

隐球酵母对长枣果实的生防效果及诱导抗性

班兆军, 李莉, 李喜宏*, 郭红莲

(天津科技大学食品工程与生物技术学院, 天津 300457)

摘要 隐球酵母(*Cryptococcus* sp.) C331 菌株是从灵武长枣果实表面分离筛选得到的一种拮抗酵母菌。接种优势致病菌黑根霉(*Rhizopus* sp.) 后, 研究拮抗菌和致病菌诱导果实自身抗真菌性能的影响。通过离体抑菌法和活体抑菌法, 以及 PPO、POD 和 SOD 酶活测定, 用 EXCEL 和 SAS 软件分析数据。结果表明, 隐球酵母 C331 菌株能有效抑制长枣采后病害的发病率和病斑直径, 其拮抗效果与拮抗菌的使用浓度成正比; 拮抗菌能显著提高 PPO 和 SOD 活性, 降低 POD 活性。研究证明隐球酵母 C331 菌株能显著抑制长枣采后病害, 提高果实自身抗真菌性能。

关键词 隐球酵母 C331 菌株; 长枣; 生防效果; 诱导抗性

中图分类号: S 436.611 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3969/j.issn.0529-1542.2009.01.019

Effects of *Cryptococcus* on biological control of diseases on post-harvest long jujubes

Ban Zhaojun, Li Li, Li Xihong, Guo Honglian

(College of Food Engineering & Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract *Cryptococcus* C331, isolated from Lingwu long jujube fruits, was effective antagonist yeast for control of postharvest diseases. The induction of antifungal activity by infection of C331 and *Rhizopus* sp. was investigated. The changes in PPO, POD and SOD were measured *in vitro* and *in vivo*. The results showed that C331 could significantly reduce disease incidences and lesion diameters, and there was a significant positive correlation between the concentrations of C331 and its antagonistic activity; C331 could increase the activities of phenoloxidase (PPO) and superoxide dimutase (SOD) SOD, and decrease the activities of peroxidase (POD). *Cryptococcus* C331 could control the post-harvest diseases and increase the antifungal activity of long jujubes.

Key words *Cryptococcus* C331; long jujubes; biocontrol effect; induced resistance

果蔬采后由于病原菌侵染造成的损失十分严重。目前防治侵染病害最有效的方法是低温贮藏结合化学防腐剂的使用, 但过量化学药剂的使用会引发毒物残留量的增加和果蔬病原微生物的抗性, 从而降低化学药剂的防病效果^[1]。采摘后生物防治成为近年来各国研究的新热点, 极有可能成为取代现有化学杀菌剂的有效方法。迄今为止, 人们已经从苹果、草莓、柑橘、油桃等多种水果上分离筛选到几十种拮抗菌, 对水果采后主要病害具有明显的拮抗效果。

灵武长枣是宁夏具有地方特色的优良鲜果品种, 有“百果之王”的美称。长枣采后病害的防治是贮藏保鲜技术中的关键问题。

本试验以宁夏灵武长枣为试材, 分离优势致病菌和拮抗菌隐球酵母(*Cryptococcus* sp.), 重点研究拮抗酵母菌离体和活体对长枣采后致病菌的抑制效果, 以及接种拮抗菌对果实自身抗真菌性能的诱导, 旨在为生物防治在贮藏保鲜中的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

灵武长枣采摘于宁夏灵武市农户果园, 采后在 0℃ 下贮藏备用。

供试培养基 PDA 和 YEPD 按方中达方法制备^[2]。

拮抗菌隐球酵母 C331 菌株分离自灵武长枣。使用时取 1 环接种于 YEPD 培养基平板上画线后在 28 ℃ 下培养 24 h, 再用接种环取 1 环于盛有 50 mL YEPD 液体培养基的三角瓶中, 于 28 ℃ 下振荡培养 24 h 后, 制备成浓度为 1.0×10^6 、 1.0×10^7 、 1.0×10^8 cfu/mL 的活菌液备用。

致病菌从自然发病的长枣上分离, 优势致病菌青霉(*Penicillium* sp.)、黑根霉(*Rhizopus* sp.)、交链孢霉(*Alternaria* sp.)和曲霉(*Aspergillus* sp.), 于 PDA 培养基上 28 ℃ 活化培养 7 d, 用含有 0.05% Tween-20 的无菌水制成孢子含量为 1.0×10^4 、 1.0×10^5 、 1.0×10^6 个/mL 的孢子悬浮液, 备用。

1.2 试验方法

1.2.1 病原菌和拮抗菌的分离筛选

(1) 组织块分离法: 病果和枝叶在自然条件下放置数日发病后, 观察发病部位症状, 以 75% 乙醇清洗患处, 以无菌刀片切取病健交界处 5 mm 见方的组织, 于超净台转至 PDA 平板上, 28 ℃ 恒温培养箱中倒置培养; (2) 无菌水洗法: 用无菌水清洗枣果表面, 洗涤液稀释成不同倍数后, 在 PDA 平板上于 28 ℃ 恒温倒置培养。待菌落长出后挑取前缘菌丝, 并及时纯化直至获得纯培养体。

1.2.2 病原菌鉴定与致病性测定

每种微生物选取 30 个健康无病枣果, 无菌水清洗消毒后, 以无菌刀片划伤进行回接, 外套一塑料袋保湿, 置于 28 ℃ 恒温培养箱中培养, 观察出现的症状是否与原始症状一致, 若完全相同, 根据柯赫氏法则确定为致病菌。将主要微生物转入试管, 4 ℃ 冰箱保存。显微镜下观察致病菌的个体形态特征, 鉴定到属。选取拮抗效果好的拮抗菌测定抑菌效果。

1.2.3 拮抗菌的生防效果测定

1.2.3.1 离体测定

采用牛津杯法^[3]: PDA 平板中分别加入 0.1 mL 致病菌悬浮液, 每个 PDA 平板中央摆放 1 个牛津杯, 牛津杯中加入 30 μ L 拮抗菌悬浮液。以 30 μ L 无菌水作 CK。28 ℃ 培养 7 d 后测量抑菌圈大小。每处理 3 次重复。观察拮抗菌隐球酵母 C331 菌株对病原菌的抑制效果。

1.2.3.2 活体测定

选择无病虫害、无伤、成熟度和大小一致的枣果, 用 2% 的 NaClO 溶液消毒 2 min, 经蒸馏水冲洗后风干。在枣果伤口 (3 mm $\times$ 3 mm) 处接种 1.0×10^8 cfu/mL 的拮抗菌悬浮液 30 μ L, 以无菌水为 CK, 2 h 后再分别接种相同体积的 1.0×10^4 个/mL 致病菌的孢子

悬浮液。将枣果放入托盘内, 置于相对湿度 95% 左右, 28 ℃ 的恒温恒湿培养箱。每处理 30 个果, 3 次重复。培养 7 d 后, 测定枣果的发病率和病斑直径。

1.2.4 拮抗菌的诱导抗病机制

1.2.4.1 处理方法

接种方法同 1.2.2。处理如下:

① 接种 30 μ L 1×10^8 cfu/mL 的隐球酵母 C331 菌悬浮液, 5 h 后接种 15 μ L 孢子含量为 1×10^4 个/mL 的黑根霉(*Rhizopus* sp.)孢子悬浮液;

② 只接种 15 μ L 孢子含量为 1×10^4 个/mL 的黑根霉孢子悬浮液;

③ 不刺伤不接种的枣果作为 CK。

每处理 30 个枣果, 接种后外套一塑料袋保湿, 放在 28 ℃ 恒温恒湿培养箱中。每隔 24 h 测定果实酶活性, 3 次重复。

1.2.4.2 测定方法

枣果的多酚氧化酶(PPO)活力测定采用邻苯二酚法^[4], 以 A_{420} 1 min 变化 0.01 个单位为 1 个酶活力单位(U); 过氧化物酶(POD)活力测定采用愈创木酚法^[5], 以 A_{470} 1 min 变化 0.01 个单位为 1 个酶活力单位(U); 超氧化物歧化酶(SOD)活力测定采用氮蓝四唑(NBT)光化还原法^[6], 以 A_{560} NBT 光化还原 50% 抑制率作为 1 个酶活力单位。

1.2.5 数据处理

采用 EXCEL 和 SAS 软件统计, 试验数据用 ANOVA 进行邓肯氏多重比较分析。

2 结果与分析

2.1 病原菌和拮抗菌的分离筛选及鉴定

灵武长枣采后贮藏不同时期、不同温度下分离到不同种类优势致病菌。常温 (22 $\pm$ 1) ℃ 下贮藏 30 d: 分离到青霉、黑根霉、镰刀菌、交链孢霉、腐霉、细菌; 低温 (0 $\pm$ 1) ℃ 下贮藏 60 d: 分离到青霉、黑根霉、交链孢霉、曲霉; 低温 (0 $\pm$ 1) ℃ 下贮藏 90 d: 分离到青霉、黑根霉、交链孢霉、曲霉、腐霉、镰刀菌、细菌、酵母菌; 低温 (0 $\pm$ 1) ℃ 下贮藏 120 d: 分离到青霉、黑根霉、镰刀菌、青霉变种、交链孢霉、曲霉、腐霉、细菌。

根据柯赫氏法则确定致病菌为黑根霉、青霉、青霉变种、曲霉、交链孢霉、腐霉、镰刀菌和细菌; 非致病菌为酵母菌。

2.2 拮抗菌的生防效果测定

2.2.1 离体(in vitro)

抑菌圈法测定拮抗酵母菌对优势致病菌的拮抗

作用。试验结果(表 1)表明,隐球酵母 C331 菌株的拮抗效果与其使用浓度成正比,当接种致病菌孢子浓度 1×10^4 个/mL 时, 1×10^8 cfu/mL C331 能较好地抑制致病菌。

表 1 不同稀释度拮抗菌在 PDA 平板上对致病菌的抑制效果¹⁾

拮抗菌浓度/ cfu · mL ⁻¹	致病菌孢子浓度/ 个 · mL ⁻¹	抑菌圈直径/mm			
		青霉属	根霉属	交链孢霉属	曲霉属
1.0×10^6	1.0×10^4	16.4 c	27.0 c	24.0 d	11.0 cd
1.0×10^7	1.0×10^4	22.2 b	33.8 b	35.4 b	17.6 b
1.0×10^8	1.0×10^4	25.6 a	42.2 a	41.0 a	22.5 a
1.0×10^6	1.0×10^5	12.0 d	22.4 d	19.6 e	12.0 c
1.0×10^7	1.0×10^5	16.5 c	28.0 c	28.5 c	11.2 cd
1.0×10^8	1.0×10^5	22.4 b	30.8 bc	34.2 b	14.0 c
1.0×10^6	1.0×10^6	9.6 d	15.8 e	20.0 e	8.4 d
1.0×10^7	1.0×10^6	12.5 d	18.9 e	23.4 d	11.0 cd
1.0×10^8	1.0×10^6	17.0 c	30.5 bc	27.8 c	11.2 cd
0(CK)	0(CK)	0 e	0 f	0 f	0 e

1) 同列相同字母代表差异性不显著($p=0.05$)。

2.2.2 活体(in vivo)

长枣接种隐球酵母 C331 菌株和致病菌 7 d 后,结果表明 C331 菌株对 4 种优势致病菌具有显著的抑制效果(图 1),其中对交链孢霉的抑制效果最好,抑制率高达 54.08%,对根霉的抑制率为 48.72%,对青霉和曲霉的抑制率不高。

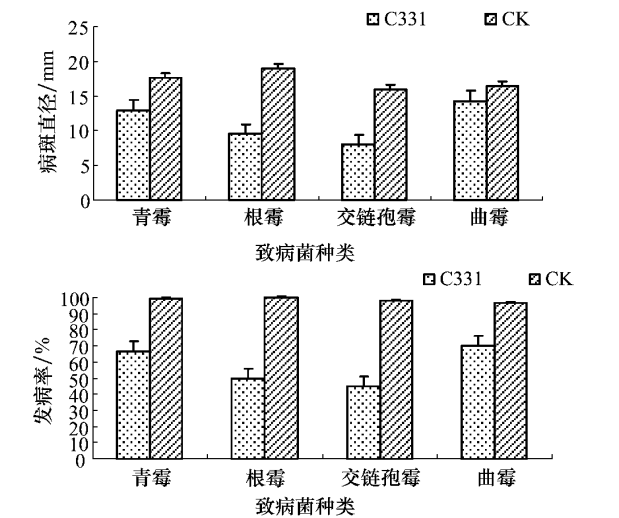


图 1 28 °C 下接种 7 d 后长枣上拮抗菌对致病菌的抑制效果

2.3 拮抗菌的诱导抗性机制

2.3.1 不同处理对 PPO 活力的影响

随着接种时间的延长,PPO 活力呈上升趋势,接种 3 d 达到酶活高峰(图 2)。接种 1~5 d 拮抗菌和病原菌处理比病原菌处理更能诱导枣果 PPO 活性的提高,两者酶活均高于对照,其中 3 d 高峰时前者高于后者 35.2%。

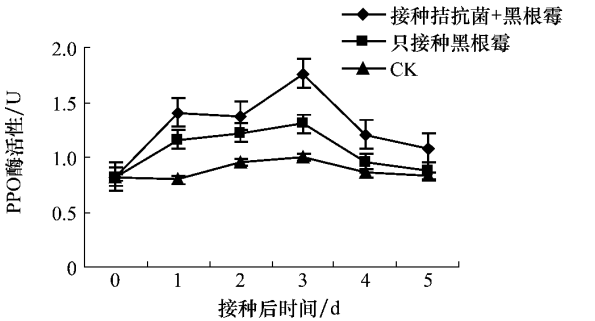


图 2 不同处理下灵武长枣 PPO 活力的变化

2.3.2 不同处理对 POD 活力的影响

由图 3 得知,接种后不同处理的 POD 活性均呈现类似的下降趋势。而不刺伤不接种的对照枣果 POD 活性则呈平稳状态。

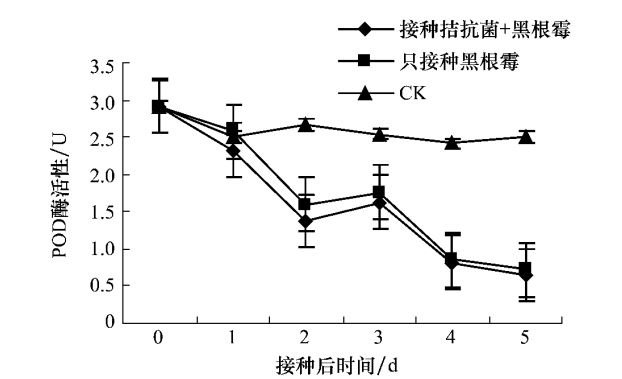


图 3 不同处理下灵武长枣 POD 活力的变化

2.3.3 不同处理对 SOD 活性的影响

接种拮抗菌和病原菌及只接种病原菌的枣果 SOD 活性上升,2 d 开始趋于稳定(图 4),可能是果实开始适应周围环境的原因。2 d 时 SOD 酶活分别

高于对照 64.1%和 30.4%。

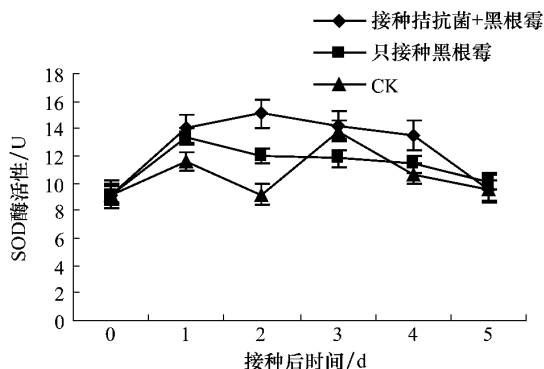


图4 不同处理下灵武长枣 SOD 活力的变化



图5 隐球酵母对黑根霉的拮抗效果

3 结论与讨论

果蔬的表面、伤口以及培养基的营养和湿度利于微生物的定殖和生存,是筛选拮抗菌的理想生境。酵母菌作为果蔬生防菌的最大优点是它能在较干燥的果蔬表面生存,迅速利用营养进行繁殖。Wilson^[7]和 Janisiewicz^[8]分别从柠檬和苹果表面分离到汉逊德巴利酵母(*Debaryomyces hansenii*)和假单胞杆菌(*Pseudomonas* sp.),可有效防治柑橘青绿霉病和苹果灰霉病。

本研究发现,从长枣果实表面分离的 *Cryptococcus* sp. 对长枣的几种优势致病菌具有良好的抑菌效果,并对果实感染病原菌后的防御酶系具有诱导作用。

拮抗菌和病原菌对果蔬组织作用的过程中,拮抗菌诱导防御酶系活性产生相应变化,增强了细胞壁和细胞膜抵抗病菌穿透的能力,阻碍病菌的扩散和作用。PPO 与组织的褐变有着密不可分的关系,并在植物抗病反应中也发挥着重要作用。PPO 可以催化木质素及其他酚类氧化产物的形成,构成保

护性屏蔽而抵抗病菌的入侵,也可以通过形成醌类物质直接发挥抗病作用^[9]。本试验结果显示,拮抗菌和病原菌处理比单独病原菌处理更能诱导枣果 PPO 活性的提高,并且枣果的发病率相对较低,病斑直径也较小,说明拮抗酵母菌对病原菌的拮抗效应与诱导 PPO 活力的提高有关。POD 活性的降低是植物感病后 H_2O_2 的积累破坏了组织内原有的动态平衡,细胞无法适应体内 H_2O_2 积累的自我调节,活性氧浓度升高,使植物遭受损伤。关于 POD 在植物抗病反应中的作用,秦国政等报道,在桃感染软腐病菌(*Rhizopus stolonifer*)时,POD 活力变化不与抗性的获得有直接关联^[10]。本试验也表明,接种拮抗菌和病原菌都不能诱导长枣果实 POD 的活力升高。SOD 活性的变化与细胞内氧自由基 $O_2^- \cdot$ 的活动密切相关。细胞内氧自由基 $O_2^- \cdot$ 对细胞尤其是膜系统有毒害作用。拮抗菌+病原菌和只接种病原菌 1 d 后,果实 SOD 活力开始上升,并显著高于对照,整个过程中接种拮抗菌+病原菌果实的 SOD 活力一直保持着最高水平。在 SOD 活力逐步升高的同时,果实也开始发病,但是,接种拮抗菌+病原菌的果实比只接种病原菌的果实发病晚、发病率低,病斑直径也较小,此时对应的 SOD 活力也稳定在较高的水平。说明长枣果实的抗病性与 SOD 的活力有一定的关系。

本研究从长枣果实表面分离拮抗酵母菌 C331 菌株,对长枣有良好的抑菌效果,而且还能和低温、低剂量的化学杀菌剂等常规处理方法结合使用,对人和动植物都无致病性,是一株具有较高利用价值的拮抗菌。为了使拮抗菌更稳定地作用于果蔬采后病害,今后有必要对酵母菌 C331 菌株的生物学特性进行深入研究,以明确其作用机理,为果蔬采后病害的生物防治奠定基础。

参考文献

- [1] El-Ghaouth A, Wilson C L. Biologically-based technologies for the control of postharvest diseases[J]. Postharvest News and Information, 1995, 6: 5-11.
- [2] 方中达. 植病研究方法[M]. 第3版. 北京: 中国农业出版社, 1998.
- [3] Janisiewicz W J, Korsten L. Biological control of postharvest diseases of fruits[J]. Annual Review of Phytopathology, 2002, 40: 411-441.