

## 二氧化硫调控亚硫酸盐代谢对葡萄采后灰霉病的抑制作用

王曼<sup>1</sup>, 魏佳<sup>2,3</sup>, 伊丽达娜·迪力夏提<sup>1</sup>, 张政<sup>2,3</sup>, 吴斌<sup>2,3\*</sup>

(<sup>1</sup>新疆农业大学食品科学与药学学院 乌鲁木齐 830052

<sup>2</sup>新疆农业科学院农产品贮藏加工研究所 乌鲁木齐 830091

<sup>3</sup>新疆农产品加工与保鲜重点实验室 乌鲁木齐 830091)

**摘要** 为了探明二氧化硫(SO<sub>2</sub>)调控亚硫酸盐代谢途径对鲜食葡萄采后灰霉病的抑制作用,以新疆木纳格葡萄为试材,采用 200 μL/L SO<sub>2</sub>熏蒸处理后损伤接种灰葡萄孢,测定贮藏期间果实品质相关参数,分析亚硫酸盐代谢途径中代谢物含量、相关酶活性变化趋势及相关基因的表达量,研究外源 SO<sub>2</sub>处理对葡萄采后亚硫酸盐代谢途径的作用方式,探讨亚硫酸盐代谢水平与果实抗灰霉病之间的关系。结果表明:SO<sub>2</sub>熏蒸能延缓果实的发病率,降低贮藏期间果实的失重率,保持其硬度,延缓可溶性固形物和可滴定酸含量的下降,诱导亚硫酸盐含量的上升。外源 SO<sub>2</sub>显著提高了果实中硫化氢(H<sub>2</sub>S)和半胱氨酸(Cys)的含量,增强了亚硫酸盐还原酶(SiR)、丝氨酸乙酰转移酶(SAT)和乙酰丝氨酸裂解酶(OAS-TL)的活性,并诱导了 *VvSiR1*、*VvSAT1*、*VvSAT2*、*VvSAT5* 和 *VvOAS-TL* 基因的表达,说明外源 SO<sub>2</sub>通过对亚硫酸盐代谢途径的调控来增强葡萄采后对灰霉病的抗性。

**关键词** 二氧化硫;葡萄;采后;亚硫酸盐代谢;灰葡萄孢

**文章编号** 1009-7848(2022)11-0299-10 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2022.11.031

灰霉病是由灰葡萄孢引起的一种真菌性采后病害,引起葡萄浆果采后品质的快速下降<sup>[1]</sup>。葡萄果实表面发生机械损伤后,容易遭受病原菌的感染<sup>[2]</sup>。果皮表面会产生褐色的凹陷斑,病程发展迅速且难以控制,致鲜食葡萄货架期缩短并影响其商品性,造成巨大的经济损失<sup>[3]</sup>。

自 1925 年 Winker 采用二氧化硫(Sulfur dioxide, SO<sub>2</sub>)熏蒸处理葡萄以来<sup>[4]</sup>,SO<sub>2</sub>作为一种商业化鲜食葡萄保鲜剂至今还无法替代。SO<sub>2</sub>通过降低果实中氧含量,抑制氧化酶活性和微生物活动,防止果实腐烂变质、变色<sup>[5]</sup>,其作用方式可能与诱导果实组织产生抗病性有关<sup>[6]</sup>。SO<sub>2</sub>作为一种常见形态的外源硫,能延缓果实采后贮藏品质劣变,抑制植物病原菌生长,增强其防御机制<sup>[7]</sup>。外源硫在葡萄贮运期间对其品质起到“保驾护航”的作用<sup>[8]</sup>,不仅能有效抑制灰霉病发生<sup>[9]</sup>,还可以引起葡萄浆果转录组数据的大规模重组<sup>[10]</sup>,参与调节防

御相关酶基因的表达,激活次生代谢和抗病相关蛋白的防御系统<sup>[11]</sup>。然而,外源 SO<sub>2</sub>如何参与硫代谢途径影响果实品质和提高抗病性方面至今还不清楚。

硫代谢途径是植物生长发育过程中重要的防御途径之一,作为植物中含硫化合物吸收和转运的关键途径,它和植物生理反应密切相关。植物中的含硫化合物作为硫代谢的中间产物对植物抗毒素、抗真菌性病害效果显著,并参与耐受和防御生物胁迫反应<sup>[12]</sup>。内源硫多以硫化氢(Hydrogen sulfide, H<sub>2</sub>S)形式存在,参与调控植物多种代谢过程<sup>[13]</sup>。外源 SO<sub>2</sub>气体进入植物细胞质外体与水结合形成 SO<sub>3</sub><sup>2-</sup><sup>[14]</sup>,SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>直接被运输至质体中,被亚硫酸盐还原酶(Sulfite reductase, SiR)还原成硫化物(主要以 H<sub>2</sub>S 形式,S 成为还原态 S<sup>2-</sup>),经乙酰丝氨酸裂解酶(O-Acetylserine (thiol) lyase, OAS-TL)的催化,H<sub>2</sub>S 与乙酰丝氨酸(O-Acetylserine, OAS)反应生成半胱氨酸(Cysteine, Cys),而 Cys 是植物硫代谢途径中的中心位置<sup>[15]</sup>,其中 OAS 又是在丝氨酸乙酰转移酶(Serine acetyltransferase, SAT)催化下形成的。关于葡萄采后贮运过程中的硫代谢作用机制尚不明确,外源 SO<sub>2</sub>如何参与硫代谢相关途径鲜见研究报道。本文以外源 SO<sub>2</sub>影

**收稿日期:** 2021-11-14

**基金项目:** 国家自然科学基金项目(U2003213,31860460);  
新疆维吾尔自治区区域协同创新专项(2021E01005)

**第一作者:** 王曼,女,硕士生

**通信作者:** 吴斌 E-mail: 42042615@qq.com

响亚硫酸盐代谢对葡萄采后灰霉菌的抑制作用为切入点,从硫代谢角度解析外源SO<sub>2</sub>处理对葡萄抗灰霉病的调控作用,为进一步揭示其在葡萄保鲜过程中的作用机制提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

木纳格葡萄 (*Vitis vinifera* L. cv 'Munage') 采摘于新疆阿图什市葡萄种植园,挑选果梗嫩绿、成熟度一致(TSS≥16%)、大小均一、无机械损伤、无病虫害的葡萄果实,立即运往新疆农业科学院农产品贮藏加工研究所,常温放置进行试验。

SO<sub>2</sub> 标准气体(≥99.99%),新疆乌鲁木齐鑫天意有限公司;磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、聚乙烯吡咯烷酮,天津市福晨化学试剂厂;三氯乙酸,天津市致远化学试剂有限公司;盐酸,天津福晨化学试剂厂;氢氧化钠,天津市光复科技发展有限公司;碘、酚酞,天津市致远化学试剂有限公司;硫代巴比妥酸,上海展云化学有限公司;还原甲基紫精、乙酰辅酶A钠盐、O-乙酰基-L-丝氨酸盐,乌鲁木齐国耀化玻仪器有限公司,以上试剂均为分析纯级。RNA提取试剂盒、反转录试剂盒,天根生化科技有限公司。

### 1.2 仪器与设备

UV-2000型紫外分光光度仪,日本岛津有限公司;DELTA320分析天平,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;SIM-F140ADL制冰机,日本松下电器;DW-86L626超低温冰箱,青岛海尔特种电器有限公司;D-78532微型离心机,德国Hettich公司;DYY-6D电泳仪,北京市六一仪器厂;SERIAL N凝胶成像系统,英国Uvitec Firereader公司;LightCycler® 96荧光定量PCR仪,美国罗氏公司;OSE-MP25 TGear Plate微孔板离心机,天根生化科技有限公司。

### 1.3 处理方法

1.3.1 菌悬液的制备 灰葡萄孢菌种由新疆农业科学院微生物所提供。将灰葡萄孢接种在马铃薯葡萄糖琼脂培养基上,在22℃的恒温保湿培养箱中培养7d后,加入5.0 mL含有0.05%吐温80的无菌去离子水,轻轻刮取培养基表面收集孢子。将收集液倒在灭菌后的纱布上面进行过滤,再将滤

液调配到最终浓度为1×10<sup>5</sup>个/mL进行后续试验。

1.3.2 样品处理方法 将试供材料随机分组,放置在一定体积的密闭箱中,以200 μL/L的SO<sub>2</sub>熏蒸处理2h为试验组,无处理作为对照组。熏蒸完成后室温放置24h,将葡萄果粒剪下(保留果柄),果实表面先用无菌水擦拭,再用75%的酒精溶液擦拭果实表面需要接种的位置。在葡萄赤道部位刺伤(直径1.67 mm,深度3.00 mm),接种10 μL的灰霉菌菌悬液(浓度为1×10<sup>5</sup>个/mL),放入聚乙烯样品盒中,放置恒温培养箱中(22±1)℃培养。每个处理3次平行,每次选用700个果粒,进行每天取样,共7次。选取果实病斑外围2~10 mm的果肉样品,切碎混匀后用液氮速冻并置于-80℃保存,以测定其它相关指标。

### 1.4 指标测定方法

1.4.1 失重率和硬度的测定 失重率参考公式(1)计算。

$$\text{失重率}(\%) = \frac{\text{贮前质量} - \text{贮后质量}}{\text{贮前质量}} \times 100 \quad (1)$$

硬度的测定,每个处理随机选取30颗葡萄(含皮),采用GY-4型硬度计测定果实硬度,单位N。

1.4.2 可溶性固形物的测定 每个处理随机挑选20颗葡萄,采用PR-PAL-1型数显糖度计测定,各处理重复3次。

1.4.3 可滴定酸的测定 参照Loay<sup>[6]</sup>的方法,略有改动,随机选取30粒果实,榨汁机榨汁后,将果汁在4℃,8500 r/min离心10 min。用0.05 mol/L的NaOH对加入酚酞的上清液进行滴定,测定3次,取平均值。

1.4.4 发病率的测定 在接种果皮处,用游标卡尺在病斑处进行十字交叉法测量,病斑直径若大于1.67 mm则为接种发病果实。发病率计算方法如下:

$$\text{发病率}(\%) = \frac{\text{发病果实数}}{\text{总接种果实数}} \times 100 \quad (2)$$

1.4.5 亚硫酸盐含量 参照GB 5009.34-2016《食品安全国家标准 食品中二氧化硫的测定》<sup>[7]</sup>中的方法,略有改动。取8.0 g样品,置于蒸馏瓶中,加入250 mL水,装上冷凝装置,冷凝管下端插入预先备用的25 mL乙酸铅吸收液,然后在蒸馏

瓶中加入 10 mL 盐酸溶液,立即盖塞,加热蒸馏。当蒸馏液约 200 mL 时,再蒸馏 1 min。用少量的蒸馏水冲洗插入乙酸铅溶液装置做空白试验。用碘标准溶液(0.005 mol/L)滴定。

1.4.6 硫化氢含量的测定  $H_2S$  含量的检测方法参考杜鑫哲<sup>[18]</sup>的方法,略有改动。将装有 0.5 mL  $Zn(Ac)_2$  溶液的 1.5 mL  $E_p$  管放入 25 mL 三角瓶中,取 1.0 g 样品,冰浴研磨,加入 2 mL 50 mmol/L 磷酸盐缓冲溶液(0.1 mmol/L 二乙胺四乙酸、0.2 mmol/L 抗坏血酸,pH 7)放入三角瓶底部并在底部加入 1 mL 1 mol/L HCl 启动反应,室温反应 30 min,取出  $E_p$  管,加入 0.2 mL 20 mmol/L DPD 和 30 mmol/L  $FeCl_3$  混匀黑暗反应 15 min,在波长 670 nm 处测定吸光值。

$H_2S$  含量的计算公式如下:

$$H_2S \text{ 含量}(\text{nmol/L}) = \frac{c(H_2S) \times 1000 \times (0.5 + 0.2 + 0.2) \times 0.001}{m} \quad (3)$$

式中, $c$ —— $H_2S$  浓度, mol/L;  $m$ ——样品质量, g。

1.4.7 半胱氨酸含量的测定 参照 Rahat 等<sup>[19]</sup>的方法,略有改动。取 1.0 g 样品,冰浴研磨,体积分数为 5% 的高氯酸中研磨。12 000 r/min 离心 20 min。收集上清液加 1 mL 酸性茚三酮试剂。在波长 560 nm 处读取吸光值,半胱氨酸的量为参照标准半胱氨酸在类似条件下获得标准曲线计算。

1.4.8 SiR、SAT、OAS-TL 活力测定 SiR 活力参照 Randewig 等<sup>[20]</sup>的方法进行测定,略有改动,取 1.0 g 样品冰浴研磨,加入 5 mL 0.1 mol/L HEPES-NaOH(pH 7.8),在 4 °C、14 000 r/min 离心 10 min,取 80  $\mu$ L 上清液加入 20  $\mu$ L 100 mmol/L 醋酸缓冲溶液再加入 400  $\mu$ L 反应液(25 mmol/L HEPES-NaOH、1 mmol/L  $Na_2SO_3$ 、5 mmol/L OAS-HCl、10 mmol/L DTT、30 mmol/L  $NaHCO_3$ 、15 mmol/L  $Na_2SO_4$ 、

5 mmol/L 还原甲基紫精)15 min 后加入 50  $\mu$ L 20% TCA。测定半胱氨酸含量,以每分钟生成 1  $\mu$ mol Cys 为 1 U,酶活性以 U/g 表示。

SAT 活力参照王璐怡<sup>[21]</sup>的方法进行测定,略有改动,取 1.0 g 样品冰浴研磨,加入 3 mL 提取液(30 mmol/L Tris-HCl 内含 10 mmol/L DTT)冰浴研磨,在 4 °C、14 000 r/min 离心 20 min。取 100  $\mu$ L 上清液加入 100  $\mu$ L 反应液(4 mmol/L L-丝氨酸、2 mmol/L 乙酰辅酶 A、0.5 mmol/L DTT、1 mmol/L  $Na_2S$ 、50 mmol/L  $K_2HPO_4-KH_2PO_4$ 、pH 7.5)25 °C 条件下培养 10 min,加 50  $\mu$ L 20% TCA 终止反应,测定半胱氨酸含量,以每分钟生成 1  $\mu$ mol Cys 为 1 U,酶活性以 U/g 表示。

OAS-TL 活力参照 Liang 等<sup>[22]</sup>方法进行测定,略有改动。取 1.0 g 样品冰浴研磨,加入 1 mL 20 mmol/L Tris-HCl 冰浴研磨,在 4 °C、13 000 r/min 离心 10 min,取上清 50  $\mu$ L 加入 1 mL 反应液(5 mmol/L OAS、5 mmol/L  $Na_2S$ 、33.4 mmol/L DTT、100 mmol/L Tris-HCl)。37 °C 孵育 30 min,测定半胱氨酸含量,以每分钟生成 1  $\mu$ mol Cys 为 1 U,酶活性以 U/g 表示。

1.4.9 果实中 SiR1、SAT1、SAT2、SAT5 和 OAS-TL 的基因表达量分析 样品加入液氮研磨成粉末,参照快速 RNA 提取试剂盒说明书的步骤进行操作。RNA 浓度及纯度检测合格后采用反转录试剂盒进行反转录,合成的 cDNA 第一链置于 -20 °C 备用。采用 qPCR 仪分析基因的相对表达量。95 °C 预变性 30 s;95 °C 变性 10 s,退火温度,10 s,72 °C 延伸 10 s,40 个循环;95 °C 10 s,59 °C 60 s,97 °C 1 s;37 °C 30 s。每个样品重复 3 次。采用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法<sup>[23]</sup>,将第 0 天样品数据定义为 1,其它取样时间点基因表达均与第 0 天比较,计算出相对表达量,Actin 为内参基因。

表 1 亚硫酸盐代谢相关引物序列

Table 1 Sulfite metabolism-related primer sequences

基因名称	正向引物(5'-3')	反向引物(5'-3')
SiR1	GGAAGAACACATAGATTGGAG	AATAAACCACCATCACCCCTG
SAT1	ATGATGTTCTGTGGCTGAA	CTCTAATGGCTCTCCTGAC
SAT2	TGCCATGGGTCTCTCCAAGG	ATFGGCTCCTTCTCCGCCTC
SAT5	ACGATCTATTCTGGACACCTT	AGACAATGCGAGAACGACAC
OAS-TL	CTGGCATTGGGTTGGCATT	CTCTGGTCTGTGGTCTCATAA
Actin	GATTCTGCTGATGCTGTGAGT	GACAATTTCCCCTTCAGCAGT

## 1.5 数据处理

使用 GraphPad Prism 8.0.2 软件作图,SPSS 20.0 进行数据分析以及利用 Duncan 法来比较均值。 $P<0.05$  表示差异显著, $P<0.01$  表示差异极显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 $\text{SO}_2$ 处理对果实生理品质的影响

如图 1a 表明, 两组果实硬度的变化趋势一致, 均呈下降趋势, 处理组硬度显著高于对照组 ( $P<0.01$ ),  $\text{SO}_2$  处理能够显著延缓果实软化进程。在图 1b 中, 失重率总体呈现上升趋势, 处理组均低于对照组。在 0~3 d 时无差异显著, 在 4~6 d 呈极显著差异 ( $P<0.01$ ), 表明  $\text{SO}_2$  处理在贮藏期间

能够有效地延缓水分的流失。

果实中可溶性固形物含量变化呈先上升后下降趋势, 对照组高于处理组(图 1c)。所有处理在第 0~4 天缓慢上升, 随之又呈急速下降趋势, 且对照组下降速度大于处理组, 并在第 4 天出现峰值 ( $P<0.01$ )。至贮藏结束时, 处理组比对照组高 0.84%。

果实中可滴定酸含量在贮藏期间呈先下降后上升再下降的变化趋势(图 1d)。在贮藏前 2 d 出现下降趋势, 且处理组高于对照组, 第 2 天同时出现最低点。处理组在第 3~4 天出现上升趋势, 第 4 天达到峰值随之开始下降, 而对照组则是第 3 天出现峰值。贮藏后期处理和对照组同步出现下降趋势, 随着贮藏时间的延长, 导致有机酸含量逐渐降低。

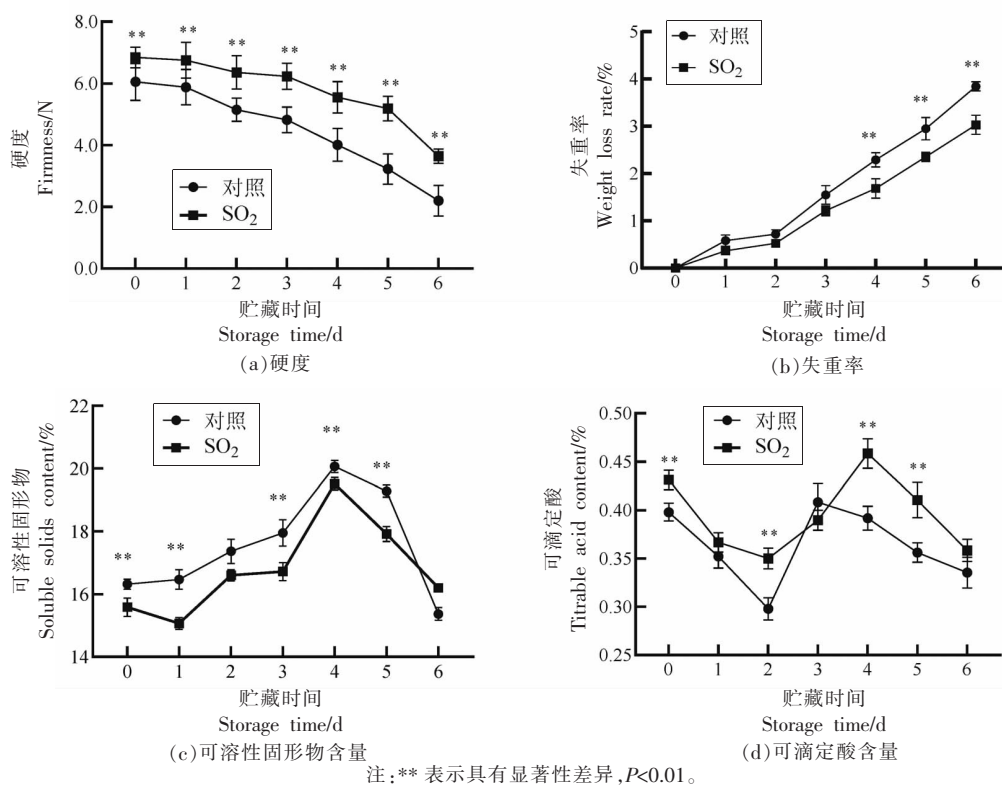


图 1  $\text{SO}_2$  处理对果实生理品质的影响

Fig.1 Effects of  $\text{SO}_2$  treatment on postharvest physiological quality of fruit

### 2.2 $\text{SO}_2$ 处理对果实发病率的影响

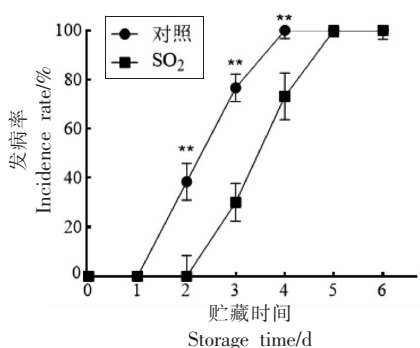
由图 2 可知, 果实发病率的变化趋势一致且呈现上升趋势。在第 2~4 天时果实发病率出现极显著差异 ( $P<0.01$ ) 且对照组高于处理组。对照组和处理组的发病时间分别为第 2 天和第 3 天;第

4 天对对照组的发病率达到了 100%。

### 2.3 $\text{SO}_2$ 处理对果实亚硫酸盐相关代谢物含量的影响

果实中亚硫酸盐含量变化趋势一致, 处理组高于对照组 ( $P<0.01$ )。(图 3a)。处理组前 4 d 缓慢



图 2 SO<sub>2</sub> 处理对果实发病率的影Fig.2 Effects of SO<sub>2</sub> treatment on postharvest morbidity of fruit

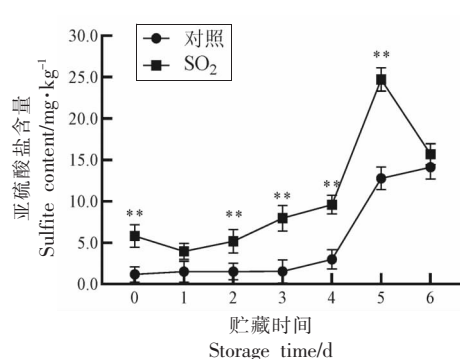
上升,第 4~5 天期间出现快速上升趋势,第 5 天达到峰值(24.71 mg/kg),随之开始下降;而对照组前 4 d 亚硫酸盐含量变化趋于平稳,无显著变化,第 5~6 天呈现上升趋势,第 6 天达到最大值(14.11 mg/kg)。

在图 3b 中,果实中的硫化氢含量变化呈先上升后缓慢下降趋势,处理组均高于对照组,在 0~4 d 期间呈极显著差异。处理组第 0 天的硫化氢含量是对照组的 2.77 倍,所有处理第 2 天均达到峰值,贮藏后期处理组的下降速度较快,而对照组的下降速度较缓慢。

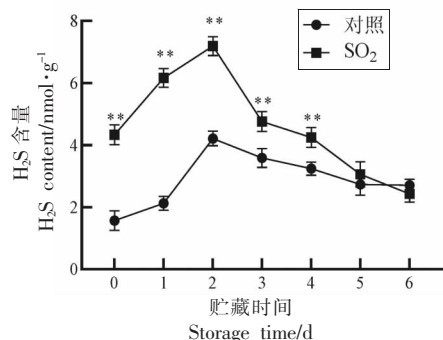
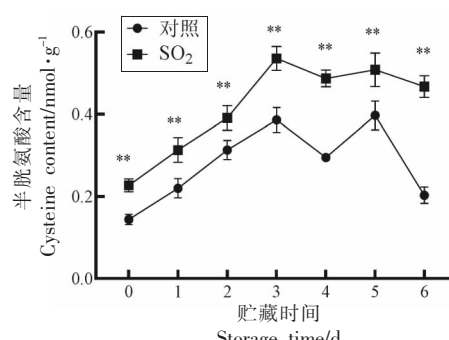
处理组显著提升了果实中半胱氨酸的含量,呈先上升后平稳下降的趋势(图 3c)。处理组第 3 天达到峰值,贮藏后期平缓下降,下降幅度较小,第 6 天半胱氨酸含量是对照组的 2.35 倍( $P<0.01$ )。对照组第 0~3 天呈现上升趋势,而在第 4~6 天呈曲折下降趋势且第 5 天达到最大值(0.4 nmol/g)。

#### 2.4 SO<sub>2</sub> 处理对果实亚硫酸盐代谢相关酶活力的影响

SiR、SAT 和 OAS-TL 是亚硫酸盐代谢途径中的主要相关酶。由图 4a~c 可知,与对照组相比, SiR、SAT 和 OAS-TL 的活力分别提高了 4.33, 1.02 倍和 1.37 倍。处理组的 SiR 活力平稳上升,对照组的 SiR 活力先平稳上升后缓慢下降(图 4a)。第 0~2 天处理和对照组无显著差异,而第 3~6 天出现极显著差异( $P<0.01$ )。处理组中 SiR 活力由 0.06 U/g 升高到 0.26 U/g,对照组中 SiR 活力由 0.08 U/g 上升到 0.14 U/g,第 6 天处理组是对照组的 1.86 倍。



(a) 亚硫酸盐含量

(b) H<sub>2</sub>S 含量

(c) Cys 含量

图 3 SO<sub>2</sub> 处理对果实亚硫酸盐相关代谢物含量的影响Fig.3 Effects of SO<sub>2</sub> treatment on the content of postharvest sulfite related metabolites in fruit

由图 4b 可知,所有处理中 SAT 活力保持在一个相对平稳的状态,在第 3 天均出现最低点,第 0 天和第 2~4 天呈现极显著差异( $P<0.01$ )。处理组第 2 天出现最大值是对照组的 1.31 倍。

OAS-TL 活力变化呈先上升后下降的趋势,第 0~2 天无显著差异,第 3~6 天呈差异极显著(图 4c)。处理和对照出现峰值时间分别为第 4 天和第 2 天,第 4 天时 OAS-TL 活力是对照组的 4.07 倍( $P<0.01$ ),对照组在第 2 天后出现快速下降趋势。

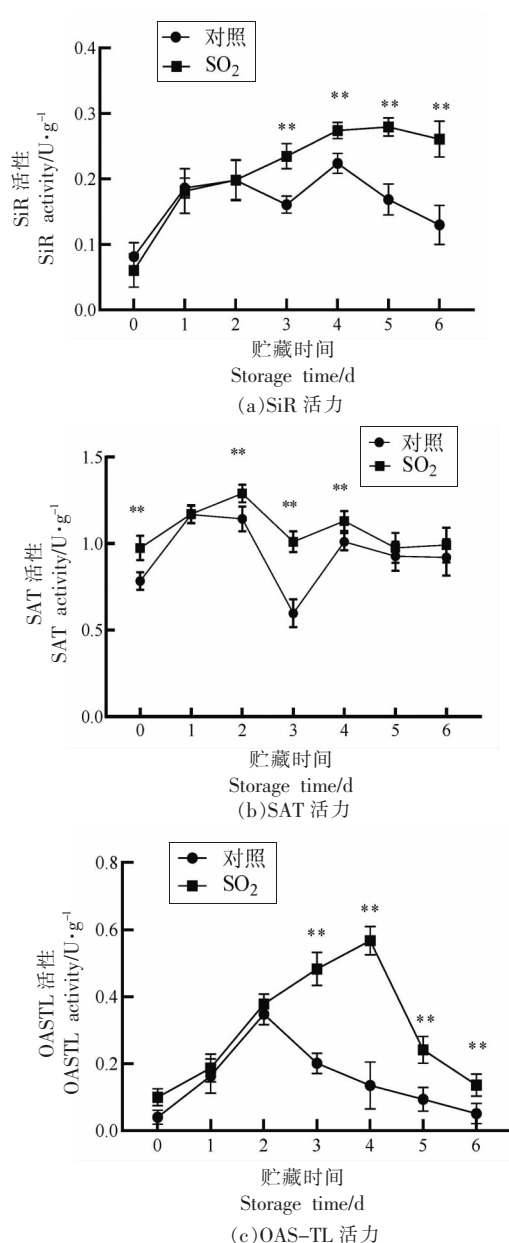


图4  $\text{SO}_2$ 处理对果实亚硫酸盐代谢相关酶活性的影响  
Fig.4 Effects of  $\text{SO}_2$  treatment on activities of enzymes related to sulfite metabolism in postharvest fruit

## 2.5 $\text{SO}_2$ 处理对果实亚硫酸盐代谢相关基因表达量的影响

图5a~e为亚硫酸盐代谢的相关基因表达量。处理组中 $VvSiR1$ 相对表达量在第0~5天持续上调,表达水平呈现先上升后下降趋势;第2天时相对表达量达到最大值是对照组的39.18倍,随之呈下降趋势;第3~5天相对表达量分别是对照组

的3.67,4.00和1.55倍( $P<0.01$ )。对照组则是呈缓慢上升的趋势;在0~2d相对表达量无明显变化,至贮藏结束时,达到最大值并高于处理组50.39%(图5a)。

$VvSAT1$ 基因的相对表达量总体呈现曲折上升的变化趋势(图5b)。两组处理前期无显著差异,则在后期表现极显著差异。处理组在第3,4,6天时高于对照组( $P<0.01$ ), $VvSAT1$ 的相对表达量上调,第6天时出现最大值(5.78)。对照组中的 $VvSAT1$ 基因的相对表达量平稳上升,并和处理组同在第6天出现峰值。

如图5c所示, $VvSAT2$ 基因的相对表达量处理和对照组均是呈现下降趋势,对照组高于处理组,下调了 $VvSAT2$ 基因表达。处理和对照组的 $VvSAT5$ 基因相对表达量变化趋势有一定差异(图5d)。处理组第3天出现峰值,在第0,2,3,5天时上调了该基因的表达,分别是对照组的2.82,1.31,1.50倍和5.21倍。对照组第1~3天无明显变化,在第4天时快速下降随后保持相对平稳趋势。

$VvOAS-TL$ 相对表达量在对照组中呈现先上升后下降的趋势(图5e)。处理组在第0~4天显著上调了 $VvOAS-TL$ 相对表达量( $P<0.01$ ),第4天达到最大值为1.46,随后呈现下降趋势且低于对照组。第0天处理组 $VvOAS-TL$ 相对表达量是对照组的1.71倍。

## 3 讨论

灰霉病是导致葡萄采后贮运过程中腐烂变质的主要病害,严重制约葡萄产业的发展。本文通过外源 $\text{SO}_2$ 熏蒸处理后损伤接种灰葡萄孢的方式,研究 $\text{SO}_2$ 调控亚硫酸盐代谢途径对提高葡萄采后对灰霉病抗性的作用。本研究发现贮藏期外源 $\text{SO}_2$ 处理不仅延迟了发病时间,降低果实发病率和贮藏过程中果实的失重率,还延缓了果实软化。接种的灰葡萄孢在生长繁殖过程中需要消耗果实中营养物质造成可溶性固形物含量的下降<sup>[24]</sup>。此外,有机酸转化成其它物质成分<sup>[25]</sup>,或是果实接种灰霉菌使得有机物被消耗分解<sup>[26]</sup>,导致可滴定酸含量的下降。图1d中第2~4天出现返酸的现象可能是由于微生物代谢产酸。

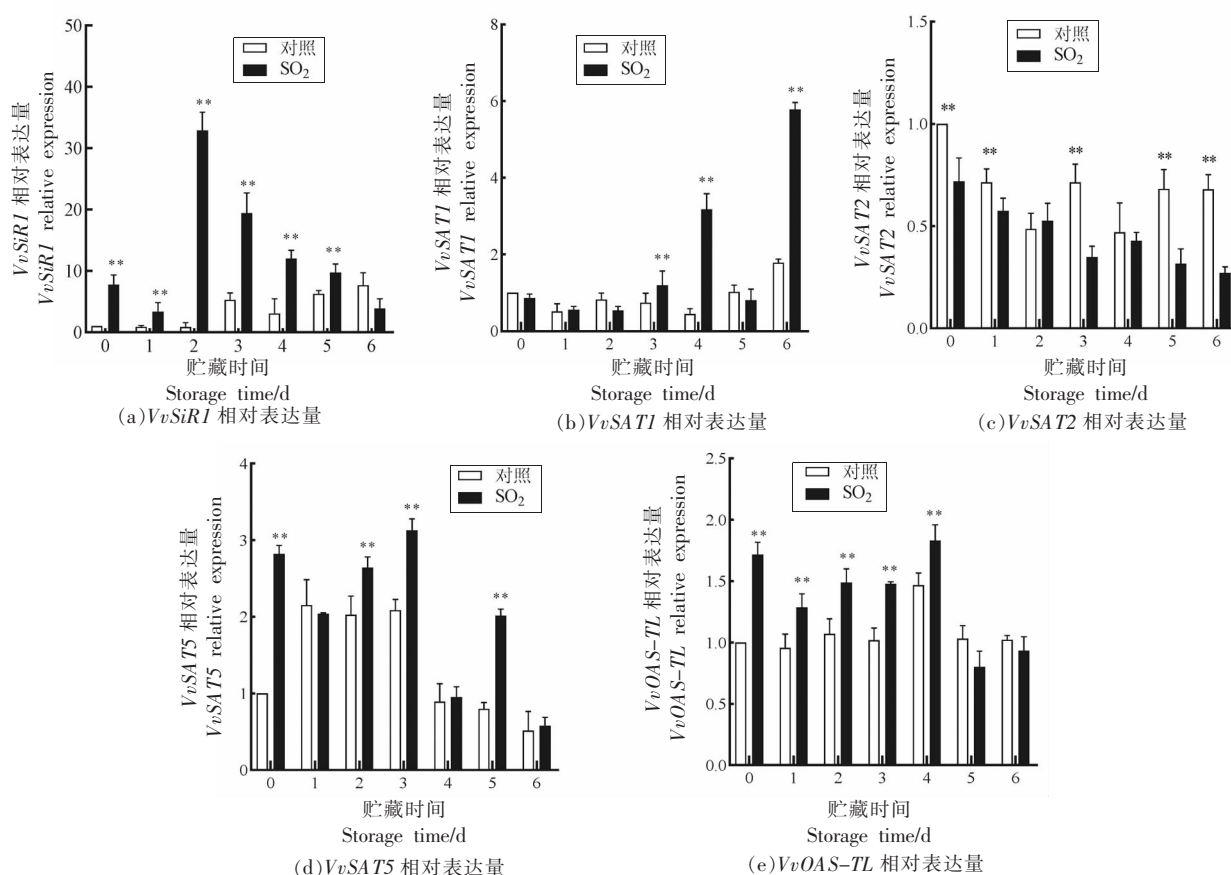


图 5 SO<sub>2</sub> 处理对果实亚硫酸盐代谢相关基因表达量的影响

Fig.5 Effects of SO<sub>2</sub> treatment on the expression levels of genes related to postharvest sulfite metabolism in fruit

鲜食葡萄在熏蒸处理过程中,SO<sub>2</sub>进入葡萄果实,并诱导了亚硫酸盐的生成,从而使其含量增加<sup>[27]</sup>。有研究表明一定浓度的亚硫酸盐可以提高小麦的防御体系,增强了植物的抗性减轻植物所受的伤害<sup>[28]</sup>。本试验中亚硫酸盐含量前期缓慢平稳后期快速上升,并且处理组显著高于对照组。在亚硫酸盐代谢过程中SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>运入质体后被SiR持续还原为H<sub>2</sub>S,随后通过SAT、OAS-TL合成Cys来解除其细胞毒性<sup>[29]</sup>。因此,亚硫酸盐含量的上升为下游H<sub>2</sub>S的合成提供必需化合物。H<sub>2</sub>S可通过调节植物生长发育和生物胁迫的抵御能力,来增强植物生物与非生物的抗病性<sup>[30]</sup>。Cys是硫代谢的枢纽,也是参与植物抗氧化和抗感染防御反应的含硫有机物<sup>[31]</sup>。有研究表明施硫可以激发植物硫相关代谢过程,提高Cys和H<sub>2</sub>S含量导致病情指数的下降从而增强植物对真菌的抗性,为植物抵御真菌提供代谢途径<sup>[32]</sup>。整个贮藏期处理组中H<sub>2</sub>S

和Cys含量显著高于对照组,这与前人研究结果一致,说明外源SO<sub>2</sub>处理可以提高葡萄果实贮藏期间亚硫酸盐代谢途径中代谢物含量来增强对灰霉菌的抵御能力。

SiR和OAS-TL是促进无机硫转化为有机硫的关键酶。本试验结果显示SiR和OAS-TL酶活性在第3天之后上升幅度较大,这与Cys含量变化趋势相似,说明在贮藏后期酶活性的上升增加了Cys的含量,从而增强果实对灰霉病的抗病性。其中OAS-TL是亚硫酸盐代谢途径中的最后一个酶。研究发现OAS-TL对胁迫有更强的耐受力和抵抗力,其酶活力受硫含量的影响<sup>[33]</sup>,因此,SO<sub>2</sub>处理后H<sub>2</sub>S含量维持较高水平有利于下游OAS-TL酶活力的增强,而OAS-TL酶活力的上升有助于合成Cys。外源SO<sub>2</sub>处理显著上调了果实中亚硫酸盐代谢途径相关基因*VvSiR1*、*VvSAT1*、*VvSAT5*和*VvOAS-TL*的相对表达量,这与外源SO<sub>2</sub>处理

后相关酶 SiR、SAT 和 OAS-TL 活力变化趋势一致,说明外源 SO<sub>2</sub> 有助于增强葡萄果实亚硫酸盐代谢途径中相关酶活性和基因表达量,从而促进对灰霉病的抑制作用。贮藏前期 *VvSiR1* 基因的高表达与 H<sub>2</sub>S 前期出现高峰一致,说明 *VvSiR1* 基因通过调控 SiR 的活性提高 H<sub>2</sub>S 的含量来增强果实抵御灰霉病的能力。SAT 酶活力总体上调幅度趋于一个相对平稳的状态,*VvSAT5* 基因相对表达量在贮藏前期显著上调,*VvSAT1* 基因在贮藏后期显著上调。值得注意的是不同 SAT 家族基因对 Cys 的反馈抑制敏感性不同。本文中 *VvSAT2* 基因表达下调,研究表明只有在缺硫或胁迫情况下此基因才会上调表达<sup>[34]</sup>。

#### 4 结论

外源 SO<sub>2</sub> 可以通过调控葡萄采后亚硫酸盐代谢过程,降低贮藏期间果实的失重率,保持其硬度,延缓可溶性固形物和可滴定酸含量的下降,诱导亚硫酸盐含量的上升。由于 *VvSiR1*、*VvSAT1*、*VvSAT5* 和 *VvOAS-TL* 基因表达的上调,提高了 SiR、SAT、OAS-TL 酶活性,增加了 Cys 和 H<sub>2</sub>S 含量,抑制果实的发病率延迟其发病时间,从而增强了果实对生物胁迫的抗性,抑制了果实中灰葡萄孢的生长,激活了果实防御能力。外源 SO<sub>2</sub> 调控可以促进葡萄采后亚硫酸盐代谢水平,诱导果实对灰葡萄孢的抗病性,可为深入解析外源 SO<sub>2</sub> 在葡萄采后生物学调控机制的研究提供理论依据。

#### 参 考 文 献

- [1] FELIZIANI E, SMILANICK J L, MARGOSAN D A, et al. Preharvest fungicide, potassium sorbate, or chitosan use on quality and storage decay of table grapes[J]. *Plant Disease*, 2013, 97(3): 307-314.
- [2] 杨艺琳, 张正敏, 李美琳, 等. 2,4-表油菜素内酯对葡萄果实采后灰霉病的抑制作用机理[J]. *食品科学*, 2019, 40(15): 231-238.  
YANG Y L, ZHANG Z M, LI M L, et al. The action modes of 2,4-epibrassinolide on controlling gray mold decay in postharvest grapes[J]. *Food Science*, 2019, 40(15): 231-238.
- [3] 张平, 朱志强, 集贤. 鲜食葡萄保鲜潜力表达关键影响因素和控制技术解析及其贮藏期潜力预警[J]. *保鲜与加工*, 2021, 21(1): 1-6.  
ZHANG P, ZHU Z Q, JI X. Analyses on the key affecting factors and control technologies of table grape storage-capacity [J]. *Storage and Process*, 2021, 21(1): 1-6.
- [4] SHOUJIANG C, MIN Z, SHAOJIN W. Effect of initial hermetic sealing on quality of 'Kyoho' grapes during storage[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2011, 59(2): 194-199.
- [5] 乔言平, 丁真真, 马越, 等. 二氧化硫和臭氧处理对链格孢菌生长的抑制能力[J]. *保鲜与加工*, 2020, 20(2): 35-39.  
QIAO Y P, DING Z Z, MA Y, et al. Effect of sulfur dioxide and ozone treatments on growth inhibition of *Alternaria alternata*[J]. *Storage and Process*, 2020, 20(2): 35-39.
- [6] 田静, 薛美昭, 仪慧兰. SO<sub>2</sub> 保鲜剂对玫瑰香葡萄灰霉菌的抑制作用[J]. *食品工业科技*, 2018, 39(10): 298-302.  
TIAN J, XUE M Z, YI H L. Inhibitory activity of sulfur dioxide preservative on *Botrytis cinerea* of Muscat Hamburg table grapes[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2018, 39(10): 298-302.
- [7] MICHELLE Q C, MARY H C, FRANKA G, et al. Effect of sulfur dioxide fumigation on survival of foodborne pathogens on table grapes under standard storage temperature[J]. *Food Microbiology*, 2015, 49(8): 189-196.
- [8] MEIZHAO X, HUILAN Y. Induction of disease resistance providing new insight into sulfur dioxide preservation in *Vitis vinifera* L.[J]. *Scientia Horticulturae*, 2017, 225: 567-573.
- [9] SAEED A, SERGIO R R, ALLAN R D, et al. Effects of different sulfur dioxide pads on botrytis mold in 'Italia' table grapes under cold storage[J]. *Horticulturae*, 2018, 4(4): 147-156.
- [10] ESTELLE G, ANETA I, COLIN S G, et al. Sulphur dioxide evokes a large scale reprogramming of the grape berry transcriptome associated with oxidative signalling and biotic defence responses[J]. *Plant, Cell and Environment*, 2012, 35(2): 405-417.
- [11] DUARTE-SIERRA A, AISPURO-HERNÁNDEZ E, VARGAS-ARISPURO I, et al. Quality and PR gene expression of table grapes treated with ozone and



- sulfur dioxide to control fungal decay[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2016, 96(6): 2018–2024.
- [12] KRUSE C, JOST R, LIPSCHIS M, et al. Sulfur-enhanced defence: Effects of sulfur metabolism, nitrogen supply, and pathogen lifestyle[J]. Plant Biology, 2007, 9(5): 608–619.
- [13] PRODHAN M A, FINNEGAN P M, LAMBERS H. How does evolution in phosphorus-impooverished landscapes impact plant nitrogen and sulfur assimilation?[J]. Trends in Plant Science, 2019, 24(1): 69–82.
- [14] 刘丽青, 王燕楠, 仪慧兰, 等. 二氧化硫对玫瑰香葡萄果实采后保鲜的机理[J]. 应用与环境生物学报, 2016, 22(2): 338–341.
- LIU L Q, WANG Y N, YI H L, et al. The mechanism of SO<sub>2</sub> preserving Muscat Hamburg table grapes[J]. Chin J Appl Environ Biol, 2016, 22(2): 338–341.
- [15] KOPRIVA S, MUGFORD S G, MATTHEWMAN C, et al. Plant sulfate assimilation genes: Redundancy versus specialization[J]. Plant Cell Reports, 2009, 28(12): 1769–1780.
- [16] LOAY A. Preharvest salicylic acid and delay ripening of 'superior seedless' grapes[J]. Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences, 2017, 4(3): 227–230.
- [17] 国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准食品中二氧化硫的测定: GB. 5009.34–2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.
- National Health and Family Planning Commission. National standard for food safety – determination of sulfur dioxide in food; GB. 5009.34–2016[S]. Beijing: Standards Press of China, 2016.
- [18] 杜鑫哲. H<sub>2</sub>S 信号与 MAPK 在拟南芥应答干旱与冷胁迫中的关系[D]. 山西: 山西大学, 2019.
- DU X Z. The relationship between H<sub>2</sub>S signal and MAPK in response to drought and cold stress in arabidopsis[D]. Shanxi: Shanxi University, 2019.
- [19] RAHAT N, SHAHID U, NAFEES A K. Exogenous salicylic acid improves photosynthesis and growth through increase in ascorbate–glutathione metabolism and S assimilation in mustard under salt stress[J]. Plant Signaling and Behavior, 2015, 10(3): e1003751.
- [20] RANDEWIG D R, HAMISCH D, HERSCHBACH C, et al. Sulfite oxidase controls sulfur metabolism under SO<sub>2</sub> exposure in *Arabidopsis thaliana*[J]. Plant Cell and Environment, 2012, 35(1): 100–115.
- [21] 王璐怡. 普瑞杨抗硫代谢机制的研究[D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2018.
- WANG L Y. Research on the anti-sulfur metabolic mechanism of purui poplar[D]. Beijing: Chinese Academy of Forestry Sciences, 2018.
- [22] LIANG T, DING H, WANG G, et al. Sulfur decreases cadmium translocation and enhances cadmium tolerance by promoting sulfur assimilation and glutathione metabolism in *Brassica chinensis* L.[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2016, 124: 124–129.
- [23] CHIEKO S, CLAUDIA Z, HARTMUT J. Novel mechanisms of protection against acetaminophen hepatotoxicity in mice by glutathione and *N*-acetylcysteine[J]. Hepatology, 2010, 51(1): 246–256.
- [24] 张文涛, 高凯, 王鹏翔, 等. 樱桃番茄 SO<sub>2</sub> 熏蒸保鲜研究[J]. 食品研究与开发, 2017, 38(6): 194–197.
- ZHANG W T, GAO K, WANG P X, et al. Application of SO<sub>2</sub> fumigation in preservation of cherry tomato[J]. Food Research And Development, 2017, 38(6): 194–197.
- [25] 李杰, 魏佳, 张政, 等. 二氧化硫(SO<sub>2</sub>)熏蒸改善木纳格葡萄的采后品质[J]. 现代食品科技, 2020, 36(2): 114–121.
- LI J, WEI J, ZHANG Z, et al. Improving on postharvest quality of Munag grape berries fumigated by sulfurdioxide (SO<sub>2</sub>)[J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(2): 114–121.
- [26] ZHENG Z, JING X, YAN C, et al. Nitric oxide treatment maintains postharvest quality of table grapes by mitigation of oxidative damage[J]. Postharvest Biology and Technology, 2019, 152: 9–18.
- [27] XIN Q X, ZE T F, ZHI Q Z, et al. Improved preservation process for table grapes cleaner production in cold chain[J]. Journal of Cleaner Production, 2019, 211: 1171–1179.
- [28] 杜青平, 孟紫强, 王茜, 等. 亚硫酸盐对小麦幼苗叶组织生长代谢的影响[J]. 西北植物学报, 2002, 22(6): 92–96.
- DU Q P, MENG Z Q, WANG Q, et al. Effects of sulfite on enzymes and membrane system of wheat seedling leaves[J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2002, 22(6): 92–96.

- [29] 罗焘, 李双双, 郭晓萌, 等. 脱硫对熏硫‘黑叶’荔枝采后品质及果肉亚硫酸盐代谢的影响[J]. 食品科学, 2019, 40(7): 238–246.  
LUO T, LI S S, GUO X M, et al. Effect of desulfurization on postharvest quality and sulfite metabolism in sulfur-fumigated ‘Heiye’ litchi fruit[J]. Food Science, 2019, 40(7): 238–246.
- [30] 杜鑫哲, 张丽萍, 裴雁曦. 硫化氢信号能够通过生物钟调控拟南芥对冷胁迫的响应[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2019, 35(1): 61–66.  
DU X Z, ZHANG L P, PEI Y X. Hydrogen sulfide signaling alleviates the cold stress through circadian clock in *Arabidopsis thaliana*[J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2019, 35(1): 61–66.
- [31] HOLLER K, KIRALY L, KUNSTLER A, et al. Enhanced glutathione metabolism is correlated with sulfur-induced resistance in *Tobacco mosaic virus*-infected genetically susceptible *Nicotiana tabacum* plants [J]. Molecular Plant Microbe Interactions, 2010, 23(11): 1448–1459.
- [32] SILVIA H, ELKE B, LUIT J D K, et al. The potential of sulfur induced resistance against plant diseases of oilseed rape [C]. Wuhan: The 12<sup>th</sup> International Rapeseed Congress, 2007: 296, 2221–2224.
- [33] DAVIDIAN J C, KOPRIVA S. Regulation of sulfate uptake and assimilation – the same or not the same?[J]. Mol Plant, 2010, 3(2): 314–325.
- [34] KAWASHIMA C G, BERKOWITZ O, HELL R, et al. Characterization and expression analysis of a serine acetyltransferase gene family involved in a key step of the sulfur assimilation pathway in *Arabidopsis* [J]. Plant Physiology, 2005, 137(1): 220–230.

### Inhibitory Effect of Sulfur Dioxide on Gray Mold Disease of Postharvest Grape by Regulating the Sulfite Metabolism Pathway

Wang Man<sup>1</sup>, Wei Jia<sup>2,3</sup>, Yilidana·Dilixiati<sup>1</sup>, Zhang Zheng<sup>2,3</sup>, Wu Bin<sup>2,3\*</sup>

<sup>1</sup>College of Food Science and Pharmacy, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052

<sup>2</sup>Institute of Agro-products Storage and Processing, Xinjiang Academy of Agricultural Sciences, Urumqi 830091

<sup>3</sup>Xinjiang Key Laboratory of Processing and Preservation of Agricultural Products, Urumqi 830091)

**Abstract** The mechanism of sulfur dioxide (SO<sub>2</sub>) to inhibit gray mold disease of postharvest tablegrape by regulating sulfite metabolism was investigated. The Munage grape (*Vitis vinifera* L.) was fumigated with 200 μL/L SO<sub>2</sub>, and then inoculated with *Botrytis cinerea*. The parameters related to fruit quality during storage and the contents of sulfite metabolites were determined. The change trends of enzyme activities, as well as the sulfite metabolism related genes were also analyzed. The effects of exogenous SO<sub>2</sub> treatment on sulfite metabolism pathway of postharvest grapes, and the relation between sulfite metabolism level and fruit resistance to *Botrytis cinerea* were discussed. The results showed that SO<sub>2</sub> fumigation could reduce the weight loss rate, maintain the hardness, delay the morbidity and the decrease of soluble solids and titratable acid content, and induce the increase of sulfite content as well. The contents of sulfites, H<sub>2</sub>S and Cys were significantly increased by exogenous SO<sub>2</sub>. The enzyme activities of SiR, SAT and OAS-TL were promoted and the expression of *VvSiR1*, *VvSAT1*, *VvSAT2*, *VvSAT5* and *VvOAS-TL* were also induced. It was suggested that exogenous SO<sub>2</sub> might enhance the disease resistance of postharvest grape to *Botrytis cinerea* by regulating the sulfite metabolism pathway.

**Keywords** sulfur dioxide; grape; postharvest; sulfite metabolism; *Botrytis cinerea*