

# 1 株拮抗酵母菌对柑橘绿霉病菌的抑制作用

罗建军 耿鹏 胡美英 黄慧斯 贾建文

华南农业大学天然农药与化学生物学教育部重点实验室, 广州 510642

**摘要** 以柑橘绿霉病菌(*Penicillium digitatum* Sacc.)为供试材料,研究拮抗酵母菌(*Kluyveromyces marxianus*)对柑橘采后绿霉病菌的抑制效果,并观察其对采后柑橘果实多酚氧化酶(PPO)、过氧化物酶(POD)和苯丙氨酸解氨酶(PAL)活性的影响。结果表明:拮抗酵母菌的菌株悬浮液和培养原液对柑橘采后绿霉病菌均有较好的抑制作用,但菌株培养上清液和热杀死液对柑橘绿霉病菌的抑制效果较差;与对照相比,接种拮抗菌与病原菌能够诱导柑橘果实 PPO、POD 和 PAL 活性的升高;拮抗酵母菌对柑橘绿霉病菌的抑菌机制与营养和空间的竞争以及诱导抗病性相关酶有关。

**关键词** 柑橘绿霉病; 马克斯克鲁维酵母; 柑橘绿霉病菌; 抗性酶

**中图分类号** S 482.2<sup>+</sup>92 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2013)01-0054-05

由柑橘绿霉病菌(*Penicillium digitatum* Sacc.)引起的绿霉病是柑橘采后的主要病害之一,在贮藏转运过程中可造成巨大的经济损失。目前,控制柑橘采后绿霉病的主要措施是使用化学杀菌剂<sup>[1]</sup>。化学杀菌剂虽然对柑橘绿霉病防治效果明显,但对环境和人体的健康有潜在威胁,而且在同一地区长期使用单一种类的杀菌剂还会导致病原菌产生抗药性,从而降低化学杀菌剂的防治效果<sup>[2]</sup>。随着公众环保意识的增强和对果品质量要求的不断提高,迫切需要寻找防效高、残留低、对寄主无毒害作用的采后病害控制新途径。

拮抗酵母菌控制果蔬采后病害具有拮抗效果好、不产生毒素、可与化学杀菌剂共同使用等优点,因而成为采后病害生物防治的研究热点。国内外学者对果蔬采后病害拮抗酵母菌的筛选、特性和防治效果等均进行过研究,并已分离筛选到若干拮抗酵母菌株,但对拮抗酵母菌防治机制的研究相对较少<sup>[3-5]</sup>。目前,普遍认为拮抗酵母菌的生防机制主要包括营养或空间竞争、酵母菌对病原菌的直接寄生作用影响寄主抗性等<sup>[6]</sup>。笔者从木瓜表面分离获得 1 株拮抗酵母菌,经鉴定为马克斯克鲁维酵母(*Kluyveromyces marxianus*),初步证明其对柑橘采后绿霉病具有较好的防治效果<sup>[7]</sup>。为探讨拮抗酵

母菌对柑橘绿霉病菌的拮抗机制,笔者观察了拮抗酵母菌对柑橘采后绿霉病的抑制作用和对采后柑橘果实中 3 种酶的活性影响,旨在为拮抗酵母菌的商业化应用与开发提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

沙糖橘(*Citrus reticulata* Blanco cv. *shang-tang*)购自广东省广州市天平架水果批发市场。选取外观整齐、大小一致、无病虫害、无机械损伤的果实。供试果实运到实验室后,先用 2% 次氯酸钠溶液消毒 2 min,再用自来水冲洗,晾干后待用。

拮抗酵母菌株 HP-10,分离于华南农业大学园艺果园,以经典形态学和分子生物学鉴定,确定为马克斯克鲁维酵母 *K. marxianus*,菌种保存于笔者所在实验室,其 GenBank 登录号为 HQ414234。解淀粉芽孢杆菌 HF-01 为笔者所在实验室保存的拮抗细菌菌株。

### 1.2 孢子悬浮液的配制

先将分离于自然发病柑橘果实上的柑橘绿霉病菌(*P. digitatum*)接种在马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)上培养 7 ~ 14 d,然后用含有 0.05% 的 Tween 80 无菌水配成  $5 \times 10^4$  个/mL 的孢子悬浮

收稿日期: 2012-05-03

基金项目: 广东省科技计划项目(2008B020900007)

罗建军,助理研究员. 研究方向: 天然源农药. E-mail: luojianjun@scau.edu.cn

通讯作者: 胡美英,教授. 研究方向: 昆虫毒理. E-mail: humy@scau.edu.cn

液。在直径 90 mm 的培养基上打 2 个直径 8 mm 的小孔,然后分别加入 20  $\mu\text{L}$   $1 \times 10^5$  cfu/mL 酵母菌 HP-10 悬浮液、 $1 \times 10^5$  cfu/mL 解淀粉芽孢杆菌 HF-01 悬浮液和无菌水于其中一个孔内。8 h 后加  $1 \times 10^5$  cfu/mL 的柑橘绿霉病菌孢子悬浮液 20  $\mu\text{L}$  于另一个孔内,置于 25  $^{\circ}\text{C}$  恒温培养箱中培养,1 周后观察抑菌情况。

### 1.3 接种处理

将拮抗酵母菌株 HP-10 活化后接入含有 50 mL NYDB 三角瓶中,置于恒温摇床上振荡培养(26  $^{\circ}\text{C}$ 、120 r/min)48 h 后,分别将培养液制成以下处理液。A. 培养原液:用血球计数板将培养液浓度配至  $1 \times 10^8$  cfu/mL; B. 上清液:培养原液在 6 000 r/min 下离心 10 min 后,收集上清液,用 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤; C. 悬浮液:培养原液在 6 000 r/min 下离心 10 min 后,弃上清液,加入无菌水,混合均匀后重复离心,最后用血球计数板将菌体浓度配至  $1 \times 10^8$  cfu/mL; D. 热杀死液:将培养液在 121  $^{\circ}\text{C}$  高压灭菌 20 min; E. 对照 CK 为无菌水。

参照 Janisiewicz 等<sup>[8]</sup>的方法进行伤口接种。在柑橘果实上接种 30  $\mu\text{L}$  上述不同处理液,4 h 后在伤口接种 15  $\mu\text{L}$   $5 \times 10^4$  个/mL 的柑橘绿霉病菌孢子悬浮液果实晾干后贮藏于 25  $^{\circ}\text{C}$  下,并保持 95% 左右的湿度,于 4 d 后统计绿霉病的发病率和病斑直径。每处理 30 个果实,重复 3 次。

### 1.4 酶活性的测定

将柑橘果实分为 3 个不同处理:A. 果实刺伤后接种 15  $\mu\text{L}$   $5 \times 10^4$  个/mL 的柑橘绿霉病菌孢子悬浮液; B. 果实刺伤后接种 20  $\mu\text{L}$   $1 \times 10^5$  cfu/mL 的酵母菌悬浮液,4 h 后再接种 15  $\mu\text{L}$   $1 \times 10^4$  个/mL 的柑橘绿霉病菌孢子悬浮液; C. 果实不刺伤不接种作为对照。分别于接种处理 0、24、48、72、96 h 后在果实伤口与完好组织交接部位取样测定酶活性。

酶液的制备参照秦国政等<sup>[9]</sup>的方法加以改进:取 5 g 果皮剪碎,加入 0.5 g 聚乙烯吡咯烷酮(PVP),再加入 0.1 mol/L 的磷酸缓冲液 20 mL (pH 6.8)和少量石英砂,冰浴中研磨匀浆,于 4  $^{\circ}\text{C}$  下 12 000 r/min 离心 10 min,上清液用于酶活性测定。PPO 活性测定采用邻苯二酚法<sup>[10]</sup>,POD 活性测定采用愈创木酚法<sup>[11]</sup>,PAL 活性测定参照 Assis 等<sup>[12]</sup>的方法。以每分钟 D 值变化 0.01 为 1 个酶活性单位(U)。

## 1.5 数据分析

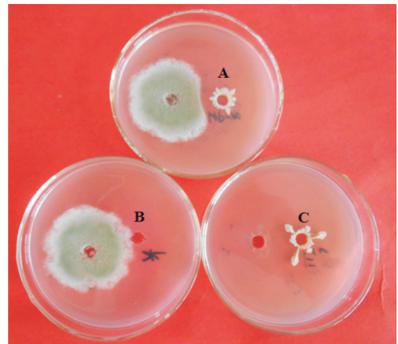
试验数据采用 SPSS 软件进行统计,并用邓肯氏新复极差多重比较法(DMRT)进行显著性分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株悬浮液对病菌的抑制效果

拮抗酵母菌株 HP-10 悬浮液、解淀粉芽孢杆菌 HF-10 悬浮液和清水对照对柑橘绿霉病菌的抑制效果见图 1。

由图 1 可知,拮抗酵母菌株 HP-10 悬浮液与柑橘绿霉病菌对峙培养后有微小的抑菌圈,而解淀粉芽孢杆菌 HF-10 悬浮液可完全抑制橘绿霉病菌的生长。这表明酵母菌株 HP-10 可以产生微量的抑菌活性物质,但这些抑菌物质并不足以完全抑制柑橘绿霉病菌,其抑制病菌的主要机制可能是该酵母菌株对病原菌的直接作用以及与病原菌竞争营养和空间有关。



A: 菌株悬浮液; B: 无菌水对照; C: 解淀粉芽孢杆菌悬浮液。A: Living cell suspension of *K. marxianus*; B: Sterile water; C: Living cell suspension of *B. amloliquefaciens*.

图 1 菌株悬浮液对柑橘绿霉病菌的抑制效果  
Fig. 1 Inhibition effect of living cell suspension of *K. marxianus* against *P. digitatum*

### 2.2 菌株不同处理液对病菌的抑制效果

拮抗酵母菌株 HP-10 不同处理液处理 4 d 后对柑橘采后绿霉病菌的抑制效果见表 1。

由表 1 可知,菌株悬浮液(C)处理对柑橘绿霉病菌的抑制效果优于其他各个处理( $P < 0.05$ ),其发病率和病斑直径分别为 61.67% 和 11.57 mm;培养原液(A)对柑橘绿霉病菌的抑制效果次之,发病率和病斑直径分别为 71.67% 和 14.71 mm;与无菌水对照(E)相比,菌株培养上清液(B)和热杀死液(D)对柑橘绿霉病菌的抑制效果较差,甚至能刺激病菌的生长。

表 1 菌株不同处理液对柑橘绿霉病菌的抑制效果<sup>1)</sup>

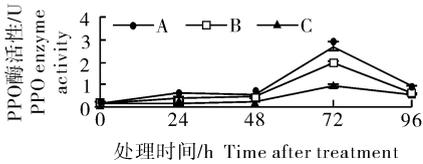
Table 1 Inhibition effect of different treating fluids of yeast strain against green mold

处理液 Treating fluids	发病率/% Disease incidence	病斑直径/mm Lesion diameter
A	71.67±5.71 a	14.71±0.56 b
B	93.33±2.89 a	29.29±1.50 a
C	61.67±2.87 b	11.57±0.70 c
D	100.00±0.00 c	31.79±1.48 d
E	91.67±2.87 b	25.61±1.97 c

1)数据后不同字母表示在 5%水平上差异显著(DMRT)。Data with the different letters in column are significant difference at 5% level (DMRT)。

### 2.3 接种处理对多酚氧化酶活性的影响

由图 2 可知,各接种处理在 48 h 后,柑橘果实多酚氧化酶(PPO)活性均开始迅速升高,72 h 时达到最高峰。接种 *K. marxianus*+*P. digitatum* 或只接种 *P. digitatum* 在各个处理阶段 PPO 活性均高于对照( $P<0.05$ )。这表明 2 种处理均能诱导柑橘果实 PPO 活性的提高,而单独接种病原菌的诱导强度则明显低于接种拮抗菌+病原菌处理。



A: 刺伤接种 *K. marxianus*+*P. digitatum*; B: 只接种 *P. digitatum*; C: 不刺伤不接种(图 3 和 图 4 同)。A: Inoculation with *K. marxianus* and *P. digitatum*; B: Inoculation with *P. digitatum* alone; C: Non-wounded and non-inoculated control fruit (the same as Fig. 3 and Fig. 4)。

图 2 不同处理采后柑橘果实多酚氧化酶活性的变化  
Fig. 2 Changes of polyphenoloxidase (PPO) activity with different treatments in citrus fruit

### 2.4 接种处理对过氧化物酶活性的影响

由图 3 可知,接种 *P. digitatum* 和对照组处理的柑橘果实过氧化物酶(POD)活性在 48 h 以前处于下降趋势,而接种 *K. marxianus*+*P. digitatum* 后柑橘果实 POD 活性趋于稳定或变化不大;接种 48 h 以后,随着病斑的扩展,各处理 POD 活性有所上升,72 h 时达到最高峰;相对于接种 *P. digitatum* 和对照组,接种 *K. marxianus*+*P. digitatum* 后柑橘果实 POD 活性相对较高( $P<0.05$ )。

### 2.5 接种处理对苯丙氨酸解氨酶活性的影响

由图 4 可知,各接种处理在 24 h 以前柑橘果实的 PAL 活性差异不大。在 24~72 h 时间段内,各

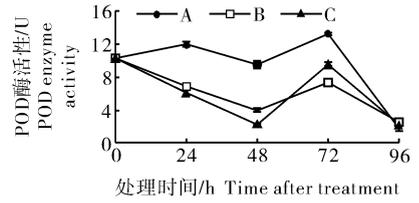


图 3 不同处理采后柑橘果实过氧化物酶活性的变化  
Fig. 3 Changes of peroxidase (POD) activity with different treatments in citrus fruit

处理柑橘果实苯丙氨酸解氨酶(PAL)活性均处于升高趋势,在 72 h 时 PAL 活性达到峰值,随后均有所下降,接种 *K. marxianus*+*P. digitatum* 柑橘果实的 PAL 活性最高,只接种病原菌处理的 PAL 活性次之,处理组的 PAL 活性最低。

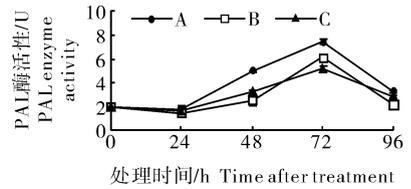


图 4 不同处理采后柑橘果实苯丙氨酸解氨酶活性的变化  
Fig. 4 Changes of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) activity with different treatments in citrus fruit

## 3 讨论

生物防治近年来被证明是控制果蔬采后病害卓有成效的新途径<sup>[13]</sup>。拮抗微生物是一种重要的生防因子,它主要是利用微生物之间的拮抗作用,选择对环境和人体健康不造成危害的微生物来抑制果蔬采后病原菌的生长<sup>[14]</sup>,其中酵母菌是采后病害生物防治研究的热点之一。

与病原菌的直接作用是酵母菌生防机制的一个重要方面。许多酵母菌可以分泌产生胞外水解酶,如几丁质酶、 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶等,这些酶可以参与病原真菌细胞壁的降解,从而达到防治病害的效果<sup>[15]</sup>。另外,有些酵母菌还可以附着在病原菌的菌丝体上,通过分泌胞外水解酶水解病原菌的细胞壁,形成对病原菌的直接寄生作用。

营养或空间的竞争被认为是拮抗酵母菌发挥抑菌作用的主要途径。由于拮抗酵母菌的抗逆性较强,在温度、湿度、pH 值或渗透压不利于病原菌生长的情况下,能够迅速消耗掉寄主植物伤口处的营养物质并大量繁殖,故可在较短的时间内占领生存空间,使病原菌得不到充足的营养和空间,从而达到

抑制病原菌生长的目的<sup>[16]</sup>。

本试验的离体培养中,以产生抗菌物质的解淀粉芽孢杆菌为对照,观察了拮抗酵母菌株 HP-10 对柑橘绿霉病菌的直接抑菌作用效果,同时利用菌株 HP-10 不同处理液进行柑橘活体的生物防治试验。结果表明:菌株 HP-10 对柑橘绿霉病菌直接抑制作用不明显,显示其仅产生微量的抑菌物质并直接作用于柑橘绿霉病菌;应用菌株 HP-10 不同处理液处理柑橘果实后,菌株悬浮液对柑橘采后绿霉病的抑制效果最好,菌株培养液次之,其原因可能是培养液中的营养成分削弱了拮抗菌与病原菌之间的竞争作用,这与范青等<sup>[16]</sup>的研究结果一致。另外,菌株 HP-10 培养上清液和热杀死液对柑橘绿霉病菌的抑制效果较差,甚至能刺激病菌的生长,进一步确证了菌株 HP-10 对柑橘采后绿霉病的生防机制主要是营养和空间的竞争,而不是产生抗菌物质并直接作用于病原菌。

植物在抵抗病原微生物侵染的过程中,抗病性相关酶发挥了至关重要的作用,其中多酚氧化酶(PPO)、过氧化物酶(POD)和苯丙氨酸解氨酶(PAL)是存在于植物体内与抵抗病原微生物侵染有关的酶<sup>[17]</sup>。拮抗菌诱导系统抗性相关酶活性的提高是发挥抑病作用的一种重要机制<sup>[18]</sup>。本试验中观察砂糖糖果实接种拮抗酵母菌 *K. marxianus* 后 PPO、POD 和 PAL 活性的变化,与对照相比,刺伤接种 *K. marxianus* + *P. digitatum* 后 3 种抗病防御相关酶活性均有一定的升高。据此可初步确认,对抗病防御相关酶活性的诱导是拮抗酵母菌 *K. marxianus* 发挥拮抗作用的又一途径。

本试验首次探讨了拮抗酵母菌 *K. marxianus* 对柑橘绿霉病菌的拮抗作用机制,结果表明营养和空间的竞争以及诱导抗病性相关酶是菌株对柑橘采后绿霉病产生抑菌作用的重要因素。但是,拮抗酵母菌的拮抗作用往往是多种机制共同影响的结果,因此,拮抗酵母菌 *K. marxianus* 是否存在其他的拮抗作用机制还有待进一步研究。同时,关于拮抗酵母菌 *K. marxianus* 诱导抗性的分子作用机制也有待深入探讨。

## 参 考 文 献

- [1] ISMAIL M, ZHANG J. Post-harvest citrus diseases and their control [J]. *Outlooks Pest Manage*, 2004, 15: 29-35.
- [2] EI-GHAOUTH A. Biologically-based alternatives to synthetic fungicides for the control of post-harvest diseases [J]. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 1997, 19 (3): 160-162.
- [3] CHANCHAICHAOVIVAT A, RUENWONGSA P, PANIJPAN B. Screening and identification of yeast strains from fruits and vegetables: potential for biological control of postharvest chilli anthracnose (*Colletotrichum capsici*) [J]. *Biological Control*, 2007, 42(3): 326-335.
- [4] ZHANG H Y, WANG S Z, HUANG X Y, et al. Integrated control of postharvest blue mold decay of pears with hot water treatment and *Rhodotorula glutinis* [J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2008, 49(2): 308-313.
- [5] SHARMA R R, SINGH D, SINGH R. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: a review [J]. *Biological Control*, 2009, 50 (3): 205-221.
- [6] EI-TARABILY K A, SIVASITHAMPARAM K. Potential of yeasts as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters [J]. *Mycoscience*, 2006, 47: 25-35.
- [7] 耿鹏, 张彦博, 胡美英, 等. 柑橘采后绿霉病生防酵母菌的筛选、鉴定及其生防效果研究 [J]. *西北农林科技大学学报: 自然科学版*, 2011, 39(6): 191-196.
- [8] JANISIEWICZ W J, SAFTNER R A, WILLIAM S C, et al. Control of blue mold decay of apple during commercial controlled atmosphere storage with yeast antagonists and sodium bicarbonate [J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2008, 49: 374-378.
- [9] 秦国政, 田世平, 刘海波, 等. 拮抗菌与病原菌处理对采后桃果实多酚氧化酶、过氧化物酶及苯丙氨酸解氨酶的诱导 [J]. *中国农业科学*, 2003, 36(1): 89-93.
- [10] QUINQ-BOLANOS E N, MERCADO-SILVA A. Effects of polyphenol oxidase and peroxidase activity, phenolics and lignin content on the browning of cut jicama [J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2004, 33(3): 275-283.
- [11] LURIE S, FALLIK E, HANDROS A, et al. The possible involvement of peroxidase in resistance to *Botrytis cinerea* in heat-treated tomato fruit [J]. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 1997, 50(3): 141-149.
- [12] ASSIS J S, MALDONADO R, MUNOZ T, et al. Effect of high carbon dioxide concentration on PAL activity and phenolic contents in ripening cherimoya fruit [J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2011, 23: 33-39.
- [13] CANAMAS T P, VINAS I. Control of postharvest diseases on citrus fruit by preharvest applications of biocontrol agent *Pantoea agglomerans* CPA-2: Part II. Effectiveness of different cell formulations [J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2008, 49(1): 96-106.
- [14] CASTORIA R, CURRIS F D, LIMA G, et al. Beta- $\beta$ -1,3-glucanase activity of two saprophytic yeasts and possible mode of

- action as biocontrol agents against postharvest diseases [J]. *Postharvest Biology and Technology*, 1997, 12: 293-300.
- [15] JANISIEWICZ W J, USALL J, BORS B. Nutritional enhancement of biocontrol of blue mold on apples [J]. *Phytopathology*, 1992, 82: 1364-1370.
- [16] 范青, 田世平, 徐勇. 丝孢酵母对苹果采后灰霉病和青霉病抑制效果的影响[J]. *中国农业科学*, 2001, 34(2): 163-168.
- [17] GE L L, ZHANG H Y, CHEN K P, et al. Effect of chitin on the antagonistic of *Rhodotorula glutinis* against *Botrytis cinerea* in strawberries and the possible mechanisms involved [J]. *Food Chemistry*, 2010, 120: 490-495.
- [18] 孙建波, 王宇光, 赵平娟, 等. 拮抗菌 XB16 在香蕉体内的定殖及对抗病相关酶活性的影响[J]. *热带作物学报*, 2010, 31(2): 212-216.

## Inhibitive activity of *Kluyveromyces marxianus* on *Penicillium digitatum* Sacc.

LUO Jian-jun GENG Peng HU Mei-ying HUANG Hui-si JIA Jian-wen

*Key Laboratory of Natural Pesticide and Chemical Biology, Ministry of Education, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China*

**Abstract** The inhibitive activity of *Kluyveromyces marxianus* against citrus green mold caused by *Penicillium digitatum* Sacc. was investigated, as well as its effect on the activities of polyphenol oxidase (PPO), peroxidase (POD) and phenylalanine ammonium-lyase (PAL). The results showed that the treatments of washed cell suspension and living cell suspension have better inhibiting effect, as compared to the control treatment; while the culture filtrate and autoclaved cell suspensions could exacerbate green mold decay. The application of *K. marxianus* could induce higher PPO, POD and PAL activity as compared to the control. It was suggested that the biocontrol mechanism might be competitive for nutrition and space, and contribute to the secretion of antagonistic substance.

**Key words** citrus green mold; *Kluyveromyces marxianus*; *Penicillium digitatum* Sacc.; resistant enzyme

(责任编辑:陈红叶)