

天津市特色农产品沙窝萝卜根际 细菌多样性及促生菌研究

谭红晓, 崔康佳, 王娜娜, 孙久云, 路来凤*

(天津科技大学 食品科学与工程学院, 天津 300457)

摘要 为发挥微生物资源在地理标志特色农产品品牌维护中的作用, 采用高通量测序技术分析天津市西青区沙窝萝卜根际细菌多样性和群落结构, 通过纯培养根际土壤细菌对樱桃萝卜果实质量与黄酮、多酚、维生素 C、可溶性糖含量的影响评估根际微生物与沙窝萝卜品质的关系。结果表明沙窝萝卜根际土壤样本中的细菌主要来自 5 门 9 属, 其中假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、芽胞杆菌属 (*Bacillus*)、糖单胞分泌菌属 (*Saccharimonadales*) 为核心细菌群落。通过纯培养共获得 39 株可培养细菌菌株。经过筛选, 获得 7 株具有固氮、解磷或分泌生长素综合水平较高且具有促生功能的菌株, 包括菌株 J3、J5、H11、X3、X6、X10、X13。根据 16S rRNA 基因序列鉴定这些菌株为奇异变形杆菌 (*Proteus mirabilis*)、嗜虫假单胞菌 (*Pseudomonas entomophila*)、巨大芽胞杆菌 (*Bacillus megaterium*)、蜡状芽胞杆菌 (*B. cereus*)、惠州芽胞杆菌 (*B. huizhouensis*)、地形变形杆菌 (*P. terrae*) 和粘质沙雷氏菌 (*Serratia marcescens*)。盆栽试验结果表明, 施用 7 株菌株可以促进樱桃萝卜生长或改善果实品质。其中, 菌株 H11、J5、X13 可分别提高樱桃萝卜果实重量 47%、45% 和 42%; 菌株 H11 和 J5 可提高樱桃萝卜黄酮含量 47% 和 40%, 菌株 J5 和 X6 可提高樱桃萝卜多酚含量 70% 和 67%; 菌株 X6 对果实中维生素 C 含量影响较大, 较对照组提高了近 3 倍, 达 (24.60±5.07) mg/100 g, 菌株 H11 处理后果实中可溶性糖含量较对照组提高了 2.7 倍。研究结果表明, 挖掘沙窝萝卜根际土壤微生物资源有助于利用细菌群落制定有效和可持续的作物田间管理策略。

关键词 沙窝萝卜; 根际细菌; KEGG 功能注释; 促生

中图分类号 Q939.96 文献标识码 A 文章编号 1005-7021(2024)02-0042-11

doi:10.3969/j.issn.1005-7021.2024.02.004

Rhizosphere Bacteria Diversity and Growth Promoting Strains of Tianjin City Distinctive Produce *Shawo* Radish

TAN Hong-xiao, CUI Kang-jia, WANG Na-na, SUN Jiu-yun, LU Lai-feng*

(Coll. Food Sci. Eng., Tianjin Uni. Sci. Tech., Tianjin 300457)

Abstract In order to better exertion of microbial resources' role to maintain the brand of produce with geographical indications, high-throughput sequencing technology was employed to evaluate the structure and composition of the rhizosphere bacterial community of *Shawo* radish in Xiqing District, Tianjin city. The relationship between rhizosphere microorganisms and the quality of *Shawo* radish was evaluated by the effect of pure culture of rhizosphere soil bacteria on the quality of cherry radish fruit and the content of flavonoids, polyphenols, vitamin C, soluble sugar. The results showed that *Shawo* radish possesses rhizosphere bacteria from 5 phyla and 9 genera, of which *Pseudomonas*, *Bacillus* and *Saccharimonaspora* were the core bacterial communities. A total of 39 culturable bacterial strains were obtained

基金项目: 天津市技术创新引导专项(基金)企业科技特派员项目(20YDTPJC00810); 天津市食品质量与健康重点实验室开放基金项目(TJS202105)

作者简介: 谭红晓 女, 硕士研究生。研究方向为食品科学与工程。E-mail: 2044037104@qq.com

* 通讯作者。男, 副教授, 博士, 硕士生导师。研究方向为植物源食品贮藏与保鲜。E-mail: Frank@tust.edu.cn

收稿日期: 2023-05-16

through pure culture. Seven strains with high nitrogen fixation ability, phosphorus degradation capacity or secretion of auxin and growth-promoting capacity were screened and obtained from the 39 strains, namely strains J3, J5, H11, X3, X6, X10 and X13. Based on 16S rRNA gene sequence, these strains were identified as *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas entomophila*, *Bacillus megaterium*, *B. cereus*, *B. huizhouensis*, *P. terrae*, and *Serratia marcescens*. The results of the pot experiment showed that the application of seven strains could significantly promote the growth of cherry radish plants or improve their quality. Strains H11, J5 and X13 increased the weight of cherry radish fruit by 47%, 45% and 42%. Strains H11 and J5 increased fruit flavonoids by 47% and 40%, while strains J5 and X6 increased polyphenols by 70% and 67%. Strain X6 had advantages in improving vitamin C content (24.60 ± 5.07) mg/100 g in the fruit, and was 3 times higher than control groups. In addition, soluble sugar content in fruit treated with strain H11 was 2.7 times higher than in the control group. The above results indicated that excavating rhizosphere microbial resources around *Shawo* radish conducive to the utilization of bacterial community to enact effective and sustainable strategies for crop field management.

Keywords *Shawo* radish; rhizosphere bacteria; KEGG functional annotation; growth promotion

植物根际是指植物根系与土壤之间的界面,在这个区域里蕴藏着多种微生物,这些微生物与植物间的互作深刻影响着生物地理化学循环、植物生长以及植物对生物、非生物胁迫的耐受性^[1]。植物的根系分泌物为根际微生物的生长提供营养物质,不同的作物因根际分泌物不同,从而形成不同的根际微生物群落。不同的根际微生物同时以不同的方式如调节植物激素水平、激活植物防御信号通路、影响植物信号的产生与传导来影响植物健康和改善土壤肥力^[2]。Yadav 等^[3]研究根际亲和菌荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*) OKC 和木霉(*Trichoderma asperellum*) T42 发现其可以促进微量元素在鹰嘴豆中富集,提高鹰嘴豆中的蛋白质、多酚、黄酮的含量。Sun 等^[4]研究高品质南瓜和低品质南瓜根际微生物发现其存在较大差异,高品质的南瓜能招募吸收更多的根际微生物。因此,了解根际微生物群的分类学、基因组学和功能成分对于管理它们以实现可持续作物生产至关重要^[5]。传统的微生物分离筛选方法通量低、工作量大,无法获得全面根际微生物种群信息与核心优势微生物资源,只能部分模拟自然条件^[6]。为全面揭示根部微生物组在植物生长和发育中的功能和机制,需要通过高通量测序和微生物多样性分析技术,对微生物多样性和群落结构进行系统研究,以便更好地了解根际微生物群的丰度和多样性以及优势物种,通过对根际核心微生物资源的定向挖掘,可以深层次的探寻植物和根际微生物之间的互作机制^[7-8]。沙窝萝卜皮薄、肉质密,呈翠绿色,口感细腻,脆甜可口,味如水

果,为优质型水果萝卜,历来有“沙窝萝卜赛鸭梨”之誉^[9],且富含葡萄糖、蔗糖、果糖及维生素 C、微量元素、纤维粗蛋白等^[10]。沙窝萝卜中可溶性固形物、粗纤维、维生素 C 的含量分别可达 5.81%、1.18% 和 0.47 mg/g,高于常见的青品种萝卜如卫青萝卜、潍县萝卜和翘头青萝卜。其中可溶性固形物高于潍县萝卜 44%,粗纤维高于卫青萝卜 24%,维生素 C 含量高于翘头青萝卜 48%^[11]。由于沙窝萝卜口感独特、营养丰富、品质优越,被农业农村部认定为“2017 年中国百强区域公用品牌”。为了更好地保证沙窝萝卜特色农产品的品质,维护品牌形象,研究影响沙窝萝卜品质的因素是非常必要的。目前,中央财政和天津市财政已共同出资开展“天津市西青区农用地适宜性评价”工作,主要从农作物和特色农产品的立地地质背景和土壤地球化学特征,探索其分布规律,分析蔬菜及沙窝萝卜种植适宜性,结果表明西青区土质上沙下粘,较为适合沙窝萝卜种植^[12]。但沙窝萝卜根际微生物如何影响沙窝萝卜品质尚缺乏系统的研究。微生物资源是国家自然科技资源的重要组成部分。由此,发掘农作物品种和种植地域的根际微生物资源十分必要且社会经济效益巨大。本研究旨在探究天津市特色产品沙窝萝卜根际细菌群落组成与根际微生物群落关系,通过深入了解微生物的生态占位,挖掘天津沙窝萝卜根际土壤微生物组的资源潜力。力争通过对沙窝萝卜根际细菌的分离,明确其对萝卜作物农艺性状、农产品采后品质的影响及其机制,收集天津市特色农产品菌种资源。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验植株 沙窝萝卜 (*Raphanus sativus* L.) 采自天津市西青区沙窝萝卜种植基地; 樱桃萝卜 (*Raphanus sativus* L. var. *radculus pers*) 种子购自山东潍坊; 土壤购自山东潍坊寿禾。

1.1.2 沙窝萝卜根际土壤 沙窝萝卜根际样本 2021 年 11 月取自天津市西青区沙窝萝卜种植基地, 选取 3~4 株沙窝萝卜为一组平行, 设置 3 组平行, 进行根际土壤采集, 分别编号为 GR_1、GR_2、GR_3。采集工具使用 75% 乙醇进行灭菌处理。以沙窝萝卜为圆心, 铲出环状根区, 将沙窝萝卜从土壤中取出, 轻轻抖动其根部去除松散的土壤, 只保留距离根系表面 1 mm 以内的土壤, 将植物根系装入无菌封口取样袋中运送至实验室。在超净工作台中收集根际土壤, 然后将样品在液氮中速冻后置于 -80 °C 低温冰箱保存^[13]。

1.1.3 培养基 ①Luria-Bertani (LB) 培养基: 胰蛋白胨 10.0 g, 酵母抽提物 5.0 g, 氯化钠 5.0 g, 葡萄糖 1.0 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 7.3 左右。②假单胞基础培养基: 明胶蛋白胨 16.0 g, K₂SO₄ 10.0 g, 胰蛋白胨 10.0 g, MgCl₂ 1.4 g, 溴化十六烷基三甲胺 0.2 g, 甘油 10 mL, 蒸馏水 1 000 mL, pH 7.3 左右。③阿须贝无氮固体培养基。④蒙金娜液体培养基。固体培养基加入 2% 琼脂, 所有培养基均经过 121 °C、20 min 高压蒸汽灭菌。

1.1.4 主要试剂与仪器设备 HiPure Soil DNA Kits 试剂盒(美国 Omega 公司); 细菌 DNA 提取试剂盒(美国 AXYGEn 公司); AxyPreDNA 凝胶回收试剂盒(美国 AXYGEn 公司); TruSeq Nano DNA 文库制备试剂盒(美国 Illumina 公司); E.Z.N.A.® Soil DNA Kit 试剂盒(美国 Omega 公司)。超净工作台 (SW-CJ-1FD, 上海博讯事业有限公司医疗设备厂); 恒温培养箱 (KCL2000, 珠江广东省医疗器械厂); 酶标仪 (Multiskan FC, 上海 Thermo fisher 仪器有限公司); 台式高速冷冻离心机 (Allegra X-30, 美国 BECKMAN 公司); 回旋式恒温调速摇床 (HYG-III, 上海); 智能人工气候光照培养箱 (XZ-600, 宁波江南仪器厂); 超低温冰箱 (Multiskan FC, 青岛海尔特种电器有限公司); 超微量分光光度计 (Nano-Drop2000, 美国赛默飞世尔科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 沙窝萝卜根际细菌群落组成及功能预测

①总 DNA 的提取、PCR 扩增: 取 -80 °C 储存的土壤样品, 使用 E.Z.N.A.® Soil DNA Kit 试剂盒提取土壤样品中的微生物 DNA, 采用分光光度计检测提取的 DNA 浓度和纯度, 采用 1% 琼脂糖凝胶检测 DNA 样品的完整性, 将合格的 DNA 样本 -80 °C 保存备用。以提取的合格的根际土壤 DNA 为模板, 对细菌 16S rRNA 的 V3~V4 高变区域采用引物 338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCA-3') 和引物 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') 进行 PCR 扩增。PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳并纯化^[14]。②Illumina Miseq 测序: 使用 TruSeq® DNA PCR-Free Sample Preparation Kit 进行文库构建, 利用 Illumina HiSeq 2 500 系统进行测序, 委托美生物有限公司完成。③生物信息学分析: 测序得到的原始序列数据通过 FLASH 软件进行拼接优化; 序列片段通过 QIIME 软件在设定的过滤条件下进行过滤, 以获得高质量的样品序列; 使用 UPARSE 软件将样品序列按照相似度 ≥97% 进行操作分类单元 (OTU) 的聚类 and 物种分类学分析, 获得样本对应的物种信息和物种的丰度分布情况; 使用 PICRUST2 软件对 16S 序列的 KEGG、COG 功能预测^[15]。通过美吉生物云平台 (<http://www.majorbio.com/>) 进行高通量测序数据处理, 在线数据计算得到分类学、物种组成、微生物群落功能预测等分析结果。

1.2.2 根际细菌促生菌株的筛选及促生特性的研究

①菌株的分离纯化: 取 10 g 沙窝萝卜根系土壤, 加入 90 mL 无菌水, 180 r/min, 28 °C 振荡 2 h, 使根际中的微生物分散到无菌水中, 将菌液稀释至 10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶、10⁻⁷, 每个梯度分别取 200 μL 稀释菌液均匀涂布于 LB 固体培养基和假单胞基础培养基上, 28 °C 倒置培养。采用四区划线法进行分离纯化, 得到纯化单菌落后编号并保存^[16]。②菌株固氮、解磷能力检测: 参照杨华等^[17]方法将分离得到的纯菌落制成菌悬液后, 分别接种于阿须贝无氮固体培养基和蒙金娜液体培养基, 观察菌株生长情况, 判断固氮能力; 采用钼蓝比色法对上清液中有机磷量进行测定, 判断菌株解磷能力。③菌株分泌生长素水平检测: 采用 15 mL 0.5 mol/L FeCl₃ 溶液、300 mL 98% 浓 H₂SO₄ 与 500 mL

蒸馏水制备 Salkowshi 比色液。对 LB 培养基发酵后的发酵液进行离心,取 40 μL 上清液与 Salkowshi 试剂以 1:4 的体积混合,室温黑暗处反应 30 min。使用吡啶乙酸作为标准品制作标准曲线,通过分光光度计测量 OD_{530} ,并对照标准曲线得出样品中的生长素浓度^[18]。

1.2.3 促生菌株的 16S rRNA 分子鉴定 将有促生效果的菌株在 LB 液体培养基上扩大培养,培养结束后将发酵液在 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 条件下离心 10 min,收集菌体,送至金唯智生物有限公司天津测序部进行 16S rRNA 测序,选择引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTACTTGTTCAGACTT-3') 进行 PCR 扩增。将上述提取的基因组 DNA 作为模板进行 PCR 扩增。选用 BLAST-N 搜索程序,将测序结果与 GenBank 数据库进行对比,用 MEGA11 将序列比对结果通过邻接法 (Neighbor-Joining Algorithm) 构建系统进化树^[19]。

1.2.4 促生菌株对樱桃萝卜生长的影响 采用盆栽方式检验分离菌株对樱桃小萝卜的促生作用。将颗粒饱满、无虫害、无残缺的樱桃小萝卜种子均匀地点在营养土上,待种子萌发后,挑选长势均一的植株,3 株为一组,培养 5 d 后开始做不同的处理。对照组加 5 mL 清水,处理组加 5 mL 菌株 J3、J5、J8、H8、H11、X3、X6、X10、X13 的菌悬液,固定每天浇水 50 mL,每隔 3 d 加一次菌悬液,培养至 20 d,收获萝卜,对萝卜重量、品质指标进行测定^[20]。

1.2.5 促生菌株对樱桃萝卜品质的影响 ①总酚、黄酮含量测定:称取 1.0 g 的萝卜果肉组织,冰浴条件下研磨匀浆,用经预冷的 1% HCl-甲醇溶液,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光提取 20 min,然后过滤,并收集滤液,取滤液测定 OD_{280} 、 OD_{325} 。以每克果蔬组织在波长 280 nm 处吸光度表示总酚含量,即 OD_{280}/g ,在波长 325 nm 处的吸光度值表示黄酮物质含量,即 OD_{325}/g ^[21]。②可溶性糖含量测定:称取 1.0 g 的萝卜样品,研磨成匀浆,加入 10 mL 蒸馏水,沸水抽提,收集滤液定容至 100 mL,采用硫酸-苯酚法测定提取液中的可溶性糖含量^[21]。③维生素 C 含量测定:称取 1.0 g 的萝卜样品,加入少量 20 g/L 草酸溶液,冰浴条件下研磨成匀浆,用 20 g/L 的草酸溶液定容,提取 10 min 后收集滤

液,将滤液置于锥形瓶中,用已标定的 2,6-二氯酚靛酚滴定至出现微红色且 15 s 不褪色为止,记下染料用量^[21]。

1.2.6 数据处理与分析 使用 SPSS Statistics 20.0 进行数据统计分析。采用单因素方差分析 (One-way ANOVA) 和 Duncan 法进行多组 (≥ 3) 样本间差异显著性分析,以 $P < 0.05$ 为显著性检验标准, $P < 0.01$ 表示有极显著差异。数据表示为样本平均值 \pm 标准偏差 (SD)。使用 Origin 9.0 绘图。

2 结果与分析

2.1 沙窝萝卜根际细菌群落组成

基于门水平分析,沙窝萝卜根际细菌主要由变形菌门 (Proteobacteria)、浮霉菌门 (Patescibacteria)、放线菌门 (Actinobacteriota)、厚壁菌门 (Firmicutes)、酸杆菌门 (Acidobacteriota) 组成,分别约占细菌总数的 65.0%、13.0%、6.0%、3.0%、2.5%,变形菌门为优势细菌群 (图 1)。基于属水平分析,沙窝萝卜根际细菌包括假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、糖单胞菌属 (*norank_f_norank_o_Saccharimonadales*)、芽胞杆菌属 (*Bacillus*)、戴尔福特菌属 (*Delftia*)、嗜氢菌属 (*Hydrogenophaga*)、根瘤菌属 (*Rhizobium_sphaerophysae_group*)、双球菌属 (*norank_f_Geminococcaceae*)、黄杆菌属 (*Flavobacterium*)、德沃西亚氏菌 (*Devosia*)、鞘氨醇单胞菌 (*Sphingomonas*) 等,假单胞菌属为优势菌属 (图 2)。

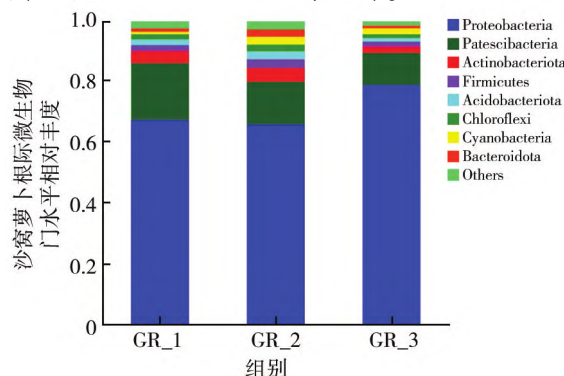


图 1 沙窝萝卜根际细菌门水平群落组成柱状图

Fig.1 Composition of rhizosphere bacteria community of Shawo radish

变形菌门根据 16S rRNA 序列被分为 α -变形菌、 β -变形菌、 γ -变形菌、 δ -变形菌、 ε -变形菌。沙窝萝卜根际细菌包含在变形菌门中的菌属有假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、戴尔福特菌属 (*Delftia*)、嗜

氢菌属 (*Hydrogenophaga*)、鞘氨醇单胞菌 (*Sphingomonas*) 等。不同的植物具有不同的根际微生物群结构,假单胞菌是沙窝萝卜根际优势细菌群,除与沙窝萝卜生长特性、土壤环境、栽培模式、水肥条件、田间管理模式相关,还可能与假单胞菌的功能相关。有研究表明,假单胞菌属可以定植在植物根部或组织内部,通过辅助植物营养获取、调节植物激素水平、诱导渗透物和抗氧化剂的积累以及上调或下调植物生长相关基因来减轻重金属、盐度等环境胁迫,减轻对植物健康和生产力产生负面影响^[22]。此外,为保证品质,在萝卜生长过程中需提供高水分的生长环境,假单胞菌能产生

胞外多糖,以便在干旱条件下生存并形成强大的生物膜,也有助于土壤中的水分保持^[23]。沙窝萝卜根际细菌也包含嗜氢菌属,该菌属具有嗜氢产碱的特点,与沙窝萝卜嗜好微碱性环境相适应,并且该菌属能降解农药残留中的 3-甲基二苯醚,减轻农残对作物和土壤的污染^[24]。芳香化合物具有高聚合度、高富集、难降解的特点,是土壤主要的有机污染源,可以通过食物链在动植物体内富集,严重危害人类健康。鞘氨醇单胞菌属是发现的一类微生物新资源,可用于高效降解芳香化合物,对土壤修复和保证食品安全具有重要意义^[25]。

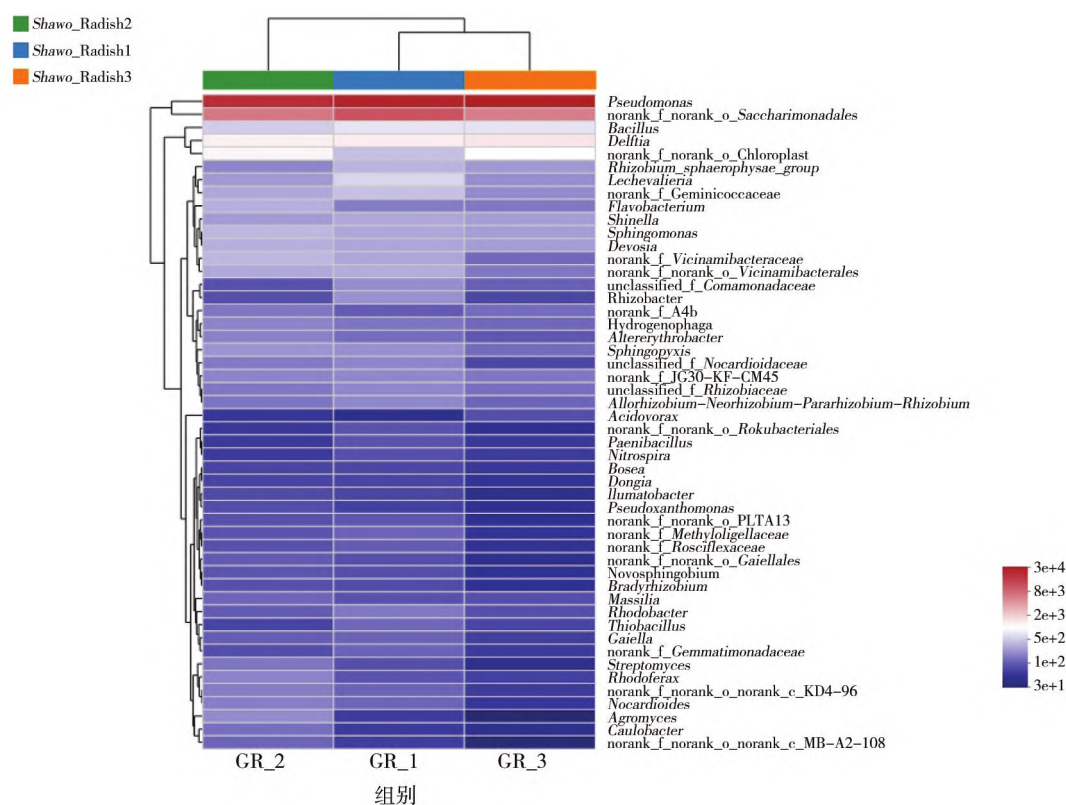


图2 沙窝萝卜根际细菌属水平群落组成热图

Fig.2 Heat map of rhizosphere bacteria community on genera level of Shawo radish

放线菌门和厚壁菌门也是沙窝萝卜根际主要的细菌群落,这两大类细菌群具有产生孢子、容易适应极端环境的特点,而沙窝萝卜喜欢温差大的环境,尤其耐低温,因此放线菌门和厚壁菌门作为优势细菌群与沙窝萝卜的生长特性相关。厚壁菌门的芽胞杆菌属也是沙窝萝卜根际优势菌属。芽胞杆菌是一种重要的农业生防菌,具有种类多、分

布广、易分离纯化的特点^[26]。目前,国内外研究报道的生防芽胞杆菌主要有枯草芽胞杆菌 (*B. subtilis*)^[27]、解淀粉芽胞杆菌 (*B. amyloliquefaciens*)^[28]、贝莱斯芽胞杆菌 (*B. velezensis*)^[29]、蜡状芽胞杆菌 (*B. cereus*)^[30]、地衣芽胞杆菌 (*B. licheniformis*)^[31] 和巨大芽胞杆菌 (*B. megaterium*)^[32] 等。贾峥嵘等^[33] 研究四种不同的芽胞杆菌对甘薯产

量及品质的影响,结果表明,枯草芽胞杆菌可使甘薯增产 26.4%,解淀粉芽胞杆菌可明显提高甘薯中可溶性糖和可溶性蛋白含量,分别较对照组提高 29.5%、14.5%。张倩等^[34]在贝莱斯芽胞杆菌(*Bacillus velezensis*)对甜樱桃采后软腐病的防治效果和作用机理的研究中表明,贝莱斯芽胞杆菌对匍枝根霉菌丝抑制率达 87.12%,防治效果达 79.00%,防治机理可能与贝莱斯芽胞杆菌诱导 POD、PAL、CHI 和 GLU 酶活性增加,提高果实抗氧化和抗病能力相关。

2.2 沙窝萝卜根际细菌功能预测

基于 KEGG 功能注释,沙窝萝卜根际细菌在能源生产和转换、氨基酸代谢、运输与合成、碳水化合物代谢和运输、无机离子转运和代谢、信号转导等过程具有较高的丰度。沙窝萝卜根际细菌在氨基酸代谢、运输与合成功能中,参与精氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸等氨基酸代谢,丙氨酸、色氨酸、酪氨酸等合成功能的代谢通路丰度较高(表 1)。根际微生物代谢及合成氨基酸会对植物生长产生影响,微生物可通过特殊代谢途径将氨基酸转变成其他含氮物质,如生物碱,可以提

高植物的抗逆性。根际微生物合成色氨酸等可以调控植物激素进而调节植物生长^[35];合成苯丙氨酸供植物吸收后,可促进木质素和花青素的合成,促进果实中糖分转化进程^[36-37]。总之,根际微生物氨基酸代谢与合成的功能在微生物-植物的互动中具有重要的作用。

沙窝萝卜根际细菌中养分循环的代谢通路也有较高丰度,如氮代谢、碳水化合物代谢、吡啉与叶绿素代谢、氧化磷酸化等(表 1)。根际微生物碳氮代谢旺盛可以提高碳、氮素利用率,有利于植物对根际土壤碳氮的利用。在众多参与根际土壤碳氮代谢的微生物中,假单胞菌因特殊的双组分系统引起了关注。有研究表明,假单胞菌属中的双组分系统 CbrA-CbrB,是与碳氮源代谢有关的全局调控因子,它可以高效的调节菌体对环境不同碳、氮源的利用,从而达到快速生长的目的^[38]。同时助力碳、氮循环,保证土壤中丰富的有机质,为萝卜的生长创造了有益的环境。此外,沙窝萝卜根际戴尔福特菌属^[39]也为土壤中氮代谢发挥了重要作用,该菌属具有反硝化的作用,在减少氮肥施用的负面环境效应方面具有重要意义。

表 1 沙窝萝卜根际细菌 KEGG 功能注释

Table 1 Functional annotation of KEGG bacteria in rhizosphere of Shawo radish

代谢功能	GR_1/%	GR_2/%	GR_3/%
嘌呤代谢	2.932 8	2.958 2	2.923 3
精氨酸和脯氨酸代谢	2.443 0	2.419 7	2.452 6
氮代谢	2.060 0	2.043 8	2.060 3
细菌趋化性	2.034 7	1.982 3	2.061 8
氨酰 tRNA 生物合成	2.033 9	2.080 9	2.016 1
淀粉和蔗糖代谢	1.855 3	1.840 2	1.869 0
吡啉与叶绿素代谢	1.743 8	1.739 5	1.730 9
甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢	1.700 7	1.695 9	1.696 4
嘧啶代谢	1.592 1	1.623 6	1.580 7
果糖和甘露糖代谢	1.130 9	1.142 2	1.124 2
苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成	1.014 8	1.014 4	1.014 8
丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢	1.005 9	1.012 1	1.004 5
甘油磷脂代谢	0.995 9	0.996 5	0.999 1
半胱氨酸和蛋氨酸代谢	0.948 4	0.953 3	0.946 4
氧化磷酸化	1.407 9	1.422 5	1.393 3
乙醛酸和二羧酸代谢	1.334 2	1.326 7	1.329 9
丙酮酸代谢	1.283 4	1.287 3	1.280 8
谷胱甘肽代谢	0.808 8	0.823 0	0.803 4

注:KEGG 功能注释是对沙窝萝卜根际细菌的代谢功能进行预测,表 1 中的数值表示对应的功能在数据库中总的代谢功能中的占比,即丰度

2.3 沙窝萝卜根际细菌促生菌株的筛选及促生特性的研究

从沙窝萝卜根际土壤中共分离到 39 株细菌,按照 1.2.2②和 1.2.2③的实验方法分别对分离菌株的固氮、解磷和分泌生长素水平进行检测,最终获得 8 株单一或综合促生因子较高的菌株(表 2)。菌株编号分别为 J3、J5、J8、H11、X3、X6、X10、X13。

表 2 沙窝萝卜根际分离菌株促生能力评价

Table 2 Growth promoting ability of isolated rhizosphere strains from *Shawo* radish

菌株	固氮能力	溶磷能力/ (mg · L ⁻¹)	生长素含量/ (μg · mL ⁻¹)
J3	+	—	18.88±1.65
J5	+++	—	26.66±0.54
J8	+	—	16.87±0.95
H11	+	22.33±1.98	23.69±1.85
X3	—	—	22.44±2.38
X6	+	30.62±0.83	40.66±5.59
X10	+	—	20.99±0.72
X13	+	—	10.13±0.21

注:“+”表示具有该功能,“+”越多功能越强;“—”表示无此功能

在 8 株菌株中,除菌株 X3 外其他 7 株菌株都

具有固氮能力,菌株 J5 的固氮能力最强,该菌株同时还具有溶磷和分泌生长素的能力,在发酵第 3 天时,所分泌生长素含量可达(26.66±0.54) mg/L。在所有的试验菌株中,只有菌株 X6 和 H11 具有解磷能力,在发酵培养到第 5 天时,检测发酵液中有机磷溶解量可分别达到(30.62±0.83) mg/L 和(22.33±1.98) mg/L,8 株菌株均具有分泌生长素的能力,其中菌株 X6 发酵液中的生长素含量最高,在培养第 3 天时达到最高量为(40.66±5.59) mg/L。

2.4 沙窝萝卜促生菌株的 16S rRNA 分子鉴定

按照 1.2.3 的实验方法对能促进樱桃萝卜果实生长的 7 株菌株进行测序。经 16S rRNA 序列 BLAST 比对,菌株 J3、J5、H11、X3、X6、X10、X13 分别为奇异变形杆菌(*Proteus mirabilis*)、嗜虫假单胞菌(*P. entomophila*)、巨大芽胞杆菌(*B. megaterium*)、蜡状芽胞杆菌(*B. cereus*)、惠州芽胞杆菌(*B. huizhouensis*)、地性变形杆菌(*P. terrae*)、粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*),用 MEGA7.0 构建菌株的系统进化树见图 3。

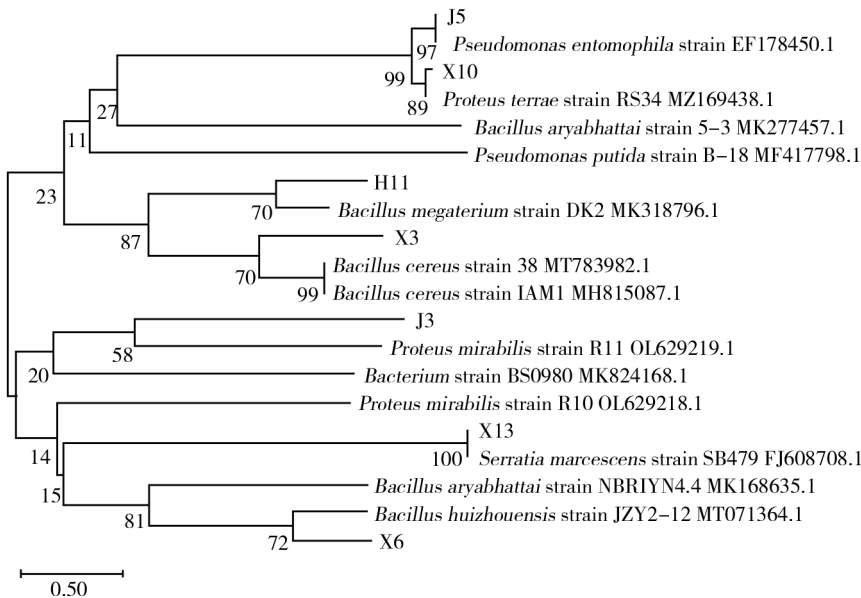


图 3 沙窝萝卜根际菌株 16S rRNA 的 Neighbor-Joining 系统发育树

Fig.3 Phylogenetic tree of 16S rRNA of *Shawo* radish rhizosphere strains

2.5 促生菌株对樱桃萝卜生长的影响

按照 1.2.4 的方法,研究不同根际分离菌株对樱桃萝卜果实重量的影响。通过盆栽实验考察分离菌株的促生长作用,将分离的 8 株促生菌株

分别和樱桃萝卜共培养至 25 d 时,果实的生长情况如图 4 所示。

除了菌株 J8 外,其他菌株均能在一定程度上提高樱桃萝卜果实重量,其中菌株 H11、J5、X13

对樱桃萝卜果实重量的促进作用相对较为显著,分别提高果实重量 47%、45%、42%,菌株 J3 促进樱桃萝卜果实生长的能力仅次于 X13,可增产 34%。这些菌株表现出较高的促生功能,除了与其能产生促生因子外,还可能与其繁殖能力快、定殖能力强以及易存活、耐受不良环境的抗逆性较强相关。菌株 H11 具有促生长作用归因于其能产生生长素且具有解磷能力,这一结论与赵英男^[40]的研究结果一致,其研究表明在大田条件下巨大芽胞杆菌可使黄瓜增产 10%,促生机理归因于巨大芽胞杆菌提高了土壤中有效磷、钾的含量,并且能调控黄瓜生长素含量,激活防御基因的表达。菌株 J8 虽然能分泌生长素且具有一定的固氮能力,但该菌株菌悬液处理樱桃萝卜植株后抑制了萝卜果实的生长,可能因为该菌株在分泌促生因子的同时还分泌了其他抑制果实生长的物质。

2.6 促生菌株对萝卜品质的影响

按照 1.2.5①的方法研究不同菌株对樱桃萝卜果实多酚、黄酮等影响。结果如图 5 所示,8 株促生菌株处理樱桃萝卜植株后,菌株 J3、J5、H11、X6、X13 能提高樱桃萝卜果实中黄酮含量,其中菌株 H11 和 J5 的作用最为明显,分别提高果实黄酮含量 47%、40%。菌株 X6、X13、J3 对果实黄酮含量也有较大影响,可分别提高黄酮含

量 36%、30%、11%。从图 6 也可以看出,8 株促生菌株均能提高樱桃萝卜果实的多酚含量。菌株 J5 和 X6 对樱桃萝卜果实含量的多酚含量促进作用较大,分别提高 70%、67%。值得注意的是,能促进樱桃萝卜果实生长的菌株同时能提高其活性物质多酚的含量,可见促生菌株促进果实生长,不仅与菌株分泌促生长因子有关,还可能与菌株提高植株与果实的抗逆性相关。

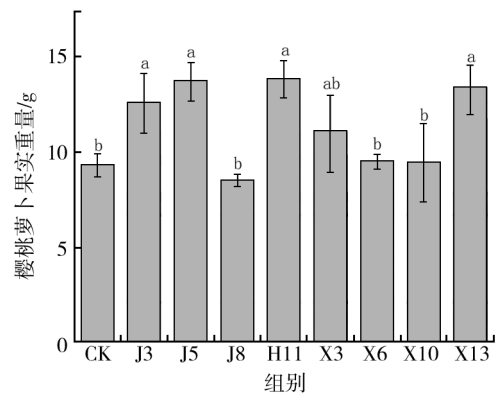


图 4 沙窝萝卜根际分离菌株对樱桃萝卜果实重量的影响

Fig.4 Effect of rhizosphere isolated strains on cherry radish fruit weight

不同小写字母表示处理间差异显著性 ($P < 0.05$), 下图同
Different letters indicate significant difference between treatments ($P < 0.05$), same below

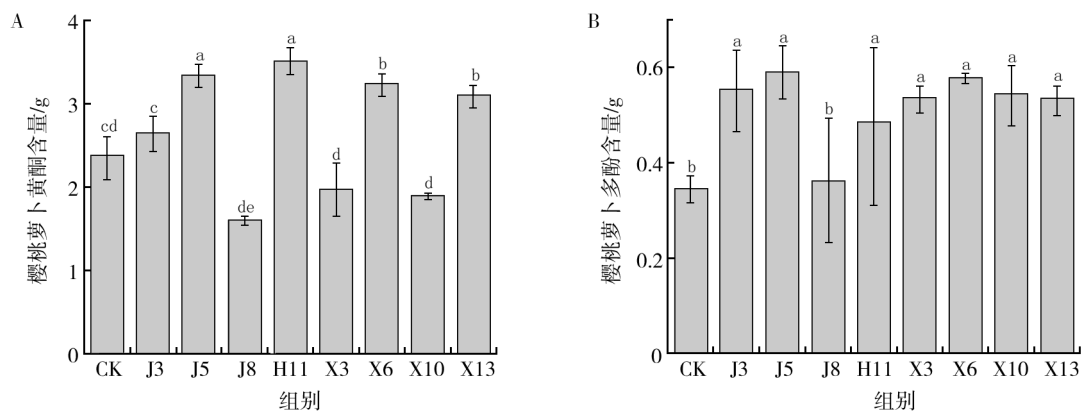


图 5 沙窝萝卜根际分离菌株对樱桃萝卜黄酮 (A) 和多酚 (B) 含量的影响

Fig.5 Effects of rhizosphere isolated strains from Shawo radish on the contents of flavonoids (A) and polyphenols (B) in cherry radishers indicate significant difference between treatments

按照 1.2.5②和 1.2.5③的方法研究不同菌株对樱桃萝卜果实可溶性糖、维生素 C 等的影响。结果如图 6A 所示,菌株 J3、J5、H11、X6 能显著提高果实的维生素 C 含量。菌株 X6 处理后果

实中维生素 C 含量较对照组提高了 3 倍,可达 (24.60 ± 5.07) mg/100 g。菌株 J5、H11 处理后维生素 C 含量较对照组分别提高了 2.4、2.2 倍,可达到 (20.70 ± 3.81) mg/100 g、 (19.20 ± 1.87)

mg/100 g。菌株 J8、X3、X10、X13 对果实的维生素 C 含量无较大影响。如图 6B 所示,菌株 J3、J5、J8、H11、X3、X6 可以提高樱桃萝卜中的可溶性糖含量,菌株 H11 处理后果实可溶性糖含量

可达到 42.7%,较对照组提高了 2.7 倍。菌株 J3 和 X6 对果实可溶性糖的促进作用仅次于菌株 H11,果实中的可溶性糖含量可达到 25.9%、25.6%。

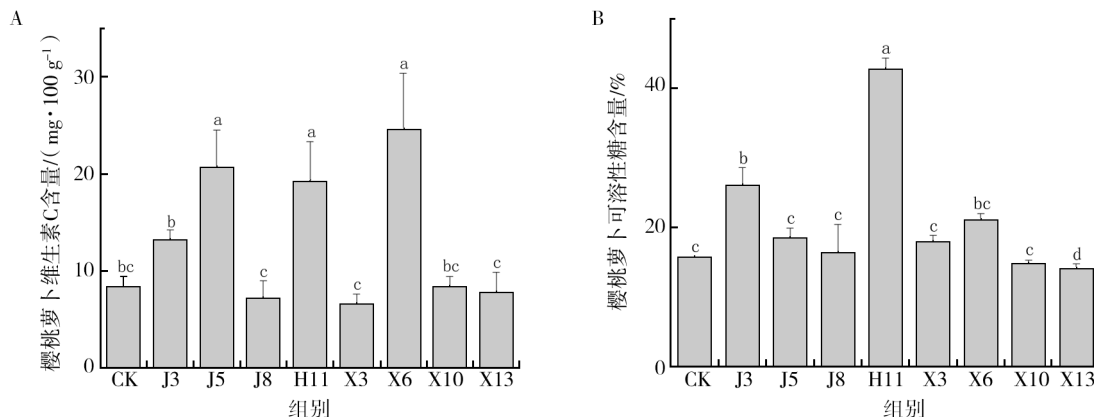


图 6 沙窝萝卜根际分离菌株对樱桃萝卜维生素 C (A) 和可溶性糖 (B) 含量的影响

Fig.6 Effect of rhizosphere isolated strains on the content of vitamin C (A) and soluble sugar (B) in cherry radish

3 讨论

粮食生产安全和农作物品质提升对我国农业发展提出了更高的科技需求,与农作物相依相生的根际微生物组是影响作物生长、产量和品质的重要因素。为了精准、全面地揭示根际微生物如何影响植物生长发育和健康,可以通过高通量组学技术挖掘土壤微生物组的资源潜力。此外,根际微生物来源于农作物组织或周边环境,容易在相似的环境下生存并定殖于植物根部,与植物形成共生关系,并持续发挥功效^[41]。因此,从植物根际筛选对作物农艺性状、农产品采后品质产生影响的根际益生菌,对充分利用土地资源并保障农产品质量具有重要的理论与应用价值。

本研究通过高通量测序技术对沙窝萝卜根际细菌群落组成及功能预测进行分析,分析结果显示沙窝萝卜根际的细菌群落主要来自 5 门 9 个种。基于门水平分析,沙窝萝卜根际优势细菌群为变形菌门、浮霉菌门。基于属水平分析,沙窝萝卜根际优势菌属为假单胞菌属、糖单胞菌属、芽胞杆菌属。除了这几类丰度高的菌属。也有其他具有重要功能的菌属如根瘤菌属、嗜氢菌属、鞘氨醇单胞菌属、戴尔福特菌属。假单胞菌属在沙窝萝卜根际的丰度最高,可能与假单胞菌可以调节植物激素水平,提高植物的抗逆性有关。除此之外,

假单胞菌的双组分系统 CbrA-CbrB 可以调节碳氮代谢,进而高效的调节菌体对环境不同碳、氮源的利用,从而达到快速生长的目的,同时助力根际土壤碳氮循环,为萝卜生长创造有利的条件。芽胞杆菌属的丰度仅次于假单胞菌属,是沙窝萝卜根际优势菌属之一,这可能与芽胞杆菌能耐极端环境相关,而这一特性与沙窝萝卜嗜好低温的生长特性相适应。通过 KEGG 功能注释,发现沙窝萝卜根际微生物参与氨基酸代谢与合成的功能丰度较高,如精氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、甘氨酸代谢;苯丙氨酸、色氨酸等合成,根际微生物氨基酸代谢与合成等活动会对植物产生影响,如某些氨基酸可以通过特殊代谢途径转变成其他含氮物质如嘌呤、嘧啶、某些激素、生物碱等调控植物的生长,影响作物的品质。

从沙窝萝卜根际分离 39 株细菌中筛选具有促进萝卜生长作用的菌株。经过多轮筛选最终获得 8 株单一或综合水平较高的促生菌株,分别为菌株 J3、J5、J8、H11、X3、X6、X10、X13。为准确测定菌株固氮、解磷能力和生长素分泌水平,分别在相应选择培养基中对待检菌株进行了 2~5 d 的培养,并对不同时间发酵液中促生因子的分泌水平进行了检测。研究结果显示,除菌株 X3 没有固氮能力外,其他菌株都具有固氮能力,其中菌株 J5 的固氮能力最好,菌株 H11、X6 具有解磷的能

力,在第4天测得的溶磷水平最高,分别可达 (22.33 ± 1.98) mg/L 和 (30.62 ± 0.83) mg/L。菌株具有解磷能力可以帮助植物利用土壤中的磷元素。刘泽平等^[42]发现水稻根际促生菌株 *B. huizhouensis* LZP05 解磷能力较强,促生效果良好,与本研究结果一致。巨大芽胞杆菌具有解磷的作用,这一结果与杨晓燕等^[43]的研究结果一致,该研究中对巨大芽胞杆菌的解磷效果进行优化,田间试验处理2周后发现巨大芽胞杆菌能够有效降解有机磷和无机磷提高土壤有效磷含量。不同细菌分泌生长素的能力不同,部分菌株在培养的第3天即达到峰值,此后随着培养时间的延长生长素含量下降。

为了系统考察促生微生物的促生效果,利用盆栽实验,将8株促生菌株与樱桃萝卜共培养,结果表明,除菌株J8外,剩余7株菌均可不同程度地促进果实生长,其中菌株J5、H11的促生长作用最为显著,可提高果实重量47%、45%。菌株X6虽然具有固氮、解磷和产生生长素的能力,但促生效果不佳,可能与其产生其他一些抑制植物生长的物质或者不能在樱桃萝卜根际成为优势菌有关,还需要定植动态实验进一步研究。7株促生菌株多数为芽胞杆菌,芽胞杆菌属在沙窝萝卜根际具有较高的生态占位,可能与其在营养和空间位点的竞争能力较强、可与环境中的病原菌竞争资源、抑制病原菌的生长,从而为植物生长创造有利的条件有关^[26]。蜡状芽胞杆菌表现出较好生物防治作用并得到了较好的应用,通过产生各种酶类如溶菌酶、氨基酸转氨酶、酰胺酶、纤溶酶,抑制其他的病原体^[30]。随后还考察了7株促生菌株对樱桃萝卜果实品质的影响。7株促生菌株均能提高樱桃萝卜果实的多酚含量,在促进樱桃萝卜果实生长的同时均能提高其黄酮、多酚等活性成分的含量,可见促生菌株在促进果实生长的同时,也能影响植物的抗性。芽胞杆菌的生物防治效果不仅通过直接合成活性代谢产物实现,也可间接影响植物多个防御反应机制。植物受到病原微生物侵染时,其防御酶会被诱导并激活,从而提高植株本身的抗病能力。经蜡样芽胞杆菌AR156处理可显著提高桃果实总酚含量和DPPH自由基清除能力^[44]。菌株X6、J5、H11能提高果实中维生素C的含量,菌株X6促进作用 $(24.60 \pm$

$5.07)$ mg/g)最显著。除菌株X10、X13无明显影响外,其他菌株处理均可以提高果实中可溶性糖含量,菌株H11的作用最为明显,其处理后果实中可溶性糖含量可达到42.7%,较对照组提高了2.7倍。综上,沙窝萝卜根际分离菌株J5、H11、X6对樱桃萝卜品质的影响显著,作为根际分离菌株,菌株J5、H11、X6对根际具有一定的亲和力,可在根际定植并直接影响植物的生长和代谢,也可改善土壤状况,间接影响萝卜的生长。

通过分离纯化及促生功能验证,本研究从沙窝萝卜根际筛选出7株益生菌,包含1株假单胞菌、3株芽胞杆菌、1株粘质沙雷氏菌、2株变形杆菌。巨大芽胞杆菌H11对萝卜果实的可溶性糖、黄酮、多酚有显著的提升作用,嗜虫假单胞菌能显著提高萝卜果实中黄酮和维生素C含量。此外,随着“合成微生物菌群”的发展,可将单一功能菌组合起来达到功能叠加的作用,以达到更好的促生效果。本研究后续也将进一步研究如何有机复配具有不同功能的微生物,以期更好地发挥种植区益生菌资源在对地理标志特色农产品沙窝萝卜品质、品牌维护中的作用。

参考文献:

- [1] 刘京伟,李香真,姚敏杰,等.植物根际微生物群落构建的研究进展[J].微生物学报,2021,61(2):231-248.
- [2] 刘智,张虹,罗会婷,等.不同种植模式下凤丹根际微生物群落结构和多样性分析[J].江苏农业学报,2022,38(2):502-511.
- [3] Yadav SK, Singh S, Singh HB, et al. Compatible rhizosphere-competent microbial consortium adds value to the nutritional quality in edible parts of chickpea[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2017, 65(30):6122-6130.
- [4] Sun Y, Huang ZY, Chen SY, et al. Higher-quality pumpkin cultivars need to recruit more abundant soil microbes in rhizospheres[J]. Microorganisms, 2022, 10(11):2219.
- [5] Xu J, Zhang Y, Zhang P, et al. The structure and function of the global citrus rhizosphere microbiome[J]. Nature Communications, 2018(8):4894.
- [6] 高丹蕾,吴璐瑶,孟凡志,等.引种栽培条件下大花黄牡丹根际微生物多样性及群落结构[J].东北农业大学学报,2022,53(3):19-29.
- [7] Castellano-Hinojosa A, Strauss SL, González-López J, et al. Changes in the diversity and predicted functional composition of the bulk and rhizosphere soil bacterial microbiomes of tomato and common bean after inorganic N-fertilization[J]. Rhizosphere, 2021(18):10036.

- [8] Matthews A, Majeed A, Barraclough TG, et al. Function is a better predictor of plant rhizosphere community membership than 16S phylogeny[J]. *Environmental Microbiology*, 2021, 23(10):6089-6103.
- [9] 左东黎. “赛鸭梨”的沙窝萝卜[J]. *中国食品*, 2013(3):46-47.
- [10] 吕玉里. “津翠”青萝卜新品种介绍[J]. *天津农林科技*, 2012(5):26-27.
- [11] 袁伟玲, 崔磊, 甘彩霞, 等. 不同生食萝卜品质指标的评价分析[J]. *长江蔬菜*, 2017(12):27-29.
- [12] 曹淑萍, 刘金成, 刘永涛, 等. 天津市重点地区农用地质量地球化学调查评价综合成果报告[Z]. 2016-06-30.
- [13] 王帅帅. 饼肥对番茄植株根际土壤生物学特性和微生物多样性的影响[D]. 南宁: 广西大学, 2020.
- [14] 孔维宝, 霍焕燃, 陈冬, 等. 基于高通量测序技术分析武都油橄榄根际土壤微生物多样性[J]. *西北师范大学学报(自然科学版)*, 2020, 56(6):75-82.
- [15] 杨敏, 殷绒, 张国涛, 等. 基于高通量测序技术的香格里拉葡萄酒产区根际微生物多样性研究[J]. *云南农业大学学报(自然科学)*, 2020, 35(3):392-400.
- [16] 赵诗佳, 郭晓农, 王银平, 等. 兰州唐古特白刺根际微生物分离鉴定[J]. *微生物学报*, 2022, 62(7):2582-2593.
- [17] 杨华, 胡展, 郭照辉, 等. 水稻促生菌的筛选、鉴定及其促生效果[J]. *微生物学通报*, 2022, 49(6):2088-2099.
- [18] Clickman E, Dessaux Y. A critical examination of the specificity of the salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, 61(2):793-796.
- [19] 赵晓芬. 几种湿地植物根际微生物的分离鉴定及其污水净化效果的研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2012.
- [20] 保善存, 樊光辉, 李发毅. 解淀粉芽孢杆菌微生物菌剂对枸杞生长及土壤性状的影响[J]. *中国土壤与肥料*, 2023(8):112-120.
- [21] 蔡达, 江育炎, 王文正, 等. 山东、四川不同类型萝卜营养成分分析与综合评价[J]. *食品安全质量检测学报*, 2022, 13(8):2649-2657.
- [22] Rajkumar M, Bruno LB, Banu JR, et al. Alleviation of environmental stress in plants: The role of beneficial *Pseudomonas* spp. [J]. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 2017, 47(6):372-407.
- [23] Vurukonda S, Vardharajula S, Shrivastava M, et al. Multifunctional *Pseudomonas putida* strain FBKV2 from arid rhizosphere soil and its growth promotional effects on maize under drought stress[J]. *Rhizosphere*, 2016(24):4-13.
- [24] Yang Q, Cai S, Dong S, et al. Biodegradation of 3-methyldiphenylether (MDE) by *Hydrogenophaga* atypical strain QY7-2 and cloning of the methy-oxidation gene mde ABCD[J]. *Scientific Reports*, 2017(6):39270.
- [25] 阮博. 蒙脱石介导鞘氨醇单胞菌 GY2B 降解菲过程的作用机制研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2020.
- [26] 邹曼, 陈雨诗, 许春艳, 等. 生防芽孢杆菌对果蔬采后病害防治的研究进展[J]. *食品工业科技*, 2023, 44(4):488-495.
- [27] 邱月. 枯草芽孢杆菌在现代农业中的应用[J]. *园艺与种苗*, 2022(7):81-85.
- [28] 刘小玉, 付登强. 解淀粉芽孢杆菌在农业生产中的应用[J]. *中国果菜*, 2022, 42(8):81-84.
- [29] 徐淑琴, 贺曦, 龚紫凤, 等. 贝莱斯芽孢杆菌的生物学特性及其农业应用现状[J]. *饲料研究*, 2022, 45(9):143-147.
- [30] 易龙, 张亚, 廖晓兰, 等. 蜡状芽孢杆菌次生代谢产物的研究进展[J]. *农药*, 2013, 52(3):162-164.
- [31] 刘付军. 地衣芽孢杆菌在种植业上应用研究进展[J]. *中国园艺文摘*, 2013, 29(8):55-64.
- [32] 刘露, 李丽, 闫洪雪, 等. 巨大芽孢杆菌的应用研究进展[J]. *北方农业学报*, 2016, 44(4):7-120.
- [33] 贾峥嵘, 郝佳丽, 郝艳芳, 等. 四种芽孢杆菌菌剂对甘薯不同时期产量及品质的影响[J]. *作物杂志*, 2023(1):170-175.
- [34] 张倩, 陈雨诗, 许春艳, 等. 贝莱斯芽孢杆菌防治甜樱桃采后软腐病的效果和机理[J]. *食品科学*, 2023, 44(7):229-239.
- [35] 黎家, 李传友. 新中国成立 70 年来植物激素研究进展[J]. *中国科学: 生命科学*, 2019, 49(10):1227-1281.
- [36] Wu ZS, Huang SA, Zhang XB, et al. Regulation of plant immune receptor accumulation through translational repression by a glycine-tyrosine-phenylalanine (GYF) domain protein[J]. *Elife*, 2017(6):e23684.
- [37] Haghighi M, Saadat S, Abbey L, et al. Effect of exogenous amino acids application on growth and nutritional value of cabbage under drought stress [J]. *Scientia Horticulture*, 2020(272):109561.
- [38] 代淑贤. 固氮施氏假单胞菌双组分系统 CbrAB 碳氮代谢调控功能研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2012.
- [39] 王欢, 汪苹, 张海波. 一株戴尔福特菌的异养硝化与好氧反硝化性能研究[J]. *北京工商大学学报自然科学版*, 2008(2):1-5.
- [40] 赵英男. 设施黄瓜施用巨大芽孢杆菌对土壤微生物群落影响及其促生效应机制[D]. 保定: 河北农业大学, 2021.
- [41] 张哲超. 耐盐碱根际促生菌与丛枝菌根真菌联合提高牧草盐碱耐受性的微生物机制研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古大学, 2022.
- [42] 刘泽平, 王志刚, 徐伟慧, 等. 水稻根际促生菌的筛选鉴定及促生能力分析[J]. *农业资源与环境学报*, 2018, 5(2):119-125.
- [43] 杨晓燕, 叶伟伟, 魏善强, 等. 一株巨大芽孢杆菌发酵培养基的优化及解磷效果研究[J]. *中国农学通报*, 2022, 38(15):105-112.
- [44] Wang XL, Xu F, Wang J, et al. *Bacillus cereus* AR156 induces resistance against *Rhizopus* rot through priming of defense responses in peach fruit [J]. *Food Chemistry*, 2013, 136(2):400-406.