

# $\beta$ -氨基丁酸处理对采后桃果实还原势的影响及抗病性的诱导作用

陈 偲<sup>1,2</sup>, 汪 立<sup>2</sup>, 夏明星<sup>3</sup>, 伍冬志<sup>2</sup>, 廖云霞<sup>2</sup>, 汪开拓<sup>1,2</sup>, 郑永华<sup>1,\*</sup>

(1.南京农业大学食品科技学院, 江苏 南京 210095; 2.重庆三峡学院生物与食品工程学院, 重庆 404100;  
3.重庆出入境检验检疫局, 重庆 404100)

**摘 要:** 采用10 mmol/L  $\beta$ -氨基丁酸 ( $\beta$ -aminobutyric acid, BABA) 和病原菌 *Rhizopus stolonifer* 处理采后‘白凤’水蜜桃, 以此研究BABA处理诱导水蜜桃防卫反应的模式, 并从还原势变化角度分析相关诱导抗性机理。结果显示: 经10 mmol/L BABA处理的桃果实于20 °C下贮藏2 d后, 伴随着果实的发病, 其还原性内源信号分子NO含量以及 *PpNPR1-like*、*PpCHI* 和 *PpGNS* 基因表达丰度均明显高于对照组; 而BABA+病原菌处理组 *PpNPR1-like*、*PpCHI* 和 *PpGNS* 表达丰度在贮藏前3 d整体上显著高于BABA处理和病原菌接种果实 ( $P < 0.05$ ), 在整个贮藏期间3种基因的表达丰度均处于较高水平。此外, 与对照组相比, BABA处理和BABA+病原菌接种均可显著诱导NO的积累, 并同时提升桃果实中磷酸戊糖途径关键酶葡萄糖-6-磷酸脱氢酶和6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶活力, 促使果实中还原型辅酶II (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH) 和还原型谷胱甘肽大量生成, 并降低NADP<sup>+</sup>和氧化型谷胱甘肽含量, 因而有效提高果实组织还原势。通过这些结果可推测, 10 mmol/L BABA可通过诱导Priming反应的方式赋予桃果实受病原菌感染时更强的抗病性, 从而抑制采后软腐病的发生; 同时, BABA处理可通过诱导还原性信号分子积累并提高磷酸戊糖途径关键酶活力, 进而提升桃果实还原势、活化相关转录因子, 以此诱导PRs基因的表达。

**关键词:**  $\beta$ -氨基丁酸; 桃果实; 还原势; 磷酸戊糖途径; 诱导抗病性

## Effect of $\beta$ -Aminobutyric Acid Treatment on Redox Status and Induction of Disease Resistance in Postharvest Peach Fruits

CHEN Si<sup>1,2</sup>, WANG Li<sup>2</sup>, XIA Mingxing<sup>3</sup>, WU Dongzhi<sup>2</sup>, LIAO Yunxia<sup>2</sup>, WANG Kaituo<sup>1,2</sup>, ZHENG Yonghua<sup>1,\*</sup>

(1. College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;  
2. College of Biology and Food Engineering, Chongqing Three Gorges University, Chongqing 404100, China;  
3. Chongqing Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Chongqing 404100, China)

**Abstract:** The present study was conducted to investigate the pattern of disease resistance induced by 10 mmol/L  $\beta$ -aminobutyric acid (BABA) treatment in postharvest peach (*Prunus persica* Batsch cv ‘Baifeng’) fruits and to analyze the underlying mechanism with respect to the change in redox status. The results showed that the peach fruits treated with 10 mmol/L BABA alone demonstrated remarkably higher concentrations of the endogenous reductive signaling molecule nitric oxide (NO) and higher expression levels of *PpNPR1-like*, *PpCHI* and *PpGNS* genes after 2 days of storage at 20 °C when compared with the control, accompanied by an increase in disease incidence. Meanwhile, the fruits simultaneously treated with BABA and inoculated with the pathogen *Rhizopus stolonifer* exhibited significantly higher expression levels of *PpNPR1-like*, *PpCHI* and *PpGNS* genes during the first three days of storage than did those receiving either treatment alone ( $P < 0.05$ ), and maintained high levels throughout the storage period. Moreover, either BABA treatment alone or the combined treatment stimulated the accumulation of NO and simultaneously elevated the activities of glucose 6-phosphatedehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase, which are recognized as key enzymes in the pentose

收稿日期: 2017-10-18

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (31672209); 重庆市基础与前沿研究计划项目 (cstc2015jcyjA80028);

第五批重庆市高校优秀人才支持计划项目 (2017019); 重庆三峡学院科研创新团队建设计划项目 (201703);  
2017年度重庆三峡学院大学生创新性实验计划项目 (2017030)

第一作者简介: 陈偲 (1993—) (ORCID: 0000-0001-9724-499X), 女, 硕士研究生, 研究方向为农产品加工与贮藏。

E-mail: 190846165@qq.com

\*通信作者简介: 郑永华 (1963—) (ORCID: 0000-0002-6293-5990), 男, 教授, 博士, 研究方向为农产品加工与贮藏。

E-mail: zhengyh@njau.edu.cn

phosphate pathway (PPP), thereby contributing to enhanced production of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) and glutathione (GSH) and lower contents of  $\text{NADP}^+$  and oxidized glutathione and consequently enhanced redox status. Therefore, 10 mmol/L BABA could confer peach fruits with enhanced resistance to *R. stolonifera* infection by activating the priming defense, thereby reducing the incidence of soft rot disease. At the same time, BABA treatment could induce the accumulation of the reductive signaling molecule and increase the activities of the key enzymes in PPP and consequently enhance the reduction potential and activate relevant transcription factors, thereby inducing the expression of *PR* gene.

**Keywords:**  $\beta$ -aminobutyric acid; peach fruit; redox status; pentose phosphate pathway; induction of disease resistance

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20171018-174

中图分类号: TS255.36

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2019) 01-0209-07

引文格式:

陈偲, 汪立, 夏明星, 等.  $\beta$ -氨基丁酸处理对采后桃果实还原势的影响及抗病性的诱导作用[J]. 食品科学, 2019, 40(1): 209-215. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20171018-174. <http://www.spkx.net.cn>

CHEN Si, WANG Li, XIA Mingxing, et al. Effect of  $\beta$ -aminobutyric acid treatment on redox status and induction of disease resistance in postharvest peach fruits[J]. Food Science, 2019, 40(1): 209-215. (in Chinese with English abstract)

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20171018-174. <http://www.spkx.net.cn>

真菌性病害严重缩短采后果实货架期和贮藏期。合成化学杀菌剂如特克多、波尔多液和咪唑霉处理可有效抑制果实采后病害的发展, 但长期施用会对农业生产环境及食品安全造成严重的不利影响<sup>[1]</sup>。通过物理、化学及生物等绿色激发子处理来诱导果实自身抗病性可有效抑制病原菌侵染, 显著降低化学药剂使用量<sup>[2]</sup>。对相关抗病性机理的进一步研究结果显示, 植物诱导抗病性的形成与细胞或组织内氧化还原势的消长密切相关: 在植物经激发子处理或病原菌侵染后, 其细胞核内还原性信号分子以及还原型辅酶II (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH) 和还原型谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 大量积累, 并通过电子传递链逐级传递以使细胞核内还原势急剧上升, 从而修饰转录因子以实现病程相关蛋白 (pathogenesis-related proteins, PRs) 基因的调控并诱导其迅速表达, 最终促进PRs、植保素及酚类物质的合成<sup>[3-4]</sup>。本课题组前期研究也发现, 经茉莉酸甲酯处理的葡萄果实中NO积累量显著增加, 同时病程相关基因非表达子基因 (nonexpressor of pathogenesis-related genes 1, *NPR1*) 表达量也急剧上升, 这暗示还原势的变化与抗病性的诱导可能存有密切相关性<sup>[5-6]</sup>。

$\beta$ -氨基丁酸 ( $\beta$ -aminobutyric acid, BABA) 是一种小分子的非蛋白类氨基酸, 其可通过独特的BABA诱导途径和交联应答机制刺激植物的超敏反应, 从而导致活性氧迸发、PRs基因表达、植保素合成等一系列抗病反应, 抑制病原菌的侵染<sup>[7-8]</sup>。在果蔬采后保鲜领域, BABA处理可有效诱导芒果<sup>[9]</sup>、樱桃<sup>[10]</sup>、葡萄<sup>[11]</sup>、草莓<sup>[12]</sup>等多种果实PRs基因的表达和抗病相关物质的合成, 从而显著抑制果实贮藏期间腐烂率的上升。近年来的研究进一步发现, BABA处理可诱导多种植物或果实的Priming反应,

从而在病原菌侵染时赋予果实强烈的抗病性, 但其具体机理仍不明确<sup>[13]</sup>。考虑到内部还原势可直接调控植物的防卫反应, 本实验从内部还原势变化角度研究BABA诱导果实抗病性形成的机理以弥补研究空白。此外, 桃果 (*Prunus persica* L.) 为我国夏季最主要的大宗水果之一, 产销需求旺盛; 但桃果实为呼吸跃变型水果, 采后呼吸强度大、品质劣变迅速, 且果实娇嫩, 极易遭受霉菌侵染而发生大范围腐烂, 损耗极为严重, 开发绿色高效的保鲜方法极为迫切。本研究在前期成果的基础上, 以‘白凤’水蜜桃为试材, 分析BABA处理对桃果实磷酸戊糖途径和还原性物质积累的影响, 以期明确还原势消长对果实诱导抗性形成之间的关联。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

商业成熟度 (八分熟) 的‘白凤’水蜜桃 (*Prunus persica*) 采摘于重庆市武隆区火炉镇有机桃种植基地, 采后即刻运回实验室。挑选大小一致、转色均匀并剔除存有机机械伤和病虫害果实, 平铺于操作台上用20℃强制冷风吹去田间热。

BABA、几丁质、二硫代硝基苯甲酸 (dithionitrobenzoic acid, DTNB) 美国Sigma公司; 3,5-二硝基水杨酸、三氯乙酸、L-苯丙氨酸、邻苯二甲基氨基甲醛 上海国药集团化学试剂有限公司; 乙醇、盐酸、冰醋酸 重庆戊业化学试剂有限公司; 谷胱甘肽还原酶、昆布多糖 上海源叶生物科技有限公司; NO检测试剂盒、 $\text{NADP}^+$ /NADPH检测试剂盒、GSH/氧化型谷胱甘肽 (oxidized glutathione, GSSG) 检测试剂盒 南京建成生物工程研

究所; Tripure Isolation Reagent试剂盒、SuperScript II试剂盒 美国Invitrogen公司。

## 1.2 仪器与设备

UV2600i紫外-可见分光光度计 日本岛津公司; DK-98-II型电热恒温水浴锅 天津市泰斯特仪器有限公司; BSC-150恒温恒湿培养箱 上海博迅医疗生物仪器股份有限公司; DW-86L338J型超低温冰箱 青岛海尔特种电器有限公司; PTC-200型反转录聚合酶链式反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)仪、Gel Doc XR型凝胶成像仪 美国Bio-Rad公司; DYCP-31D型核酸电泳仪 北京六一仪器厂。

## 1.3 方法

### 1.3.1 病原菌孢子悬浮液的制备、原料处理与分组

匍枝根霉(*Rhizopus stolonifer*)分离于发生软腐病的桃果实, 纯化鉴定后接种于PDA斜面上, 冷藏(4℃)备用。接种处理前, 将斜面上的菌种转接至PDA平板中, 传代培养7 d后用含体积分数0.02% Tween-80的无菌生理盐水将病原菌孢子洗出, 随后用血球计数板计数并将孢子浓度稀释至 $5 \times 10^4$ 个/mL, 现配现用。

本实验室前期研究证实10 mmol/L的BABA处理可有效抑制多种果实贮藏期间病害的发生, 故选用此浓度为开展后续研究<sup>[11-12]</sup>。桃果实随机分为4组: 1) 对照组: 桃果实不经任何处理; 2) 病原菌接种组: 先用体积分数70%乙醇溶液仔细擦拭果实表面, 然后用解剖针在果实赤道对称部位刺孔2个(深3 mm、直径3 mm), 各穿刺孔均用移液枪打入15  $\mu$ L *R. stolonifer*孢子悬浮液; 3) BABA处理组: 桃果实经体积分数70%乙醇溶液表面消毒, 并在赤道位置对称穿刺2个, 各穿刺孔均打入15  $\mu$ L 10 mmol/L BABA溶液; 4) BABA+病原菌接种组: 桃果实经表面70%乙醇溶液消毒和对称穿刺后, 先打入15  $\mu$ L 10 mmol/L的BABA溶液, 随后置于20℃下贮藏6 h后, 在穿刺处再接种15  $\mu$ L *R. stolonifer*孢子悬浮液。处理结束后, 将桃果实用60  $\mu$ m厚的聚乙烯袋分装, 细绳轻绕袋口2圈, 随后置于(20 $\pm$ 1)℃、相对湿度80%~90%的培养箱中贮藏5 d。在贮藏期间观察桃果实发病情况, 并每天切取健康桃果肉在液氮中速冻, 最后于-80℃超低温冰箱中保存备检。每个处理不少于40个果实, 各处理均重复3次, 整个实验重复2次。

### 1.3.2 指标的测定

#### 1.3.2.1 发病率和病斑直径的测定

果实病斑直径大于3 mm即为发病果, 发病率按下式进行计算。

$$\text{发病率}/\% = \frac{\text{发病果实数}}{\text{总果实数}} \times 100$$

用游标卡尺直接测量果实病斑直径。

#### 1.3.2.2 水杨酸、NO含量的测定

水杨酸(salicylic acid, SA)含量测定参考龚波林<sup>[14]</sup>

的方法, 利用水杨酸的溴代反应生成2,7-二氯荧光素-Br<sub>2</sub>-SA反应物, 通过荧光法测定果实痕量SA含量; NO含量的测定参考Murphy等<sup>[15]</sup>的方法, 以高铁血红蛋白法进行测定。SA、NO含量的结果均以鲜果质量计。

#### 1.3.2.3 NADPH、NADP<sup>+</sup>、GSH和GSSG含量的测定

NADPH和NADP<sup>+</sup>含量参考Nagano等<sup>[16]</sup>的硫酸甲酯吩嗪反应法进行测定; GSH和GSSG含量参考Rahman等<sup>[17]</sup>的酶循环法, 利用5,5'-二硫硝基苯甲酸反应进行测定。

#### 1.3.2.4 G6PDH、6PGDH活力的测定

称取2 g果实冻样, 加入10 mL内含30 mmol/L甘露醇、5 mmol/L MgSO<sub>4</sub>、5 mmol/L KCl和1 mmol/L EDTA的50 mmol/L Tris-HCl缓冲液(pH 7.2), 匀浆, 再以5 000 $\times$ g离心10 min(4℃)后, 取上清液测定酶活力。

葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(glucose-6-phosphatedehydrogenase, G6PDH)和6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶(6-phosphogluconatedehydrogenase, 6PGDH)活力参照Šindelář等<sup>[18]</sup>的方法进行测定, 略有改进。G6PDH反应体系(共3 mL)包含0.5 mL粗酶液、1 mL 10 mmol/L NADP<sup>+</sup>溶液、1 mL 10 mmol/L 6-磷酸葡萄糖溶液和0.5 mL 50 mmol/L Tris-HCl缓冲液(pH 7.2); 测定6PGDH活力时, 则将上述体系中6-磷酸葡萄糖溶液替换为6-磷酸葡萄糖酸溶液。反应液中每分钟生成1 nmol NADPH为1个酶活力单位(U), 用考马斯亮蓝比色法测定提取液中蛋白质含量<sup>[19]</sup>, 以每毫克蛋白中的酶活力表示果实样品中酶活力, 单位为U/mg。

#### 1.3.2.5 PRs基因表达丰度的测定

取1 g果实冻样使用Tripure Isolation Reagent试剂盒提取RNA。取1 mg RNA采取SuperScript II试剂盒逆转录cDNA第一链, Oligo(dT)为引物。用Primer Premier 7.0软件设计相关基因特异性引物(表1), 以桃18S rRNA基因为内参。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳分离, 用溴化乙锭染色后用凝胶成像仪扫描并定量分析<sup>[20]</sup>。

表1 桃果实PRs基因特异性引物序列  
Table 1 Primer sequences used for PCR amplification of PR genes in peach fruits

基因 (基因库ID)	引物序列	
	F (5'→3')	R (5'→3')
<i>PpNPR1-like</i> (DQ149935)	TCTTCAGTCGACATGGCTCATTCAGCC GAACCATCATCC	CCACTAGTCAGTAAACCTCCGA AGGCTTATTAGATGC
<i>PpCHI</i> (AF206635)	GGAATTCAGTAGTATTCTCGAAG	CAAATAGGTAAGTCTCTGTAGC
<i>PpGNS</i> (U49454)	GAACCATGATGCTCCACGGAC	AGCCGCGAATTCAGTGTAT
18S rRNA (L28749.1)	ATGGCCGTTCTTAGTTGGTG	GTACAAAGGGCAGGGACGTA

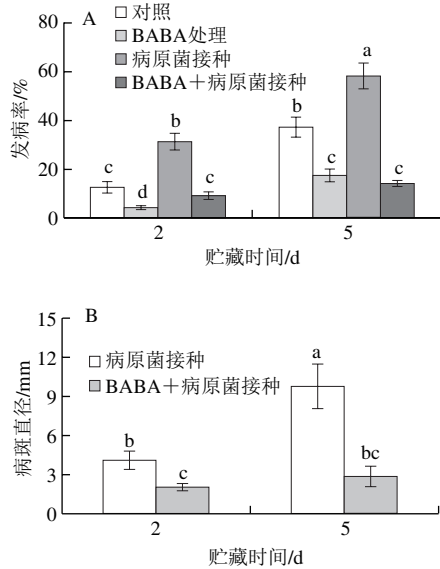
## 1.4 数据处理与分析

果实发病率和病斑直径重复测定5次, 其余指标均重复测定3次。采取邓肯氏多重比较法(SAS 8.2软件)进行差异显著性检验,  $P < 0.05$ 表示差异显著,  $P < 0.01$ 表示差异极显著。



## 2 结果与分析

### 2.1 不同处理对桃果实发病率与病斑直径的影响



小写字母不同表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。下同。

图1 不同处理对桃果实贮藏期间发病率(A)和病斑直径(B)的影响  
Fig. 1 Effects of different treatments on disease incidence (A) and lesion diameter (B) in peach fruits during storage

如图1A所示,桃果实 $20^{\circ}\text{C}$ 下贮藏5 d后,对照组果实发病率达到37.2%,同时病原菌接种组果实有58.4%的果实发生病害,而BABA处理组果实发病率比对照组低52.7%;BABA+病原菌接种组果实发病率则较病原菌接种组低72.3%。BABA+病原菌接种组果实病斑直径显著低于病原菌接种组(图1B)。这些结果说明BABA处理可有效控制桃果实贮藏期间软腐病的发展。

### 2.2 不同处理对桃果实贮藏期间NO、SA含量的影响

由图2A、B可知,对照组桃果实中NO含量在整个贮藏期间无明显变化,SA含量则随贮藏时间的延长逐渐上升。BABA处理在贮藏3 d后显著促进了桃果实中NO生成 ( $P < 0.05$ ),但BABA处理组SA含量与对照组无显著差异。病原菌接种组果实的NO和SA含量在贮藏第1天出现明显峰值,其数值分别为相同贮藏时间对照组的1.68倍和2.46倍,随后快速下降,至贮藏结束时,两者含量与对照组相比均无显著差异 ( $P > 0.05$ )。桃果实经BABA处理并接种病原菌后,其组织内NO和SA含量在贮藏第1天出现较病原菌接种组更高的峰值,在贮藏的前4 d也显著高于病原菌接种组。同时,在贮藏期间,BABA+接种病原菌组果实的NO和SA生成量均显著高于BABA处理组 ( $P < 0.05$ )。

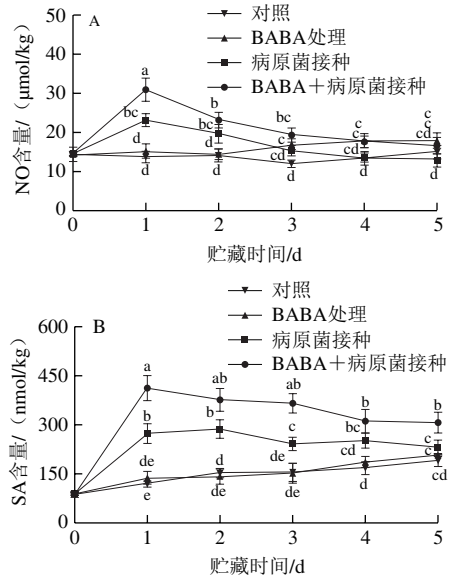


图2 不同处理对桃果实贮藏期间NO(A)和SA(B)含量的影响  
Fig. 2 Effects of different treatments on NO (A) and SA (B) content in peach fruits during storage

### 2.3 不同处理对桃果实贮藏期间NADPH和NADP<sup>+</sup>含量的影响

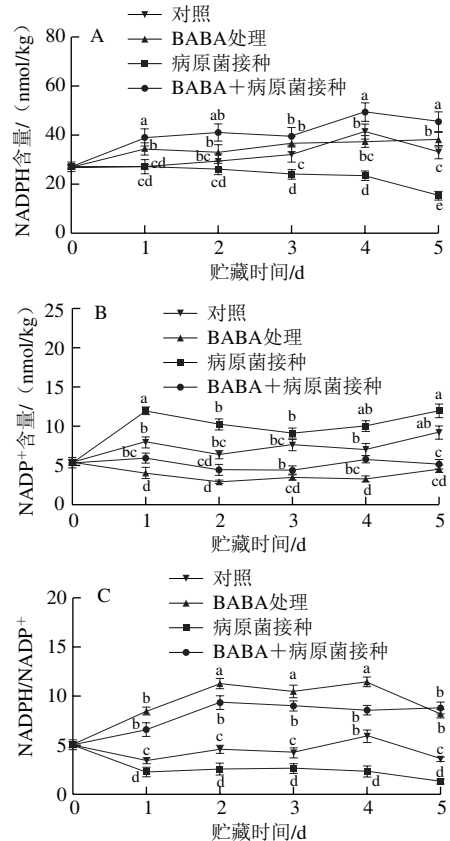


图3 不同处理对桃果实贮藏期间NADPH含量(A)、NADP<sup>+</sup>含量(B)和NADPH/NADP<sup>+</sup>比值(C)的影响  
Fig. 3 Effects of different treatments on NADPH (A) and NADP<sup>+</sup> (B) contents as well as NADPH/NADP<sup>+</sup> ratio (C) in peach fruits during storage

NADPH是植物体内重要的还原性物质, NADPH/NADP<sup>+</sup>比值一定程度上可以反映果实细胞还原势的高低。由图3A~C可知, 在贮藏前4 d, 对照组桃果实组织内NADPH含量逐渐上升, 而NADP<sup>+</sup>含量基本保持稳定。BABA处理与对照相比可促进NADPH的积累, 并同时降低NADP<sup>+</sup>含量, 且BABA处理组果实NADPH/NADP<sup>+</sup>比值在整个贮藏期间均显著高于对照组 ( $P<0.05$ ); 病原菌接种组果实在贮藏1 d后, 其NADPH含量开始下降, 而NADP<sup>+</sup>含量在贮藏前期快速上升, 之后含量均高于其他处理组, NADPH/NADP<sup>+</sup>比值显著低于对照组 ( $P<0.05$ ); BABA+病原菌接种处理组果实中NADPH含量在整个贮藏期间均显著高于BABA处理组果实 ( $P<0.05$ )。

#### 2.4 不同处理对桃果实贮藏期间GSH和GSSG含量的影响

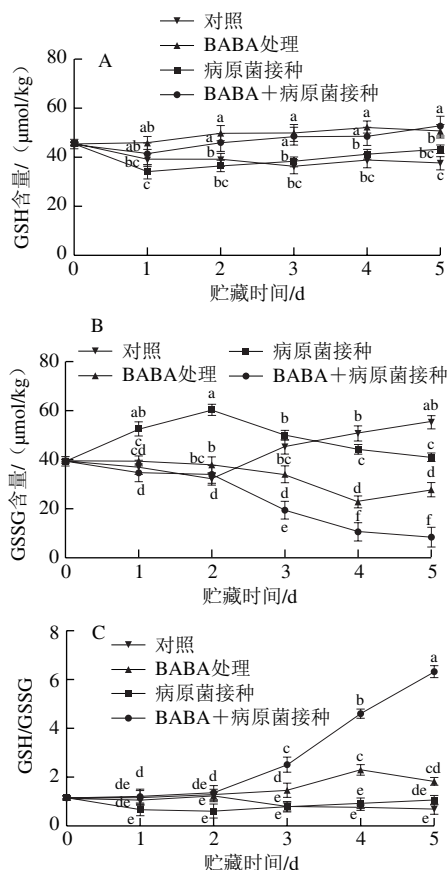


图4 不同处理对桃果实贮藏期间GSH含量(A)、GSSG含量(B)和GSH/GSSG比值(C)的影响

Fig. 4 Effects of different treatments on GSH (A) and GSSG (B) contents as well as GSH/GSSG ratio (C) in peach fruits during storage

由图4可见, 对照组桃果实中GSH含量在贮藏期间缓慢下降, 而GSSG含量则呈现先缓慢下降后急剧上升趋势。桃果实接种病原菌后, GSSG含量开始迅速上升, 至贮藏第2天出现峰值, 随后逐渐下降; GSH含量先下

降, 贮藏1 d后又逐渐上升。在贮藏2 d后, 与对照和病原菌接种相比, BABA处理和BABA+病原菌接种均可诱导提高果实中GSH含量、降低GSSG含量, 并可降低GSH/GSSG比值。

#### 2.5 不同处理对桃果实贮藏期间G6PDH和6PGDH活力的影响

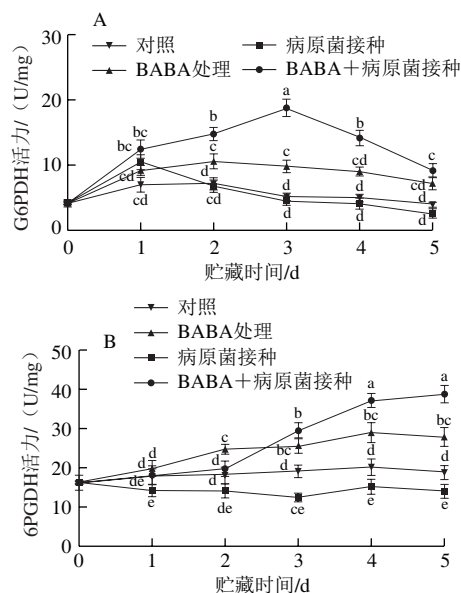


图5 不同处理对桃果实贮藏期间G6PDH (A) 和6PGDH (B) 活力的影响

Fig. 5 Effects of different treatments on G6PDH (A) and 6PGDH (B) activities in peach fruits during storage

由图5可见, 对照组桃果实中G6PDH活力在贮藏前2 d缓慢上升, 随后逐渐下降; 6PGDH活力在整个贮藏期间无显著变化。与对照组相比, BABA处理显著诱导了G6PDH和6PGDH活力的上升, 并使两者酶活力在整个贮藏周期均维持在较高水平。果实经病原菌接种后, G6PDH活力在贮藏第1天出现明显峰值, 随后迅速下降至对照组果实水平; 而6PGDH活力在整个贮藏期间均显著低于对照组 ( $P<0.05$ )。果实先经BABA处理再接种病原菌后, 其G6PDH活力在贮藏期前3 d较BABA处理组出现更为明显的上升, 在贮藏3 d后也显著高于BABA处理组 ( $P<0.05$ )。

#### 2.6 不同处理对桃果实贮藏期间PRs基因表达丰度的影响

如图6A~C所示, 对照组与BABA处理组桃果实的PRs基因表达丰度在贮藏前2 d并无显著差异 ( $P>0.05$ ), 但2 d后BABA处理组的PpNPR1-like、PpCHI和PpGNS基因表达丰度则明显高于对照组。接种病原菌后, PpNPR1-like和PpCHI表达丰度在贮藏第1天最高, 同时PpGNS表达丰度则在贮藏第2天最高, 随后逐渐下降, 贮藏后期3种基因表达丰度均显著低于BABA处理组

水平 ( $P < 0.05$ )。BABA+病原菌处理组 *PpNPR1-like*、*PpCHI* 和 *PpGNS* 表达丰度在贮藏前3 d整体上显著高于BABA处理组和病原菌接种组 ( $P < 0.05$ )，在整个贮藏期间3种基因的表达丰度均处于较高水平，说明BABA+病原菌处理有效诱导了桃果实 *PRs* 基因的表达。

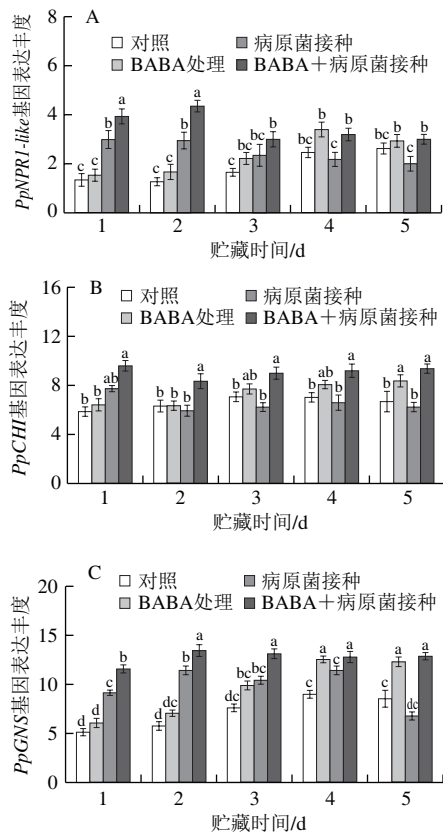


图6 不同处理对桃果实贮藏期间 *PpNPR1-like* (A)、*PpCHI* (B) 和 *PpGNS* (C) 基因表达丰度的影响

Fig. 6 Effects of different treatments on expression levels of *PpNPR1-like* (A), *PpCHI* (B) and *PpGNS* (C) genes in peach fruits during storage

### 3 讨论

BABA作为一种典型的激发子，可有效激发多种果实的抗病性反应<sup>[13]</sup>。在本研究中，10 mmol/L BABA处理在贮藏前期未能诱导果实产生明显的抗病性反应，但贮藏后期当果实发病率明显上升时，经BABA处理的果实中 *PRs* 基因表达丰度明显上升；BABA+病原菌处理则较BABA处理或病原菌接种更明显地诱导了果实防卫反应，果实中NO和SA的积累量以及 *PRs* 基因表达丰度在整个贮藏期间均维持在最高水平。这说明10 mmol/L BABA处理无法直接激活桃果实防卫反应，但可通过诱导Priming反应的方式使果实在受 *R. stolonifer* 侵染时有效激活抗病性，从而抑制果实软腐病的发生。这些结果与本实验

室前期研究相类似，即较高浓度的BABA处理（100、500 mmol/L）可直接诱导芒果<sup>[9]</sup>和樱桃<sup>[10]</sup>果实的活性氧迸发、*PRs* 基因表达和植保素合成等一系列抗病性反应，但经有效低浓度BABA（10 mmol/L）处理的果实则不直接表现抗病性，需再进行病原菌接种后果实才能表现出更强烈的抗病性反应，这符合典型Priming反应的特征<sup>[21]</sup>。

活性氧自由基的瞬时大量迸发被认为是植物联级防卫反应的首要程序，其与后续的 *PRs* 基因表达以及 *PRs*、植保素合成等一系列抗病性反应密切相关<sup>[22]</sup>。但近年来的研究证实，短时间的活性氧迸发是促进植物组织中细胞还原势提高的重要前提，而还原势的提高正是启动植物防卫反应的重要条件<sup>[23]</sup>。在模式作物拟南芥中，SA处理或病原菌接种均可有效诱导植株内GSH含量和NADPH含量的上升，提高组织还原势，进而将以共聚体形式存在的无活性WRKYs和TGAs等转录因子中二硫键逐步还原为巯基，释放出活性单体，最终启动 *PRs* 基因的表达<sup>[24-26]</sup>。因此，提高细胞还原势可有效活化大量与 *PRs* 基因表达密切相关的转录因子，从而诱导植物抗病性。NO和SA作为典型的还原性信号分子，不仅能直接提高细胞还原势，而且可通过复杂信号交联机制调控下游 *PRs* 基因的表达<sup>[27-28]</sup>。此外，磷酸戊糖途径（pentose phosphate pathway, PPP）是在动、植物和微生物中普遍存在的糖代谢支路，其可使葡萄糖直接氧化脱氢和脱羧并同时使NADP<sup>+</sup>还原为游离NADPH，从而直接提高细胞还原势并为细胞各项生命活动提供氢元素<sup>[29]</sup>。G6PDH和6PGDH是PPP途径中两种关键的限速酶，其活性的高低与NADPH合成量密切相关<sup>[30]</sup>。在本研究中，10 mmol/L BABA处理或BABA+病原菌接种均可有效诱导桃果实中NO的积累，BABA+病原菌处理可有效诱导桃果实中SA的积累。与对照组相比，BABA处理也可诱导G6PDH和6PGDH活力的提高，逐渐将NADP<sup>+</sup>还原为NADPH，因此提高了NADPH/NADP<sup>+</sup>比值；BABA处理也同样促进了桃果实中GSH含量的上升。此外，NPR1是植物抗病信号传导网络中关键的中间位点，对下游 *PRs* 基因的表达可起到正向调控作用<sup>[31]</sup>；*CHI* 和 *GNS* 基因经转录、翻译后可生成几丁质酶和 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶，可直接水解真菌细胞壁<sup>[32]</sup>。伴随着果实还原势的提高，经BABA处理的桃果实中 *NPR1-like*、*PpCHI* 和 *PpGNS* 基因表达丰度较对照组也明显增加，从而赋予果实较强的抗病性。

这些结果说明，10 mmol/L BABA处理可促进还原性信号分子积累并提高PPP途径关键酶活力，从而提升桃果实还原势，最终诱导 *PRs* 基因的表达以增加果实抗病性。这些结果解释了BABA诱导桃果实Priming抗性的形成机理，但相关转录因子在这其中发挥的作用仍有待后续研究。



## 参考文献:

- [1] SCHIRRA M, D'AQUINO S, CABRAS P, et al. Control of postharvest diseases of fruit by heat and fungicides: efficacy, residue levels, and residue persistence. a review[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59(16): 8531-8542. DOI:10.1021/jf201899t.
- [2] BORGES A A, SANDALIO L M. Induced resistance for plant defense[J]. Frontiers in Plant Science, 2015, 6: 109. DOI:10.3389/fpls.2015.00109.
- [3] TADA Y, SPOEL S H, PAJEROWSKA-MUKHTAR K, et al. Plant immunity requires conformational charges of NPR1 via S-nitrosylation and thioredoxins[J]. Science, 2008, 321: 952-956. DOI:10.1126/science.1156970.
- [4] SKELLY M J, LOAKE G J. Synthesis of Redox-active molecules and their signaling functions during the expression of plant disease resistance[J]. Antioxidants and Redox Signaling, 2013, 19(9): 990-997. DOI:10.1089/ars.2013.5429.
- [5] 汪开拓, 郑永华, 唐文才, 等. 茉莉酸甲酯处理对葡萄果实NO和H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>水平及植保素合成的影响[J]. 园艺学报, 2012, 39(8): 1559-1566. DOI:10.16420/j.issn.0513-353x.2012.08.015.
- [6] WANG K T, LIAO Y X, KAN J Q, et al. Response of direct or priming defense against *Botrytis cinerea* to methyl jasmonate treatment at different concentrations in grape berries[J]. International Journal of Food Microbiology, 2015, 194: 32-39. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2014.11.006.
- [7] COHEN Y, RUBIN A E, KILFIN G. Mechanisms of induced resistance in lettuce against *Bremia lactucae* by DL- $\beta$ -amino-butyric acid (BABA)[J]. European Journal of Plant Pathology, 2010, 126(4): 553-573. DOI:10.1007/s10658-009-9564-6.
- [8] HAMIDUZZAMAN M, JAKAB G, BARNAVON L, et al.  $\beta$ -Aminobutyric acid-induced resistance against downy mildew in grapevine acts through the potentiation of callose formation and jasmonic acid signaling[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2005, 18(8): 819-829. DOI:10.1094/MPMI-18-0819.
- [9] ZHANG Z K, YANG D P, YANG B, et al.  $\beta$ -Aminobutyric acid induces resistance of mango fruit to postharvest anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides* and enhances activity of fruit defense mechanisms[J]. Scientia Horticulturae, 2013, 160(27): 78-84. DOI:10.1016/j.scienta.2013.05.023.
- [10] WANG L, ZHANG H, JIN P, et al. Enhancement of storage quality and antioxidant capacity of harvested sweet cherry fruit by immersion with  $\beta$ -aminobutyric acid[J]. Postharvest Biology and Technology, 2016, 118: 71-78. DOI:10.1016/j.postharvbio.2016.03.023.
- [11] 廖云霞, 费良航, 夏明星, 等. 不同浓度 $\beta$ -氨基丁酸处理对葡萄果实抗病性的诱导模式研究[J]. 食品科学, 2018, 39(17): 221-228. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201817036.
- [12] WANG K T, LIAO Y X, XIONG Q, et al. Induction of direct or priming resistance against *Botrytis cinerea* in strawberries by  $\beta$ -aminobutyric acid and their effects on sucrose metabolism[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2016, 64(29): 5855-5865. DOI:10.1021/acs.jafc.6b00947.
- [13] COHEN Y, VAKNIN M, MAUCH-MANI B. BABA-induced resistance: milestones along a 55-year journey[J]. Phytoparasitica, 2016, 44(4): 513-538. DOI:10.1007/s12600-016-0546-x.
- [14] 龚波林. 以溴化钾-溴酸钾-2',7'-二氯荧光素为试剂对痕量水杨酸的间接荧光测定法[J]. 分析化学, 2001, 29(9): 1055-1057. DOI:10.3321/j.issn:0253-3820.2001.09.019.
- [15] MURPHY M E, NOACK E. Nitric oxide assay using hemoglobin method[J]. Methods in Enzymology, 1994, 233: 240-250. DOI:10.1016/S0076-6879(94)33027-1.
- [16] NAGANO I, SHAPSHAK P, YOSHIOK M, et al. Increased NADPH-diaphorase reactivity and cytokine expression in dorsal root ganglia in acquired immunodeficiency syndrome[J]. Journal of the Neurological Sciences, 1996, 136(1/2): 117-128. DOI:10.1016/0022-510X(95)00317-U.
- [17] RAHMAN I, KODE A, BISWAS S K. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method[J]. Nature Protocols, 2007, 1(6): 3159-3165. DOI:10.1038/nprot.2006.378.
- [18] ŠINDELÁŘ L, ŠINDELÁŘOVÁ M, BURKETOVÁ L. Changes in activity of glucose-6-phosphate and 6-phosphogluconate dehydrogenase isozymes upon potato virus Y infection in tobacco leaf tissues and protoplasts[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 1999, 37(3): 195-201. DOI:10.1016/S0981-9428(99)80034-5.
- [19] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72(Suppl 1/2): 248-254. DOI:10.1016/0003-2697(76)90527-3.
- [20] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>- $\Delta\Delta C_T$</sup>  method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408. DOI:10.1006/meth.2001.1262.
- [21] CONRATH U. Molecular aspects of defence priming[J]. Trends in Plant Science, 2011, 16(10): 524-531. DOI:10.1016/j.tplants.2011.06.004.
- [22] O'BRIEN J A, DAUDI A, BUTT V S, et al. Reactive oxygen species and their role in plant defence and cell wall metabolism[J]. Planta, 2012, 236(3): 765-779. DOI:10.1007/s00425-012-1696-9.
- [23] MOU Z, FAN W, DONG X. Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes[J]. Cell, 2003, 113(7): 935-944. DOI:10.1016/S0092-8674(03)00429-X.
- [24] MURMU J, BUSH M J, DELONG C, et al. Arabidopsis basic leucine-zipper transcription factors TGA9 and TGA10 interact with floral glutaredoxins ROXY1 and ROXY2 and are redundantly required for anther development[J]. Plant Physiology, 2010, 154(3): 1492-1504. DOI:10.1104/pp.110.159111.
- [25] LINDERMAYR C, SELL S, MÜLLER B, et al. Redox regulation of the NPR1-TGA1 system of *Arabidopsis thaliana* by nitric oxide[J]. Plant Cell, 2010, 22(8): 2894-2907. DOI:10.1105/tpc.109.066464.
- [26] LEVÉE V, MAJOR I, LEVASSEUR C, et al. Expression profiling and functional analysis of populus WRKY23 reveals a regulatory role in defense[J]. New Phytologist, 2009, 184(1): 48-70. DOI:10.1111/j.1469-8137.2009.02955.x.
- [27] YU M, LAMATTINA L, SPOEL S H, et al. Nitric oxide function in plant biology: a redox cue in deconvolution[J]. New Phytologist, 2014, 202(4): 1142-1156. DOI:10.1111/nph.12739.
- [28] KUMAR D. Salicylic acid signaling in disease resistance[J]. Plant Science, 2014, 228: 127-134. DOI:10.1016/j.plantsci.2014.04.014.
- [29] AHARONI A, GALILI G. Metabolic engineering of the plant primary-secondary metabolism interface[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2011, 22(2): 239-244. DOI:10.1016/j.copbio.2010.11.004.
- [30] SIDDAPPAJI M H, SCHOLLES D R, BOHN M, et al. Overcompensation in response to herbivory in *Arabidopsis thaliana*: the role of glucose-6-phosphate dehydrogenase and the oxidative pentose-phosphate pathway[J]. Genetics, 2013, 195(2): 589-598. DOI:10.1534/genetics.113.154351.
- [31] LE HENANFF G, FARINE S, KIEFFER-MAZET F, et al. *Vitis vinifera* VvNPR1.1 is the functional ortholog of AtNPR1 and its overexpression in grapevine triggers constitutive activation of PR genes and enhanced resistance to powdery mildew[J]. Planta, 2011, 234(2): 405-417. DOI:10.1007/s00425-011-1412-1.
- [32] WALLY O, JAYARAJ J, PUNJA Z. Comparative resistance to foliar fungal pathogens in transgenic carrot plants expressing genes encoding for chitinase,  $\beta$ -1,3-glucanase and peroxidase[J]. European Journal of Plant Pathology, 2009, 123(3): 331-342. DOI:10.1007/s10658-008-9370-6.