

## 淡紫灰链霉菌 X33 发酵提取物对采后柑橘绿霉病菌的抑制作用

林书华, 汪林兰, 罗攀, 张斌, 吴晓玉\*

(江西农业大学生物科学与工程学院 江西农业微生物资源开发与利用工程实验室  
江西省果蔬采后处理关键技术及质量安全协同创新中心 南昌 330045)

**摘要** 为了揭示淡紫灰链霉菌 X33 发酵提取物(SLFE)对柑橘采后绿霉病菌——指状青霉 Pd165 的抑制作用,以 SLFE 处理的菌株 Pd165 为研究对象,测定病原菌菌株 Pd165 细胞完整性及相关细胞内容物的变化。采用扫描电镜、拉曼光谱、荧光光谱和荧光定量 PCR,探究 SLFE 处理对菌丝形态、细胞应答和 DNA 的影响。结果表明:1.2 mg/mL SLFE 处理导致菌株 Pd165 菌丝干瘪、扭曲折叠,分生孢子梗与分生孢子畸形,且产孢抑制率高达 94.86%。SLFE 诱导菌丝细胞完整性受损严重,导致胞外上清液中代表脂肪酸、核酸和蛋白质的特征峰增强(1 129,1 330,1 565  $\text{cm}^{-1}$ ),胞内糖类、可溶性蛋白和丙酮酸含量下降。SLFE 处理破坏了菌株 Pd165 基因组 DNA 构象和结构,上调了与细胞完整性、产孢、代谢和氧化应激相关的基因表达水平(*cej60377.1*、*oko99898.1*、*crl18986.1* 和 *kzn90160.1*)。结论:SLFE 处理导致菌株 Pd165 细胞完整性受损,扰乱细胞内原有的稳态,并严重破坏 DNA 构象及菌丝体形态。

**关键词** 淡紫灰链霉菌 X33 发酵提取物;指状青霉 Pd165;抑制作用;细胞完整性

**文章编号** 1009-7848(2022)01-0206-09 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2022.01.023

柑橘果肉组织柔嫩多汁且富含糖分,在贮藏和运输过程中果皮易受损而被病原菌侵染,引发采后柑橘病害。其中,柑橘绿霉病是引起柑橘果实腐败的主要病害之一,其致病菌为指状青霉(*Penicillium digitatum*)。目前,我国预防柑橘采后病害主要采用化学杀菌剂,如:邻苯基苯酚钠、噻苯咪唑、啞霉胺等<sup>[1]</sup>。化学杀菌剂具有高效、广谱和使用方便等优势,然而,其安全性问题备受社会关注<sup>[2]</sup>。因微生物杀菌剂具有高效、低毒、无残留等特点,故众多学者正积极寻找能替代化学杀菌剂的采后柑橘生物防腐剂。

Liu 等<sup>[3]</sup>发现白色链霉菌(*Streptomyces albulus*)发酵产物  $\epsilon$ -聚赖氨酸( $\epsilon$ -PL)对指状青霉具有显著抑制效果,经质量浓度为 200 mg/L 的  $\epsilon$ -PL 处理后,对指状青霉细胞膜有损伤作用,破坏膜结构并诱导脂质过氧化,从而降低绿霉病的发病率。Liu 等<sup>[4]</sup>从柠檬克勒克酵母(*Kloeckera*

*apiculata*)34-9 中分离的 2-苯基乙醇(PEA),通过竞争苯丙氨酸-tRNA 合成酶的活性位点来控制柑橘青霉病发生。Ouyang 等<sup>[5]</sup>用质量浓度为 1.78 mg/mL 的植物精油——柠檬醛处理,导致指状青霉细胞膜的一系列变化,包括麦角固醇含量减少以及大量羊毛甾醇积累,抑制麦角固醇合成基因 *ERG7*,*ERG11*,*ERG6*,*ERG3*,*ERG5* 的表达。Xin 等<sup>[6]</sup>从直立白薇(*Cynanchum atratum* Bunge)中分离出生物碱安托芬。安托芬通过破坏指状青霉细胞完整性,干扰能量代谢系统来抑制柑橘绿霉病菌。

本课题组从柑橘根系土壤中分离筛选到 1 株柑橘绿霉病的拮抗菌,经鉴定,命名为淡紫灰链霉菌(*Streptomyces lavendulae*)X33。前期研究发现,其发酵液提取物对柑橘意大利青霉、白地霉、指状青霉等病原菌等均有良好杀菌效果,且无毒、极性较强,易溶于水<sup>[7]</sup>。在随后的结构解析中发现提取物的活性成分为低聚赖氨酸类化合物<sup>[8]</sup>。本研究以指状青霉为研究对象,分析菌株 X33 发酵提取物(Extract of fermentation broth from *Streptomyces lavendulae* X33,SLFE)对指状青霉的抑制作用,为 SLFE 作为柑橘采后防腐剂的研究开发提供参考。

收稿日期:2021-01-12

基金项目:江西省重点研发计划重点项目(20171ACF60006);  
农业部功能食品重点实验室开放基金项目  
(201606)

作者简介:林书华(1994—),女,硕士生

通信作者:吴晓玉 E-mail:xywu166@163.com

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌株 提取发酵液的菌株 X33: 淡紫灰链霉菌 X33(*Streptomyces lavendulae* X33)。

采后柑橘绿霉病菌 Pd165: 指状青霉 Pd165(*Penicillium digitatum* Pd165)。

以上菌株均由江西省农业微生物资源开发利用工程实验室分离、提供。

1.1.2 主要试剂、培养基 主要试剂: 氯金酸、柠檬酸三钠、乙醇、浓硫酸、乙酸铅等试剂均为分析纯级, BCA 含量测试盒、丙酮酸试剂盒, 南京建成生物工程研究所; 基因组 DNA 提取试剂盒, 康为世纪公司。

发酵培养基(g/L): 可溶性淀粉 20, 牛肉膏 3, 鱼粉蛋白胨 10, NH<sub>4</sub>Cl 0.6, NaCl 10, CaCO<sub>3</sub> 0.02, 初始 pH 7.0。

PDA 培养基(g/L): 土豆 200, 葡萄糖 20, 琼脂 20, 自然 pH。

PDB 培养基: 不含琼脂的 PDA 培养基。

1.1.3 主要仪器及设备 Quanta 250 扫描电子显微镜, 美国赛默飞世尔科技公司; SCIENTISTS-10N 冷冻干燥机, 宁波新芝生物科技股份有限公司; NanoDrop one 超微量分光光度计, 美国赛默飞世尔科技公司; Eclipse Ti-S 倒置荧光显微镜, 日本尼康仪器有限公司; DXR 激光共聚焦显微拉曼光谱仪, 美国 Thermo Scientific 公司; T6 新世纪紫外可见分光光度计, 北京普析通用仪器有限公司。

### 1.2 方法

1.2.1 SLFE 的提取与配制 基于课题组前期的提取方法, 略有改进<sup>[9]</sup>。将菌株 X33 接种于发酵培养基, 28 °C, 180 r/min 振荡培养 96 h, 离心、收集上清液; 利用 D101 大孔树脂柱洗脱上清液, 经薄层检测和抑菌活性追踪后, 收集抑菌活性物质粗提液; 粗提液再经 C18 柱层析, 纯水洗脱, 将有抑菌活性的精提液冷冻干燥, 获得粉末状物质为淡紫灰链霉菌 X33 发酵液提取物 (SLFE), SLFE 称量后溶于无菌水, 保存于 4 °C 冰箱备用。

1.2.2 病菌 Pd165 孢子悬液制备 用生理盐水将 28 °C 培养 5 d 的病菌 Pd165 孢子洗入三角瓶, 8 层无菌纱布过滤, 除去菌丝, 血球计数板计数, 调整孢子悬液浓度为 10<sup>7</sup> 个/mL。

### 1.2.3 SLFE 处理对病菌 Pd165 生长的检测

1) 对病菌 Pd165 菌丝干重的影响 将 1 mL 菌株 Pd165 孢子悬液接入 50 mL PDB 培养液, 28 °C, 180 r/min 振荡培养至对数生长期 (48 h), 加入不同浓度的 SLFE, 以加等量无菌水为对照, 继续培养 96 h, 过滤, 收集菌丝体, 干燥至恒重后称重。

2) 对病菌 Pd165 产孢量的影响 参考曾志红等<sup>[10]</sup>的方法。取 200 μL 菌株 Pd165 孢子悬液, 分别均匀涂布于含质量浓度 1.2, 2.4, 4.8 mg/mL 的 SLFE 的 PDA 平板上, 对照组涂布等量无菌水。置于 28 °C, 培养 5 d 后, 0.85% 生理盐水将斜面孢子洗入三角瓶, 8 层纱布过滤, 制成孢子悬液, 用血球计数板分别计算对照组 (A<sub>1</sub>)、处理组 (A<sub>2</sub>) 的孢子数量, 单位: 个/mL。

$$\text{抑制率} = \frac{A_1 - A_2}{A_1} \times 100\% \quad (1)$$

1.2.4 SLFE 处理对菌株 Pd165 菌丝体形态的观察 参考 Ju 等<sup>[11]</sup>方法并略作修改。取 200 μL 菌株 Pd165 孢子悬液均匀涂布在 SLFE 质量浓度为 4.8 mg/mL 的 PDA 平板上, 对照组加入等量无菌水, 取灭菌盖玻片 45° 倾斜插入平板, 28 °C 培养, 待菌丝爬片长满盖玻片时取出。将盖玻片置于 2.5% 的戊二醛溶液中, 4 °C 避光固定 12 h; 磷酸缓冲液 (0.1 mol/L pH 7) 漂洗 3 次, 每次 10 min; 进行梯度脱水, 乙醇体积分数分别为 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100%, 每个体积分数处理 6 min。最后将处理好的盖玻片置于冷冻干燥机中干燥, 喷金后扫描电子显微镜观察。

1.2.5 SLFE 处理对菌株 Pd165 菌丝细胞完整性的观察 采用 FDA-PI 双色荧光法检测指状青霉细胞完整性<sup>[12]</sup>。在 PDA 培养基中加入 4.8 mg/mL 的 SLFE、插片培养指状青霉 (方法同 1.2.4 节)。选取已长满病原菌的盖玻片, 加入二乙酸荧光素 (FDA) 2.5 μmol/L, 避光反应 10 min, 再加入 10 μL 0.5 μmol/L 碘化丙啶 (PI), 避光反应 10 min。将其置于荧光显微镜下观察。

1.2.6 表面增强拉曼光谱 (SERS) 在抑菌过程中的应用

1.2.6.1 SERS 基底的制备 在 250 mL 的烧杯中加入 0.01% 氯金酸溶液 100 mL, 超声混匀, 将其置于预热好的电炉上加热至沸腾。迅速加入 0.7

mL 1%柠檬酸三钠溶液,待其颜色变成红棕色后,继续加热 8 min,冷却至室温,避光保存备用<sup>[13]</sup>。

1.2.6.2 SERS 对细胞外漏物质的检测 采用 1.2.3 节的方法培养菌丝体,通过真空抽滤收集约 1 g 2 日龄的菌丝体,并重悬于 20 mL 0.85%的生理盐水中,4 ℃冷藏使菌丝饥饿 24 h。分别加入质量浓度 1.2,2.4,4.8 mg/mL 的 SLFE,对照组(CK)加入等量无菌水。SLFE 与 CK 分别处理 120 min 后,取 1 mL 悬浮液转移至 EP 管中,并在 12 000 r/min 冷冻离心 5 min,收集上清液。将 100 μL 上清液滴入含有 400 μL 的胶体 Au 纳米颗粒中,并充分混合,置于共聚焦显微拉曼光谱仪检测<sup>[14]</sup>。

1.2.7 SLFE 处理对菌株 Pd165 菌丝内容物的测定 采用 1.2.3 节的方法,分别取对照组和处理组的菌丝各 0.5 g,置于含 pH 7.0 PBS 2 mL 的研钵中,加入适量石英砂,冰浴研磨成匀浆,4 ℃,10 000 r/min 冷冻离心 20 min,取上清液,用于测定可溶性蛋白、还原糖和丙酮酸的含量。

分别采用蒽酮比色法<sup>[15]</sup>、二辛可宁酸法(Bicinchoninic acid method, BCA)法<sup>[16]</sup>和硫代巴比妥酸法<sup>[17]</sup>测定上述上清液中还原糖、可溶性蛋白和丙酮酸的含量。

1.2.8 SLFE 处理对与菌株 Pd165 遗传物质的影响

1.2.8.1 荧光光谱法检测 SLFE 对指状青霉 DNA 含量的影响 采用康为世纪基因组 DNA 提取试剂盒提取病菌 Pd165 DNA。采用超微量分光光度计检测提取 DNA 的纯度和浓度。用 0.01 mol/L Tris-HCl(pH 7.2)将真菌基因组 DNA 稀释至 60 μg/mL。将不同质量浓度的 SLFE(0,1.2,2.4,4.8 mg/mL)加入到相同体积(60 μg/mL)的 DNA 溶液中,黑暗处理 1 h。采用荧光酶标仪在激发波长 280 nm 下,测量混合物从 360~500 nm 波长下的荧光光谱<sup>[18]</sup>。

1.2.8.2 SLFE 对细胞应答相关基因表达的影响 根据有关丝状真菌细胞应答基因的报道<sup>[19-21]</sup>,本研究选择并设计 4 对荧光定量 PCR 引物(表 1)。提取处理组(1.2 mg/mL)和对照组菌丝体总 RNA,经完整性检测合格后,反转录成 cDNA,并进行荧光定量 PCR 试验。20 μL 反应体系: 2×T5 Fast qPCR 预混液 10 μL、PCR 正向引物 0.8 μL、PCR

表 1 荧光定量 PCR 基因扩增的引物序列

Table 1 Primer sequences for gene amplification by fluorescence quantitative PCR

基因名称	引物序列(5'-3')
<i>Actin</i>	CGACTTCAGGAAGGGGTGTA CCTTGGATGTGGTAGCCGTT
<i>kzn90160.1</i>	GCTGCAACAGGACTTTGTGG CCAATGTCAGGGCGTCATCT
<i>cej60377.1</i>	GTCCGGCCAACCGTCA GGAGGCACGCATGATTGG
<i>oko99898.1</i>	CATCGTGGATGGCAAGGAGT CCTCTTCTGTCACTGCTCC
<i>cr118986.1</i>	CTGGCCGACCTCATTGTTCT GTGTCCGGTATCCGGTCTGCTC

注:基因 ID 来源于 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)。

反向引物 0.8 μL、cDNA 1 μL、ddH<sub>2</sub>O 7.4 μL。扩增条件:95 ℃预变性 1 min,95 ℃变性 15 s,60 ℃退火 15 s,40 个循环;采用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法以 actin 作为内参来量化每个样本的值。

### 1.3 数据处理

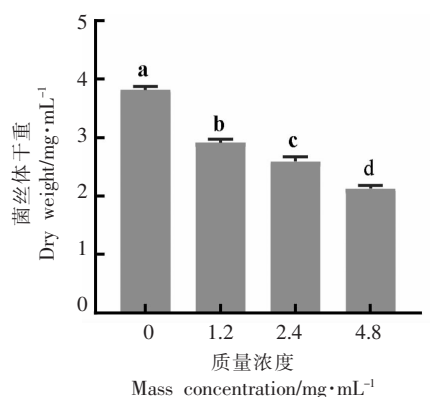
所有试验设置 3 组重复,数据以“平均值±标准差”表示。采用 Origin 9.0 作图,DPS 7.05 进行数据分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 SLFE 对菌株 Pd165 菌丝干重与产孢量的影响

指状青霉菌丝的生长受到 SLFE 显著抑制(图 1)。不同质量浓度 SLFE 处理组的菌丝干重均显著低于对照组(菌丝干重 3.82 mg/mL);随着 SLFE 质量浓度增大,对指状青霉抑制作用增强;当 SLFE 的质量浓度达到 4.8 mg/mL 时,菌丝干重(2.13 mg/mL)较对照组(CK)降低 1.69 mg/mL,降低了 44.24%。

SLFE 处理菌株 Pd165 后,其产孢量明显降低(表 2)。与对照组(CK)相比,质量浓度为 1.2,2.4,4.8 mg/mL 的 SLFE 处理组产孢量分别为 2.09×10<sup>8</sup>,1.27×10<sup>8</sup>,9.4×10<sup>7</sup> 个/mL,产孢抑制率分别为 94.9%,97.0%,97.8%;各处理组产孢量均显著低于对照组( $P<0.05$ );且 SLFE 浓度越高,对指状青霉产孢能力的抑制更强。



注: 不同小写字母 a, b, c, d 表示差异显著,  $P < 0.05$ 。

图 1 SLFE 对指状青霉菌生长的影响

Fig.1 Effect of SLFE on mycelial growth of *P. digitatum*

表 2 SLFE 对指状青霉产孢量的影响

Table 2 Effect of SLFE on sporulation quantity of *P. digitatum*

SLFE 质量浓度/ mg·mL <sup>-1</sup>	产孢量/个·mL <sup>-1</sup>	产孢抑制率/%
1.2	$2.09 \times 10^8$ <sup>a</sup>	94.86
2.4	$1.27 \times 10^8$ <sup>b</sup>	96.95
4.8	$9.4 \times 10^7$ <sup>c</sup>	97.75
0 (CK)	$4.17 \times 10^9$ <sup>d</sup>	0

注: 不同小写字母表示差异显著,  $P < 0.05$ 。

上述结果表明: SLFE 对指状青霉的菌丝生长及产孢能力具有较好的抑制效果。

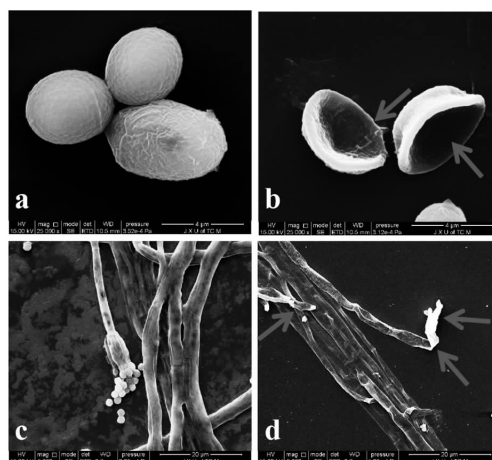
## 2.2 SLFE 对菌株 Pd165 菌丝和孢子形态的影响

从图 2 可知, 经 SLFE 处理后的菌株 Pd165 形态发生明显改变。对照组的分生孢子为球形, 形态规则且饱满(图 2a), 而处理组的分生孢子变形为不规则的椭圆, 且孢子表面出现凹陷、皱缩(图 2b); 对照组的菌丝形态饱满、生长旺盛(图 2c), 而处理组菌丝细、干瘪, 并发生折叠(图 2d)。

## 2.3 SLFE 对菌株 Pd165 菌丝细胞完整性的影响

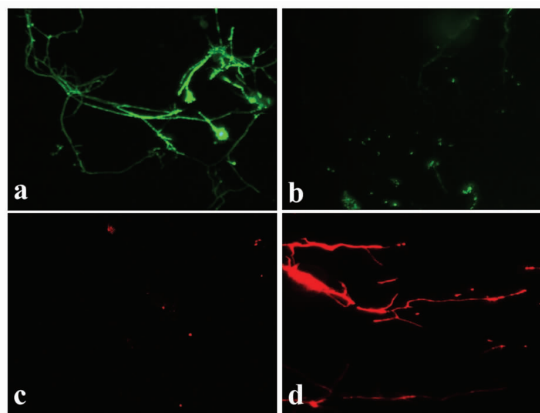
为探明 SLFE 对指状青霉菌丝体细胞活性状态的影响, 使用 FDA-PI 双染色法对菌株 Pd165 菌丝体染色。当细胞膜完整时, PI 无法进入细胞着色, FDA 在胞内酯酶作用下形成荧光素, 使完整细胞发出绿色荧光; 当细胞膜受损时, FDA 形成的荧

光素无法在细胞内积聚, 无法发出绿色荧光, 而 PI 可进入细胞, 与胞内核酸物质作用生成红色荧光物, 因而受损细胞呈红色荧光。将染色后的菌丝体置于荧光显微镜下观察。对照组菌丝体经染色后细胞显现绿色荧光(图 3a), 仅有微弱的红色荧光(图 3c), 而 SLFE 处理组菌丝细胞大部分呈红色荧光(图 3d), 少数为绿色荧光(图 3b)。结果表明: 菌株 Pd165 菌丝体经 SLFE 处理后, 细胞膜的完整性受到破坏。



注: a, c 为对照组的分生孢子和菌丝形态; b, d 为 SLFE 处理后的分生孢子和菌丝形态。

图 2 SLFE 对指状青霉分生孢子和菌丝形态的影响  
Fig.2 Effect of SLFE on morphology of the conidia and hyphae of *P. digitatum*



注: a, c 为空白对照组, b, d 为 SLFE 处理组。

图 3 荧光显微镜观察指状青霉菌丝细胞膜的完整性  
Fig.3 Observation of the integrity of pathogenic *P. digitatum* membrane by laser confocal microscope

## 2.4 SLFE 对病菌 Pd165 菌丝细胞物质外漏的影响

利用拉曼光谱进一步研究了 SLFE 对病菌 Pd165 菌丝细胞物质外泄的影响。与对照组相比, SLFE 处理后的菌株 Pd165 胞外液在  $400\sim 1800\text{ cm}^{-1}$  范围内呈现出显著的特征峰变化(图 4)。其中,最明显的特征峰  $1330\text{ cm}^{-1}$ (核酸特征峰)<sup>[22]</sup>、 $1129\text{ cm}^{-1}$ (脂肪酸特征峰)<sup>[23]</sup>、 $1570\text{ cm}^{-1}$ (蛋白质酰胺 II 特征峰)<sup>[24]</sup>在经不同浓度的 SLFE 处理后,较对照组的峰值明显增强,且随 SLFE 质量浓度增加,特征峰峰值增大。表明与对照组相比,SLFE 处理后胞外液中脂肪酸、蛋白质及核酸等大分子物质含量增加,推测可能是由于菌丝细胞膜受损,引发胞内大分子物质外泄。

## 2.5 SLFE 对菌株 Pd165 菌丝内容物的影响

### 2.5.1 对病菌 Pd165 菌丝还原糖含量的影响

病菌 Pd165 经质量浓度 1.2, 2.4, 4.8 mg/mL 的 SLFE 处理后,病菌菌丝体内还原糖含量分别为 0.53%, 0.39%, 0.10%, 均显著低于对照组(0.87%, 图 5a); 且 SLFE 质量浓度越高, 菌丝还原糖含量越低; 当 SLFE 质量浓度为 4.8 mg/mL 时, 处理组菌丝总糖较对照组下降了 81.13%。

### 2.5.2 对病菌 Pd165 可溶性蛋白含量的影响

病菌 Pd165 经不同浓度 SLFE 处理后, 各浓度处理组(1.2, 2.4, 4.8 mg/mL SLFE)菌丝可溶性蛋白含

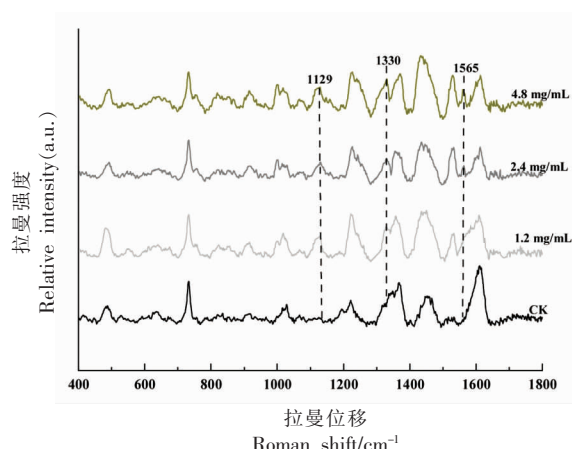
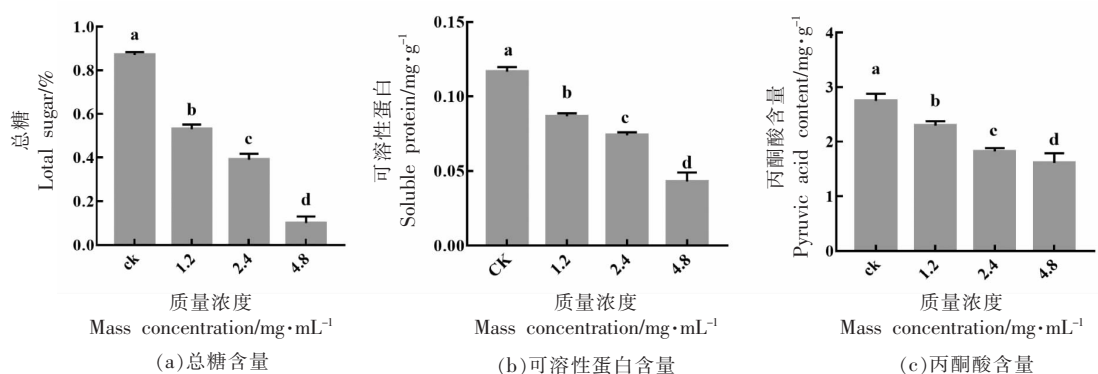


图 4 不同质量浓度 SLFE 处理指状青霉的 SERS  
Fig.4 SERS spectra of *P. digitatum* treated with different concentrations of SLFE

量分别为 0.09, 0.07, 0.04 mg/g (图 5b), 较对照组 (0.12 mg/g) 含量分别降低 25.00%, 41.67%, 66.67%。SLFE 处理后菌株 Pd165 菌丝体内可溶性蛋白含量显著减少, SLFE 质量浓度越高, 可溶性蛋白含量下降越显著。

### 2.5.3 对病菌 Pd165 菌丝丙酮酸含量的影响

病菌 Pd165 菌丝体内丙酮酸含量随着 SLFE 处理浓度的升高呈下降趋势(图 5c)。对照组菌丝体丙酮酸含量为 2.74 mg/g, 而经 4.8 mg/mL 的 SLFE 处理后, 菌丝体内丙酮酸含量为 1.61 mg/g, 含量降低率达到 41.41%。



注:不同小写字母表示差异显著,  $P < 0.05$ 。

图 5 SLFE 对指状青霉菌丝内容物的影响

Fig.5 Effect of SLFE on mycelial ingredients of *P. digitatum*

## 2.6 SLFE 对菌株 Pd165 遗传物质的影响

### 2.6.1 对病菌 Pd165 基因组 DNA 的影响

采用

荧光光谱技术分析 SLFE 与 DNA 的体外结合情况<sup>[25]</sup>。与对照组相比,随着 SLFE 质量浓度的增加,各处

理组中均表现出明显的荧光猝灭 (图 6), 表明 SLFE 可与 DNA 结合, 导致 DNA 的结构和构象发生变化。

2.6.2 对细胞应答相关基因表达的影响 选取与细胞壁生物合成、能量代谢、氧化应激与产孢等有关的 4 个基因: *cej60377.1* (编码几丁质酶——CHI)、*oko99898.1* (编码酰基辅酶 A 脱氢酶——ACAD)、*crl18986.1* (编码过氧化物酶——POD) 和 *kzn90160.1* (编码 BRLA), 荧光定量 PCR 测定其基因表达量, 结果见表 3。经 1.2 mg/mL SLFE 处理后, 4 个基因的表达水平均显著高于对照组。

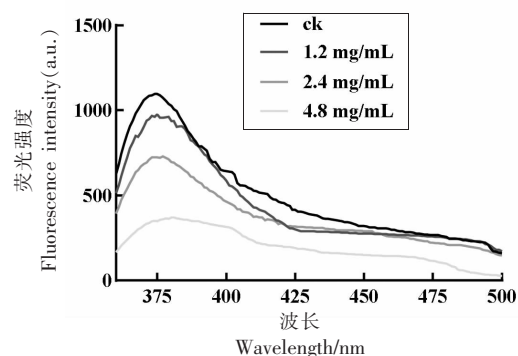


图 6 SLFE 对指状青霉基因组 DNA 的影响  
Fig.6 Effect of SLFE treatment on genetic DNA of *P. digitatum*

表 3 SLFE 对指状青霉细胞应答相关基因表达的影响

Table 3 Effects of SLFE on the expression of response-related genes in *P. digitatum*

基因	对照组	SLFE 处理组
<i>cej60377.1</i> (CHI)	1.58 ± 0.23	751.44 ± 40.40 <sup>a</sup>
<i>oko99898.1</i> (ACAD)	60.92 ± 4.00	657.09 ± 39.84 <sup>a</sup>
<i>crl18986.1</i> (POD)	661.06 ± 41.80	1 013.13 ± 58.11 <sup>a</sup>
<i>kzn90160.1</i> (BRLA)	1.44 ± 0.28	513.23 ± 44.54 <sup>a</sup>

注: a. SLFE 处理组和对照相比差异显著,  $P < 0.05$ 。

### 3 讨论

与化学杀菌剂相比, SLFE 具有易溶于水、无毒、广谱、抗菌性强等优势。正常条件下, 菌株 Pd165 在 PDB、PDA 培养基中可快速生长、产孢, 而经 SLFE 处理后, 菌株 Pd165 菌丝生长量和产孢量明显减少, 且菌丝体和孢子形态被严重破坏, 菌丝细而干瘪, 并发生折叠, 分生孢子变形为不规则的椭圆, 且孢子表面出现凹陷、皱缩。1.2 mg/mL 的 SLFE 对病菌 Pd165 产孢抑制率高达 94.86%, 且 SLFE 的抑菌效果呈现剂量-效应关系。

为深入探讨 SLFE 对菌株 Pd165 的抑制机制, 本研究使用 FDA-PI 双染色法对病菌 Pd165 菌丝体染色, SLFE 处理组菌丝细胞大部分呈红色荧光, 少数为绿色荧光, 说明经 SLFE 处理后的病菌 Pd165 菌丝体细胞膜的完整性受到破坏。运用拉曼光谱检测 SLFE 处理后的病菌 Pd165 胞外液, 其中代表脂肪酸、核酸和蛋白质的吸收峰: 1 129, 1 330, 1 565  $\text{cm}^{-1}$  同时增强。由此更进一步证实由于细胞膜完整性被破坏, 造成病菌 Pd165 胞内脂肪酸、核酸和蛋白质的外泄。这与黄飞<sup>[26]</sup>研

究发现反式肉桂醛处理对意大利青霉菌丝体细胞膜结构具有损伤作用的研究结果相似。

通过检测菌株 Pd165 菌丝体胞内的还原糖、可溶性蛋白、丙酮酸含量在添加不同质量浓度 SLFE 后的变化, 发现三者含量均显著降低, 4.8 mg/mL 的 SLFE 处理后, 三者分别下降 81.13%, 66.67% 和 41.41%。还原糖和可溶性蛋白是细胞内重要组成成分, 丙酮酸是参与生物体基础代谢的中间产物之一, 在糖、脂肪、氨基酸的代谢联系中起着重要的枢纽作用, 这 3 种胞内物质含量的下降表明菌丝体合成代谢出现紊乱, 无法维持正常的生长与生理功能。Chen 等<sup>[27]</sup>研究发现经 7-脱甲基酪氨酸处理后的意大利青霉菌体胞内还原糖、可溶性蛋白含量显著降低, 这与本研究结果一致。

Parveen 等<sup>[28]</sup>研究表明酵母细胞通过诱导 CHI 的过量表达, 进而激活了细胞壁的代偿机制以克服  $\alpha$ -萜品烯的毒性; Guo 等<sup>[29]</sup>研究表明 2-甲氧基-1,4-萘醌上调了与能量产生相关的蛋白——ACAD, 从而扰乱病菌 Pd165 的代谢过程, 以发挥

抑菌作用;Fan等<sup>[30]</sup>研究表明,NO通过诱导抗氧化酶(SOD和POD)基因的过表达,以保护狗牙根免受冷胁迫;王明爽<sup>[31]</sup>报道*BrlA*的过量表达会导致病菌Pd165菌丝停止生长和菌丝尖端直接形成分生孢子。本研究的荧光定量PCR试验发现,SLFE处理病菌Pd165后,菌株显著上调了上述4种酶的基因表达量,推测病菌Pd165受到SLFE胁迫后,激活细胞壁代偿机制,导致细胞壁结构受损;酰基辅酶A脱氢酶是参与催化脂肪酸与氨基酸分解代谢中的脱氢酶,其基因表达量上调加速了脂肪酸和氨基酸分解代谢,引起细胞合成代谢紊乱。过氧化物酶(POD)作为细胞内重要的内源活性氧清除剂,其基因的过表达可能是SLFE处理激活了病菌Pd165细胞内防御酶系,以增强细胞清除活性氧能力,防止细胞损伤;*BrlA*是调节分生孢子形成的重要元件,其基因的过量表达可能是造成菌丝生长慢和分生孢子少的原因之一。此外,DNA结合试验发现SLFE可与指状青霉DNA结合导致破坏其结构与构象。

综上,SLFE对柑橘病原菌菌株Pd165的抑菌作用主要是引发细胞完整性受损,扰乱细胞内原有的稳态,使核酸、糖类、可溶性蛋白等内容物渗出;SLFE可与DNA结合,抑制DNA功能的表达;同时诱导与细胞壁生物合成、能量代谢、氧化应激与产孢等有关的基因的过表达,最终达到杀菌作用。一些活性抗菌成分也有相似的抑菌机制,如 $\alpha$ -水芹烯和壬醛对圆弧青霉的抑菌机制是攻击细胞膜和破坏菌丝结构<sup>[32]</sup>。石竹烯对热杀索丝菌的抑菌机理是攻击病菌细胞壁和细胞膜,使胞内物质外泄,影响细胞正常生长代谢;且与基因组DNA结合,破坏其结构与构象,抑制病菌生长<sup>[33]</sup>。

#### 4 结论

本研究将SLFE作用于病菌Pd165,结果表明不同质量浓度的SLFE对菌株Pd165均有一定的抑制作用,且呈现剂量效应。SLFE通过影响菌株Pd165细胞结构的完整性,致使核酸、糖类、可溶性蛋白等细胞内容物外渗,诱导参与细胞应答反应的部分基因过量表达,从而达到抑菌、杀菌效果。SLFE能抑制病菌Pd165的生长,可用于柑橘采后绿霉病的防治,有望开发为环境友好型的新

型生物防腐剂。

#### 参 考 文 献

- [1] BAZIOLI J M, BELINATO J R, COSTA J H, et al. Biological control of citrus postharvest phytopathogens[J]. *Toxins*, 2019, 11(8): 460.
- [2] PALOU L, SMILANICK J, DROBY S. Alternatives to conventional fungicides for the control of citrus postharvest green and blue molds[J]. *Stewart Postharvest Review*, 2008, 4(2): 1-16.
- [3] LIU K, ZHOU X, FU M. Inhibiting effects of epsilon-poly-L-lysine ( $\epsilon$ -PL) on *Penicillium digitatum* and its involved mechanism[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2017, 123: 94-101.
- [4] LIU P, CHENG Y, YANG M, et al. Mechanisms of action for 2-phenylethanol isolated from *Kloeckera apiculata* in control of *Penicillium* molds of citrus fruits[J]. *BMC Microbiology*, 2014, 14(1): 242.
- [5] OUYANG Q L, TAO N G, JING G. Transcriptional profiling analysis of *Penicillium digitatum*, the causal agent of citrus green mold, unravels an inhibited ergosterol biosynthesis pathway in response to citral[J]. *BMC Genomics*, 2016, 17(1): 599.
- [6] XIN Z, OUYANG Q, WAN C, et al. Isolation of antifungal from *Cynanchum atratum* BUNGE (Asclepiadaceae) and its antifungal activity against *Penicillium digitatum*[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2019, 157: 110961.
- [7] 张宇坤. 柑橘绿霉病拮抗菌的分离筛选及其产物特性研究[D]. 南昌: 江西农业大学, 2013.  
ZHANG Y K. Isolation and screening of an antagonistic agent against Citrus green mold and characterization of its product[D]. Nanchang: Jiangxi Agricultural University, 2013
- [8] 徐芳. 淡紫灰链霉菌 X33 发酵液水溶性活性物质分离纯化及结构分析[D]. 南昌: 江西农业大学, 2018.  
XU F. Isolation and purification of water-soluble active substances from fermentation broth of *Streptomyces lavendulae* X33 and structural analysis [D]. Nanchang: Jiangxi Agricultural University, 2018.
- [9] 段栓成. 淡紫灰链霉菌 X33 发酵培养基的优化及其活性物质的提取[D]. 南昌: 江西农业大学, 2015.  
DUANG S C. Optimization of fermentation medium for *Streptomyces lavendulae* X33 and extraction of

- its active substances[D]. Nanchang: Jiangxi Agricultural University, 2015.
- [10] 曾志红, 陈玲苗, 黄秋蓉. 丁香提取物对枝孢霉菌的抑菌效果及抑菌机理[J]. 福建林学院学报, 2019, 39(1): 77-81.
- ZENG Z H, CHEN L M, HUANG Q R. Study on the antibacterial effect of clove extract on *Cladosporium* and its mechanism[J]. Journal of Fujian Academy of Forestry, 2019, 39(1): 77-81.
- [11] JU J, XIE Y, YU H, et al. Synergistic inhibition effect of citral and eugenol against *Aspergillus niger* and their application in bread preservation[J]. Food Chemistry, 2019, 310: 125974.
- [12] 周祺, 刘芳, 范晓然, 等.  $\epsilon$ -聚赖氨酸对肠球菌的抑菌作用及机制[J]. 中国食品学报, 2018, 18(1): 65-72.
- ZHOU Q, LIU F, FANG X R, et al. Antimicrobial activity and mechanism of  $\epsilon$ -polylysine on *Enterococcus*[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2018, 18(1): 65-72.
- [13] 彭义杰, 刘木华, 赵进辉, 等. 应用表面增强拉曼光谱法检测鸭肉中萘夫西林残留的研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2017, 37(12): 3736-3742.
- PENG Y J, LIU M H, ZHAO J H, et al. Study on detection of nafcillin residues in duck meat using surface enhanced Raman spectroscopy[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2017, 37(12): 3736-3742.
- [14] LONG Y, HUANG W, WANG Q, et al. Green synthesis of garlic oil nanoemulsion using ultrasonication technique and its mechanism of antifungal action against *Penicillium italicum* [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2020, 64: 104970.
- [15] RONDEL C, MARCATO-ROMAIN C E, GIRBAL-NEUHAUSER E. Development and validation of a colorimetric assay for simultaneous quantification of neutral and uronic sugars[J]. Water Research, 2013, 47(8): 2901-2908.
- [16] CHEN L, YU Z, LEE Y J, et al. Quantitative evaluation of proteins with bicinchoninic acid (BCA): Resonance Raman and surface-enhanced resonance Raman scattering-based methods [J]. The Analyst, 2012, 137(24): 5834-5838.
- [17] YANG Y, ZHANG S W, LI K T. Antagonistic activity and mechanism of an isolated *Streptomyces corchorusii* strain AUH-1 against phytopathogenic fungi[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2019, 35(9): 145.
- [18] JING G X, TAO N G, JIA L, et al. Influence of  $\alpha$ -terpineol on the growth and morphogenesis of *Penicillium digitatum*[J]. Botanical Studies, 2015, 56(1): 35.
- [19] CAMÕES F, ISLINGER M, GUIMARÃES S C, et al. New insights into the peroxisomal protein inventory: Acyl-CoA oxidases and -dehydrogenases are an ancient feature of peroxisomes[J]. Biochim Biophys Acta, 2015, 1853(1): 111-125.
- [20] WANG Y, FENG K, YANG H, et al. Effect of cinnamaldehyde and citral combination on transcriptional profile, growth, oxidative damage and patulin biosynthesis of *Penicillium expansum*[J]. Front Microbiol, 2018, 9: 597.
- [21] WANG M, SUN X, ZHU C, et al. PdbrlA, PdabaA and PdwetA control distinct stages of conidiogenesis in *Penicillium digitatum* [J]. Research in Microbiology, 2015, 166(1): 56-65.
- [22] SCHUSTER K, URLAUB E, GAPES J R. Single-cell analysis of bacteria by Raman microscopy: Spectral information on the chemical composition of cells and on the heterogeneity in a culture[J]. Journal of Microbiological Methods, 2000, 42(1): 29-38.
- [23] ZHANG H, SILVA A C, ZHANG W, et al. Raman spectroscopy characterization extracellular vesicles from bovine placenta and peripheral blood mononuclear cells[J]. PloS One, 2020, 15(7): e0235214.
- [24] 李皓. 基于动态表面增强拉曼光谱法的耐药白色念珠菌诊断及药物筛选研究[D]. 上海: 第二军医大学, 2017.
- LI H. Dynamic surface enhanced Raman spectroscopy based diagnostic and drug screening studies for drug-resistant *Candida albicans*[D]. Shanghai: Second Military Medical University, 2017.
- [25] LIU S, WANG W, DENG L, et al. Control of sour rot in citrus fruit by three insect antimicrobial peptides[J]. Postharvest Biology and Technology, 2019, 149: 200-208.
- [26] 黄飞. 反式肉桂醛对意大利青霉菌的抑制机理研究[D]. 无锡: 江南大学, 2019.
- HUANG F. Study on the inhibitory mechanism of trans-cinnamaldehyde against *Penicillium italicum*[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2019.
- [27] CHEN C, QI W, PENG X, et al. Inhibitory effect



- of 7-Demethoxytylophorine on *Penicillium italicum* and its possible mechanism[J]. *Microorganisms*, 2019, 7(2): 36.
- [28] PARVEEN M, HASAN M K, TAKAHASHI J, et al. Response of *Saccharomyces cerevisiae* to a monoterpene: Evaluation of antifungal potential by DNA microarray analysis[J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2004, 54(1): 46–55.
- [29] GUO M, ZHANG X, LI M, et al. Label-free proteomic analysis of molecular effects of 2-methoxy-1, 4-naphthoquinone on *Penicillium italicum*[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(14): 3459.
- [30] FAN J, CHEN K, AMOMBO E, et al. Physiological and molecular mechanism of nitric oxide (NO) involved in bermudagrass response to cold stress[J]. *PLoS One*, 2015, 10(7): 132991.
- [31] 王明爽. 柑橘褐斑病菌比较基因组和转录组分析及柑橘绿霉病菌产孢中心调控途径和高渗甘油途径的功能基因研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2016.
- WANG M S. Comparative genome and transcriptome analysis of citrus brown spot pathogen and study on the functional genes of the spore production center regulation pathway and hypertonic glycerol pathway of citrus green mold pathogen[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2016.
- [32] ZHANG J H, SUN H L, CHEN S Y, et al. Antifungal activity, mechanism studies on alpha-phellandrene and nonanal against *Penicillium cyclopium* [J]. *Botanical Studies*, 2017, 58(1): 13.
- [33] 舒慧珍, 唐志凌, 韩薇, 等. 石竹烯对热杀索丝菌的抑菌机理[J]. *食品科学*, 2020, 41(15): 31–38.
- SHU H Z, TANG Z L, HAN W, et al. Antibacterial activity and mechanism of caryophyllene against *Brochothrix thermosphacta*[J]. *Food Science*, 2020, 41(15): 31–38.

### Inhibitory Effect of Fermentation Extract of *Streptomyces lavendulae* Strain X33 on Postharvest Citrus Green Mold

Lin Shuhua, Wang Linlan, Luo Pan, Zhang Bin, Wu Xiaoyu\*

(College of Bioscience and Bioengineering, Jiangxi Agriculture University, Jiangxi Engineering Laboratory for the Development and Utilization of Agricultural Microbial Resources, Collaborative Innovation Center of Postharvest Key Technology and Quality Safety of Fruits and Vegetables in Jiangxi Province, Nanchang 330045)

**Abstract** In order to reveal the inhibitory effect of the extract of fermentation broth from *Streptomyces lavendulae* X33 (hereafter referred to as SLFE) on *Penicillium digitatum* (*P. digitatum*), a postharvest pathogen of citrus, the cellular integrity and related cell contents of *P. digitatum* treated with SLFE were determined. Scanning electron microscope, Raman spectrum, fluorescence probe, fluorescence spectrum and fluorescence quantitative PCR were used to observe the effects of SLFE treatment on mycelium morphology, cell response and DNA. The results showed that the hyphae of the strain Pd165 appeared withered, twisted and folded, and the conidiophores and conidia were abnormal by the treatment of 1.2 mg/mL SLFE, and moreover, the sporulation inhibition rate was as high as 94.86%. At the same time, the cell integrity of the strain was seriously damaged by SLFE, which acted as triggers for an increase in the characteristic peaks of fatty acids, nucleic acids and proteins in the extracellular supernatant (1 129, 1 330, 1 565  $\text{cm}^{-1}$ ), and the massive exudation of intracellular sugars, nucleic acids and soluble proteins, and a decrease of the pyruvate content. In addition, SLFE treatment destroyed the conformation and structure of *P. digitatum* genomic DNA and upregulated the expression levels of genes related to cell integrity, sporulation, metabolism and oxidative stress (*cej60377.1*, *oko99898.1*, *crl18986.1*, *kzn90160.1*). The results suggested that SLFE treatment damaged the integrity of *P. digitatum* cells, disturbed the original homeostasis of cells, and seriously destroyed the conformation of DNA and the morphology of mycelium.

**Keywords** extract of fermentation broth from *Streptomyces lavendulae* X33; *Penicillium digitatum* Pd165; antagonistic mechanism; cell integrity