

壳聚糖处理对两种马铃薯干腐病菌的抑制效果比较

燕璐,寇宗红,毕阳*,朱艳*,李永才,王毅
(甘肃农业大学食品科学与工程学院,甘肃兰州 730070)

摘要:由镰刀菌(*Fusarium*)引起的干腐病是马铃薯块茎采后的重要病害。本文通过体外和体内实验测定了不同浓度壳聚糖处理对马铃薯干腐病菌的抑制效果。结果表明,体外条件下壳聚糖处理能够有效抑制 *F. sulphureum* 和 *F. sambucinum* 的孢子萌发,不同浓度壳聚糖处理后 *F. sulphureum* 的孢子萌发相比对照下降了 92%,*F. sambucinum* 的孢子萌发几乎完全被抑制。壳聚糖处理能够有效抑制 *F. sulphureum* 和 *F. sambucinum* 的菌落直径的扩展,其中以 0.25% 处理效果最好,比同期对照分别下降 7.46% 和 8.9%,且对 *F. sambucinum* 的抑制效果较好。壳聚糖处理可显著降低 *F. sulphureum* 和 *F. sambucinum* 损伤接种马铃薯块茎切片的病斑直径,0.25% 的壳聚糖处理者的病斑直径分别低于对照 45.3% 和 34.5%,更高浓度处理并没有增加抑制效果。由此表明,壳聚糖可通过直接抑菌抑制马铃薯的干腐病。

关键词:马铃薯,壳聚糖,干腐病

Comparison of inhibition on two pathogens of dry rot in potato tubers by chitosan treatments

YAN Lu, KOU Zong-hong, BI Yang*, ZHU Yan*, LI Yong-cai, WANG Yi

(College of Food Science and Engineering, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China)

Abstract: Dry rot is an important postharvest disease of potato tubers caused by *Fusarium*. This study investigated the effects of chitosan at different concentrations against *F. sulphureum* and *F. sambucinum* of dry rot pathogens in potato tubers *in vitro* and *in vivo*. Results indicated that chitosan significantly inhibited the spore germination of two pathogens. The rate of spore germination of *F. sulphureum* was 92% lower than the control, and of *F. sambucinum* was completely inhibited. Chitosan also inhibited the mycelium growth of two pathogens, the mycelium diameter were 7.46% and 8.9% lower than the control at 0.25% of the optimum treatment concentration. Its inhibition showed more effective to *F. sambucinum*. Chitosan inhibited the lesion diameter of slices inoculated with *F. sulphureum* and *F. sambucinum*, and lesion diameters were 45.3% and 34.5% lower than the control at 0.25% of the optimum treatment concentration. Efficacy was not enhanced when the concentration of chitosan was increased. It is proposed that chitosan treatment could directly inhibit pathogen growth and decrease dry rot of potato tubers by induced resistance.

Key words: potatoes; chitosan; dry rot

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2015)13-0334-04

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2015.13.061

马铃薯 (*Solanum tuberosum*) 是我国重要的经济作物,其块茎在贮藏期间颇易发生腐烂,不仅影响品质,而且造成较大的经济损失^[1]。由镰刀菌 (*Fusarium*) 引起的干腐病是导致马铃薯块茎腐烂最重要的真菌性病害^[2],该病可占贮藏期间真菌性病害的 50% 以上^[3-4],其中硫色镰刀菌 (*F. sulphureum*) 和接骨木镰刀菌 (*F. sambucinum*) 是我国西北主产区的

重要病原物^[5]。

化学杀菌剂虽然可有效地控制马铃薯干腐病^[6],但由于杀菌剂残留、环境污染及诱导病原物产生抗药性等问题使其应用逐渐受到限制。因此急需筛选安全、有效的防腐剂替代化学杀菌剂^[7]。由自然界广泛存在的几丁质经脱乙酰作用得到的壳聚糖 (chitosan) 为地球上第二大可再生自然资源,是一种

收稿日期: 2014-09-18

作者简介: 燕璐 (1989-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 采后生物学。

* 通讯作者: 毕阳 (1962-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 采后生物学与技术。

朱艳 (1977-), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 采后生物学与技术。

基金项目: 国家科技支撑计划项目 (2012BAD06B03); 地区科学基金项目 (31460412); 甘肃农业大学“伏羲人才”项目 (FXYC20130110)。

应用前景广阔天然防腐剂^[8]。早在2001年就被美国FDA确认为“公认安全物质”(GRAS)^[9]。壳聚糖具有广谱的抗菌活性,对细菌^[10]及青霉、毛霉、曲霉在内的多种真菌都具有较强的抑制作用^[11-12]。壳聚糖可显著抑制真菌的孢子萌发、芽管伸长、菌丝生长和孢子的形成^[13-15],其抑菌活性取决于其分子量、脱乙酰度、溶液的pH以及目标生物敏感度^[16]。但尚未见壳聚糖对镰刀菌的抑制报道。此外,壳聚糖还可用于多种果实采后病害的控制,对冬枣青霉病^[17]、鲜食葡萄以及草莓的采后腐烂^[18-19]均具有良好的控制效果。但尚未见壳聚糖对马铃薯块茎干腐病的研究报道。本文拟研究不同浓度壳聚糖处理对*F. sulphureum*和*F. sambucinum*孢子萌发、菌落生长的抑制效果,以及不同浓度壳聚糖处理对损伤接种马铃薯块茎切片病斑直径的影响,以期对马铃薯干腐病的安全防治提供有效的方法。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

供试马铃薯(品种:陇薯3号)2013年10月采于甘肃省农业科学院渭源县会川实验基地;供试病原菌*F. sulphureum* 甘肃省农业科学院植物保护所提供;*F. sambucinum* 购于中国微生物菌种研究保藏管理中心;水溶性壳聚糖(食品级) 购于济南海得贝海洋生物工程有限公司。马铃薯葡萄糖琼脂培养基 每1L培养基:土豆200g,葡萄糖20g,琼脂15~20g,水1000mL,自然pH;琼脂 北京康倍斯科技有限公司。

SW-CJ-2FD 洁净工作台 苏净集团苏州安泰空气技术有限公司;LDZX-30KBS 立式压力蒸汽灭菌锅 上海申安医疗器械厂;DHP-9272B 恒温培养箱 上海一恒科技有限公司;CX21FS1C 生物显微镜 奥林巴斯(广州)工业有限公司;VXH-3 微型漩涡混合器 上海跃进医疗器械厂。

1.2 实验方法

1.2.1 孢子悬浮液的配制 参照周德庆方法^[20]。取25℃下培养7d的带菌PDA平皿一个,加入含0.05% Tween80的无菌水约10mL,用涂布器刮下平板上的病原菌孢子,然后转入50mL三角瓶中,在VXH-3微型漩涡混合器上振荡15s,再用双层纱布过滤,滤液用血球计数板计数算出孢子悬浮液的浓度后,最后稀释至所需浓度(1×10^6 孢子/mL)。

1.2.2 不同浓度壳聚糖处理对*F. sulphureum*和*F. sambucinum*孢子萌发的影响 参照杨玲玉^[21]方法。用镊子夹取直径为8mm的2%琼脂培养基圆饼并将其置于灭菌的载玻片上,然后分别加入10 μ L 0.125%、0.25%、0.5%和1.0%的壳聚糖溶液于培养基上,壳聚糖溶液以无菌蒸馏水配制,对照组加入10 μ L 无菌蒸馏水,再在其上加入10 μ L 孢子悬浮液。置于28℃下,连续数小时镜检萌发率,直到对照基本完全萌发。每次镜检100个孢子,重复3次。

1.2.3 不同浓度壳聚糖处理对*F. sulphureum*和*F. sambucinum*菌落直径的影响 参照盛占武^[22]方法。分别取0.125%、0.25%、0.5%和1.0%的壳聚糖溶液

100 μ L,均匀涂布在装有20mL PDA,直径为90mm的培养皿中,随后将直径8mm菌饼倒置于培养基中央,28℃避光培养5d,测定菌落直径。以无菌水处理作为对照,每处理3个平行,重复3次。

1.2.4 不同浓度壳聚糖处理对*F. sulphureum*和*F. sambucinum*损伤接种块茎切片病斑直径的影响 参照Li^[7]的方法并改进。选择外观整齐、无病虫害、无损伤的马铃薯块茎,清洗后用2%次氯酸钠溶液浸泡2min,冲洗后将马铃薯块茎切成10mm厚的切片,用直径为35mm打孔器打成圆片。切片先用无菌水清洗,再用75%酒精擦洗并在酒精灯火焰上灼烧去除多余酒精,置于灭菌的湿滤纸上,室温下黑暗放置4h。后取200 μ L浓度为0.125、0.25、0.5和1.0%的壳聚糖溶液,用灭菌的玻璃涂布器均匀涂布于马铃薯切片上,以无菌水处理为对照。然后在室温下(20℃)黑暗培养24h后接种病原物。接种方法:分别取PDA上培养7d的8mm的*F. sulphureum*和*F. sambucinum*菌饼,倒置接种于处理后的马铃薯切片中央,3d后用十字交叉法测量病斑直径,记录数据。每个处理8个切片,重复3次。

1.3 数据处理

全部实验数据用Microsoft Excel 2007和SPSS13.0数据处理系统进行统计处理。计算标准误差(\pm SE)或进行Duncan's多重差异显著分析。

2 结果与分析

2.1 不同浓度壳聚糖处理对*F. sulphureum*和*F. sambucinum*孢子萌发的影响

壳聚糖处理可有效抑制*F. sulphureum*(图1A)和*F. sambucinum*(图1B)的孢子萌发,对*F. sambucinum*的抑制效果优于*F. sulphureum*,但各浓度处理之间没有显著性差异。*F. sulphureum*经不同浓度壳聚糖处理后的孢子萌发率仅约为同期对照的8%,而不同浓度壳聚糖处理几乎完全抑制了*F. sambucinum*的孢子萌发。

2.2 不同浓度壳聚糖处理对*F. sulphureum*和*F. sambucinum*菌落直径的影响

不同浓度壳聚糖处理对*F. sulphureum*和*F. sambucinum*菌落生长的抑制效果存在差异,表现为低浓度有效而高浓度无效,其中0.25%壳聚糖处理对两株菌的抑制效果最好,抑制率分别为7.46%和8.9%(图1A、B)。虽然0.125%和0.25%的低浓度处理均显著抑制了*F. sulphureum*和*F. sambucinum*菌落直径的扩展,但两浓度处理之间无显著差异。当处理浓度升至0.5%时,仅对*F. sambucinum*的菌落生长显著抑制,对*F. sulphureum*则表现无效。当处理浓度增至1%时,壳聚糖对两株菌的菌落生长均表现无效。

2.3 不同浓度壳聚糖处理对损伤接种块茎切片病斑直径的影响

壳聚糖处理可有效抑制损伤接种块茎切片病斑直径的扩展,但抑制效果存在差异,其中以0.25%的处理效果最好,损伤接种*F. sulphureum*(图3A)和

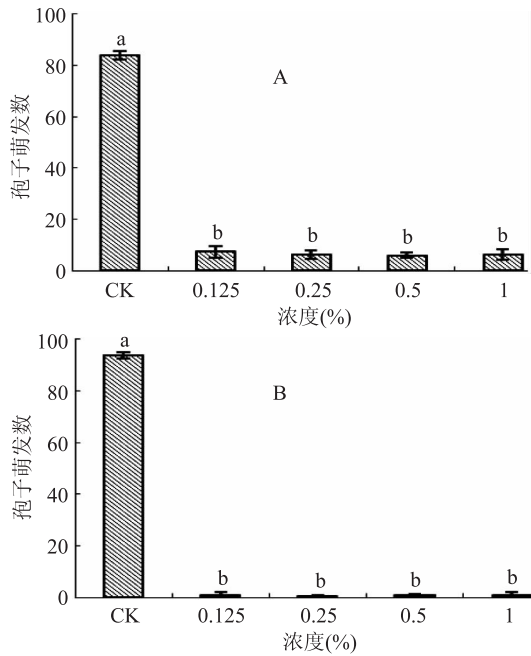


图1 不同浓度壳聚糖处理对 *F. sulphureum* (A) 和 *F. sambucinum* (B) 孢子萌发的影响

Fig.1 Effects of chitosan at different concentrations on spore germination of *F. sulphureum* (A) and *F. sambucinum* (B)

注:图中不同字母代表差异显著($p < 0.05$), 竖线表示标准误差($\pm SE$),图2、图3同。

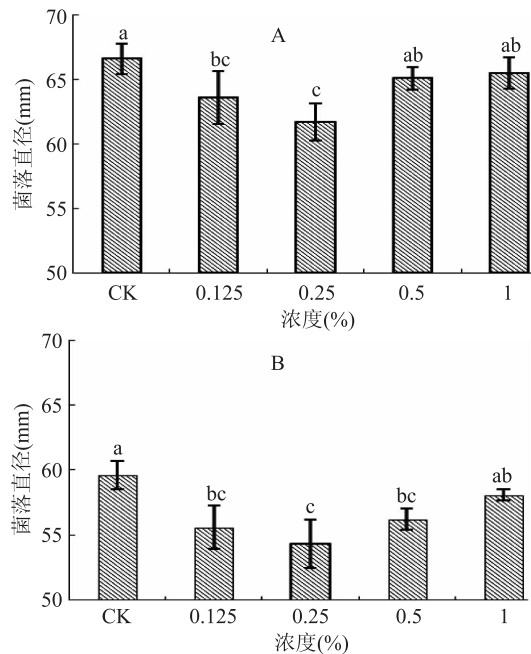


图2 不同浓度壳聚糖处理对 *F. sulphureum* (A) 和 *F. sambucinum* (B) 菌落生长的影响

Fig.2 Effects of chitosan at different concentrations on mycelial growth of *F. sulphureum* (A) and *F. sambucinum* (B)

F. sambucinum (图3B)的病斑直径分别比对照低45.3%和34.5%。0.125%壳聚糖处理对损伤接种 *F. sulphureum* 和 *F. sambucinum* 的病斑直径与对照间无显著性差异,0.5%壳聚糖处理可抑制两菌株损伤接种病斑直径的扩展,1%壳聚糖处理仅抑制了损伤

接种 *F. sambucinum* 的病斑直径。

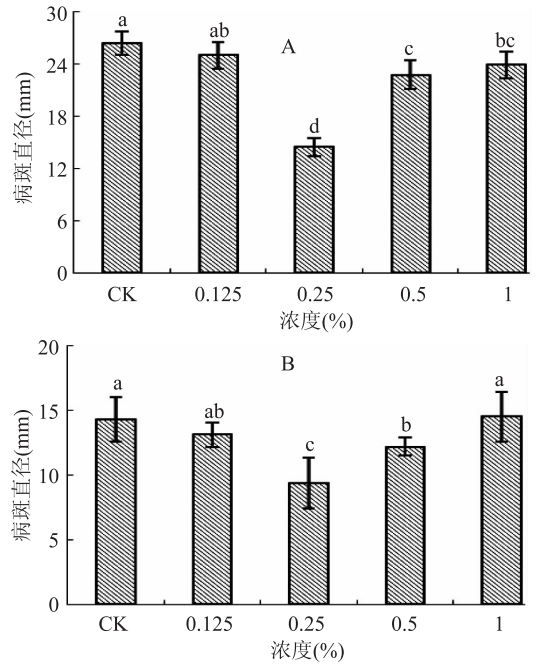


图3 不同浓度壳聚糖处理对损伤接种 *F. sulphureum* (A) 和 *F. sambucinum* (B) 块茎切片病斑直径的影响

Fig.3 Effects of chitosan at different concentrations on lesion diameters of slices inoculated with *F. sulphureum* (A) and *F. sambucinum* (B)

3 讨论

本文研究结果表明,壳聚糖处理能有效抑制 *F. sulphureum* 和 *F. sambucinum* 的孢子萌发。该结果与体外条件下壳聚糖抑制 *Botrytis cinerea* 和 *Alternaria kikuchiana* 孢子萌发的结果基本一致^[23-24]。壳聚糖对 *F. sulphureum* 孢子萌发抑制更为有效的原因可能与该病原物在孢子萌发阶段对壳聚糖更为敏感有关^[25]。由于壳聚糖的正电荷氨基与质膜磷脂的负电荷相互作用,造成质膜系统通透性的改变^[17],从而破坏孢子质膜^[26],导致孢子萌发失败。

壳聚糖处理对 *F. sulphureum* 和 *F. sambucinum* 菌落生长所表现出的低浓度有效、高浓度无效的抑制结果,其中0.25%壳聚糖处理效果最好,该结果与Sudarshan等的研究类似^[27],适当的低浓度壳聚糖处理可以与病原菌细胞表面所带的负电荷中和,使细胞胶合在一起,而高浓度的壳聚糖可能使病原菌细胞表面带一定数量的正电荷,从而使细胞处于悬浮状态,不能胶合^[28]。另一方面,由于浓度高、黏度大的壳聚糖不易透过细胞壁;而低浓度的壳聚糖容易穿透细胞壁进入细胞内部,与细胞内物质进一步作用,扰乱病原菌的合成和代谢,导致病原菌不能正常生长和繁殖,从而发挥其抗菌作用^[29-30]。

壳聚糖处理可有效抑制马铃薯块茎切片损伤接种 *F. sulphureum* 和 *F. sambucinum* 的病斑直径的扩展,其中以0.25%壳聚糖处理效果最好。这种抑制效果可能与壳聚糖处理诱导了块茎的抗病性有关^[31]。本实验室前期研究表明,壳聚糖处理能明显促进马铃薯切片活性氧的积累,增加过氧化氢酶和谷胱甘肽

还原酶活性,降低超氧化物歧化酶和抗坏血酸过氧化物酶的活性,通过诱导活性氧迸发而启动马铃薯组织的抗病反应^[32]。更高浓度的处理并没有达到更好的效果,可能与高浓度壳聚糖对块茎切片造成了损伤,导致组织抗病力降低有关。

4 结论

壳聚糖处理可有效抑制 *F. sulphureum* 和 *F. sambucinum* 的孢子萌发和菌落生长,也可抑制损伤接种 *F. sulphureum* 和 *F. sambucinum* 块茎切片的病斑直径扩展。综合比较不同浓度壳聚糖处理对马铃薯干腐病菌的抑制效果,0.25% 浓度壳聚糖对马铃薯干腐病抑制效果最好。由此表明,壳聚糖除了直接的抑菌作用外,还具有诱导马铃薯块茎抗病性的功能。

参考文献

- [1] 孙小娟,李永才,毕阳,等.西北地区马铃薯贮藏期病害调查分析[J].中国马铃薯,2009,23(6):364-365.
- [2] 李金花,柴兆祥,王蒂,等.甘肃马铃薯贮藏期真菌性病害病原菌的分离鉴定[J].兰州大学学报,2007,43(2):39-42.
- [3] 魏周全,张廷义,杜奎.马铃薯块茎干腐病发生危害及防治[J].植物保护,2006,32(2):103-105.
- [4] 杨志敏,毕阳,李永才,等.马铃薯干腐病菌疏色镰孢的生物学特性[J].菌物学报,2012,31(4):574-583.
- [5] 杨志敏,毕阳,李永才,等.马铃薯干腐病菌侵染过程中切片组织胞壁降解酶的变化[J].中国农业科学,2012(1):127-134.
- [6] 胡林刚,李渐鹏,李永才,等.外源 H₂O₂ 处理对马铃薯块茎干腐病的控制及其机理[J].中国农业科学,2013,46(22):4745-4752.
- [7] Li Y C, Bi Y, Ge Y H, et al. Antifungal activity of sodium silicate on *Fusarium sulphureum* and its effect on dry rot of potato tubers[J]. Journal of Food Science, 2009, 74(5): 213-218.
- [8] 寇宗红,毕阳,李永才,等.柠檬酸处理对两种马铃薯干腐病菌的抑制效果比较[J].食品工业科技,2013,34(14):314-316.
- [9] 李小芳.壳聚糖抑菌活性及机理研究[D].兰州:兰州大学,2009.
- [10] 朱旭明,郑铁生.克氏螯虾壳聚糖对细菌表面作用机理研究[J].食品科学,2009(9):155-157.
- [11] Liu J, Tian S P, Meng X H, et al. Control effects of chitosan on postharvest diseases and physiological response of tomato fruit[J]. Postharvest Biology and Technology, 2007, 44(3): 300-306.
- [12] 吴清平,陈威,张菊梅,等.壳聚糖衍生生物抗菌活性研究进展[J].食品科学,2009,30(5):269-272.
- [13] Yang L Y, Zhang J L, Bassett C L, et al. Difference between chitosan and oligochitosan in growth of *Monilinia fructicola* and control of brown rot in peach fruit[J]. LWT- Food Science and Technology, 2012, 46(1): 254-259.
- [14] Guerrero J, Jansson H B, Salinas J, et al. Effect of chitosan on hyphal growth and spore germination of plant pathogenic and biocontrol fungi[J]. Journal of Applied Microbiology, 2008, 104(2): 541-553.
- [15] Fernández-Saiz P, Sánchez G, Soler C, et al. Chitosan films for the microbiological preservation of refrigerated sole and hake fillets[J]. Food Control, 2013, 34(1): 61-68.
- [16] Kushwaha S K S, Rai A K, Singh S. Chitosan: a platform for targeted drug delivery[J]. International Journal of PharmTech Research, 2010, 2(2): 2271-2282.
- [17] Wang L T, Wu H, Qin G Z, et al. Chitosan disrupts *Penicillium expansum* and controls postharvest blue mold of jujube fruit[J]. Food Control, 2014, (41): 56-62.
- [18] Meng X H, Li B Q, Liu J, et al. Physiological responses and quality attributes of table grape fruit to chitosan preharvest spray and postharvest coating during storage[J]. Food Chemistry, 2008, 106(2): 501-508.
- [19] Zhang H, Li R, Liu W. Effects of chitin and its derivative chitosan on postharvest decay of fruits[J]. International Journal of Molecular Science, 2011, 12(2): 917-934.
- [20] 周德庆.微生物学实验教程[M].第二版.北京:高等教育出版社,2006.
- [21] 杨玲玉,孟祥红,刘成圣,等.壳聚糖的抗菌性及其对果实病害的防治研究进展[J].中国农业科学,2009,42(2):626-635.
- [22] 盛占武,毕阳,鄯晋晓,等.采后硅酸钠处理对马铃薯干腐病的抑制[J].食品工业科技,2007,28(9):190-191.
- [23] Liu J, Tian S T, Meng X H, et al. Effects of chitosan on control of postharvest diseases and physiological responses of tomato fruit[J]. Postharvest Biology and Technology, 2007, 44(3): 300-306.
- [24] Meng X H, Yang L, Kennedy J F, et al. Effects of chitosan and oligochitosan on growth of two fungal pathogens and physiological properties in pear fruit[J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 81(1): 70-75.
- [25] 马增新,杨玲玉,孟祥红.壳聚糖和壳寡糖对四种青霉菌菌生长和病害控制的比较研究[J].食品科学,2011,32(1):72-76.
- [26] Laflamme P, Benhamou N, Bussièrès G, et al. Differential effect of chitosan on root rot fungal pathogens in forest nurseries[J]. Canadian Journal of Botany, 2000, 77(10): 1460-1468.
- [27] Sudarshan N R, Hoover D G, Knorr D. Antibacterial action of chitosan[J]. Food Biotechnology, 1992, 6(3): 257-272.
- [28] Jung E J, Youn D K, Lee S H, et al. Antibacterial activity of chitosan with different degrees of deacetylation and viscosities[J]. International Journal of Food Science and Technology, 2010, 45(4): 676-682.
- [29] 陈威,吴清平,张菊梅,等.壳聚糖抑菌机制的初步研究[J].微生物学报,2008,48(2):164-168.
- [30] 王丽,赵盼,孟祥红.壳聚(寡)糖对柑橘酸腐、黑腐病菌的抑制作用及采后病害的防治[J].食品工业科技,2011,32(12):424-428.
- [31] 刘瑶瑶,毕阳,李国林,等.热水和壳聚糖处理对厚皮甜瓜采后病害及苯丙烷代谢的影响[J].食品工业科技,2013,34(15):315-319.
- [32] 李永才,孙小娟,毕阳.壳聚糖处理对马铃薯块茎组织活性氧代谢的影响[J].食品工业科技,2010(8):313-315.