

罗伦隐球酵母、褐腐病菌与甜樱桃果实 在不同温度下的互作效应

王友升^{1,2}, 田世平²

(¹北京工商大学北京市植物资源研究开发重点实验室, 北京 100037; ²中国科学院植物研究所光合作用与环境分子生理学重点实验室, 北京 100093)

摘要: 【目的】研究酵母拮抗菌 *Cryptococcus laurentii*, 病原菌 *Monilinia fructicola* 与甜樱桃果实在接种伤口处的互作效应。【方法】在‘先锋’甜樱桃果实伤口处分别单独接种病原菌、酵母拮抗菌以及病原菌与酵母拮抗菌共同接种, 分析不同处理体系下果实的发病、酵母拮抗菌的生长动态、果实的脂质过氧化以及氧化酶与抗氧化酶活性的变化。【结果】酵母拮抗菌 *C. laurentii* 在 25 和 1℃ 下均能有效抑制甜樱桃果实褐腐病 *M. fructicola* 发生。病原菌 *M. fructicola* 在接种初期刺激拮抗菌生长, 而后期则抑制拮抗菌。单独接种病原菌 *M. fructicola* 或同时接种拮抗菌和病原菌均能诱导果实超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT) 和过氧化物酶 (POD) 活性升高并加速脂质过氧化作用。病原菌 *M. fructicola* 侵染甜樱桃果实发病后特异诱导多酚氧化酶 (PPO) 同工酶新酶带出现; 而拮抗菌 *C. laurentii* 对甜樱桃果实的抗氧化酶体系、脂质过氧化程度以及 PPO 同工酶谱的作用效果相对较弱。【结论】在酵母拮抗菌 *C. laurentii*、病原菌 *M. fructicola* 与甜樱桃果实的相互作用中, 甜樱桃果实褐腐病病害发生受到抑制的主要原因是 *M. fructicola* 刺激拮抗菌的生长并诱导果实抗性相关酶活性升高。

关键词: 罗伦隐球酵母; 褐腐病; 甜樱桃; 互作效应

Interaction between *Cryptococcus laurentii*, *Monilinia fructicola* and Sweet Cherry Fruit at Different Temperatures

WANG You-sheng^{1,2}, TIAN Shi-ping²

(¹Beijing Key Laboratory of Plant Resources Research and Developments, Beijing Technology and Business University, Beijing 100037; ²Key Laboratory of Photosynthesis and Environmental Molecular Physiology, Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093)

Abstract: 【Objective】The present study is mainly to investigate the antagonist-pathogen-host interaction in wounds of sweet cherry fruit. 【Method】Sweet cherry fruits (*Prunus avium* L. cv. Van) were inoculated with *C. laurentii*, *M. fructicola*, or *C. laurentii* plus *M. fructicola* to detect the population dynamics of the antagonist, fruit infection rate, lesion diameter as well as the change of lipid peroxidation and activities of antioxidant enzymes. 【Result】Antagonistic yeast *Cryptococcus laurentii* significantly reduced the brown rot of sweet cherry fruit at 25℃ and 1℃ caused by *Monilinia fructicola*. Populations of the yeast increased faster in the presence of the pathogen at first, but then decreased rapidly. In fruits inoculated with *M. fructicola* alone or combined with *C. laurentii*, an induction of lipid peroxidation and activities of antioxidant enzymes, such as SOD, CAT, and POD, was observed. The isoenzyme pattern of PPO changed greatly after the symptoms appeared, with new PPO isoforms being induced. By contrast, the induction of lipid peroxidation and activities of SOD, CAT, and POD was low while no significant change was found in PPO isoenzyme in fruits inoculated with antagonist *C. laurentii* alone. 【Conclusion】The inhibition of brown rot during the antagonist-pathogen-host interaction in wounds of sweet cherry fruit is mainly due to the stimulated growth of *C. laurentii* as well as

收稿日期: 2007-03-05; 接受日期: 2007-04-03

基金项目: 中国科学院知识创新工程重要方向项目 (KSCX2-YW-G-010); 国家自然科学基金项目 (300671473)

作者简介: 王友升 (1976-), 男, 山东日照人, 讲师, 博士, 研究方向为应用生物技术。Tel/Fax: 010-68984940; E-mail: wangys@th.btbu.edu.cn。
通讯作者田世平 (1957-), 女, 教授, 博士生导师, 研究方向为农业产后生物技术。Tel: 010-62836559; Fax: 010-85794675; E-mail: tsp@ibcas.ac.cn

the induction of anti-oxidant enzymes of fruits by *M. fructicola*.

Key words: *Cryptococcus laurentii*; *Monilinia fructicola*; Sweet cherry; Interaction

0 引言

【研究意义】由于导致果实采后病害的病原菌大多数通过伤口入侵^[1]，而酵母拮抗菌的主要抑病机理是在果实伤口处与病原菌进行营养与空间的竞争^[2]；因此，深入探讨酵母拮抗菌、病原菌与寄主之间在果实伤口处的互作效应以及影响因素，可为进一步提高酵母拮抗菌的生防效果奠定理论基础，这也是采后生物防治的重点与难点。【前人研究进展】在拮抗菌、病原菌与寄主之间的互作研究中，对酵母拮抗菌抑菌机理的报道较多。目前，大多认为酵母拮抗菌可在果实伤口处快速繁殖，不仅与病原菌竞争营养成分^[2]，还对病原菌产生直接抑制作用^[3]。也有研究表明，拮抗菌能够诱导果实产生水解酶，如几丁质酶和 β -1,3-葡聚糖酶。最近，Castoria 等发现在果实伤口处产生的氧化胁迫（oxidative stress）也影响酵母拮抗菌的生防效果^[5]；但是他们对于拮抗菌接种、病原菌侵染后及拮抗菌与病原菌的互作中，果实中的氧化酶与抗氧化酶是如何应答的，没有深入研究。【本研究切入点】甜樱桃果实采后极易遭受病原菌侵染而腐烂变质，其中病原菌 *Monilinia fructicola* 是其主要致病菌^[6]。酵母菌 *Cryptococcus laurentii* 是从苹果果实表面分离获得并能有效防治多种果实采后病害的生物拮抗菌^[7,8]，但目前未见关于酵母拮抗菌 *C. laurentii* 对甜樱桃 *M. fructicola* 的防治效果及其作用机理的报道。【拟解决的关键问题】本研究主要探讨不同贮藏温度下酵母拮抗菌 *C. laurentii* 和病原菌 *M. fructicola* 在甜樱桃果实伤口处的相互作用，以及拮抗菌接种、病原菌侵染或拮抗菌与病原菌互作时对甜樱桃果实中氧化酶与抗氧化酶的影响，为甜樱桃果实采后病害的生物防治提供理论参考。

1 材料与amp;方法

1.1 果实材料

供试甜樱桃果实为‘先锋’品种（*Prunus avivum* L. cv. Van），于2004年6月采收于北京市农林科学院林业果树研究所果园。果实采收后立即运到实验室进行处理，试验开始时果实硬度为3.6N，可溶性固形物含量为14.8%，pH为3.45。选择成熟度、大小一致，无病虫害与机械伤的果实，2%次氯酸钠溶液消毒5

min，用自来水冲洗、晾干后待用。

1.2 病原菌及孢子悬浮液的制备

病原菌 *M. fructicola* 分离于发病的甜樱桃果实。在果实的发病与健康组织交界处切取组织，接种到PDA（马铃薯葡萄糖琼脂培养基）上，25℃培养5~7d，然后用含有0.05%（v/v）Tween 80的无菌水配制成浓度为 5×10^4 孢子/ml的悬浮液。

1.3 酵母拮抗菌的活化、培养与悬浮液制备

本研究选用的酵母拮抗菌 *C. laurentii* 是从苹果果实表面分离的。从-20℃甘油管中吸取少量菌液，在NYDA（牛肉膏蛋白胨琼脂培养基）上铺板并在28℃下培养，72h后取少量拮抗菌在NYDB（牛肉膏蛋白胨液体培养基）中进一步活化，铺板，在NYDA培养基上分离单菌落。试验开始时挑取单菌落接入NYDB培养基中，在25℃和200 r/min的摇床上培养48h。培养液4000×g离心10min，弃上清，沉淀用无菌水悬浮，并配成浓度为 1×10^8 cells/ml的酵母菌悬浮液。

1.4 酵母拮抗菌 *C. laurentii* 对采后甜樱桃果实褐腐病的防治效果

用接种针在果实胴部刺一个4mm（深）×3mm（宽）的伤口，室温下放置1h后，进行如下处理：（A）只接种20μl浓度为 1×10^8 cells/ml的酵母菌悬浮液；（B）接种20μl浓度为 1×10^8 cells/ml的酵母菌悬浮液，1h后接种20μl浓度为 5×10^4 spores/ml的病原菌悬浮液；（C）只接种20μl浓度为 5×10^4 spores/ml的病原菌悬浮液；（D）果实刺伤但不接种（对照）。所有果实放于200mm×150mm×50mm的塑料盒内，分别贮藏于25℃和1℃，相对湿度保持在95%左右。定期取样统计发病率以及病斑直径。每个处理3个重复，每个重复取10个果实，试验进行2次。

1.5 不同温度下病原菌对酵母拮抗菌在甜樱桃果实伤口处生长动态的影响

取1.4部分（A）与（B）两种处理的果实进行酵母拮抗菌生长动态的研究。具体方法为：用灭菌的打孔器从果实伤口处取直径和高度都为10mm的组织，放在已加入1.0ml的PBS（50mmol·L⁻¹，pH7.0）的研钵中，研磨后采用稀释平板法测定拮抗菌的数目，将所统计的酵母细胞数转化成lgCFU。接种病原菌后立即取样作为起始值（0h）。每个处理2个重复，每

个重复取 5 个果实。

1.6 病原菌和(或)酵母拮抗菌对甜樱桃果实中氧化酶与抗氧化酶的影响

1.6.1 酶液的提取 在距离果实伤口 2 mm 左右处切取 3 g 果实组织, 加入 20 ml 含有 0.5 g 聚乙烯吡咯烷酮(PVPP)的磷酸缓冲液($100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7.8), 冰浴下匀浆, 离心 50 min ($18\ 000\times g$, 4°C)后, 上清液用于酶活性测定与同工酶分析。

1.6.2 SOD 活性测定 SOD 活性测定参照 Constantine & Stanley 的方法^[9], 依据 SOD 抑制氮蓝四唑(nitro blue tetrazolium, NBT)在光下的还原作用来确定。3 ml 反应体系中含 $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ PBS(pH 7.8), $75 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NBT, $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA, $2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 核黄素, $13 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ dl-Met, $100 \mu\text{l}$ 酶液。以 PBS ($50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7.8) 代替酶液的反应体系作为对照(两个)。试验开始时一个对照置于暗处, 另一个对照与各处理的反应体系置于光强为 $60 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 的日光灯下照光 10 min 后, 立即遮光停止反应, 以黑暗处对照调零, 分别测定其它管在 560 nm 处的吸光值, SOD 活性单位以抑制 NBT 光还原的 50% 为 1 个酶活力单位。酶活性以 $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}\text{FW}$ 表示。每个处理重复测定 3 次。

1.6.3 CAT 活性测定 CAT 活性通过检测 240 nm 处 H_2O_2 的分解来测定, 参照 Beers 等的方法^[10], 并略有改进。3 ml 反应体系中含 2 ml PBS ($50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7.0), 0.5 ml H_2O_2 ($40 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), 0.5 ml 酶液, 反应温度为 30°C , 加酶液后 10 s 开始计时, 记录 1 min 内 240 nm 吸光度变化。酶活性以 $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}\text{FW}$ 表示。1 个活性单位定义为 1 min 催化 $1 \mu\text{mol}$ 的 H_2O_2 (A_{240} , $\epsilon = 36 \text{ mmol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) 分解的酶量。每个处理重复测定 3 次。

1.6.4 POD 活性测定 POD 活性测定参照 Chance & Maehly 的方法^[11], 稍作修改: 将 0.5 ml 粗酶提取液加入 2 ml 浓度为 $8 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 愈创木酚(用 $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ PBS 配制, pH 6.4)中, 加入 1 ml $24 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 H_2O_2 (用 $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ PBS 配制, pH 6.4)混匀, 反应温度 30°C , 30s 后在 460 nm 处扫描 2 min 内吸光度变化。酶活性以 $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}\text{FW}$ 表示。1 个活性单位定义为 1 min 氧化 $1 \mu\text{mol}$ 愈创木酚($\epsilon = 26.6 \text{ mmol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)的酶量。每个处理重复测定 3 次。

1.6.5 PPO 活性测定 PPO 活性测定参照 Waite 的方法^[12], 略有改进。0.5 ml 酶液加入 3 ml 浓度为 $500 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的邻苯二酚溶液(用 $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ PBS 配制, pH 6.4, 30°C 保温), 5 s 后开始扫描 10 s 内 398 nm 处吸光值变化。酶活性以 $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}\text{FW}$ 表示。1 个活性单

位定义为 1 min 氧化 $1 \mu\text{mol}$ 邻苯二酚($\epsilon = 1.4 \text{ mmol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)的酶量。每个处理重复测定 3 次。

1.6.6 PPO 同工酶谱分析 采用聚丙烯酰胺垂直板进行分离。不连续凝胶缓冲液为 Tris-HCl (pH 8.8), 分离胶浓度为 10%, 配胶比例 C=2.6%; 浓缩胶浓度为 4%。配胶比例 C=2.6%; 电极缓冲液为 Tris-Gly (pH 8.3)。 4°C 下电泳, 控制 20 mA 恒流, 3 h 后结束。

PPO 同工酶染色参照 Mohammadi & Kazemi 的方法^[13], 略有改动。将上述电泳完毕的凝胶板浸入 $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 柠檬酸- $200 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸钠缓冲液(含 $15 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 邻苯二酚和 0.05% 对苯二胺), 轻轻振荡, 至褐色酶带出现。用 $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 抗坏血酸冲洗 5 min, 制作干胶, 保存。

1.7 脂质过氧化产物的提取与测定

在距离果实伤口 2 mm 左右处切取 3 g 果实组织, 加入 15 ml 10% 三氯乙酸(TCA), 冰浴中匀浆, 离心 50 min ($18\ 000\times g$, 4°C), 上清液用于测定脂质过氧化产物的含量, 参照 Buege & Aust 的方法^[14]。取 0.5 ml 上述提取液中加入 0.8 ml 0.6% 的硫代巴比妥酸(TBA, 用 15% TCA 配成)溶液中, 混匀后在 95°C 加热 20 min, 迅速冷却并在 $12\ 000\times g$ 离心 10 min。取上清液分别在 532 nm 和 600 nm 波长测定吸光度值, 并计算脂质过氧化产物含量。

1.8 数据的统计与分析

所有数据采用 SPSS 软件进行统计。邓肯氏多重差异比较或 t 检验, 当 $P < 0.05$ 时, 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 甜樱桃果实褐腐病的产生及拮抗菌 *C. laurentii* 的防治作用

图 1 显示在两种贮藏温度下, 病原菌 *M. fructicola* 侵染甜樱桃果实产生病害的过程以及拮抗菌 *C. laurentii* 的防治效果。可以看出, *M. fructicola* 作为甜樱桃果实的主要致病菌, 在 25°C 下接种 48 h 后便导致全部果实产生病害, 病斑直径达到 13.4 mm, 96 h 后病斑直径扩展为 22.1 mm; 而拮抗菌 *C. laurentii* 与 *M. fructicola* 共接种时, 果实在 48 h 内不产生病害, 96 h 后果实发病率只有 13%, 病斑直径仅为 2.2 mm。

在 1°C 下, 所有处理的甜樱桃果实贮藏 21 d 时均未发病, 说明 1°C 能延缓甜樱桃果实褐腐病的发生, 但贮藏 40 d 后单独接种 *M. fructicola* 的果实发病率达到 100%, 在随后 25°C 贮藏 3 d 的货架期中病斑直径从 12.6 mm 迅速扩展为 32.7 mm; 而与拮抗菌 *C. laurentii*

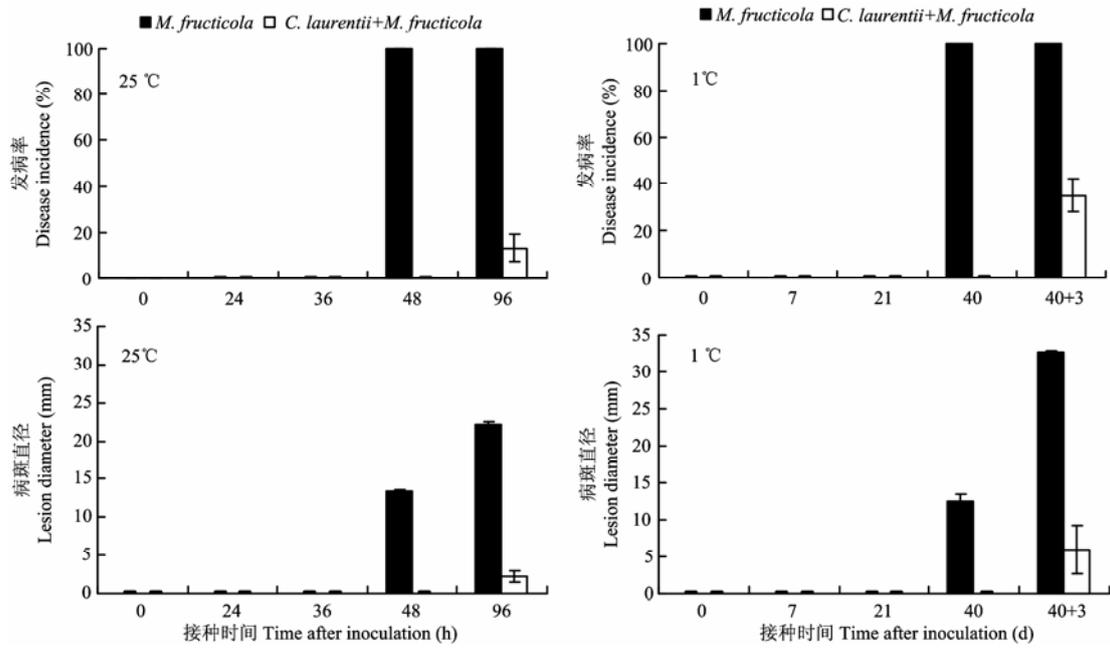


图1 两种温度下(25°C, 1°C) *C. laurentii* 对甜樱桃果实褐腐病 *M. fructicola* 的抑制效果

Fig. 1 Disease incidence (top) and lesion diameter (bottom) in sweet cherry fruit inoculated with *M. fructicola* alone or *M. fructicola* plus *C. laurentii* at 25°C or 1°C

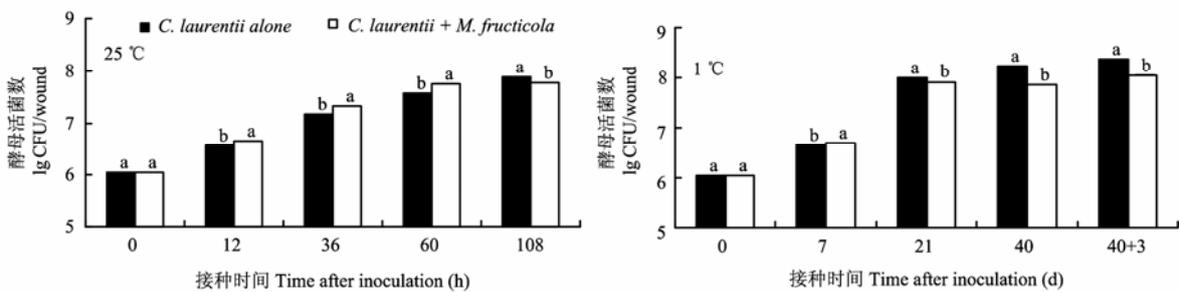
共接种的果实在贮藏40 d没有发病, 转入25°C贮藏3 d后的发病率也仅为35%, 病斑直径只有5.9 mm。

2.2 病原菌 *M. fructicola* 对拮抗菌 *C. laurentii* 在甜樱桃果实伤口处生长的影响

在25°C下, 单独接种的 *C. laurentii* 能在甜樱桃果实伤口处迅速定殖(图2)。与单独接种拮抗菌相比, 接种 *C. laurentii* + *M. fructicola* 在前期显著刺激了酵母

拮抗菌在伤口处的快速繁殖, 而在接种后期(108 h)则显著抑制了拮抗菌 *C. laurentii* 的生长。

拮抗菌 *C. laurentii* 在低温1°C下仍能快速繁殖, 病原菌同样能刺激拮抗菌的生长, 但贮藏21 d后病原菌对拮抗菌的生长由促进转为抑制。结果表明, 病原菌对拮抗菌生长的影响具有阶段性, 往往在接种初期促进作用比较明显, 但后期则有抑制作用。



在每个观察时间点, 标有不同字母的处理之间 *t* 检验差异显著 ($P < 0.05$)

At each point of time, data followed by different letters were significantly different according to paired sample *t* test at $P < 0.05$

图2 两种温度下(25°C, 1°C) 病原菌 *M. fructicola* 对拮抗菌 *C. laurentii* 生长动态的影响

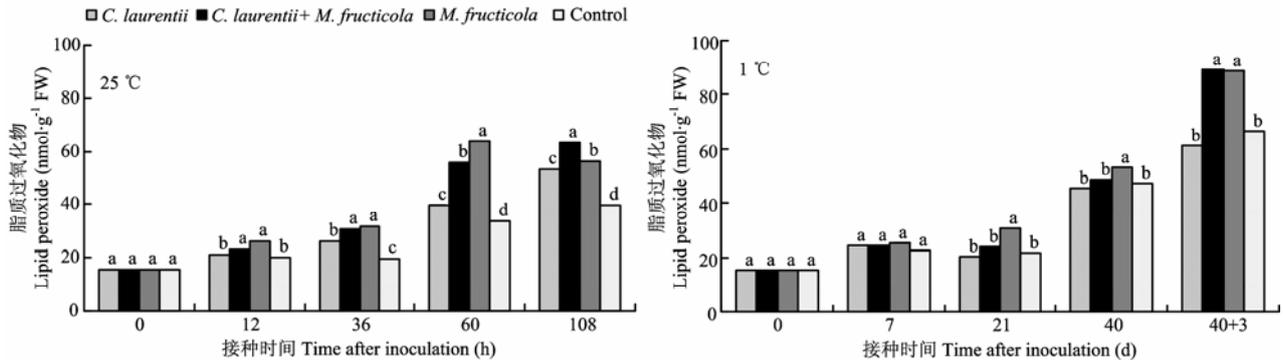
Fig. 2 Population dynamics of *C. laurentii* in wounds of sweet cherry fruit with or without *M. fructicola* at 25°C or 1°C

2.3 病原菌和（或）拮抗菌对甜樱桃果实脂质过氧化的影响

从图 3 可以看出，在 25℃ 下贮藏，无论单独接种病原菌 *M. fructicola* 还是接种 *C. laurentii* + *M. fructicola* 均能迅速诱导甜樱桃果实产生脂质过氧化。接种 60 h 后，单独接种 *M. fructicola* 的果实脂质过氧化程度显著强于接种 *C. laurentii* + *M. fructicola*，这可能由于前者已经发病所致。而拮抗菌 *C. laurentii* 对果实脂质过氧化产物的诱导效应在接种 36 h 时才开始出

现，且与病原菌 *M. fructicola* 相比诱导效应比较弱。

在 1℃ 贮藏 7 d 时，甜樱桃果实的脂质过氧化产物含量有所升高，但处理之间差异不显著。从贮藏 21 d 开始，单独接种 *M. fructicola* 诱导果实脂质过氧化产物显著增加；但接种拮抗菌 *C. laurentii* 的果实脂质过氧化产物在整个贮藏期间与对照没有明显差异。接种 *C. laurentii* + *M. fructicola* 在低温贮藏期间也不能诱导果实脂质过氧化，但贮藏 40 d 后转入 25℃ 诱导效果非常显著。



在每个观测时间点，标有不同字母的处理之间邓肯氏多重检验差异显著 ($P < 0.05$)。下同

At each point of time, data followed by different letters were significantly different according to Duncan's multiple range test at $P < 0.05$. The same as below

图 3 两种温度下 (25℃, 1℃) *M. fructicola* 和 (或) *C. laurentii* 对甜樱桃果实脂质过氧化的影响

Fig. 3 Changes of lipid peroxidation production in sweet cherry fruit inoculated with *C. laurentii*, *C. laurentii* + *M. fructicola*, *M. fructicola*, and the control at 25℃ or 1℃

2.4 病原菌和（或）酵母拮抗菌对甜樱桃果实 SOD 活性的影响

图 4 的结果表明，在 25℃ 贮藏时，对照果实 SOD 活性呈现先升高后降低的变化趋势。单独接种 *M. fructicola* 能诱导甜樱桃果实接种初期的 SOD 活性升高，但在发病前 (36 h) 显著抑制 SOD 活性，而病害产生后 (60 h) 又明显诱导 SOD 活性。接种 *C. laurentii* + *M. fructicola* 的果实 SOD 活性在初期与对照没有明显差别，但在接种后期显著高于对照处理。拮抗菌 *C. laurentii* 在接种 12 h 时对 SOD 活性显著抑制，但随着时间的延长，拮抗菌 *C. laurentii* 对果实的 SOD 活性逐渐由抑制转为诱导。

在 1℃ 贮藏时，不同处理的果实 SOD 活性在最初 7d 内保持稳定而且各处理之间没有显著差异，但贮藏 21 d 后 SOD 活性迅速升高了 2.8~3.3 倍。与对照相比，单独接种拮抗菌 *C. laurentii* 或病原菌 *M. fructicola* 均显

著诱导果实 SOD 活性升高，其中又以接种 *C. laurentii* + *M. fructicola* 的诱导效果最为显著，表现出 *C. laurentii* 与 *M. fructicola* 的协同作用。贮藏 40 d 后，转入 25℃ 后接种 *C. laurentii* + *M. fructicola* 或单独接种 *M. fructicola* 的果实 SOD 活性显著高于对照，但拮抗菌 *C. laurentii* 的诱导效果不明显。

2.5 病原菌和（或）酵母拮抗菌对甜樱桃果实 CAT 活性的影响

从图 5 可以看出，在 25℃ 贮藏时，单独接种病原菌 *M. fructicola* 和接种 *C. laurentii* + *M. fructicola* 都能在 12 h 内迅速诱导果实 CAT 活性升高，相比而言，单独接种 *M. fructicola* 的诱导作用更强。但单独接种病原菌 *M. fructicola* 的果实在发病前 (36 h) 显著抑制 CAT 活性，病害产生后 (60 h) 又迅速升高。单独接种拮抗菌 *C. laurentii* 的果实 CAT 活性在整个试验期间与对照差异不显著。

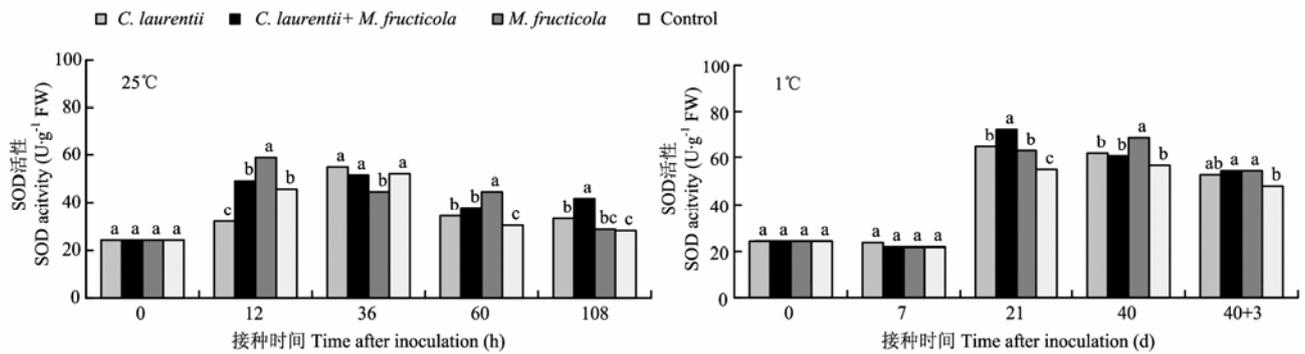


图 4 两种温度下 (25°C, 1°C) *M. fructicola* 和 (或) *C. laurentii* 对甜樱桃果实 SOD 活性的影响

Fig. 4 Changes of SOD activity in sweet cherry fruit inoculated with *C. laurentii*, *C. laurentii* + *M. fructicola*, *M. fructicola*, and the control at 25°C or 1°C

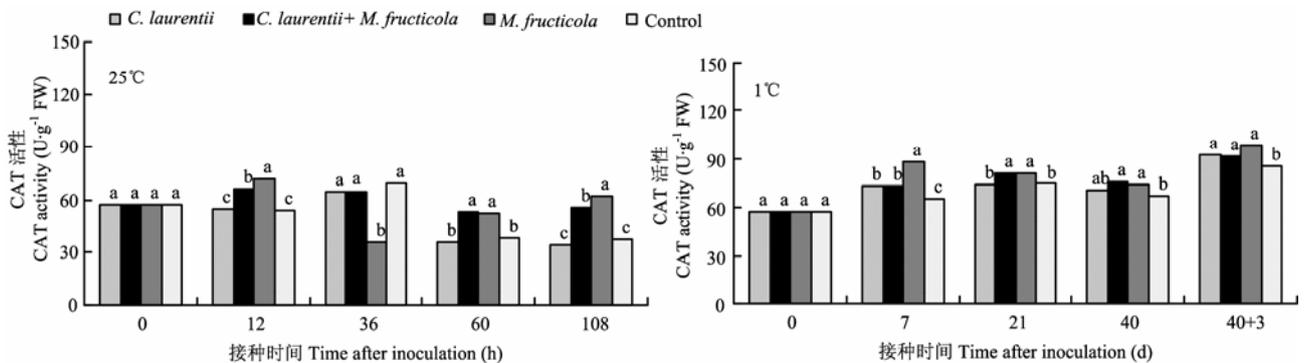


图 5 两种温度下 (25°C, 1°C) *M. fructicola* 和 (或) *C. laurentii* 对甜樱桃果实 CAT 活性的影响

Fig. 5 Changes of CAT activity in sweet cherry fruit inoculated with *C. laurentii*, *C. laurentii* + *M. fructicola*, *M. fructicola*, and the control at 25°C or 1°C

在 1°C 贮藏温度下, 单独接种病原菌 *M. fructicola* 和接种 *C. laurentii* + *M. fructicola* 的果实 CAT 活性在整个贮藏期间均显著高于对照。而单独接种拮抗菌 *C. laurentii* 对果实 CAT 的诱导作用比较弱。

2.6 病原菌和 (或) 酵母拮抗菌对甜樱桃果实 POD 活性的影响

图 6 的结果表明, 在 25°C 下, 单独接种 *M. fructicola* 的果实 POD 活性在接种 12 h 内显著高于对照, 但在发病前 (36 h) POD 活性被显著抑制, 而发病后 (60 h) POD 活性又迅速升高, 约为其它处理的 2.6~3.4 倍。单独接种 *C. laurentii* 对果实 POD 活性的诱导在接种 12 h 内不明显, 但随后则逐渐增强。在整个试验期间, 接种 *C. laurentii* + *M. fructicola* 均显著诱导了果实 POD 活性, 而且随着时间的延长诱导作用逐渐增强。

在 1°C 贮藏期间, 对照处理的甜樱桃果实 POD 活性一直保持稳定。而各种生物激发子对果实 POD 活性的诱导作用随着贮藏时间的延长而逐渐增强, 贮藏 40 d 时, 接种 *M. fructicola*, *C. laurentii*, 以及 *C. laurentii* + *M. fructicola* 的果实 POD 活性分别为对照的 2.3、1.9 和 1.7 倍

2.7 病原菌和 (或) 酵母拮抗菌对甜樱桃果实 PPO 活性的影响

在 25°C 下, 各处理的果实 PPO 活性在最初 12 h 内升高了 1.9~3.3 倍 (图 7)。单独接种病原菌 *M. fructicola* 或拮抗菌 *C. laurentii* 时, 甜樱桃果实的 PPO 在整个试验期间均显著低于对照。而接种 *C. laurentii* + *M. fructicola* 时, 处理果实的 PPO 活性在最初 36 h 内被显著诱导, 但随后同样显著低于对照。

在 1°C 下, 接种各种生物激发子后, 果实的 PPO

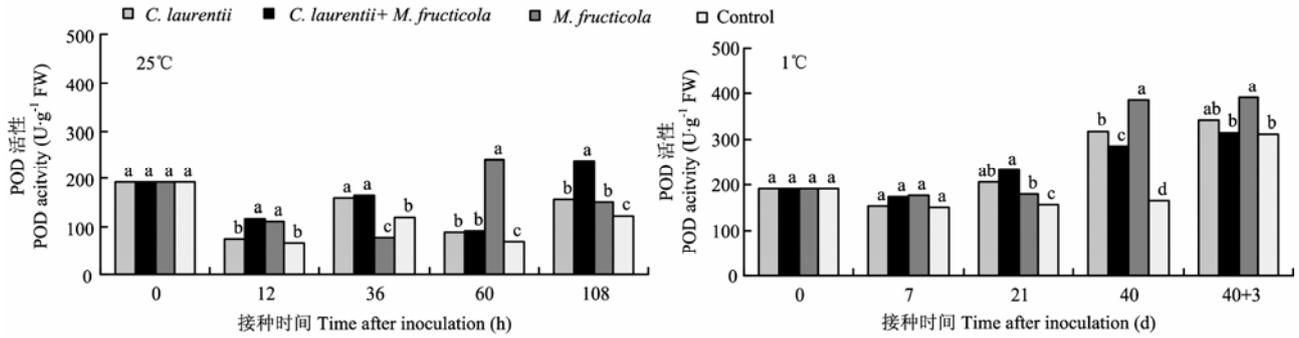


图 6 两种温度下 (25°C, 1°C) *M. fructicola* 和 (或) *C. laurentii* 对甜樱桃果实 POD 活性的影响

Fig. 6 Changes of POD activity in sweet cherry fruit inoculated with *C. laurentii*, *C. laurentii* + *M. fructicola*, *M. fructicola*, and the control at 25°C or 1°C

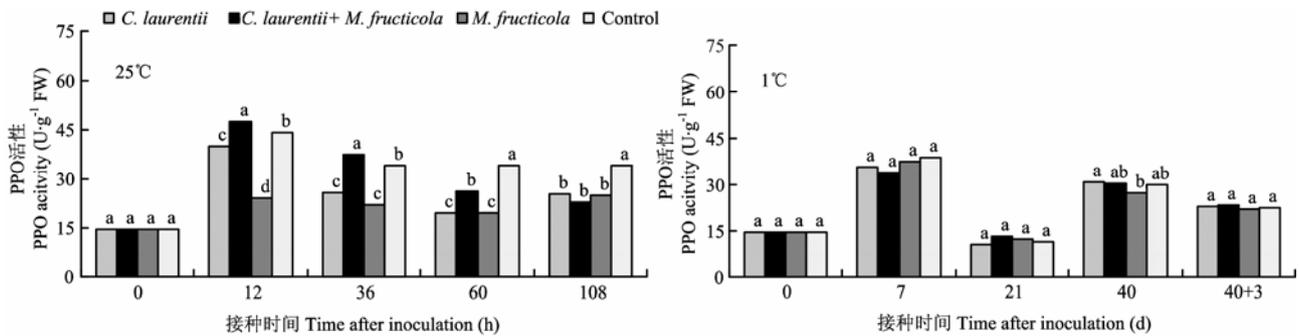


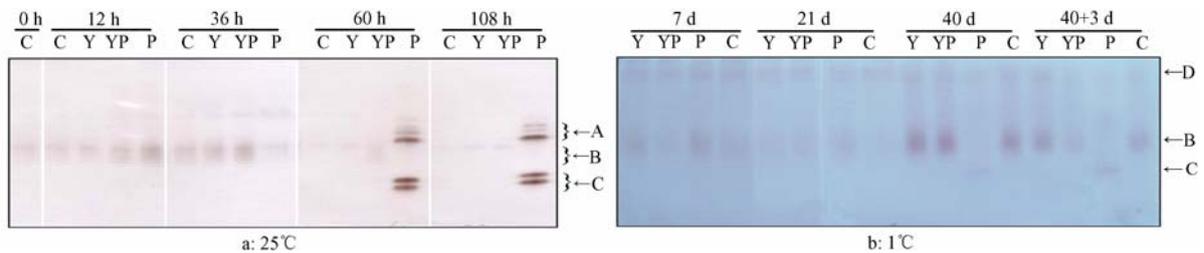
图 7 两种温度下 (25°C, 1°C) *M. fructicola* 和 (或) *C. laurentii* 对甜樱桃果实 PPO 活性的影响

Fig. 7 Changes of PPO activity in sweet cherry fruit inoculated with *C. laurentii*, *C. laurentii* + *M. fructicola*, *M. fructicola*, and the control at 25°C or 1°C

活性在整个贮藏期间与对照相比差异不显著；但各处理的果实 PPO 活性在接种 7 d 时内升高了 2.4~2.7 倍，随后则迅速下降，在贮藏 40 d 时又显著升高。

2.8 病原菌和 (或) 酵母拮抗菌对甜樱桃果实 PPO 同工酶谱的影响

从图 8-a 可以看出，在 25°C 下，病原菌 *M. fructicola*



横标中 Y: 只接种 *C. laurentii*; YP: *C. laurentii* 与 *M. fructicola* 共接种; P: 只接种 *M. fructicola*; C: 对照。纵标中, A、B、C、D 分别表示不同处理下出现的同工酶区带

Horizontal line: Y: *C. laurentii*-inoculated; YP: *C. laurentii* + *M. fructicola* co-inoculated; P: *M. fructicola*-inoculated; C: Control. Vertical line: A, B, C, D indicated the different regions of isoenzyme bands of polyphenol oxidase

图 8 两种温度下病原菌 *M. fructicola* 和 (或) 酵母拮抗菌 *C. laurentii* 对甜樱桃果实 PPO 同工酶谱的影响

Fig. 8 Active staining of polyphenol oxidase in sweet cherry fruit at 25°C (a) and 1°C (b)

侵染甜樱桃果实产生病害的过程中, PPO 的同工酶谱发生了明显变化: 在发病前 (36 h), B 区酶带消失, 而发病后 (60, 108 h) 则在 A 区和 C 区共出现了 5 条新的同工酶带, 可以推断这 5 条新酶带是病原菌 *M. fructicola* 特异性诱导表达的, 因为它们在单独接种拮抗菌 *C. laurentii* 和接种 *C. laurentii* + *M. fructicola* 的果实中均未出现。

当在 1℃ 贮藏时, 所有处理的果实均在 D 区出现新的同工酶带, 因此, 推测 D 区酶带为低温诱导表达的 (图 8-b)。而贮藏 40 d 后, 单独接种病原菌 *M. fructicola* 的果实中 B 区 PPO 同工酶带消失, 而在 C 区出现微弱的新酶带, 而此时该处理的所有果实已经发病, 暗示甜樱桃果实发病后抑制 B 区同工酶表达, 而诱导 C 区同工酶酶带。而其它处理的 B 区 PPO 同工酶强度明显增加, 而转入 25℃ 后显著变弱, B 区同工酶带可能与果实后期 PPO 活性升高相关。

3 讨论

本试验结果表明, 单独接种病原菌 *M. fructicola* 时, 甜樱桃果实在 25℃ 和 1℃ 下均能发病, 虽然拮抗菌 *C. laurentii* 能有效延缓甜樱桃果实 *M. fructicola* 病害的发生并降低病害的严重程度, 但至试验结束时, 拮抗菌处理的部分果实仍然发病, 暗示拮抗菌 *C. laurentii* 对病原菌 *M. fructicola* 的作用为抑菌而不是杀菌, 这符合酵母拮抗菌的作用特点^[15]。同时本试验结果表明, 当病原菌 *M. fructicola* 与酵母菌 *C. laurentii* 共同接种到果实伤口处后, 接种初期拮抗菌的生长速度受到显著刺激而提高, 但在后期却被显著抑制。笔者所在实验室以前的研究也发现类似现象^[16]。对于病原菌是如何刺激酵母拮抗菌快速生长的, 还需要进一步研究。

活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 积累能导致膜脂质过氧化, 而 SOD, CAT 和 POD 是 ROS 代谢中的关键酶, 因此, 脂质过氧化产物的形成和抗氧化酶的诱导是 ROS 过量产生、产生氧化胁迫标志^[17-19]。本试验的结果显示, 在 25℃ 下, 病原菌 *M. fructicola* 在接种 12 h 内显著诱导果实抗氧化酶 SOD、CAT 和 POD 活性升高, 暗示接种病原菌 *M. fructicola* 能迅速诱导果实大量产生 ROS 并造成氧化胁迫^[20]。虽然病症产生前 (36 h) 果实中抗氧化酶活性被显著抑制, 但组织中的脂质过氧化产物的持续增加暗示此时仍有大量 ROS 产生, 而发病后 (60 h) 抗氧化酶与脂质过氧化程度的加快说明果实组织已处于高度氧化状态。低

温贮藏虽然能延缓病原菌对果实侵染的速度, 在接种前期 (21 d) 和果实发病后 (40 d) 同样发现抗氧化酶与脂质过氧化产物迅速升高的现象, 暗示在不同温度下病原菌 *M. fructicola* 侵染果实时均能诱导果实产生大量 ROS 导致氧化胁迫。

接种拮抗菌 *C. laurentii* 后 12 h 内果实 SOD 活性显著低于对照, 而 CAT 和 POD 活性以及脂质过氧化产物则与对照没有明显差异, 说明接种拮抗菌 *C. laurentii* 初期果实没有产生氧化胁迫, 这可能在接种初期 *C. laurentii* 主要是利用伤口处的营养成分进行繁殖, 同时拮抗菌的数量相对较少的缘故。而接种 108 h 后 *C. laurentii* 能够显著诱导果实 SOD 与 POD 活性、抑制 CAT 活性, 并提高脂质过氧化产物含量, 这一方面可能此时菌体的数量已大大增加, 对果实的作用力也大大提高, 但也不排除 *C. laurentii* 耗尽养分达到稳定期后, 产生一些物质作为激发子对果实产生效应; 但与病原菌 *M. fructicola* 比, 拮抗菌 *C. laurentii* 对果实的作用效应比较弱。虽然在低温下拮抗菌 *C. laurentii* 处理的果实脂质过氧化产物与对照相比无明显差别, 但在贮藏 40 d 时 POD 活性的大幅度诱导同样表明拮抗菌对果实的作用。

接种 *C. laurentii* + *M. fructicola* 能迅速诱导果实 SOD、CAT 和 POD 活性并加速脂质过氧化, 表明大量 ROS 开始产生, 但由于 *C. laurentii* 单独接种时并不诱导果实产生氧化胁迫, 因此这种氧化胁迫主要由 *M. fructicola* 激发的。可以想象, 在接种初期, 病原菌 *M. fructicola* 一方面能够刺激 *C. laurentii* 在果实伤口处快速繁殖, 同时又诱导果实产生大量 ROS, 暗示在拮抗菌与病原菌共同接种的伤口处病原菌对寄主的作用没有停止。而在 108 h 时, 接种 *C. laurentii* + *M. fructicola* 果实的抗氧化酶活性和脂质过氧化程度则明显表现为拮抗菌与病原菌的共同作用, 使伤口周围的组织处于高度氧化状态, 这可能是此时拮抗菌 *C. laurentii* 活菌数下降的原因之一, 同时也可能是导致部分果实开始发病的原因。因此, 在 *M. fructicola* 侵染甜樱桃果实产生病害过程中可能主动诱导寄主积累大量 ROS, 以杀死寄主细胞、扩展其病害。Tiedemann 也认为病原菌 *Botrytis cinerea* 能通过诱导寄主产生大量 ROS 来产生病害^[21]。

由于 PPO 能催化果实内源酚酸氧化成醌类物质, 醌类聚合并与细胞内蛋白质的氨基酸结合, 产生黑色或褐色色素沉淀, 因而能引起果实褐变^[22]。同时, 由于醌类物质比酚类的毒性更强, 能直接对病原菌作用,

因而在抗病反应中发挥作用^[23,24]。有研究表明病原菌 *R. stolonifer* 或接种 *P. membranaefaciens* + *R. stolonifer* 能诱导桃果实 PPO 活性的升高^[25]。但本研究的结果表明, 单独接种 *C. laurentii* 或 *M. fructicola* 时, 使甜樱桃果实的 PPO 活性显著降低。同时发现, 在两种温度下, 发病后果实 PPO 同工酶谱中 B 区酶带消失, 暗示 B 区酶带可能与果实抗病性相关。而由于 A 区和 C 区的同工酶为 *M. fructicola* 发病后能够特异诱导, 因此它们只是 *M. fructicola* 病害产生后的一种防御反应。甜樱桃组织中酚类化合物种类繁多, 而不同形式的 PPO 同工酶具有一定的底物专一性^[26]。因此, 在 *M. fructicola* 侵染甜樱桃过程中 PPO 同工酶谱的变化可能反映了甜樱桃果实中酚类物质代谢途径的变化。从酚类物质代谢的角度, 深入探讨 PPO 同工酶谱在不同条件下的变化规律, 对揭示 PPO 在果实抗病反应中的作用, 具有重要的理论意义与应用价值。

4 结论

在酵母拮抗菌 *C. laurentii*、病原菌 *M. fructicola* 与甜樱桃果实的相互作用中, 酵母拮抗菌 *C. laurentii* 在 25 和 1 °C 下均能有效抑制甜樱桃果实褐腐病 *M. fructicola* 发生。病原菌 *M. fructicola* 在接种初期刺激酵母拮抗菌 *C. laurentii* 的生长, 而后期则对拮抗菌的生长有抑制作用。单独接种病原菌 *M. fructicola* 或同时接种拮抗菌和病原菌均能诱导甜樱桃果实 SOD、CAT 和 POD 等抗氧化酶活性升高并加速脂质过氧化作用。病原菌 *M. fructicola* 侵染甜樱桃果实发病后能特异诱导果实 PPO 同工酶新酶带出现; 而拮抗菌 *C. laurentii* 对果实的抗氧化酶体系、脂质过氧化程度以及 PPO 同工酶谱的作用效果相对较弱。因此, 甜樱桃果实褐腐病病害发生受到抑制的主要原因是 *M. fructicola* 刺激拮抗菌的生长并诱导果实抗性相关酶活性升高。

References

- [1] Droby S, Chalutz E. Mode of action of biocontrol agents for postharvest diseases. In: Wilson C L, Wisniewski M E (eds). *Biological Control of Postharvest Diseases of Fruits and Vegetables-Theory and Practice*. Florida, Boca Raton, CRC Press, 1994: 63-75.
- [2] Filonow A B. Role of competition for sugars by yeasts in the biocontrol of gray mold of apple. *Biocontrol Science and Technology*, 1998, 8: 243-256.
- [3] Wan Y K, Tian S P. Antagonistical mode of *Pichia membranaefaciens* to *Rhizopus stolonifer* in wounds of peach fruit. *Acta Botanica Sinica*, 2002, 44: 1384-1386.
- [4] Ippolito A, El-Ghaouth A, Wilson C L, Wisniewski M. Control of postharvest decay of apple fruit by *Aureobasidium pullulans* and induction of defense responses. *Postharvest Biology and Technology*, 2000, 19: 265-272.
- [5] Castoria R, Caputo L, de Cicco F, de Cicco V. Resistance of postharvest biocontrol yeast to oxidative stress: A possible new mechanism of action. *Phytopathology*, 2003, 93: 564-572.
- [6] Tian S P, Fan Q, Xu Y, Wang Y, Jian A L. Evaluation of the use of high CO₂ concentrations and cold storage to control *Monilinia fructicola* on sweet cherries. *Postharvest Biology and Technology*, 2001, 22: 53-60.
- [7] Qin G Z, Tian S P, Xu Y. Biocontrol of postharvest diseases on sweet cherries by four antagonistic yeasts in different storage conditions. *Postharvest Biology and Technology*, 2004, 31: 51-58.
- [8] Qin G Z, Tian S P, Liu H B, Xu Y, Xu Yong. Biocontrol efficacy of three antagonistic yeasts against *Penicillium expansum* in harvested apple fruits. *Acta Botanica Sinica*, 2003, 45: 417-421.
- [9] Constantine N G, Stanley K R. Superoxide dismutases. *Plant Physiology*, 1977, 59: 309-314.
- [10] Beers R F, Jr, Sizer I W. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *Journal Biological Chemistry*, 1952, 95: 133-140.
- [11] Chance B, Maehly A C. Assay of catalase and peroxidases. *Methods in Enzymology*, 1955, 2: 764-775.
- [12] Waite J H. Calculating extinction coefficients for enzymatically produced o-quinones. *Analytical Biochemistry*, 1976, 75: 211-218.
- [13] Mohammadi M, Kazemi H. Changes in peroxidase and polyphenol oxidase activities in susceptible and resistant wheat heads inoculated with *Fusarium graminearum* and induced resistance. *Plant Science*, 2002, 162: 491-498.
- [14] Buege J A, Aust S D. Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*, 1978, 52: 302-310.
- [15] Janisiewicz W J, Korsten L. Biological control of postharvest diseases of fruits. *Annual Review of Phytopathology*, 2002, 40: 411-441.
- [16] Fan Q, Tian S P. Postharvest biological control of grey mold and blue mold on apple by *Cryptococcus albidus* (Saito) Skinner. *Postharvest Biology and Technology*, 2001, 21: 341-350.
- [17] Rice-Evans C A, Diplock A T, Symons M C R. Investigations of the consequences of free radical attack on lipids. In: Burdon R H, Knippenberg P H (eds). *Techniques in Free Radical Research*,

- Amsterdam: Elsevier, 1991: 125-183.
- [18] Bolwell G P, Butt V S, Davies D R, Zimmerlin A. The origin of the oxidative burst in plants. *Free Radical Research*, 1995, 23: 517-532.
- [19] Deighton N, Muckenschanbel I I, Goodman B A, Williamson B. Lipid peroxidation and the oxidative burst associated with infection of *Capsicum annuum* by *Botrytis cinerea*. *Plant Journal*, 1999, 20: 485-492.
- [20] Baker J C, Orlandi E W. Active oxygen in plant pathogenesis. *Annual Review of Phytopathology*, 1995, 33: 299-321.
- [21] Tiedemann A V. Evidence for a primary role of active oxygen species in induction of host cell death during infection of bean leaves with *Botrytis cinerea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 1997, 50: 151-166.
- [22] Martinez M V, Whitaker J R. The biochemistry and control of enzymatic browning. *Trends in Food Science and Technology*, 1995, 6: 195-200.
- [23] Mayer A M, Harel E. Polyphenol oxidases in plants. *Phytochemistry*, 1979, 18: 193-215.
- [24] Bashan Y, Okon Y, Henis Y. Peroxidase, polyphenoloxidase, and phenols in relation to resistance against *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* in tomato plants. *Canadian Journal of Botany*, 1985, 65: 366-372.
- [25] 秦国政, 田世平, 徐 勇, 刘海波. 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. *中国农业科学*, 2003, 36: 89-93.
- Qin G Z, Tian S P, Xu Y, Liu H B. Polyphenol oxidase, peroxidase and phenylalanine ammonium lyase in postharvest peach fruits induced by inoculation with *Pichia* *branfaciens* or *Rhizopus stolonifer*. *Scientia Agricultura Sinica*, 2003, 36: 89-93. (in Chinese)
- [26] Lanzarini G, Pifferi P G, Zamorani A. Specificity of an O-diphenol oxidase from *Prunus aiium* fruit. *Phytochemistry*, 1972, 11: 89-94.

(责任编辑 曲来娥)