

钙结合双酵母对苹果采后青霉病诱导抗性机制

蔺楠, 胡俊月, 丛龙美, 杜静婷, 施俊凤*, 张立新*

(山西农业大学 食品科学与工程学院, 山西 太原 030031)

摘要: 水果含有丰富的营养物质, 但其在采后贮藏或运输期易发生侵染性病害而导致果肉腐烂和品质下降, 造成严重的经济损失。为筛选抑制效果最佳的 CaCl_2 浓度并探究其与双酵母最佳结合浓度下对苹果果实的抗性诱导机制, 该文通过体外接种实验确定添加 CaCl_2 后的最佳培养时间为 24 h; 体内实验表明不同浓度 CaCl_2 诱导双酵母对苹果青霉病均有抑制效果, 其中 2.0% CaCl_2 抑制效果最佳; 通过在苹果伤口及表面处的生长动态发现 2.0% CaCl_2 可促进双酵母迅速定殖; 2.0% CaCl_2 诱导后可以显著提高苹果中苯丙烷代谢相关酶、活性氧代谢相关酶活性和物质含量。相较对照和使用双酵母复配, CaCl_2 处理能够增强拮抗酵母的生防效力, 一方面可以促进拮抗酵母的生长和定殖, 另一方面可以降低果实的发病率并增强果实的抗病性。

关键词: 苹果; 青霉病; 拮抗酵母; 生物防治; 抗性相关酶

The Mechanism of Induced Resistance of Calcium Combined with Double Yeast to Postharvest Apple Penicilliosis

LIN Nan, HU Junyue, CONG Longmei, DU Jingting, SHI Junfeng*, ZHANG Lixin*

(School of Food Science and Engineering, Shanxi Agricultural University, Taiyuan 030031, Shanxi, China)

Abstract: Fruits contain abundant nutrients, but they are prone to infectious diseases during postharvest storage or transportation, resulting in pulp decay and quality decline, causing serious economic losses. In this study, in order to screen the optimal concentration of CaCl_2 for inhibitory effect and explore the resistance induction mechanism on apple fruit under its optimal binding concentration with double yeast, the optimal culture time after adding CaCl_2 was determined to be 24 h by the inoculation experiment *in vitro*. *In vivo* experiment, it was determined that different concentrations of CaCl_2 induced double yeast had inhibitory effect on apple penicilliosis, of which 2.0% CaCl_2 had the best inhibitory effect. Through the growth dynamics of apple wound and surface, it was found that 2.0% CaCl_2 could promote the rapid colonization of double yeast. 2.0% CaCl_2 induction could significantly increase the activities and substance contents of enzymes related to phenylpropane metabolism and active oxygen metabolism in apples. Compared with the control and the use of double yeast compound, CaCl_2 treatment could enhance the biocontrol effect of antagonistic yeast. On the one hand, it can promote the growth and colonization of antagonistic yeast; on the other hand, it can reduce the incidence of fruit and enhance the disease resistance of fruit.

Key words: apple; penicilliosis; antagonistic yeast; biological control; resistance-related enzymes

引文格式:

蔺楠, 胡俊月, 丛龙美, 等. 钙结合双酵母对苹果采后青霉病诱导抗性机制[J]. 食品研究与开发, 2024, 45(10): 84-92.

LIN Nan, HU Junyue, CONG Longmei, et al. The Mechanism of Induced Resistance of Calcium Combined with Double Yeast to Postharvest Apple Penicilliosis[J]. Food Research and Development, 2024, 45(10): 84-92.

基金项目: 山西省自然科学研究面上项目(20210302123422); 山西省重点研发计划项目(202102140601017); 山西省现代农业产业技术体系(果树)建设专项资金(2023CYJSTX07-021); 山西农业大学科技创新提升工程项目(CXGC2023033)

作者简介: 蔺楠(1998—), 女(汉), 硕士, 研究方向: 果蔬采后病害和生物防治。

*通信作者: 施俊凤(1977—), 女(汉), 研究员, 研究方向: 果蔬采后病害和生物防治; 张立新(1966—), 男(汉), 研究员, 研究方向: 果蔬贮藏保鲜技术。

苹果营养价值丰富,但其在采后储运过程中,容易受到机械损伤和真菌侵染,从而导致苹果腐败变质,造成经济损失^[1]。扩展青霉(*Penicillium expansum*)可侵染多种水果,是引起苹果腐烂的主要病原菌之一,其次代谢物展青霉素(patulin, PAT)是一种毒性极强的聚酮类代谢物,对人体的肠胃、肾脏和免疫系统均具有较强的毒害作用^[2]。

生物法由于成本低、效果好,现已成为新型防腐保鲜方法,其中生防酵母菌在自然界中分布广泛,不产生有害代谢物,对环境友好,是水果采后病害防治及真菌毒素降解的新热点^[3]。如 Cao 等^[4]发现卡利比克毕赤酵母(*Pichia caribbica*)可以通过营养和空间竞争来有效防治苹果采后青霉病。

尽管拮抗酵母可以增强果实抵御致病菌侵染的能力,但实际应用中其防治效果与化学杀菌剂相比仍有差距,众多研究表明使用拮抗酵母和其它拮抗菌混合使用能够提高拮抗酵母的防治效力^[4]。如 Calvo 等^[5]发现粘红酵母(*Rhodotorula glutinis*)和罗伦隐球酵母(*Cryptococcus laurentii*)联合应用提高了其控制苹果灰霉病的能力。也有研究报道拮抗酵母可与一些辅助因子相结合从而增强其拮抗效力,如 Wang 等^[6]将 β -葡聚糖与隐球酵母(*Cryptococcus podzolicus*)结合,可显著抑制苹果采后青霉病的病斑直径和发病率;马电通等^[7]发现羧甲基纤维素可诱导提高罗伦隐球酵母(*Cryptococcus laurentii*)对采后砂糖橘抗青霉、绿霉病的生防效果。

钙是植物必需的营养素,可调节植物细胞壁稳定和完整、抗胁迫、促进细胞分裂等,同时在延缓果实衰老中也起着重要作用^[8]。胡海燕等^[9]研究发现对枣果实施加 CaCl_2 ,能有效降低枣果的裂果率,促使果皮细胞壁中保护酶活性提高,增强果实对外界的抗逆性。然而将双酵母复合后再与 CaCl_2 结合的研究报道较少。

梅奇酵母(*Metschnikowia zizyphicola*)和卡利比克迈耶氏酵母(*Meyerozyma caribbica*)经前期试验筛选并鉴定为拮抗酵母,对苹果采后青霉病有一定程度抑制作用,进一步研究发现其复合处理比两者单独处理对该病害的抑制作用更强。本研究采用此两株酵母拮抗菌,结合 CaCl_2 辅助因子进行复配,探究辅助因子结合双酵母处理对苹果果实青霉病的控制及其抗性诱导的影响,为生物拮抗菌剂应用于果实病害的防治提供理论依据,并为生防菌剂产业化应用提供新思路。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与供试菌株

富士苹果:市售,选择无病虫害、无机械伤、成熟

度、大小一致的果实,于 $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下贮藏备用;病原菌株:扩展青霉(*Penicillium expansum*)由山西农业大学食品科学与工程学院采后病理实验室从苹果果肉处分离并进行分子和形态学鉴定,于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下保存备用;酵母拮抗菌梅奇酵母(*Metschnikowia zizyphicola*)于葡萄果实表面分离筛选;卡利比克迈耶氏酵母(*Meyerozyma caribbica*)于蟠桃果实表面分离筛选,并进行分子和生理生化鉴定,于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下保存备用。

牛肉膏、酵母膏、葡萄糖、琼脂粉:北京奥博星生物技术有限责任公司;Triton X-100、愈创木酚、L-蛋氨酸、氮蓝四唑、核黄素、 α -萘胺、四氯化钛、p-香豆酸、几丁质、昆布多糖、反式肉桂酸:北京索莱宝科技有限公司;冰醋酸、无水醋酸钠、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、无水乙醇、L-抗坏血酸、甲醇:天津市致远化学试剂有限公司。所用试剂均为分析纯。

1.1.2 仪器与设备

LS-50HD 全自动高压灭菌锅:江阴滨江医疗设备有限公司;HC-2518R 高速冷冻离心机:科大创新股份有限公司中佳分公司;DHZ-D 全温摇床:太仓市实验设备厂;SW-CJ-1FD 超净工作台:浙江苏净净化设备有限公司;BX-650 显微镜:日本 Olympus 公司;DHP-9272 电热恒温培养箱:上海一恒科技有限公司;PHS-25 pH 计:上海雷磁有限公司;Ming-Ch24uv 超纯水机:德国默克密理博公司;HHS 型电热恒温水浴锅:上海博迅实业有限公司;Allegra X-30R 冷冻高速离心机:美国 Beckman Coulter 公司;Ultrospec 2000 紫外分光光度计:美国 Pharmacia Biotech 公司;血球计数板:上海求精生化试剂仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 酵母菌株、孢子悬浮液制备

酵母菌株:将划线培养的 *M. zizyphicola* 和 *M. caribbica* 接种于营养酵母葡萄糖液体培养基(nutrient yeast dextrose broth, NYDB)培养基, $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、120 r/min 摇床培养 48 h 后,8 000 r/min 离心 15 min,弃上清液,用无菌水配成浓度为 1×10^8 cfu/mL 的悬浮液。

孢子悬浮液:将 *P. expansum* 在马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)平板上 $26\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 3 d,用无菌涂布器刮取分生孢子,采用血球计数法配制成浓度为 1×10^5 spores/mL 的孢子悬浮液。

1.2.2 不同浓度 CaCl_2 诱导双酵母对苹果青霉病的抑制作用

将苹果用清水洗净晾干后,用 2% 次氯酸钠浸泡 2 min,再用无菌水清洗 3 次后,无菌风吹干。在每个苹果赤道部位打 4 个孔(直径约 4 mm、深度约 4 mm),每个处理 8 个苹果,3 次重复,在每个伤口处分别接种 50 μL 浓度为 1×10^8 cfu/mL 的 *M. zizyphicola*+*M. caribbica* 菌悬液、*M. zizyphicola*+*M. caribbica* 菌悬液+ CaCl_2

(0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0%)和无菌水,无菌风吹2 h后接入20 μL 1×10^5 cfu/mL *P. expansum* 孢子悬浮液,晾干后用保鲜袋密封,26 $^{\circ}\text{C}$ 下培养观察。每天观察记录果实抑制率和病斑直径,每个处理重复3次,2次平行。抑制率($X, \%$)的计算公式如下。

$$X = [(A - B) / A] \times 100$$

式中: A 为对照组病斑直径,mm; B 为处理组病斑直径,mm。

1.2.3 CaCl_2 处理对双酵母生活量的影响

参照施俊凤等^[10]的方法,略作修改。将 *M. zizyphicola*+*M. caribbica* 菌悬液(M)、*M. zizyphicola* 菌悬液+*M. caribbica* 菌悬液+2% CaCl_2 (M+ CaCl_2)和无菌水(CK)接种于50 mL/250 mL NYDB培养基中,于25 $^{\circ}\text{C}$ 下120 r/min摇床培养24 h后,以1%接种于50 mL/250 mL NYDB培养基,终浓度为 1×10^6 cfu/mL,于25 $^{\circ}\text{C}$ 下120 r/min继续培养。每隔6 h用稀释平板法测定菌液浓度。

1.2.4 CaCl_2 与双酵母结合在苹果伤口的生长动态

参照1.2.2方法处理苹果并制造伤口,于每个伤口处等量加入50 μL 含有酵母菌的3种不同处理液。自然晾干后,将苹果装入塑料筐,常温下保湿培养,在接种0~6 d时测定酵母菌的细胞数。每个重复10个果实,试验重复2次。

1.2.5 CaCl_2 与双酵母结合在苹果表面的生长动态

参照 Han 等^[11]的方法,略作修改。在苹果赤道处画4个大小一致的圆(直径30 mm),之后分别将1.2.3的处理液滴在圆中(20 μL)并涂布均匀,苹果的培养及菌落的测定同1.2.4。每个处理重复3次,每个重复10个果实,2次平行。

1.2.6 CaCl_2 与双酵母结合对苹果抗性相关酶和物质含量的影响

1.2.6.1 样品处理

将挑选好的苹果120颗,随机等量分为4组,参照1.2.3的方法处理苹果并接种。接种后于26 $^{\circ}\text{C}$ 下保湿培养12 d,每2 d取果实伤口与果肉交接处的果肉,进行酶活测定。每个处理重复3次,每重复20个果实,试验重复2次。

1.2.6.2 抗性相关酶活性和物质含量测定

过氧化物酶(peroxidase, POD)、多酚氧化酶(polyphenol oxidase, PPO)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)和苯丙氨酸解氨酶(phenylalanine ammonia lyase, PAL)活性测定参照 Han 等^[11]的方法;肉桂醇脱氢酶(cinnamyl alcohol dehydrogenase, CAD)活性测定参照李磊等^[12]的方法;几丁质酶(chitinase, CHI)和 β -1,3-葡聚糖酶(β -1,3-glucanase, GLU)活性测定参照 Zhao 等^[13]的方法;超氧阴离子(superoxide anion, O_2^-)和过氧化氢(hydrogen peroxide, H_2O_2)含量测定参照徐雨晗等^[14]的方法;肉桂

酸-4-羟化酶(cinnamic-4-hydroxylase, C_4H)、4-香豆酰辅酶A连接酶(4-coumaroyl-CoA ligase, 4CL)活性,木质素(lignin)、总酚(total phenols)和类黄酮(flavonoids)含量测定参照张昱等^[15]的方法。

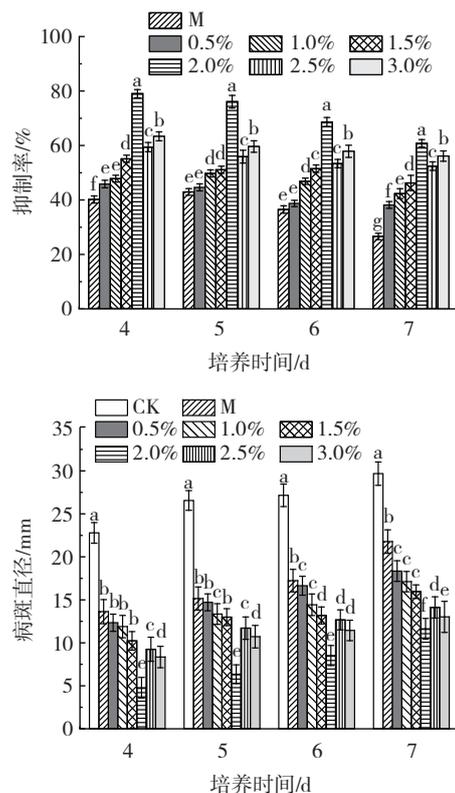
1.3 数据处理

用 Origin 2018 进行图片绘制,用 SPSS 22.0 软件对数据进行方差分析,采用 Duncan's 进行差异显著性分析,Person 进行显著性检验, $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 不同浓度 CaCl_2 诱导双酵母对苹果青霉病的抑制作用

不同浓度 CaCl_2 诱导双酵母对青霉病的抑制作用见图1。



0.5%~3.0%为 CaCl_2 浓度。不同小写字母表示组间差异显著($P < 0.05$)。

图1 不同浓度 CaCl_2 诱导双酵母对青霉病的抑制作用

Fig.1 Inhibition of penicilliosis by two yeasts induced by different concentrations of CaCl_2

如图1所示,在不同浓度的 CaCl_2 诱导培养后,*M. zizyphicola*+*M. caribbica*菌悬液对苹果青霉病的生防效力均明显提高。其中 CaCl_2 浓度为2.0%的处理抑制作用最好。接种6 d后,该处理与CK组相比,抑制率达到68.63%,显著高于其它各浓度处理组,此时病斑直径也显著低于其余处理组($P < 0.05$),因此将 CaCl_2 浓度2.0%作为后续复配处理的浓度。

2.2 CaCl₂处理对双酵母生活量的影响

将酵母菌与CaCl₂复合处理,其生长曲线见图2。

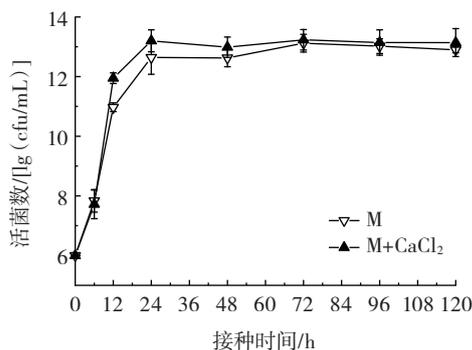


图2 CaCl₂与双酵母结合的生长动态

Fig.2 Growth dynamics of the binding of CaCl₂ with two yeasts

由图2可知,2个处理的酵母菌在接种后24h为对数生长期,生长迅速,24h后生长趋于缓慢,而经CaCl₂处理后酵母菌活菌数高于双酵母培养组。72h后2个处理组菌液浓度均达到最大值,而后缓慢降低。在72h时,CaCl₂处理组稀释10倍后的活菌数为13.23 lg(cfu/mL),比双酵母培养的活菌数增加了1.35倍。

2.3 CaCl₂与双酵母结合在苹果伤口及表面的生长动态

将CaCl₂与酵母菌复合处理,苹果伤口处及表面的生长动态见图3和图4。

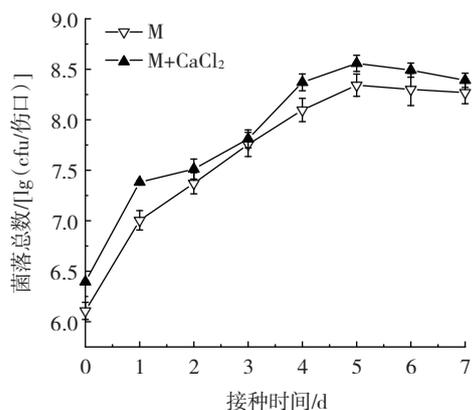


图3 CaCl₂与双酵母结合在苹果伤口处生长动态

Fig.3 Growth dynamics of the binding of CaCl₂ with two yeasts in apple wound

如图3所示,2个处理组均可在苹果伤口处快速增长繁殖,随着接种时间的延长,菌落总数也逐渐增加。且CaCl₂处理后,增强了酵母菌在苹果伤口处的定殖能力,5d时达到峰值,复合处理组比单独培养的菌落总数增加了65%。

如图4所示,经CaCl₂诱导培养及单独培养的*M. zizyphicola*+*M. caribbica*在苹果表面均能快速增殖。与伤口处的结论相似,CaCl₂处理增强了*M. zizyphicola*与*M. caribbica*在苹果表面的定殖能力。

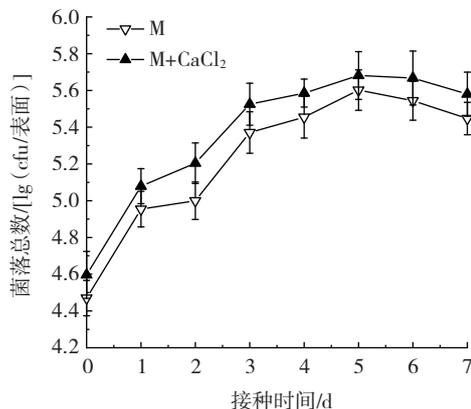


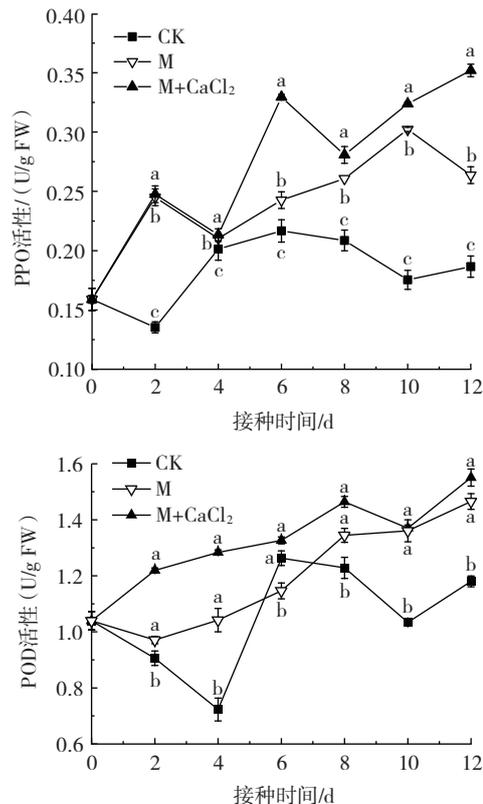
图4 CaCl₂与双酵母结合在苹果表面生长动态

Fig.4 Growth dynamics of the binding of CaCl₂ with two yeasts on the surface of apple

2.4 CaCl₂与双酵母结合对苹果抗性相关酶活性的影响

2.4.1 不同处理对苹果PPO和POD活性的影响

将CaCl₂与酵母菌复合处理后,苹果果肉PPO和POD活性见图5。



相同接种时间不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

图5 CaCl₂与双酵母结合对苹果PPO和POD活性的影响

Fig.5 Effect of CaCl₂ binding with two yeasts on the activities of PPO and POD in apple

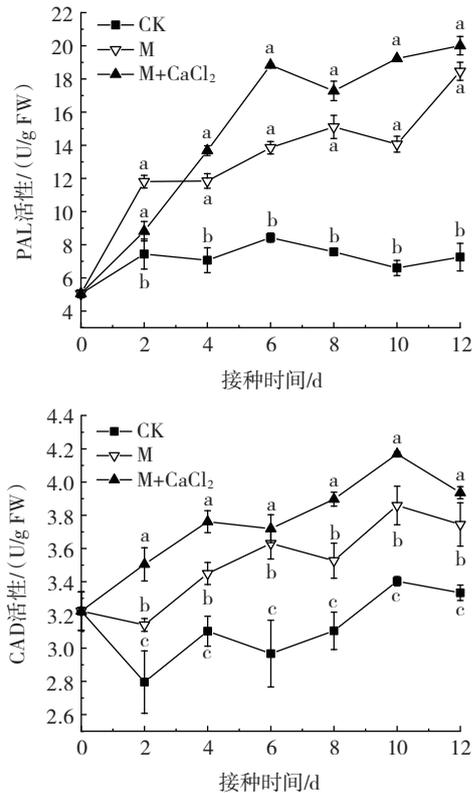
如图5所示,CK组、M组与M+CaCl₂组的PPO活性波动较大,2个酵母菌处理组PPO活性显著高于对照组($P < 0.05$),其中M+CaCl₂组在12d达到最高,为

0.35 U/g FW,分别为对照组和M组的1.89倍和1.33倍。总体来看,酶活性依次为 M+CaCl₂组>M组>CK组。

CK组苹果果肉 POD 活性呈先下降后上升又下降的趋势;M+CaCl₂组和M组 POD 活性总体呈上升趋势,且除6d外,均显著高于CK组($P<0.05$),在12d时均达到峰值,分别为CK组的1.31倍和1.06倍。

2.4.2 不同处理对苹果 PAL 和 CAD 活性的影响

双酵母添加 CaCl₂后,苹果 PAL 和 CAD 活性见图6。



同一接种时间不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

图6 CaCl₂与双酵母结合对苹果 PAL 和 CAD 活性的影响

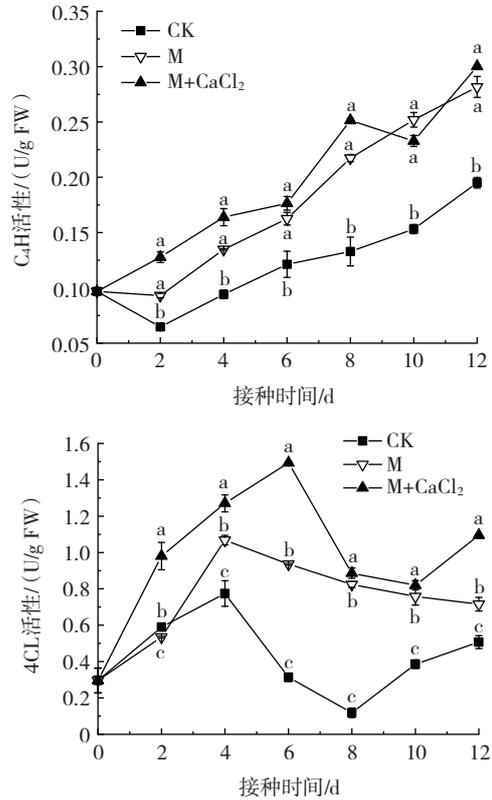
Fig.6 Effect of CaCl₂ binding with two yeasts on the activities of PAL and CAD in apple

如图6所示,CK组、M组与M+CaCl₂组的苹果果肉 PAL 活性总体呈上升趋势。0~12d,M+CaCl₂组和M组的 PAL 活性显著高于CK组($P<0.05$),均在接种12d时达到峰值,分别为CK组的2.76倍和2.54倍;接种后M+CaCl₂组活性迅速升高,略微降低后又缓慢增加。

CK组、M组与M+CaCl₂组苹果果肉 CAD 活性大体均呈上升趋势。在接种2d内,M组和CK组活性下降,M+CaCl₂组活性上升;10d时,3组活性均出现峰值,M+CaCl₂组活性最高,显著高于CK组和M组($P<0.05$),分别为对照组和M组的1.23倍和1.11倍。

2.4.3 不同处理对 C₄H 和 4CL 活性的影响

将 CaCl₂与酵母菌复合处理后,苹果果肉 C₄H 和 4CL 活性见图7。



同一接种时间不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

图7 CaCl₂与双酵母结合对苹果 C₄H 和 4CL 活性的影响

Fig.7 Effect of CaCl₂ binding with two yeasts on the activities of C₄H and 4CL in apple

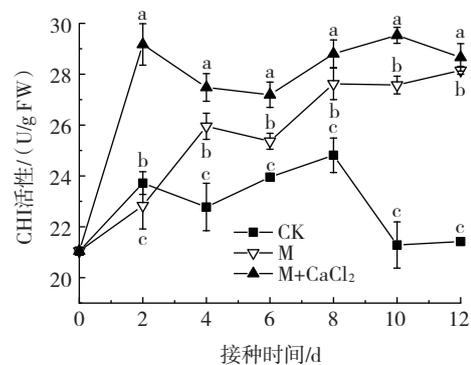
如图7所示,CK组、M组与M+CaCl₂组的苹果果肉 C₄H 活性整体呈上升趋势。除10d外,M+CaCl₂组 C₄H 活性始终最高,且显著高于对照组($P<0.05$),12d出现峰值,分别为对照组和M组的1.54倍和1.07倍。

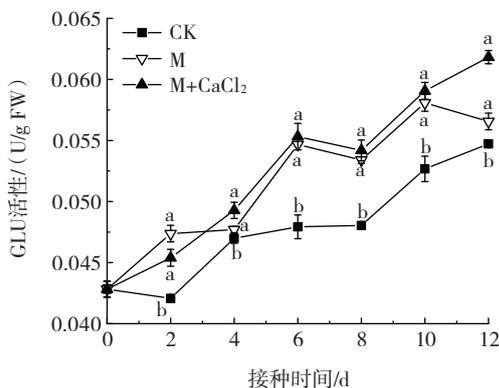
M组 4CL 活性呈先上升后下降趋势,M+CaCl₂组和CK组呈“升-降-升”趋势。0~12d中,M+CaCl₂组 4CL 活性始终最高,且显著高于M组和CK组($P<0.05$),6d时出现峰值,为CK组和M组的4.77倍和1.60倍。

2.4.4 不同处理对 CHI 和 GLU 活性的影响

双酵母与 CaCl₂结合后,苹果 CHI 和 GLU 活性见图8。

如图8所示,M组和M+CaCl₂组整体呈现上升趋势





同一接种时间不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

图8 CaCl₂与双酵母结合对苹果CHI和GLU活性的影响

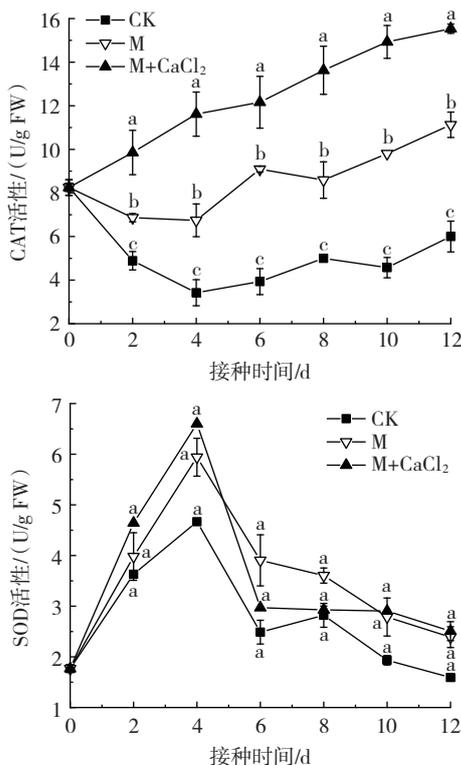
Fig.8 Effect of CaCl₂ binding with two yeasts on the activities of CHI and GLU in apple

势,且M+CaCl₂组活性始终显著高于M组和CK组($P<0.05$),接种10d时,M+CaCl₂组CHI活性达到峰值,为CK组和M组的1.39倍和1.07倍。

CK组、M组与M+CaCl₂组的苹果果肉GLU活性整体呈上升趋势。0~12d中,M+CaCl₂组活性显著高于CK组($P<0.05$);接种12d时,M+CaCl₂组达到峰值,为对照组和M组的1.13倍和1.09倍。

2.4.5 不同处理对CAT和SOD活性的影响

添加CaCl₂后,苹果果肉CAT和SOD活性见图9。



同一接种时间不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

图9 CaCl₂与双酵母结合对苹果CAT和SOD活性的影响

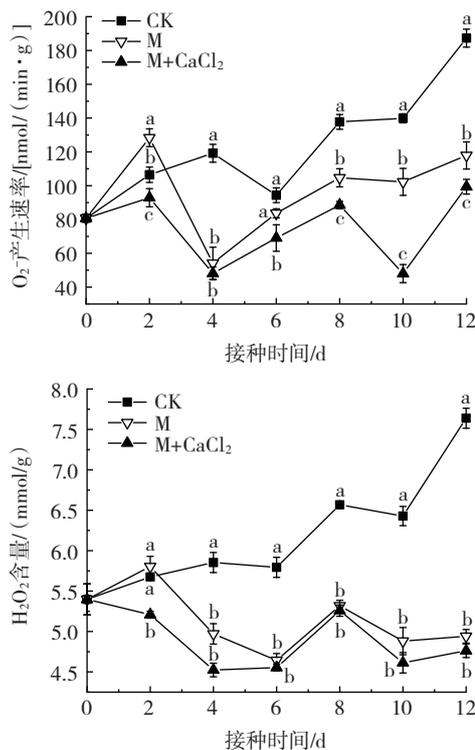
Fig.9 Effect of CaCl₂ binding with two yeasts on the activities of CAT and SOD in apple

如图9所示,经M+CaCl₂处理后的苹果果肉CAT活性总体上升,CK组活性大体呈现下降趋势。在4d时,M组和CK组活性下降到最低值,随后略有上升;接种过程中,M+CaCl₂组CAT活性一直呈上升趋势,显著高于M组和CK组($P<0.05$),CK组始终低于初始值;12d时,M+CaCl₂组达到峰值,为CK组的2.59倍。

CK组、M组与M+CaCl₂组的SOD活性大体呈“升降”趋势。M组和M+CaCl₂组活性始终高于对照组,均在4d时达到峰值,分别为对照组的1.27倍和1.41倍,随后3组活性降低,在12d时出现最低值,其中对照组活性低于初始值。

2.4.6 不同处理对超氧阴离子(O₂⁻)产生速率和过氧化氢(H₂O₂)含量的影响

CaCl₂与双酵母结合后,苹果果肉O₂⁻产生速率和H₂O₂含量见图10。



同一接种时间不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

图10 CaCl₂与双酵母结合对苹果O₂⁻产生速率和H₂O₂含量的影响
Fig.10 Effect of the binding of CaCl₂ with two yeasts on O₂⁻ production rate and H₂O₂ content of apple

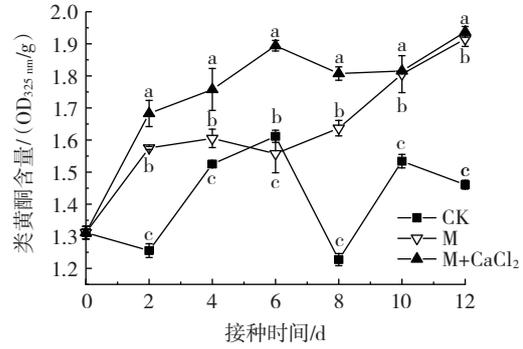
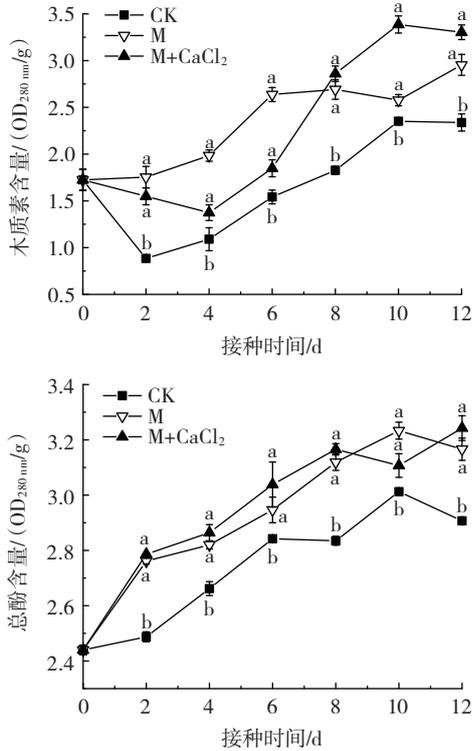
如图10所示,CK组、M组与M+CaCl₂组的O₂⁻产生速率大体呈“升-降-升”趋势。其中CK组较接种拮抗酵母的2个处理组产生速率提升更快,12d时,其产生速率分别为M组和M+CaCl₂组的1.60倍和1.88倍。

CK组、M组与M+CaCl₂组的苹果H₂O₂含量波动较大,M组和M+CaCl₂组总体呈下降趋势,12d时H₂O₂含量较初始值降低了0.46 mmol/g和0.63 mmol/g;CK组大体呈上升趋势,除2d外,均显著高于M组和

M+CaCl₂组 ($P<0.05$), 12 d 时达到峰值, 分别为 M 组和 M+CaCl₂ 组的 1.55 倍和 1.60 倍。

2.4.7 不同处理对果实木质素、总酚、类黄酮含量的影响

CaCl₂ 与双酵母结合后, 苹果果肉木质素、总酚和类黄酮含量见图 11。



同一接种时间不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)。

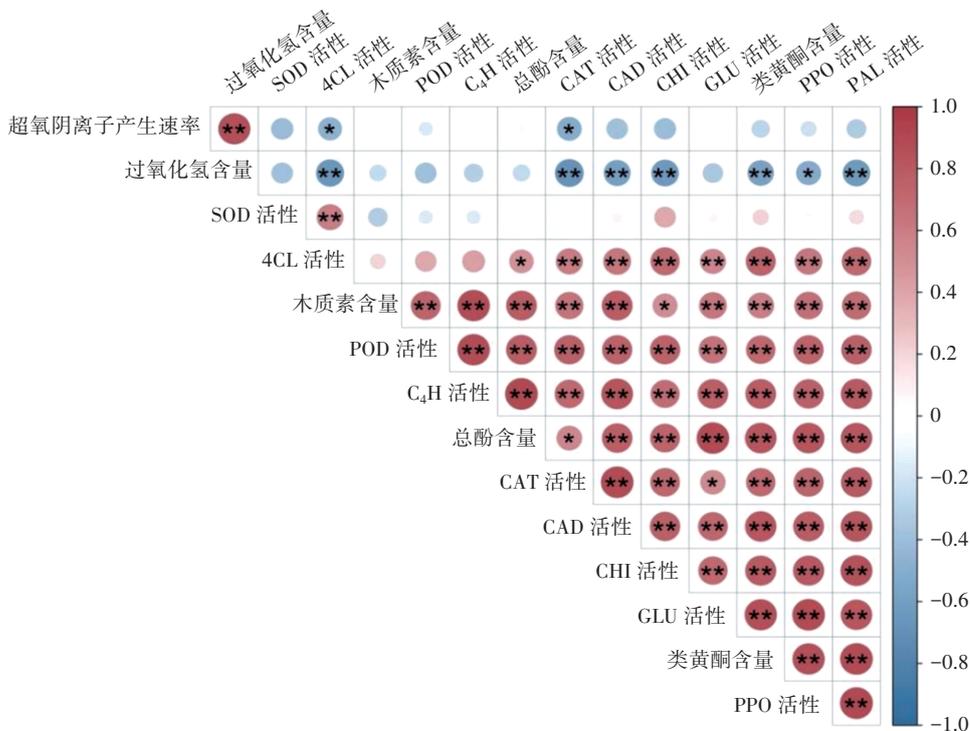
图 11 CaCl₂ 与双酵母结合对苹果木质素、总酚和类黄酮含量的影响
Fig.11 Effects of CaCl₂ binding with two yeasts on the contents of lignin, total phenols and flavonoids in apple

如图 11 所示, CK 组、M 组与 M+CaCl₂ 组的木质素和总酚含量大体呈上升趋势。接种 10 d, M+CaCl₂ 组木质素含量最高; 2~12 d 中, 酵母组木质素和总酚含量均显著高于 CK 组 ($P<0.05$)。

M+CaCl₂ 组类黄酮含量大体呈上升趋势, 且始终显著高于 CK 组和 M 组 ($P<0.05$), 12 d 时达到峰值为 1.94 OD_{325nm}/g, 为 CK 组和 M 组的 1.33 倍和 1.01 倍; CK 组类黄酮含量大体呈“升-降-升”趋势, 6 d 时含量达到最大值后迅速降低, 在 8~12 d 时含量略有上升。

2.4.8 抗性相关酶活与物质相关性分析

丙烷代谢途径和活性氧代谢途径中, 其相关的酶活与物质相关性分析见图 12。



*表示显著相关 ($P<0.05$); **表示极显著相关 ($P<0.01$)。

图 12 抗性相关酶活与物质相关性分析

Fig.12 Analysis of correlation between activity of resistance-related enzymes and substances

如图 12 所示, POD 活性、C₄H 活性、总酚含量、CAT 活性、CAD 活性、CHI 活性、GLU 活性、类黄酮含量、PPO 活性和 PAL 活性均与木质素含量间存在显著相关性 ($R^2=0.733^{**}$ 、 0.875^{**} 、 0.782^{**} 、 0.658^{**} 、 0.788^{**} 、 0.514^{*} 、 0.851^{**} 、 0.591^{**} 、 0.681^{**} 、 0.698^{**}), 表明这些相关酶活性升高与相关抗性物质含量增加可间接提高木质素含量, 延缓果实木质化进程, 提高苹果果实抗病性。

3 讨论

本研究发现 *M. zizyphicola* 与 *M. caribbica* 结合可有效抑制苹果采后青霉病的病斑直径及其发病率, 可在果实处生长定殖, 而结合 CaCl₂ 可使其抑制能力显著加强, 此类研究也有相关报道^[16-18]。

病原菌感染果实时, 会诱导其产生抗性, 表现为抗性相关酶活性提高以及相关物质含量增加^[19]。苯丙烷和活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 代谢作为植物的主要次级代谢途径之一, 能促进许多抗菌物质的合成, 如酚类、类黄酮、木质素、生物碱等, 抑制病原物侵染, 提高果实抗病能力^[20]。PAL、4CL、C₄H、POD、PPO、CAD 是参与并调控苯丙烷代谢的关键酶^[12, 21-23], GLU 和 CHI 被公认为能够降解病原菌细胞壁组分或菌丝体, 从而杀死病原菌, 保护寄主^[24], 总酚、木质素和类黄酮属于苯丙烷类代谢中的终产物^[25]。本文 3 个处理组的 PAL、C₄H、POD、PPO、CAD、GLU、CHI 活性和 3 种物质含量随时间延长有所提升, 且与木质素间相关性显著, 表明双酵母复合处理通过增加这些抗性相关酶活性及物质含量来促进木质素合成, 加固果实细胞壁结构, 进而增强苹果果实抗青霉病能力, 而钙的添加可以极大提升这种抗病机制。与李磊等^[12]和张昱等^[15]研究一致。

ROS 代谢一般包括 SOD、CAT、H₂O₂ 和 O₂⁻。果蔬采后由于其新陈代谢会产生活性氧 H₂O₂ 和 O₂⁻, H₂O₂、O₂⁻ 含量较高时, 会破坏细胞膜完整性, 加速果实衰老进程。SOD 是降解 ROS 的第一个关键酶, 通过歧化 O₂⁻ 生成 H₂O₂ 来减少果实内 ROS 自由基对有机体的毒害, CAT 则进一步催化 H₂O₂ 生成 H₂O 和 O₂, 减少多余的 H₂O₂ 对植物细胞膜结构的破坏, 维持细胞膜的稳定性^[26]。本研究中, CaCl₂ 复合提高了苹果 SOD 和 CAT 相关酶活性, 降低了 O₂⁻ 和 H₂O₂ 含量, 从而增强苹果清除其应对 *P. expansum* 侵染时产生的过量 ROS, 增强其抗病性。

4 结论

本研究结果表明, CaCl₂ 诱导后能增强 *M. zizyphicola*+*M. caribbica* 对 *P. expansum* 抑制率, 两者复合处理效果更显著; 能促进双酵母在苹果果实表面及伤口处的生长繁殖; 能显著诱导苹果果实贮藏期间苯丙烷

代谢相关酶和活性氧代谢相关酶活性的增强, 促进果实体内总酚、木质素、类黄酮、H₂O₂ 和 O₂⁻ 的积累, 从而增强苹果果实对青霉病的抗性, 本研究在苹果采后的防病保鲜领域显示了良好的应用前景。

参考文献:

- [1] CAO J, ZHANG H Y, YANG Q Y, et al. Efficacy of *Pichia caribbica* in controlling blue mold rot and patulin degradation in apples [J]. International Journal of Food Microbiology, 2013, 162(2): 167-173.
- [2] LIN R L, YANG Q Y, XIAO J W, et al. Study on the biocontrol effect and physiological mechanism of *Hannaella sinensis* on the blue mold decay of apples [J]. International Journal of Food Microbiology, 2022, 382: 109931.
- [3] LUTZ M C, LOPES C A, SOSA M C, et al. Semi-commercial testing of regional yeasts selected from North Patagonia Argentina for the biocontrol of pear postharvest decays [J]. Biological Control, 2020, 150: 104246.
- [4] MARK G, MORRISSEY J P, HIGGINS P, et al. Molecular-based strategies to exploit *Pseudomonas* biocontrol strains for environmental biotechnology applications [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2006, 56(2): 167-177.
- [5] CALVO J, CALVENTE V, DE ORELLANO M E, et al. Improvement in the biocontrol of postharvest diseases of apples with the use of yeast mixtures [J]. BioControl, 2003, 48(5): 579-593.
- [6] WANG Y, LI Y L, XU W D, et al. Exploring the effect of β -glucan on the biocontrol activity of *Cryptococcus podzolicus* against postharvest decay of apples and the possible mechanisms involved [J]. Biological Control, 2018, 121: 14-22.
- [7] 马电通, 吕鹤飞, 常雪苗, 等. 羧甲基纤维素诱导提高罗伦隐球酵母对采后砂糖橘抗青霉、绿霉病的生防效果 [J]. 食品科学, 2022, 43(21): 241-247.
MA Diantong, LÜ Hefei, CHANG Xuemiao, et al. Carboxymethyl cellulose induced improvement of the biocontrol of *Cryptococcus laurentii* against postharvest *Penicillium* and green mold in 'shat-angju' mandarin [J]. Food Science, 2022, 43(21): 241-247.
- [8] GAO Q Y, XIONG T T, LI X P, et al. Calcium and calcium sensors in fruit development and ripening [J]. Scientia Horticulturae, 2019, 253: 412-421.
- [9] 胡海燕, 袁维, 李江斌, 等. 外源 CaCl₂ 对骏枣裂果的生理调控研究 [J]. 天津农业科学, 2023, 29(6): 13-20.
HU Haiyan, YUAN Wei, LI Jiangbin, et al. Physiological regulation of CaCl₂ on fruit cracking in jujube [J]. Tianjin Agricultural Sciences, 2023, 29(6): 13-20.
- [10] 施俊凤, 薛梦林, 张晓宇, 等. 梅奇酵母 XY201 对冬枣采后病原真菌的抑制效果 [J]. 中国生物防治, 2010, 26(3): 287-292.
SHI Junfeng, XUE Menglin, ZHANG Xiaoyu, et al. Inhibitory effect of *Metschnikowia zizyphicola* XY201 on fungal pathogens of postharvest jujube fruits [J]. Chinese Journal of Biological Control, 2010, 26(3): 287-292.
- [11] HAN J J, ZHAO L N, ZHU H M, et al. Study on the effect of alginate oligosaccharide combined with *Meyerozyma guilliermondii* against *Penicillium expansum* in pears and the possible mechanisms involved [J]. Physiological and Molecular Plant Pathology, 2021, 115: 101654.
- [12] 李磊, 陈发河, 吴光斌. 热激处理对冷藏“解放钟”枇杷果实木质化及相关酶活性的影响 [J]. 食品科学, 2010, 31(16): 286-290.
LI Lei, CHEN Fahe, WU Guangbin. Effect of heat shock treatment

- on lignification and related enzymes activities in 'Jiefangzhong' loquat during cold storage[J]. Food Science, 2010, 31(16): 286-290.
- [13] ZHAO Y, TU K, SU J, et al. Heat treatment in combination with antagonistic yeast reduces diseases and elicits the active defense responses in harvested cherry tomato fruit[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57(16): 7565-7570.
- [14] 徐雨晗, 包垠秋, 易阳, 等. 乙醇熏蒸处理对鲜切莲藕片褐变和活性氧代谢的影响[J]. 中国食品学报, 2023, 23(1): 259-266.
- XU Yuhan, BAO Yinqiu, YI Yang, et al. Effects of ethanol vapor treatment on browning and reactive oxygen species metabolism of fresh-cut lotus root slices[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2023, 23(1): 259-266.
- [15] 张昱, 石玲, 张亚琳, 等. 2, 4-表油菜素内酯结合氯化钙处理对采后杏果实黑斑病及苯丙烷代谢的影响[J]. 核农学报, 2022, 36(12): 2455-2461.
- ZHANG Yu, SHI Ling, ZHANG Yalin, et al. Effect of 2, 4-epibrassinolide combined with calcium chloride treatment on postharvest apricot fruit black spot disease and phenylpropanoid pathway [J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2022, 36(12): 2455-2461.
- [16] 罗凯. 拮抗酵母结合化学物质提高草莓果实采后贮藏性能的研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2012.
- LUO Kai. Effect of antagonistic yeast alone or in combination with chemical materials on postharvest storability of strawberry fruit[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2012.
- [17] FILONOW A B. Role of competition for sugars by yeasts in the biocontrol of gray mold of apple[J]. Biocontrol Science and Technology, 1998, 8(2): 243-256.
- [18] CAO S F, ZHENG Y H, TANG S S, et al. Improved control of anthracnose rot in loquat fruit by a combination treatment of *Pichia membranifaciens* with CaCl₂[J]. International Journal of Food Microbiology, 2008, 126(1/2): 216-220.
- [19] 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.
- [20] JIANG H, WANG B, MA L, et al. Benzo-(1, 2, 3)-thiadiazole-7-carbothioic acid s-methyl ester (BTH) promotes tuber wound healing of potato by elevation of phenylpropanoid metabolism[J]. Postharvest Biology and Technology, 2019, 153: 125-132.
- [21] 尚军, 吴旺泽, 马永贵. 植物苯丙烷代谢途径[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2022, 38(11): 1467-1476.
- SHANG Jun, WU Wangze, MA Yonggui. Phenylpropanoid metabolism pathway in plants[J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2022, 38(11): 1467-1476.
- [22] PRABHUKARTHIKEYAN S R, KEERTHANA U, RAGUCHANDER T. Antibiotic-producing *Pseudomonas fluorescens* mediates rhizome rot disease resistance and promotes plant growth in turmeric plants[J]. Microbiological Research, 2018, 210: 65-73.
- [23] 田登娟, 孔珊珊, 马电通, 等. 羧甲基壳聚糖诱导培养罗伦隐球酵母处理调控采后葡萄柚果实苯丙烷代谢及其抗青霉病作用[J]. 食品科学, 2023, 44(11): 160-166.
- TIAN Dengjuan, KONG Shanshan, MA Diantong, et al. Regulation of phenylpropane metabolism and resistance to green mold in postharvest grapefruits treated by carboxymethyl chitosan-induced culture of *Cryptococcus laurentii*[J]. Food Science, 2023, 44(11): 160-166.
- [24] 陈燕玲, 岑光莉, 孙婷婷, 等. 植物几丁质酶和 β -1, 3-葡聚糖酶及其协同抗病性研究进展[J]. 农业生物技术学报, 2022, 30(7): 1394-1411.
- CHEN Yanling, CEN Guangli, SUN Tingting, et al. Progress on plant chitinase and β -1, 3-glucanase and their synergistic function in disease resistance[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2022, 30(7): 1394-1411.
- [25] CHOWDHURY B, BHATTACHARYYA D, MUKHOPADHYAY S. Antimicrobial effect of some simple and complex phenolic compounds of olive fruits against pathogenic bacteria[J]. Biomedical Letters, 1996, 54(213): 45-49.
- [26] 胡均如, 张敏. 热处理提高采后果蔬低温贮藏期间活性氧清除能力的机制[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(12): 269-276.
- HU Junru, ZHANG Min. Mechanism of heat treatment to improve the active oxygen scavenging ability of postharvest vegetables during low temperature storage[J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(12): 269-276.

责任编辑:冯娜
收稿日期:2023-08-02