调表达来控制采后青霉病的发生 (Sun et al., 2018); 美及梅奇酵母 (*Meyerozyma guilliermondii*) 处理梨果实可通过提升贮藏期间抗性基因 *PAL* 和 *GLU* 的表达水平来降低采后病害的发生 (Yan et al., 2018) 等。

已证实葡萄汁有孢汉逊酵母 (*Hanseniaspora uvarum*) 可诱导柑橘体内防御酶活性提升, 有效防治绿霉病 (李万海, 2016) 以及诱导草莓抵抗灰霉病 (罗凯, 2012; 秦晓杰 等, 2013) 的发生。但 *H. uvarum* 对草莓果实的具体诱导抗性机制不明。本试验中选择 ‘红颜’ 草莓果实为材料, 研究了 *H. uvarum* 对草莓采后灰霉病的生防效果及对抗病防卫基因表达调控的影响, 以期从分子水平揭示其诱导果实抗病机制, 为其在果实采后贮运中的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

‘红颜’ 草莓采摘于江苏省南京市江宁区锁石生态园。2017 年 12 月—2018 年 3 月采摘成熟度一致、无机械损伤、无病虫害果实, 2 h 之内运回实验室。

葡萄汁有孢汉逊酵母 (*H. uvarum*) 为本实验室贮存备用, 在 PDA 培养基上活化后用 0.85% 无

菌生理盐水通过血球计数板调节至 $1 \times 10^8 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，现用现配。

灰葡萄孢 (*B. cinerea*) 贮存于 PDA 培养基 (4 °C) 上。将其在 25 °C 下培养 7 d，用 0.85% 无菌生理盐水将孢子洗脱，8 层纱布过滤，然后用血球计数板调节至 $1 \times 10^5 \text{ spores} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，现用现配。

1.2 *H. uvarum* 定殖能力测定

参照陈亮亮 (2016) 的方法，略有修改。草莓运回实验室后用 0.1% 次氯酸钠溶液浸泡 10 s，自然通风晾干。用灭菌的接种针在果实赤道部位刺伤形成 3 mm × 3 mm 的伤口，晾干后在每个伤口处接种 $1 \times 10^8 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ *H. uvarum* 菌悬液 30 μL，自然晾干后置于 25 °C、RH 95% 培养箱中。接种后 0、24、48、72 和 96 h 后测定接种伤口处的酵母细胞数量 (接种后 2 h 计为 0 h)。取 1 g 左右伤口处果肉，加 5 mL 无菌蒸馏水充分研磨。将磨好的均质液以 10^{-1} 梯度稀释，每梯度取 100 μL 均质液在 PDA 平板上涂布，将 PDA 平板置于 28 °C 培养 24 ~ 48 h，记录平板上的单菌落数，计算酵母细胞数量。结果以 lg cfu/wound 表示。

1.3 *H. uvarum* 对草莓灰霉病生防效力测定

设 4 个处理: (1) 伤口接种 50 μL 无菌水, 2 h 后接种 50 μL 无菌水; (2) 伤口接种 $1 \times 10^8 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ *H. uvarum* 菌悬液 50 μL, 2 h 后接种 $1 \times 10^5 \text{ spores} \cdot \text{mL}^{-1}$ *B. cinerea* 悬浮液 50 μL; (3) 伤口接种 $1 \times 10^8 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ *H. uvarum* 菌悬液 50 μL, 2 h 后接种 50 μL 无菌水; (4) 伤口接种 50 μL 无菌水, 2 h 后接种 $1 \times 10^5 \text{ spores} \cdot \text{mL}^{-1}$ *B. cinerea* 悬浮液 50 μL。

各处理组果实自然晾干后置 25 °C、RH 90% ~ 95% 左右的培养箱常温贮藏。在接种 *B. cinerea* 后 0、12、24、36、48 和 72 h 去除病原菌菌丝 (以接种 *B. cinerea* 后 2 h 计为 0 h)，取病健交界处果肉组织在液氮中速冻，于 -80 °C 超低温冰箱中保存备用，每处理 135 个果实，设 3 个平行，每平行 45 个果实，试验重复 2 次。贮藏 72 h 后采用十字交叉法测定各处理草莓果实病斑直径。

1.4 抗性基因表达丰度检测

草莓果实 RNA 提取参照陈亮亮 (2016) 的方法，略有修改。试验所用离心管、枪头均用 RNA-free 级别的。取 1 mg RNA 用 DNaseI (gDNA Wiper from Vazyme™, Cat.No.R133-01) 处理，采取 HiScript™ Q Select RT SuperMix (Vazyme™, Cat. No.R133-01) 试剂盒逆转录 cDNA 第 1 链。Quantitative RT-PCR 使用 TaKaRa SYBR Premix Ex Taq (DRR031A) 通过 ABI 7500 system 进行扩增。反应条件: 95 °C 3 min; 95 °C 15 s, 55 °C 20 s, 40 个循环; 72 °C 20 s; 72 °C 5 min。试验以 *18S RNA* 作为内参基因。试验所用相关特异性基因引物如表 1 所示，检测相关基因的相对表达水平。

表 1 试验所用引物序列

Table 1 Sequence of the primers used for gene expression in strawberry

基因 Gene	上游引物 (5' - 3') Forward primer sequence	下游引物 (5' - 3') Reverse primer sequence
<i>PR1</i>	ACATGGGATGCCAATCTAGC	CCACAGGTTACAGCAGATG
<i>PAL</i>	GTGAAAGAAGCGAAGAAGG	GAAGCTCGGAGCAGTATG
<i>Glu</i>	TATAGATCAGTTTGTATTCTCTTT	TGTTATCTGTAGAGCAGGCATAA
<i>WRKY1</i>	GATATGCGTTTCAGACCAGGAGCCAAGTCG	GCTTCTTCAGATTGCAACCCGTGATGCGTG
<i>NPR1</i>	ATCAGAAGCAACTTGGAAAGGTAGA	ACCCGCATAGTTGGCTTGT
<i>PR5</i>	CGTAGTTAGGTCCACCGAAGCATGTA	ACCTCCTAATGACACTCCCGAAACA
<i>PDF1</i>	GCTTCTGAAGAGACGGTGATTCGCAGT	ATGGCTTGAAGCACATGCATTTTC
<i>JAR1</i>	TCTTCTGCTCAACATCAACATCGAC	CTACATGGCTTGAGAAATCAACAACCTC
<i>18S RNA</i>	TGTGAAACTGCGAATGGCTCATTAA	GAAGTCGGGATTGTTGCACGTAT

1.5 防卫相关酶活性检测

酶活检测参照秦晓杰等(2013)的方法并做了修改。酶提取液的制备: 样品放入液氮预冷的研钵中研磨成粉末后称 2 g 于液氮预冷试管中, 分两次加入 5 mL 50 mmol · L⁻¹ pH 7.8 磷酸提取液(含 1% PVPP), 涡旋震荡均匀后于 4 °C, 1 × 10⁴ r · min⁻¹ 低温离心 10 min, 取上清液。

参照参照司琳媛(2015)方法测定 SOD、APX、CAT 和 PAL 酶活性。

1.6 *H. uvarum* 处理对草莓果实品质的影响

取大小一致、表面完好无损伤的草莓果实, 分别用 1 × 10⁸ cfu · mL⁻¹ *H. uvarum* 菌悬液(含 0.1% Tween 20)和无菌水(含 0.1% Tween 20)均匀喷施在果实表面。每处理 100 个果实, 3 次重复。在 (2 ± 1) °C、相对湿度 90% ~ 95% 冷藏条件下贮藏, 定期取 10 个果实样品用于检测相关品质。

可溶性固形物含量采用 WYT-4 型手持糖量仪进行测量, 每处理测 10 个果实。

在果实皮下 2 cm 处用刀切取 2 g 样品置于研钵中研碎, 倒入 100 mL 容量瓶中, 加蒸馏水至刻度, 混合均匀后静置 20 min, 4 层纱布过滤研磨液, 转入 150 mL 锥形瓶中, 采用 PHS-3C pH 计经标准溶液校准之后在室温 25 °C 条件下测量 pH 值。

维生素 C 含量的测定参照马宏飞等(2012)的方法。

类黄酮和花青素相对含量的测定参照曹健康和赵兰英(2007)的方法。

1.7 数据统计分析

采用 Origin8.6 软件对试验数据进行单因素方差分析, *LSD* 多重比较。

2 结果与分析

2.1 *H. uvarum* 在草莓伤口的定殖能力

草莓果实伤口部位接种浓度为 1 × 10⁸ cfu · mL⁻¹ *H. uvarum*, 其细胞数量在接种后 24 h 迅速增长, 之后维持在较高的水平(图 1)。可见, *H. uvarum* 可以很快地适应伤口环境并迅速生长, 表明其具有竞争营养和空间的能力, 这与前人研究结果(周海莲, 2012)基本一致。

2.2 *H. uvarum* 对草莓采后灰霉病的生防效力

图 2 表明, *H. uvarum* 能减轻由灰葡萄孢引起的腐烂。*H. uvarum* + *B. cinerea* 挑战接种处理的果实病斑直径为 1.72 cm, 比 *B. cinerea* 处理减小了 41.1%, *H. uvarum* 处理比 *B. cinerea* 处理减小了 71.6%。表明 *H. uvarum* 对草莓采后灰霉病具有较好的生防效果。

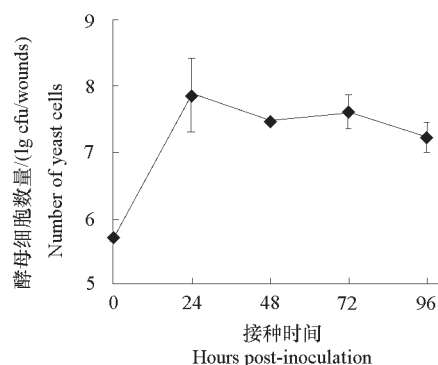


图 1 *H. uvarum* 在草莓果实伤口部位的生长动态
Fig. 1 The growth population of *H. uvarum* in the wounds of strawberry after inoculation

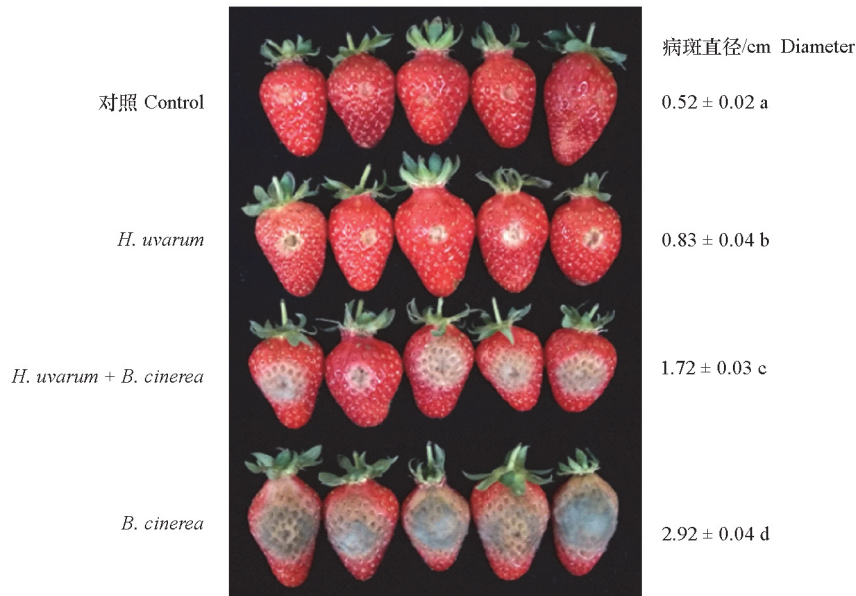


图2 *H. uvarum* 对草莓灰霉病的防治效果 (贮藏 72 h)

Fig. 2 Effects of *H. uvarum* on induction of disease resistance against gray mold in strawberry after 72 h of inoculation
 $P < 0.05$.

2.3 *H. uvarum* 对草莓抗性基因表达丰度的影响

一般来说, PR 蛋白在植物抵御病原菌侵染过程中扮演重要角色, PR-1 是 SAR 反应中的一个标志蛋白, SAR 是多种 PR 蛋白共同协调作用的结果。结果 (图 3) 显示 *H. uvarum* 处理可提高草莓果实一些 PR 基因的表达水平。*H. uvarum*、*H. uvarum* + *B. cinerea* 处理 *PR1*、*GLu* 的表达量在 12 h 达到峰值, *PR5* 在 24 h 达到峰值。*H. uvarum* + *B. cinerea* 处理 *PR1*、*GLu* 的表达量在 12 h 时分别是单独 *B. cinerea* 处理的 2.9、3.5 倍; 在 24 h 时 *H. uvarum* + *B. cinerea* 处理 *PR5* 表达量为单独 *B. cinerea* 处理的 2.18 倍。上述结果表明 *H. uvarum* 可通过提升果实 *PR1*、*GLu*、*PR5* 的表达水平参与其免疫反应。

WRKY 转录因子可以激活或抑制 SA 反应, 参与 SA 信号通路的反馈控制中。本试验发现各处理草莓果实 *WRKY1* 的表达水平在 12 h 达到峰值, 其中 *H. uvarum* + *B. cinerea* 处理显著高于单独 *B. cinerea* 处理, 是其表达水平的 1.5 倍。由此可知 WRKY1 在前期被诱导表达而参与草莓果实对灰霉病的抗病机制中。

转录因子 NPR1 (Non-expressor of pathogenesis related genes 1) 是调节 SAR 和 ISR 信号转导途径的中间调节因子, 在植物免疫反应中有重要作用。结果显示, *H. uvarum*、*H. uvarum* + *B. cinerea* 处理 NPR1 表达量在 24 h 达到峰值, 其中 *H. uvarum* + *B. cinerea* 处理其表达量为单独 *B. cinerea* 处理的 4.1 倍。可见 NPR1 在前期被诱导表达并正向调控果实 SA 信号通路抵御病原菌侵染。

苯丙氨酸氨基酸酶 (PAL) 参与 SA 的生物合成进而参与植物免疫。结果显示, *H. uvarum* + *B. cinerea* 处理 PAL 表达量在 12 h 时达到峰值, 是 *B. cinerea* 处理的 5.9 倍, 并且 *H. uvarum* 处理在 12 h 上调表达, 是 *B. cinerea* 处理的 3.6 倍。上述结果表明, 与 PR 基因类似, *H. uvarum* 可通过提升果实 PAL 表达水平进而参与果实防御反应。

PDF1 和 *JAR1* 是茉莉酸 (JA) 信号通路的标志基因。结果显示各处理果实中 *PDF1* 和 *JAR1* 的表达情况不同于其他基因, 在整个侵染期间均维持较低的表达水平。由此推测 JA 信号通路未参与

草莓果实对灰霉病的防御过程中。

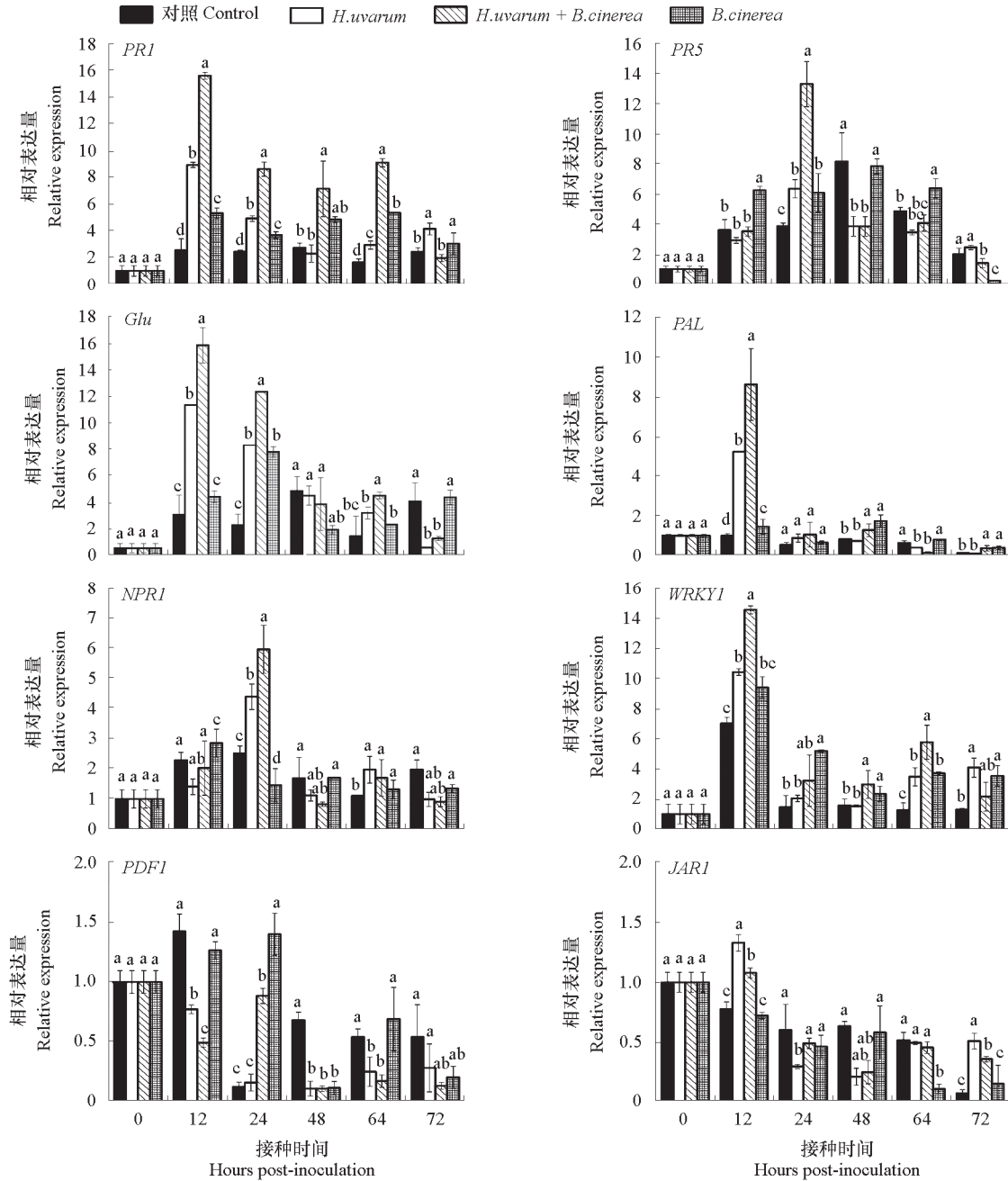


图3 *H. uvarum* 对草莓果实抗性基因表达水平的影响 (贮藏 72 h)
 Fig. 3 Effects of *H. uvarum* on defense-related genes expression after 72 h of inoculation

2.4 *H. uvarum* 对草莓果实防御酶活性的影响

H. uvarum 处理可提升草莓果实抗性酶活性的积累。*H. uvarum*、*H. uvarum* + *B. cinerea* 和 *B.*

cinerea 处理 SOD 酶活性 (图 4, A) 在 12 h 比对照组上升了 40.0%、40.7%、32.6%; 24 h 时 *H. uvarum* + *B. cinerea* 处理比 *B. cinerea* 处理上升了 20.4%。表明各处理 SOD 酶活力在侵染前期都有所增加。

H. uvarum + *B. cinerea*、*H. uvarum*、*B. cinerea* 处理 PAL 酶活性 (图 4, B) 在 24 h 达到峰值, 之后逐渐下降; *H. uvarum* + *B. cinerea*、*H. uvarum* 处理在 36 h 比 *B. cinerea* 处理上升了 46.5%、33.1%。整体上贮藏期间 *H. uvarum* + *B. cinerea* 处理的 PAL 活性较高。

H. uvarum + *B. cinerea* 和 *H. uvarum* 处理果实 CAT 酶活性 (图 4, C) 在 36 h 达到峰值, 比 *B. cinerea* 处理提高了 51.7.0% 和 51.4%; *B. cinerea* 处理组 CAT 酶活在 24 h 达到峰值, 比对照组提高 58.8%。

H. uvarum + *B. cinerea* 处理 APX 酶活性 (图 4, D) 在 12 h 比 *B. cinerea* 处理上升了 32.1%; 24 h 时 *H. uvarum* + *B. cinerea*、*H. uvarum* 处理比 *B. cinerea* 分别提高 39.4% 和 23.9%, 后缓慢降低并维持较高的活性; 而 *B. cinerea* 处理也在 24 h 达到峰值, 比对照提高了 45.0%, 之后迅速降低。

综上, *H. uvarum* 可以通过提升草莓伤口周围组织防御相关酶活性来提高草莓自身抗性, 进而抑制草莓灰霉病的发生。

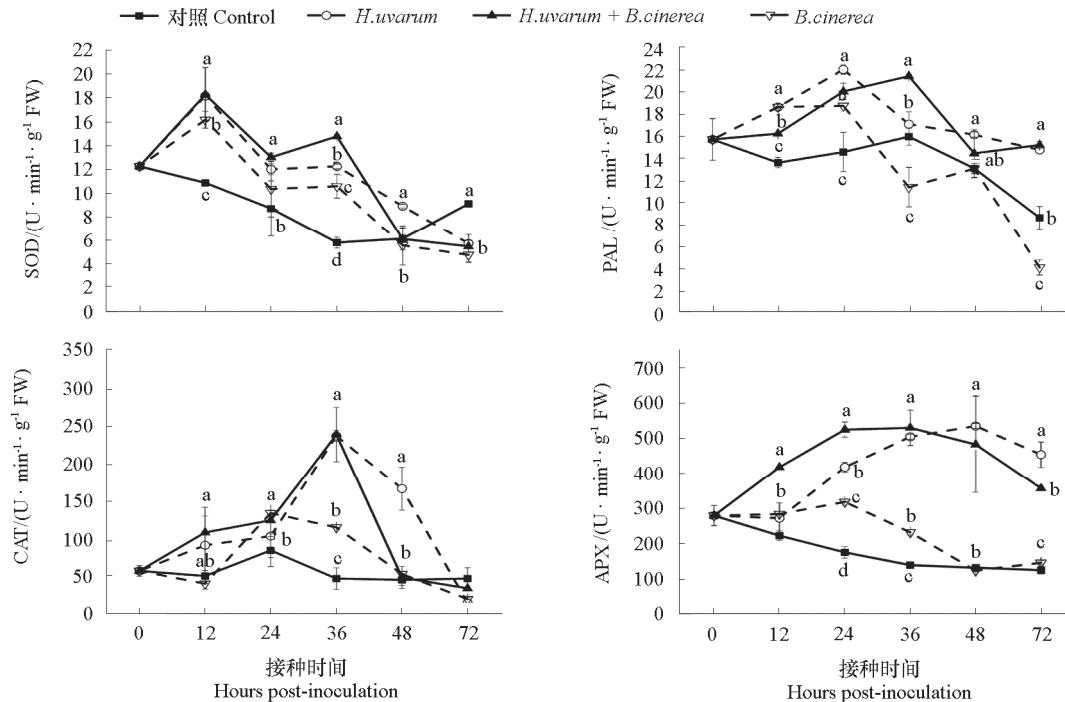


图 4 *H. uvarum* 对草莓果实抗性酶活的影响 (贮藏 72 h)

Fig. 4 Effects of *H. uvarum* on defense-related enzymes activity after 72 h of inoculation

$P < 0.05$.

2.5 *H. uvarum* 处理对低温贮藏草莓果实品质的影响

H. uvarum 处理草莓果实后低温贮藏条件下草莓果实外观变化, 结果 (图 5) 显示 *H. uvarum* 处理组果实在贮藏期与对照组相比果实颜色变化较缓, 表明 *H. uvarum* 可延缓草莓果实颜色的变化, 即可推迟果实的成熟与衰老。



图 5 *H. uvarum* 处理对采后草莓果实外观的影响 (25 d)

Fig. 5 Effects of *H. uvarum* on appearance of strawberry during cold storage period at $(2 \pm 1) ^\circ\text{C}$ (25 d)

图 6 显示, 草莓果实贮藏期间品质指标如 TSS、pH、维生素 C、类黄酮/花青素相对含量的变化。*H. uvarum* 处理与对照组相比在贮藏前期虽对可溶性固形物含量、花青素相对含量、维生素含量维持有积极作用, 但对 pH 无影响, 即 *H. uvarum* 处理有利于草莓果实贮藏期间的品质。

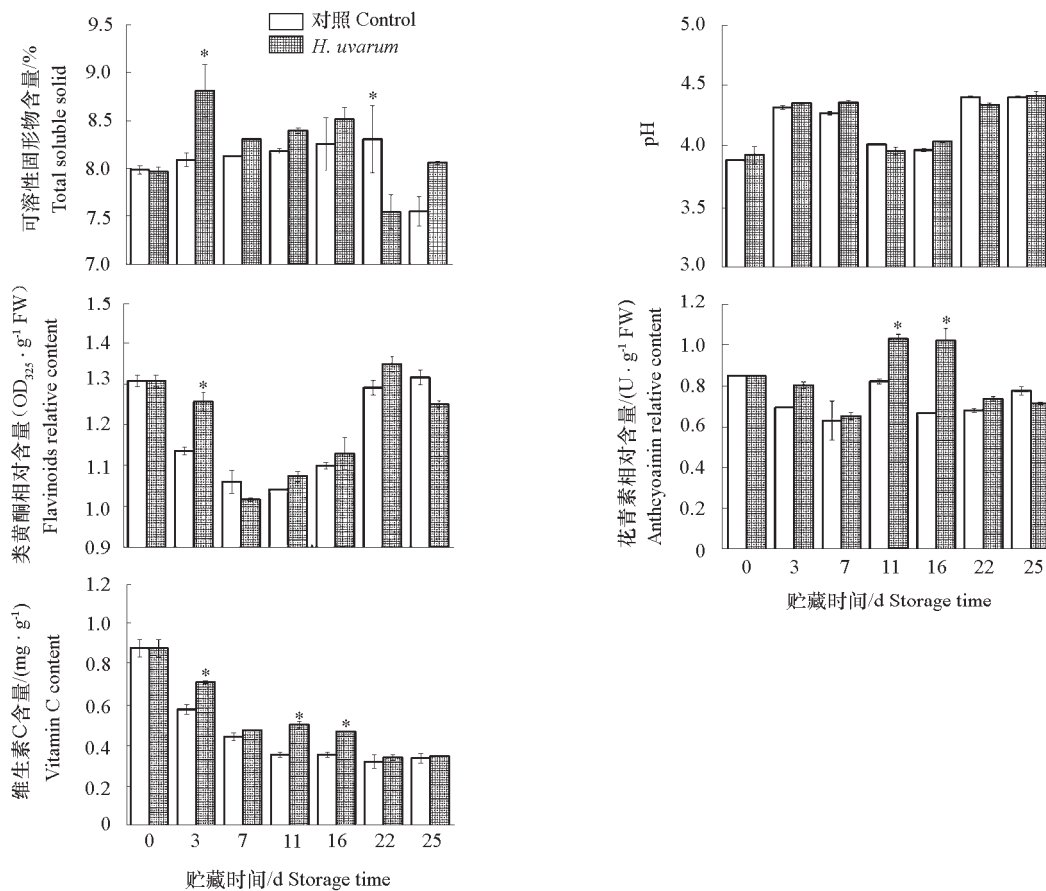


图 6 *H. uvarum* 处理对草莓采后低温贮藏品质的影响 (25 d)

Fig. 6 Effects of *H. uvarum* on quality parameters of strawberry during cold storage period at $(2 \pm 1) ^\circ\text{C}$ (25 d)

* $P < 0.05$.

3 讨论

营养素和空间的竞争被认为是拮抗菌对抗采后真菌病原菌的首要作用模式。刘慧敏（2010）研究发现 *H. uvarum* 在灰霉存在或者不存在的情况下，均可在葡萄果实伤口处迅速定殖和生长，表明营养空间竞争可能是 *H. uvarum* 的抑菌机理之一。陈亮亮（2016）同样发现解脂亚罗酵母在接种到苹果果实伤口部位 24 h 后能够大量增殖。本试验得到类似结论，*H. uvarum* 在接种到草莓果实伤口部位后可在短时间内大量增殖，证明竞争营养和空间是其抑菌机理之一。此外，除了重寄生作用（周海莲，2012），分泌次生代谢物质（司琳媛，2015），诱导寄主抗性也是生防菌防治果实病害的一个重要作用机制。

诱导植物系统抗性是果实采后病害生物防治的一个重要作用机制。生防菌处理可以诱导果实自身的抗性，从而抵抗病原菌的入侵，具有安全有效，无药物残留的优点（Droby et al., 2009; Sharma et al., 2009）。植物受到外界生物或者非生物胁迫时植物体内防御酶体系就会被启动，其中 SOD、CAT、APX、POD 等是植物体内重要防御酶，是衡量植物抗病能力的指标。生防菌作为生物激发子首先可有效提升果实防御相关酶来抵御病原菌的侵染，如海洋细菌 NH-8（李德全 等，2016）、*C. laurentii*（毛淑波，2013）和 *P. membranaefaciens*（张璐 等，2013）可通过提升防御相关酶活防治草莓灰霉病，*P. membranaefaciens* 可通过提升防御相关酶活防治杨梅绿霉病（汪开拓和郑永华，2011）。本研究中发现 *H. uvarum* 可通过提升果实伤口部位 SOD、CAT、APX 和 PAL 酶活力，这与前人研究结果类似。可见生防菌处理可以有效提升果实自身防御酶系，增强果实对病原菌的抵抗能力。

除了防御酶系的变化，生防菌作为激发子可诱导果实自身抗病基因表达来抵御病原菌的侵染。植物在受到病原菌的侵染除了防御酶的和水解酶的变化，还会引起植物体内一些 PR 蛋白的累积。其中 PR1、Glu (PR2)、PR5 和 PR10 是 PR 家族中具有抗真菌活性的蛋白质，最有特征的 PR1 一般作为 SA 响应的标记基因（Uknes et al., 1992; Lawton et al., 1995）。*H. uvarum* + *B. cinerea* 处理可有效提升果实 PR 基因表达，表明 *H. uvarum* 处理使果实处于 Priming（指果实前期不表现抗性，后期病原菌入侵时表现出抗性）状态，对后期 *B. cinerea* 侵染果实表现出更强的抗性反应。海洋生防酵母（*Rhodospiridium paludigenum*）及霜霉病菌、低温、干旱及盐响应多种体外激发子也能分别诱导柑橘（Lu et al., 2015）、葡萄（侯丽霞 等，2012）等果实中 PR 基因表达增强果实抗性。

苯丙氨酸解氨酶（PAL）是 SA 生物合成的重要途径，果实在受到外界激发子的侵染时体内会伴随着 PAL 活性及相应编码基因的表达增强，PAL 作为 SA 合成的上游信号分子参与 SA 信号传导过程（Verberne et al., 2000; Wildermuth et al., 2001）。本研究中表明 *H. uvarum* 能提升草莓果实 *FaPAL* 的表达丰度，同样的，生防酵母菌 *P. membranaefaciens* 处理也可提升柑橘果实 PAL 基因的表达（Zhou et al., 2018）。而 SA 下游的信号传导主要由调节蛋白 NPR1（Non-expressor of pathogenesis related genes 1）控制，其在被 SA 激活后充当大量防御相关基因的转录共激活因子，它在植物体内本底表达很低，但 SA 处理植物后其表达水平增加 2~3 倍，而 *npr1* 突变株体内 SA 含量仍维持正常水平，但 PR 蛋白的表达未激活，说明 NPR1 位于 SA 积累的下游和 PR 蛋白的上游（Cao et al., 1997）。Rairdan 和 Delaney（2002）、Weigel 等（2005）发现在拟南芥植物体内转入 NPR1/N1M1，发现能够提高植物对病原菌的抗性，且接种外源刺激子后明显提高 PR 蛋白的表达，以上结果证实了 NPR1 位于 PR 的上游并调控 PR；此外，NPR1 还可与处于 PR 基因启动子区域的转录因子 WRKY 家族相互作用来共同调节 SA 下游信号的转导（Fan & Dong, 2002; An & Mou, 2011）。本研究结果也表

明 WRKY1 和 NPR1 参与正向调控 *H. uvarum* 诱导的草莓果实抗病性。同样的, 枯草芽孢杆菌 SM21 (*Bacillus subtilis*) (Wang, 2013a) 和蜡质芽孢杆菌 AR156 (*Bacillus cereus*) (Wang, 2013b) 作为生物激发子可通过分别诱导桃果实 NPR1、PR1、PAL 和 CHI 等抗性相关基因上调表达来防治桃采后病害的发生。而外源绿原酸 (Chlorogenic acid) 和牛蒡低聚果糖 (Burdock fructooligosaccharide) 作为非生物激发子可通过诱导桃果实 (Jiao et al., 2018)、葡萄果实 (Sun et al., 2013) 的 NPR1、PAL、WRKY、PR1 和 PR5 等基因表达来激活 SA 信号通路并有效抑制桃青霉病、葡萄灰霉病的发生。可见, 外源激发子大多可诱导 PR 上调表达激活果实 SA 信号通路, 进而参与果实抗性机制过程。综上, 本研究显示 *H. uvarum* 作为生物激发子可诱导草莓果实 NPR1、PAL、WRKY1 及 PR 基因上调表达来激活 SA 信号通路, 进而防治草莓果实灰霉病的发生。

通常认为 ISR 与 SAR 不同, ISR 依赖于茉莉酸和乙烯, 不依赖于 SA 而与 PR 基因表达无关 (Piterse et al., 1996; van Loon et al., 1998)。结果显示 *H. uvarum* 处理不能有效提升 JA 信号通路的标志基因 JAR1 和 PDF1 的表达水平, 表明 *H. uvarum* 可能对 JA 信号没有激活作用。而 Jiang 等 (2018) 的研究也表明贝莱斯芽孢杆菌 (*Bacillus velezensis*) 处理虽然能诱导辣椒叶片 PR1 和 NPR1 的上调表达进而激活 SA 信号通路, 但不能诱导 PIN2 和 TIN1 的上调表达, 证明 JA 信号通路未参与 *B. velezensis* 诱导的辣椒对灰霉病的抗性机制。

生防菌处理能维持较好的采后果实品质。温新宇 (2016) 发现 *P. guilliermondii* Y35-1 能够明显抑制枇杷果实贮藏期间的病害腐烂发生率, 对枇杷的失重率、硬度、可溶性固形物、果皮细胞膜透性、维生素 C 含量、总糖含量和总酸含量均有一定的积极作用。张晶晶 (2013) 也发现 *H. uvarum* 和 *P. membranifactien* 以不同浓度复配处理葡萄, 随着拮抗酵母菌浓度升高, 葡萄的感官、硬度和糖酸得以更好的维持, 腐烂率、落粒率降低。本试验中也发现 *H. uvarum* 处理草莓果实可延缓果实衰老, 对维持和提高果实维生素 C 含量、可溶性固形物和花青素相对含量有一定的积极作用, 但对 pH 和类黄酮相对含量等无影响, 可能的原因是单独 *H. uvarum* 处理效果不佳, 如秦晓杰 (2013) 发现单独 *H. uvarum* 处理虽然可以提高草莓果实贮藏品质, 但 SA + *H. uvarum* 效果更好。

本研究中发现 SA 信号通路的标志基因如具有抗真菌活性的病程相关蛋白 PR1、PR5、Glu 和转录因子 WRKY1、NPR1 以及 SA 合成相关酶基因 PAL 在 *H. uvarum* 处理后均得到提高, 即表明 *H. uvarum* 可在转录水平上促进 SA 信号通路的转导, 同时可通过提升草莓果实抗性酶活性, 进而达到降低草莓采后灰霉病的效果。本试验结果初步解释了 *H. uvarum* 诱导草莓果实抗性的形成机理, 但相关转录因子 NPR1 和 WRKY1 具体作用机制及 *H. uvarum* 处理是否会促进果实内源 SA 含量的提升等问题仍有待后续深入研究。

References

- Amilruiz F, Blancoportales R, Munozblanco J, Caballero J L. 2011. The strawberry plant defense mechanism: a molecular review. *Plant and Cell Physiology*, 52 (11): 1873.
- An Chuan-fu, Mou Zhong-lin. 2011. Salicylic acid and its function in plant immunity. *Plant Journal*, 53 (6): 412 - 428.
- Cao Hui, Glazebrook J, Clarke J, Volko S, Dong Xin-nian. 1997. The *Arabidopsis* NPR1 gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats. *Cell*, 88: 57 - 63.
- Cao Jian-kang, Zhao Lan-ying. 2011. Postharvest biological basis of horticultural products. Beijing: Science Press. (in Chinese)
- 曹健康, 赵英兰. 2011. 园艺产品采后生物学基础. 北京: 科学出版社.
- Chan Zhu-long. 2006. Response mechanism of fruit to yeast antagonistic and exogenous salicylic acid-induced disease resistance [Ph. D. Dissertation]. Beijing: Graduate School of the Chinese Academy of Sciences (Botanical Research Institute). (in Chinese)

- 产祝龙. 2006. 果实对酵母拮抗菌和外源水杨酸诱导的抗病性应答机理[博士论文]. 北京: 中国科学院研究生院(植物研究所).
- Chen Liang-liang. 2016. Study on the biological control of postharvest diseases of apples and effects of induced resistance related genes of apples by *Yarrowia lipolytica* [M. D. Dissertation]. Zhenjiang: Jiangsu University. (in Chinese)
- 陈亮亮. 2016. 解脂亚罗酵母对苹果采后病害生防效力及诱导苹果抗性相关基因影响的研究[硕士论文]. 镇江: 江苏大学.
- Dai Zhong-liang, Gao Ke-xiang. 2018. Isolation and screening of biocontrol yeast strains and its control effect on apple fruit rings. *Shandong Agricultural Sciences*, 50 (9): 102 - 108. (in Chinese)
- 戴忠良, 高克祥. 2018. 生防酵母菌株的分离筛选及其防治苹果果实轮纹病效果. *山东农业科学*, 50 (9): 102 - 108.
- Ding Yue, Meng Fan, Wang Kui, Zhou Hai-lian, Zeng Dong-hui, Bian Xiao-lin, Xiao Hong-mei. 2011. Effects of *Meyerozyma guilliermondii* on the control of postharvest strawberry diseases and the quality of cold storage. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 33 (4): 64 - 68. (in Chinese)
- 丁玥, 孟帆, 王奎, 周海莲, 曾东慧, 边晓琳, 肖红梅. 2011. 季也蒙毕赤酵母对采后草莓病害控制及冷藏品质的影响. *南京农业大学学报*, 33 (4): 64 - 68.
- Droby S, Wisniewski M, Macarasin D, Wilson C. 2009. Twenty years of postharvest biocontrol research: Is it time for a new paradigm? *Postharvest Biology & Technology*, 52 (2): 137 - 145.
- Faize M, Faize L, Ishizaka M, Ishii H. 2004. Expression of potential defense responses of Asian and European pears to infection with *Venturia nashicola*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 64 (6): 319 - 330.
- Fan Wei-hua, Dong Xin-nian. 2002. *In vivo* interaction between NPR1 and transcription factor TGA2 leads to salicylic acid-mediated gene activation in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 14 (6): 1377.
- Gao Pan, Qin Jia-xing, Li De-long, Zhou Shan-yue. 2018. Inhibitory effect and possible mechanism of a *Pseudomonas* strain QBA5 against gray mold on tomato leaves and fruits caused by *Botrytis cinerea*. *PLoS ONE*, 13 (1): e0190932.
- Hou Li-xia, Gao Chao, Che Yong-mei, Zhao fang-gui, Liu Xin. 2012. Cloning and expression analysis of grape disease-related protein 1 gene. *Journal of Plant Physiology*, 48 (1): 57 - 62. (in Chinese)
- 侯丽霞, 高超, 车永梅, 赵方贵, 刘新. 2012. 葡萄病程相关蛋白1基因的克隆和表达分析. *植物生理学报*, 48 (1): 57 - 62.
- Jiao Wen-xiao, Li Xiang-xin, Wang Xiao-mei. 2018. Chlorogenic acid induces resistance against *Penicillium expansum* in peach fruit by activating the salicylic acid signaling pathway. *Food Chemistry*, 260: 274 - 282.
- Jiang Chun-hao, Liao Meng-jie, Wang Hong-kai, Zheng Ming-zi, Xu Jian-jun, Guo Jian-hua. 2018. *Bacillus velezensis*, a potential and efficient biocontrol agent in control of pepper gray mold caused by *Botrytis cinerea*. *Biological Control*, 126: 147 - 157.
- Jiang Chun-hao, Wu Fang, Xie Ping, Ke Hong-jiao, Yu Yi-yang, Guo Jian-hua. 2015. Study on screening and antagonistic mechanisms of *Bacillus amyloliquefaciens* 54 against bacterial fruit blotch (BFB) caused by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. *Microbiological Research*, 170: 95 - 104.
- Lawton K, Weymann K, Friedrich L. 1995. Systemic acquired resistance in *Arabidopsis* requires salicylic acid but not ethylene. *Mol Plant Microbe Interact*, 8 (6): 863 - 870.
- Li Dei-quan, Qian Ya-ming, Zhou Ming-ming, Tan Rong, Deng Zi-fa, Yuan Su-xia. 2016. Mechanism of *marine* bacterial NH-8 against strawberry gray mold and its antibacterial substances. *Journal of Plant Protection*, 43 (2): 42 - 48. (in Chinese)
- 李德全, 钱亚明, 周鸣鸣, 谈蓉, 邓自发, 袁素霞. 2016. 海洋细菌 NH-8 防治草莓灰霉病机理及其抗菌物质分析. *植物保护学报*, 43 (2): 42 - 48.
- Li Wan-hai. 2016. Biocontrol of postharvest green mold decay of citrus by *Hanseniaspora uvarum* in combination with phosphatidylcholine and the possible mechanisms involveds [M. D. Dissertation]. Zhenjiang: Jiangsu University. (in Chinese)
- 李万海. 2016. 葡萄汁有孢汉逊酵母结合卵磷脂对柑橘采后绿霉病的生物防治及其机制研究[硕士论文]. 镇江: 江苏大学.
- Lian Qin-gui, Zhang Jing, Gan Liang. 2017. The biocontrol efficacy of *Streptomyces pratensis* LMM15 on *Botrytis cinerea* in tomato. *Biomed Res Int*, (1): 1 - 11.
- Liu Hui-min. 2010. Mechanism of action biocontrol yeast against gray mold in postharvest grape and improvement of its biocontrol efficacy [Ph. D. Dissertation]. Wuhan: Huazhong Agricultural University. (in Chinese)

- 刘慧敏. 2010. 葡萄采后灰霉病生防酵母菌作用机理及其生防效力改良[博士学位论文]. 武汉: 华中农业大学.
- Lu La-ifeng, Wang Jian-xu, Zhu Rui-yu, Yu Ting. 2015. Transcript profiling analysis of *Rhodosporidium paludigenum*-mediated signalling pathways and defense responses in mandarin orange. *Food Chemistry*, 172: 603 - 612.
- Luo Kai. 2012. Effect of antagonistic yeast alone or in combination with chemical materials on postharvest storability of strawberry fruit[M. D. Dissertation]. Nanjing: Nanjing Agricultural University. (in Chinese)
- 罗凯. 2012. 拮抗酵母结合化学物质提高草莓果实采后贮藏性能的研究[硕士学位论文]. 南京: 南京农业大学.
- Ma Hong-fei, Lu Sheng-you, Han Qiu-ju, Li Wei. 2012. Determination of vitamin C in five kinds of fruits and vegetables by ultraviolet spectrophotometry. *Chemical and Biological Engineering*, 29 (8): 92 - 94. (in Chinese)
- 马宏飞, 卢生有, 韩秋菊, 李薇. 2012. 紫外分光光度法测定五种果蔬中维生素C的含量. *化学与生物工程*, 29 (8): 92 - 94.
- Mao Shu-bo. 2013. Study on the control and mechanism of postharvest diseases of strawberry by *Cryptococcus laurentii* combination with hot air treatment[M. D. Dissertation]. Nanjing: Nanjing Agricultural University. (in Chinese)
- 毛淑波. 2013. 罗伦隐球酵母结合热空气处理对草莓采后病害的防治及其机理研究[硕士学位论文]. 南京: 南京农业大学.
- Pieterse C, Zamioudis C, Berendsen R, Weller D, Van Wees S, Bakker P. 2014. Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annual Review of Phytopathology*, 52: 347 - 375.
- Pieterse C, van Wees S, Hoffland E, Vanpelt J, Vanloon L. 1996. Systemic resistance in Arabidopsis induced by biocontrol bacteria is independent of salicylic acid accumulation and pathogenesis-related gene expression. *Plant Cell*, 8: 1225 - 1237.
- Qin Xiaojie, Xiao Hongmei, Cheng Xu, Zhou Hailian, Si Linyuan. 2017. *Hanseniaspora uvarum* prolongs shelf life of strawberry via volatile production. *Food Microbiology*, 63: 205 - 212.
- Qin Xiao-jie, Xiao Hong-mei, Luo Kai, Wang Xiao-xia, Yang Rong. 2013. Effects of salicylic acid in combination with antagonistic yeast on the resistance of strawberry fruit during cold storage. *Food Science*, 34 (18): 290 - 294. (in Chinese)
- 秦晓杰, 肖红梅, 罗凯, 王晓霞, 杨蓉. 2013. 水杨酸结合拮抗酵母菌处理对冷藏草莓果实的抗性影响. *食品科学*, 34 (18): 290 - 294.
- Rairdan G, Delaney T. 2002. Role of SA and NPR1/NIM1 in race-specific resistance in *Arabidopsis*. *Genetics*, 161: 803 - 811.
- Sharma R, Singh D, Singh R. 2009. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: a review. *Biological Control*, 50 (3): 205 - 221.
- Si Lin-yuan. 2015. Effects of *Hanseniaspora uvarum* volatile compounds on the postharvest storage of strawberry[M. D. Dissertation]. Nanjing: Nanjing Agricultural University. (in Chinese)
- 司琳媛. 2015. 葡萄有孢汉逊酵母(*Hanseniaspora uvarum*)挥发性代谢物对草莓采后贮藏性能的影响[硕士学位论文]. 南京: 南京农业大学.
- Somssich I, Hahlbroj K. 1998. Pathogen defence in plants - a paradigm of biological complexity. *Trends in Plant Science*, 3 (3): 86 - 90.
- Sun Cui, Fu Da, Lu Huang-ping, Zhang Jia-hui, Zheng Xiao-dong, Yu Ting. 2018. Autoclaved yeast enhances the resistance against *Penicillium expansum* in postharvest pear fruit and its possible mechanisms of action. *Biological Control*, 119: 51 - 58.
- Sun Fei, Zhang Peng-ying, Guo Mo-ran, Yu Wen-qian, Chen Kao-shan. 2013. Burdock fructooligosaccharide induces fungal resistance in postharvest Kyoho grapes by activating the salicylic acid-dependent pathway and inhibiting browning. *Food Chemistry*, 138 (1): 539 - 546.
- Uknes S, Mauch-Mani B, Moyer M, Potter S, Williams S, Dincher S, Chandler D, Slusarenko A, Ward E, Ryals J. 1992. Acquired resistance in Arabidopsis. *Plant Cell*, 4 (6): 645 - 656.
- van Loon L, Bakker P, Pieterse C. 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, 36 (1): 453.
- Verberne M, Verpoorte R, Bol J, Mercado-Blanco J, Linthorst H. 2000. Overproduction of salicylic acid in plants by bacterial transgenes enhances pathogen resistance. *Nature Biotechnology*, 18 (7): 779 - 783.
- Wang Yu-ying, Li Bo-qiang, Qin Guo-zheng, Li Li, Tian Shi-ping. 2011. Defense response of tomato fruit at different maturity stages to salicylic acid and ethephon. *Scientia Horticulturae*, 129 (2): 183 - 188.
- Wang Kai-tuo, Zheng Yong-hua. 2011. Inhibition of postharvest green mold and induction of disease resistance of 'Red Bay' by *Pichia membranaefaciens*. *Food science*, (5): 64 - 69. (in Chinese)
- 汪开拓, 郑永华. 2011. 膜醭毕赤酵母对杨梅果实采后绿霉病的抑制与抗病性的诱导. *食品科技*, (5): 64 - 69.

- Wang Xiao-li, Wang Jin, Jin Peng, Zheng Yong-Hua. 2013a. Investigating the efficacy of *Bacillus subtilis* SM21 on controlling rhizopus rot in peach fruit. *International Journal of Food Microbiology*, 164 (2 - 3): 141 - 147.
- Wang Xiao-li, Xu Feng, Wang Jing, Jin Peng, Zheng Yong-Hua. 2013b. *Bacillus cereus* AR156 induces resistance against rhizopus rot through priming of defense responses in peach fruit. *Food Chemistry*, 136 (2): 400 - 406.
- Wei Ying-ying, Mao Shu-bo, Tu Kang. 2014. Effect of preharvest spraying *Cryptococcus laurentii* on postharvest decay and quality of strawberry. *Biological Control*, 73 (3): 68 - 74.
- Weigel R R, Pfitaner U M, Gatz C. 2005. Interaction of NIMIN1 with NPR1 modulates PR gene expression in *Arabidopsis*. *The Plant Cell Online*, 17 (4): 1279 - 1291.
- Wen Xin-yu. 2016. Screening, identification and antagonistic effects of antagonistic yeasts on storage and preservation of alfalfa[M. D. Dissertation]. Zhenjiang: Jiangsu University. (in Chinese)
- 温新宇. 2016. 拮抗酵母菌的筛选、鉴定及其制剂对枇杷贮藏保鲜的影响[硕士论文]. 镇江: 江苏大学.
- Wildermuth H M C, Dewdney J, Wu Gang, Ausubel F. 2001. Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature*, 414 (6863): 562 - 565.
- Xue Yao-bi, Zhou Ya-han, Deng Li-li, Zeng Kai-fang. 2015. Advances in research on pathogen-related proteins in postharvest fruits. *Food Industry Technology*, 36 (6): 391 - 394. (in Chinese)
- 薛耀碧, 周雅涵, 邓丽莉, 曾凯芳. 2015. 采后果实病程相关蛋白研究进展. *食品工业科技*, 36 (6): 391 - 394.
- Yan Yuan, Zheng Xiang-feng, Apaliya M T, Yang Hong-juan, Zhang Hong-yin. 2018. Transcriptome characterization and expression profile of defense-related genes in pear induced by *Meyerozyma guilliermondii*. *Postharvest Biology and Technology*, 141: 63 - 70.
- Zhang Hong-yin, Wang Shi-zhen, Huang Xin-yi, Dong Ying, Zheng Xiao-dong. 2008. Integrated control of postharvest blue mold decay of pears with hot water treatment and *Rhodotorula glutinis*. *Postharvest Biology & Technology*, 49 (2): 308 - 313.
- Zhang Jing-jing. 2013. Effects of antagonistic yeast on cold storage physiology and quality of grapes[M. D. Dissertation]. Nanjing: Nanjing Agricultural University. (in Chinese)
- 张晶晶. 2013. 拮抗酵母菌对葡萄冷藏生理和品质的影响[硕士论文]. 南京: 南京农业大学.
- Zhang Lu, Zhang Yao, Liu Li-dan, Zeng Kai-fang. 2013. Induction of disease resistance of postharvest gray mold of strawberry by *Pichia membranaefaciens*. *Food Science*, 34 (22): 286 - 291. (in Chinese)
- 张璐, 张瑶, 刘丽丹, 曾凯芳. 2013. 膜醭毕赤酵母对草莓采后灰霉病抗病性的诱导. *食品科学*, 34 (22): 286 - 291.
- Zhou Hai-lian. 2012. The inhibition mechanism study on *Hanseniaspora uvarum* control of gray mold[M. D. Dissertation]. Nanjing: Nanjing Agricultural University. (in Chinese)
- 周海莲. 2012. 葡萄汁有孢汉逊酵母 (*Hanseniaspora uvarum*) 对灰霉病抑制机理的探讨[硕士论文]. 南京: 南京农业大学.
- Zhou Ya-han, Ma Jia-hong, Xie Jia, Deng Li-li, Yao Shi-xiang, Zeng Kai-fang. 2018. Transcriptomic and biochemical analysis of highlighted induction of phenylpropanoid pathway metabolism of citrus fruit in response to salicylic acid, *Pichia membranaefaciens* and oligochitosan. *Postharvest Biology and Technology*, 142: 81 - 92.