

拮抗酵母控制樱桃番茄采后病害及其机制研究

张晓云¹, 岳青蓉¹, 周游¹, 顾香玉², 赵利娜¹, 张红印^{1*}

¹ 江苏大学食品与生物工程学院 江苏镇江 212013

² 江苏科技大学粮食学院 江苏镇江 212004

摘要 通过体外和体内试验,从实验室保存的酵母菌中筛选对樱桃番茄采后黑斑病具有控制作用的拮抗酵母,考察所筛选的拮抗酵母对樱桃番茄自然腐烂的防治效果及对果实品质的影响。通过拮抗酵母对黑斑病病原菌链格孢孢子萌发、芽管伸长和菌丝结构的影响,在樱桃番茄伤口处和表面的生长动态,探讨其对病原菌的直接和间接抑制作用。采用 RT-qPCR 技术测定拮抗酵母对樱桃番茄抗性相关基因表达水平的影响,分析其对樱桃番茄果实抗病性的影响。结果表明,试验菌株中,卡利比克毕赤酵母对樱桃番茄采后黑斑病的控制效果最好,该处理组果实发病率仅为 16.25%,显著低于对照组(68.76%),并且该拮抗酵母还可显著降低樱桃番茄采后自然腐烂,减缓果实品质劣变。卡利比克毕赤酵母通过抑制链格孢孢子萌发、菌丝伸长以及寄生于菌丝上直接抑制病原菌生长,还在樱桃番茄伤口处和表面与链格孢竞争营养和空间而间接抑制病原菌生长。卡利比克毕赤酵母还能诱导樱桃番茄抗氧化基因(SOD, CAT 和 APX)以及病程相关基因(PR 基因)(GLU 和 CHI)的表达。卡利比克毕赤酵母可以显著控制樱桃番茄采后黑斑病和自然腐烂,对果实品质无显著不良影响。该拮抗酵母可以通过抑制病原菌生长和提高樱桃番茄抗性基因的表达控制果实采后病害。

关键词 樱桃番茄; 采后病害; 生物防治; 抗病性

文章编号 1009-7848(2024)04-0304-11 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2024.04.029

樱桃番茄 (*Lycopersicon esculentum* Mill) 是典型的呼吸跃变型果实,皮薄汁多,在贮藏、运输和销售过程中极易遭受各种病原菌如灰葡萄孢 (*Botrytis cinerea*) 和链格孢 (*Alternaria alternata*) 的侵染,进而造成严重的经济损失。链格孢作为果蔬中常见且破坏性很强的病原菌之一,可以侵染苹果、梨和土豆等多种水果和蔬菜,引起严重的采后病害^[1-3]。链格孢侵染樱桃番茄引起的黑斑病是其主要采后病害之一,能够造成果实软腐,食用品质和商业价值降低^[4]。采取适当的方法控制樱桃番茄采后病害,对于其品质保持具有重要意义。

使用化学杀菌剂控制果蔬采后病害虽然可以取得显著效果,但是长期使用化学杀菌剂不仅会污染生态环境,可能对食用者健康产生危害,还容易导致病原菌产生耐药性^[5-6]。过去的三十多年来,科研工作者们不断探索可替代化学杀菌剂的用于果蔬采后病害控制的新方法。在已报道的生态友

好型方法中,利用拮抗微生物对果蔬采后病害进行生物防治被认为是最有希望的方法之一^[7]。近年来,酵母菌作为防治水果采后病害应用最为广泛的一类拮抗微生物,在国际上受到广泛关注。目前拮抗酵母已被广泛用于水果,如苹果、梨、柑橘等采后病害的控制,且已取得良好的效果^[8-10]。该方法具有安全、高效,对环境友好等优点,具有广阔的发展空间和良好的应用前景。目前利用拮抗酵母控制樱桃番茄采后病害的研究较少,尤其是拮抗酵母控制樱桃番茄采后黑斑病的研究较少,其控制机制也不明确。

本研究从实验室保存的酵母菌中筛选对樱桃番茄采后黑斑病和自然腐烂具有控制效果的拮抗酵母菌,通过该拮抗酵母对黑斑病病原菌链格孢生长的抑制作用,及其对樱桃番茄抗性相关基因表达水平的影响,解析其控制樱桃番茄采后病害的机制,为樱桃番茄采后病害的生物防治提供数据支持。

收稿日期: 2023-04-02

基金项目: 国家自然科学基金项目(32372778);江苏省重点研发计划项目(现代农业)(BE2022352)

第一作者: 张晓云,女,博士,教授

通信作者: 张红印 E-mail: zhanghongyin126@126.com

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

挑选无病虫害、色泽和大小均匀并且无任何

机械性损伤的樱桃番茄,先用清水冲洗其表面泥土、枯叶等杂质,再浸泡于0.2%的次氯酸钠溶液中,3 min后捞出并用流动清水冲洗表面以去除残留的次氯酸钠,将洗净的樱桃番茄置于塑料筐中晾干备用。

常用试剂和药品均为国产分析纯级。HiFiScript gDNA Removal RT Master Mix 试剂盒,北京康为世纪生物科技有限公司。柱式植物总RNA抽提纯化试剂盒,生工生物工程(上海)股份有限公司。

培养基:NYDA培养基:酵母浸膏5g,牛肉浸膏8g,葡萄糖10g,琼脂15g,溶于1000 mL水;NYDB培养基:NYDA培养基不加琼脂;PDA培养基:称取切碎的马铃薯200g于适量水中煮沸20 min,8层纱布过滤,滤液加入20g葡萄糖和20g琼脂粉,加水至1000 mL。

1.2 设备与仪器

恒温恒湿培养箱,上海一恒科学仪器有限公司;恒温振荡摇床,太仓市强乐实验设备有限公司;Nexcope 荧光显微镜,宁波永新光学股份有限公司;TA-XT2i 物性仪,英国 Stable Micro System 公司;UV-1601 紫外-可见分光光度计,北京瑞利分析仪器有限公司;ABI PRISM 7500 实时荧光定量 PCR 仪,美国 Bio-systems 公司;PCR 仪,美国 Bio-Rad 公司。

1.3 方法

1.3.1 酵母菌悬液的制备 实验室筛选并保存的5株拮抗酵母菌:Y1:胶红酵母(*Rhodotorula mucilaginosa*)、Y2:罗伦隐球酵母(*Cryptococcus laurentii*)、Y3:卡利比克毕赤酵母(*Pichia caribbica*, CGMCC No.3616)、Y4:浅黄隐球酵母(*C. flavescens*)、Y5:酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*),分别接种于NYDA培养基上,于28℃培养48 h。分别挑取2环接种于50 mL NYDB培养基中,于28℃,180 r/min条件下培养20~24 h。培养液在4℃,8000 r/min条件下离心10 min,收集沉淀并用无菌生理盐水洗涤2次以去除培养基质,然后用无菌生理盐水重新悬浮并制成 1×10^8 cells/mL的菌悬液。

1.3.2 链格孢孢子悬浮液的制备 链格孢为本课题组从樱桃番茄病斑组织中分离的黑斑病病原

菌,接种于PDA培养基平板上,于25℃培养7 d。用无菌生理盐水洗下孢子并用8层灭菌纱布过滤,滤液用无菌生理盐水调节孢子浓度为 1×10^5 spores/mL。

1.3.3 拮抗酵母的筛选

1.3.3.1 不同酵母菌对链格孢的体外抑制作用 用无菌打孔器在PDA培养基平板中央打孔(直径 \times 深度=5 mm \times 5 mm),向孔中注入50 μ L酵母菌悬液(1×10^8 cells/mL),晾干后再注入等体积的链格孢孢子悬浮液。室温下晾干后置于25℃、相对湿度(RH)95%的恒温恒湿培养箱,培养5 d。以无菌生理盐水代替酵母菌悬液的处理作为对照。每个处理包括3个重复。测量不同处理平板上链格孢的菌落直径,计算不同酵母菌对链格孢生长的抑制率。

1.3.3.2 不同酵母菌对樱桃番茄黑斑病的控制作用 分别按照1.3.1节和1.3.2节的方法制备拮抗酵母菌悬液和链格孢孢子悬浮液。在表面消毒并晾干的樱桃番茄赤道处,用无菌打孔器制造出3 mm \times 3 mm的伤口,室温下晾干后接种10 μ L酵母菌悬液(1×10^8 cells/mL)。2 h后,在樱桃番茄伤口处再接种10 μ L链格孢孢子悬浮液(1×10^5 spores/mL)。室温下晾干后置于20℃恒温恒湿培养箱(RH 95%)中,贮藏5 d,测定腐烂率及腐烂直径。以无菌生理盐水代替酵母菌悬液处理作为对照。每个处理包括3个重复,每个重复15个樱桃番茄。

1.3.4 卡利比克毕赤酵母对樱桃番茄采后自然腐烂及生理品质的影响 选用无病虫害、色泽和大小均匀并且无任何机械性损伤的樱桃番茄,不经任何处理保持其自然状态,浸泡于卡利比克毕赤酵母菌悬液(1×10^8 cells/mL)中3 min,捞出后置于消毒塑料筐中,自然晾干后于20℃恒温恒湿培养箱(RH 95%)中贮藏。30 d后统计果实腐烂率并测定生理品质相关指标。对照组为无菌生理盐水处理的樱桃番茄。每个处理包括3个重复,每个重复15个樱桃番茄。

腐烂率按公式(1)计算:

$$\text{腐烂率}(\%) = \frac{\text{腐烂果实个数}}{\text{果实总数}} \times 100 \quad (1)$$

樱桃番茄品质指标测定方法如下:

$$\text{失重率}(\%) = \frac{\text{贮藏前果实质量} - \text{贮藏结束时}}$$

果实质量)/贮藏前果实质量 $\times 100$ (2)

樱桃果实硬度和可溶性固形物的测定参考 Zhao 等^[11]的方法,分别采用 TA-XT2i 物性仪和手持式折光仪进行测定;可滴定酸的测定采用酸碱滴定法^[12],测定结果以苹果酸百分比表示;可溶性糖和抗坏血酸(AsA)含量的测定分别以蒽酮试剂法和 2,6-二氯酚靛酚滴定法进行测定^[13-14],结果以 g/100 g 鲜重表示。

1.3.5 链格孢孢子萌发率及芽管长度的测定 参考 Han 等^[15]的方法测定链格孢单独培养及与卡利比克毕赤酵母共培养时孢子萌发率及芽管长度。链格孢在 NYDB 中培养时,每隔 3 h 取 1 次样,然后于显微镜下观察并记录链格孢孢子总数及萌发孢子数,并用测微尺测量芽管长度,共计观察 9 h。每个处理 3 个重复。

1.3.6 卡利比克毕赤酵母与链格孢菌丝相互作用的观察 在固体培养基中卡利比克毕赤酵母与链格孢菌丝的相互作用参考 Liu 等^[16]的方法。用接种针挑取链格孢孢子接种在 PDA 培养基平板中央,25 °C 培养 3 d 后,在菌落周围涂布 100 μL 卡利比克毕赤酵母菌悬液 (1×10^8 cells/mL),晾干后 25 °C 培养 48 h。然后用无菌水在菌落周围进行多次冲洗以便除去周围的酵母,小心铲取菌落边缘菌丝,于显微镜下观察链格孢菌丝的显微形态。

1.3.7 卡利比克毕赤酵母生长动态的测定

1.3.7.1 卡利比克毕赤酵母在樱桃番茄伤口处的生长动态 在表面消毒并晾干的樱桃番茄赤道处,用无菌打孔器制造出 3 mm \times 3 mm 的伤口,晾干后接种 10 μL 卡利比克毕赤酵母菌悬液 (1×10^8 cells/mL)。2 h 后再接种 10 μL 链格孢孢子悬浮液 (1×10^5 spores/mL)。室温下晾干后分别置于 20 °C 和 4 °C 恒温恒湿培养箱(RH 95%)中贮藏。定时取样,参考 Han 等^[15]的方法测定樱桃番茄伤口处卡利比克毕赤酵母的数量,结果以 lg(CFU/wound)表示。试验设置 3 个重复,每个重复 15 个樱桃番茄。

1.3.7.2 卡利比克毕赤酵母在樱桃番茄表面的生长动态 在表面消毒并晾干的樱桃番茄赤道处,用记号笔标记直径为 15 mm 的圆,用无菌涂布棒分别将 10 μL 卡利比克毕赤酵母菌悬液 (1×10^8 cells/mL) 和 10 μL 链格孢孢子悬浮液 (1×10^5 spores/mL) 均匀涂布于圆圈内,室温下晾干后分别

置于 20 °C 和 4 °C (RH 95%) 恒温恒湿培养箱中贮藏。定时取样并按照 1.3.7.1 节的方法测定樱桃番茄表面卡利比克毕赤酵母的数量,结果以 lg(CFU/circle) 表示。试验设置 3 个重复,每个重复 15 个樱桃番茄。

1.3.8 樱桃番茄抗病相关基因表达水平的测定

在表面消毒并晾干的樱桃番茄赤道处,用无菌打孔器制造出 3 mm \times 3 mm 的伤口,晾干后接种 10 μL 浓度为 1×10^8 cells/mL 的卡利比克毕赤酵母菌悬液。晾干后的樱桃番茄置于 20 °C 恒温恒湿培养箱(RH 95%)中贮藏,以无菌生理盐水处理的樱桃番茄作为对照。每个处理包括 3 个重复,每个重复 15 个樱桃番茄。

挖取樱桃番茄伤口处组织,以柱式植物总 RNA 抽提纯化试剂盒提取总 RNA,然后利用 RT-qPCR 技术测定樱桃番茄抗病相关基因的表达水平。RT-qPCR 所用引物如表 1 所示,以微管蛋白(Tubulin)基因作为内参基因,所有引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。首先使用 Hi-FiScript gDNA Removal RT Master Mix 去除基因组 DNA,并将 RNA 反转录成 cDNA,然后使用 ABI PRISM 7500 实时荧光定量 PCR 仪测定基因表达量,并通过 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 方法计算基因的相对表达量^[17],反应体系如表 2 所示。

表 1 RT-qPCR 所用引物

Table 1 Primers used for RT-qPCR

基因	引物(5'→3')
<i>Actin</i>	ACACCCTGTCTCCTGACTG
	AGAGAAAGCACAGCCTGGAT
<i>SOD</i>	TGTTGAGGGGTTGTCACTC
	CGTGAAGTCCAGGAGCAAGT
<i>CAT</i>	GCAGCTCCCAGTTAATGCTC
	AGCAGGACGACAAGGATCAA
<i>APX</i>	AGCAGTTTCCCACCCTCTC
	GCTCTGGCTGTCTCTCTCTG
<i>GLU</i>	GCACAATCGGTAACCTCTGGC
	GCAGGCTCAAACCAATGTGA
<i>CHI</i>	TGCTGGTAGTCAGGAACAT
	TGTCCAGCTCGTTCTGAGTT

表 2 PCR 反应体系

试剂	体积/ μL
dd H ₂ O	3.5
TB Green	10
Primer-F	2
Primer-R	2
50×Rox Reference Dye II	0.5
cDNA	2

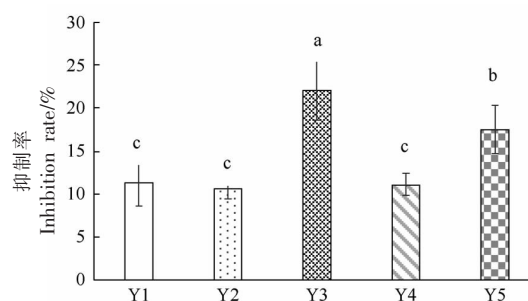
1.4 数据统计与分析

试验数据采用 Microsoft Excel 和 SPSS v. 23 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 进行分析处理, 采用独立 *T* 检验对不同处理的结果进行方差分析, $P < 0.05$ 表明两组间存在显著性差异。

2 结果与分析

2.1 拮抗酵母的筛选

2.1.1 不同酵母菌对链格孢的体外抑制效果 在 PDA 培养基上考察了实验室保藏的 5 株酵母菌对链格孢生长的抑制作用, 结果如图 1 所示。不同酵母菌与链格孢共培养 5 d 时, 对病原菌的生长均有抑制作用, 其中 Y3 (*P. caribbica*) 抑制效果最好, 对链格孢的抑制率为 22.01%, Y5 (酿酒酵母) 次之, 而 Y1 (胶红酵母)、Y2 (罗伦隐球酵母) 与 Y4 (浅黄隐球酵母) 的抑制效果无显著性差异。因此, 后续进一步通过体内试验考察卡利比克毕赤酵母 (Y3) 和酿酒酵母 (Y5) 对樱桃番茄采后黑斑病的



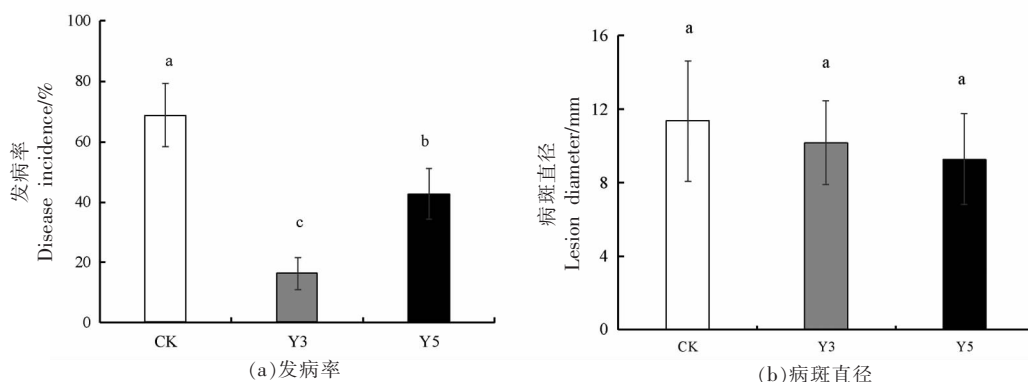
注: Y1: 胶红酵母, Y2: 罗伦隐球酵母, Y3: 卡利比克毕赤酵母, Y4: 浅黄隐球酵母, Y5: 酿酒酵母。不同小写字母表示具有显著性差异 ($P < 0.05$)。

图 1 不同酵母菌在 PDA 培养基上对链格孢的抑制率

Fig.1 Inhibitory rate of different yeasts for *A. alternata* on PDA medium

控制效果。

2.1.2 不同酵母菌对樱桃番茄采后黑斑病的控制作用 卡利比克毕赤酵母和酿酒酵母对樱桃番茄采后黑斑病的控制效果如图 2 所示。卡利比克毕赤酵母和酿酒酵母均能显著降低樱桃番茄黑斑病的发病率, 而且前者的控制效果显著优于后者 ($P < 0.05$)。卡利比克毕赤酵母处理的樱桃番茄黑斑病发病率仅为 16.25%, 显著低于对照组 (68.76%) (图 2a)。2 株酵母菌处理的樱桃番茄病斑直径虽均小于对照组, 但三者之间无显著性差异 (图 2b)。因此, 选择卡利比克毕赤酵母用于樱桃番茄采后病害的控制。本团队前期研究结果表明, 该菌株对苹果青霉病也具有显著控制效果^[18]。



注: CK: 对照, 即无菌生理盐水处理的樱桃番茄; Y3 为卡利比克毕赤酵母 (1×10^8 cells/mL) 处理的樱桃番茄; Y5 为酿酒酵母 (1×10^8 cells/mL) 处理的樱桃番茄。不同小写字母表示具有显著性差异 ($P < 0.05$)。

图 2 不同酵母菌对樱桃番茄采后黑斑病的控制效果

Fig.2 The control efficacy of different yeasts against black spot of postharvest cherry tomatoes

2.2 卡利比克毕赤酵母对樱桃番茄采后自然腐烂及生理品质的影响

卡利比克毕赤酵母对樱桃番茄自然腐烂和主要生理品质指标的影响如表3所示。从表中可以看出,卡利比克毕赤酵母处理的樱桃番茄自然腐烂率显著低于对照组($P < 0.05$),比对照组降低了50.94%。该拮抗酵母能显著降低果实的失重率

($P < 0.05$),提高樱桃番茄的硬度、可溶性固形物和AsA含量,对果实生理品质无显著不良影响。因此,卡利比克毕赤酵母不仅可以控制樱桃番茄采后黑斑病,对其采后自然腐烂也具有良好的控制效果,表明该拮抗酵母对樱桃番茄采后病害的病原菌具有广谱抑制作用,且对果实品质劣变具有减缓作用。

表3 卡利比克毕赤酵母对樱桃番茄自然腐烂及生理品质的影响

Table 3 Effects of *P. caribbica* on natural decay and physiological quality of cherry tomatoes

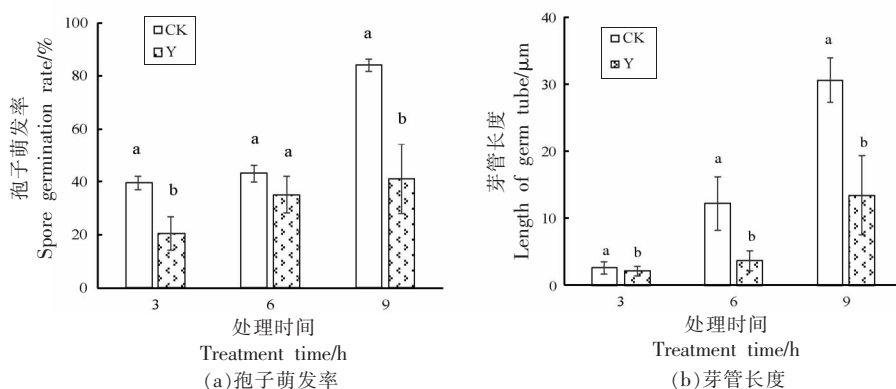
	腐烂率/%	失重率/%	硬度/N	可溶性糖/ $\text{g} \cdot (100 \text{ g})^{-1}$	可滴定酸/ $\text{g} \cdot (100 \text{ g})^{-1}$	AsA/ $\text{mg} \cdot (100 \text{ g})^{-1}$	可溶性固形物/ $\text{g} \cdot (100 \text{ g})^{-1}$
CK	60.67 ± 0.02^a	8.93 ± 0.00^a	4.40 ± 1.77^a	4.10 ± 0.02^a	0.22 ± 0.00^a	22.71 ± 0.11^a	2.6 ± 0.26^a
Y	29.76 ± 0.00^b	6.66 ± 0.00^b	5.70 ± 1.81^a	4.28 ± 0.02^a	0.27 ± 0.00^a	24.74 ± 2.93^a	2.9 ± 0.16^a

注:CK:对照,即无菌生理盐水处理的樱桃番茄;Y为卡利比克毕赤酵母(1×10^8 cells/mL)处理的樱桃番茄。不同小写字母表示具有显著性差异($P < 0.05$)。

2.3 卡利比克毕赤酵母对链格孢体外生长的抑制作用

2.3.1 卡利比克毕赤酵母对链格孢孢子萌发和芽管伸长的抑制 在NYDB培养基中,卡利比克毕赤酵母对链格孢孢子萌发率和芽管长度的影响如图3所示。从图3a可看出,与链格孢单独培养相比较,与卡利比克毕赤酵母共培养不同时间的链格孢孢子萌发率均降低,且共培养3h和9h时具有显著性差异($P < 0.05$)。卡利比克毕赤酵母还能

减少链格孢的芽管长度,与卡利比克毕赤酵母共培养的链格孢芽管长度显著低于对照组($P < 0.05$) (图3b)。这些结果表明,卡利比克毕赤酵母能够通过抑制链格孢孢子萌发和芽管伸长而直接抑制其生长。已有报道^[19]发现,膜醭毕赤酵母(*P. membranaefaciens*)和柠檬形克勒克酵母(*Kloeckera apiculata*)能够有效防治李子褐腐病,它们对病原菌桃褐腐病菌(*Monilinia fructicola*)的体外抑制作用与本研究的结果相似。



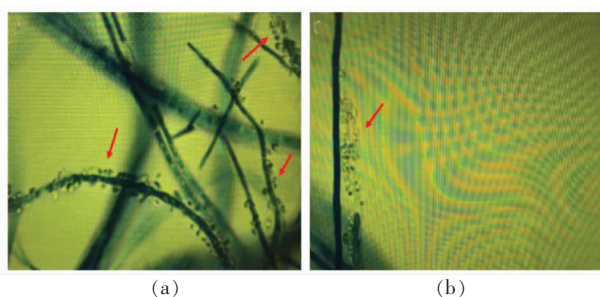
注:CK:链格孢单独培养;Y:卡利比克毕赤酵母与链格孢共培养。不同小写字母表示具有显著性差异性($P < 0.05$)。

图3 卡利比克毕赤酵母对链格孢孢子萌发率及芽管长度的影响

Fig.3 Effects of *P. caribbica* on rate of spore germination and germ tube length of *A. alternata*

2.3.2 卡利比克毕赤酵母与链格孢菌丝的相互作用 卡利比克毕赤酵母与链格孢在PDA培养基平板上共培养时,二者相互作用如图4所示。从图

中可以看出,卡利比克毕赤酵母紧密地聚集在链格孢菌丝周围或附着在其菌丝上(图4a),而且部分菌丝结构已遭到卡利比克毕赤酵母破坏(图



注:图 a 和 b 为不同视野的观察结果,放大倍数均为 400 倍。

图 4 卡利比克毕赤酵母与链格孢菌丝的相互作用

Fig.4 The interaction of *P. caribbica* and the hypha of *A. alternata*

4b),表明卡利比克毕赤酵母可通过吸附、寄生到链格孢菌丝上直接抑制其生长。该结果与 Liu 等^[16]的报道一致,拮抗菌南极拟酵母(*Pseudozyma antarctica*)FL17 能够吸附并寄生到柑橘病原菌指状青霉(*Penicillium digitatum*)菌丝上,引起菌丝破溃,从而直接抑制病原菌生长。上述研究结果表

明,卡利比克毕赤酵母控制樱桃番茄采后黑斑病的方式之一是直接抑制病原菌链格孢的生长。

2.4 卡利比克毕赤酵母在樱桃番茄伤口和表面的生长动态

2.4.1 卡利比克毕赤酵母在樱桃番茄伤口处的生长动态 不同温度(20 ℃,4 ℃)下卡利比克毕赤酵母在樱桃番茄伤口处的生长动态如图 5 所示。虽然同时接种了链格孢,但在 20 ℃条件下卡利比克毕赤酵母在伤口处仍然能快速增殖,贮藏 1 d 时,即从 5.66 lg(CFU/wound)(0 d)上升到 7.16 lg(CFU/wound),随后缓慢增加,贮藏 5 d 时,达到 8.20 lg(CFU/wound),并维持至贮藏结束(图 5a)。在 4 ℃条件下,虽然果实伤口处存在链格孢,但卡利比克毕赤酵母的数目在 0~1 d 时仍能缓慢增加,1~2 d 快速增加至 7.78 lg(CFU/wound),并在之后的贮藏过程中一直维持在较高的水平(图 5b)。

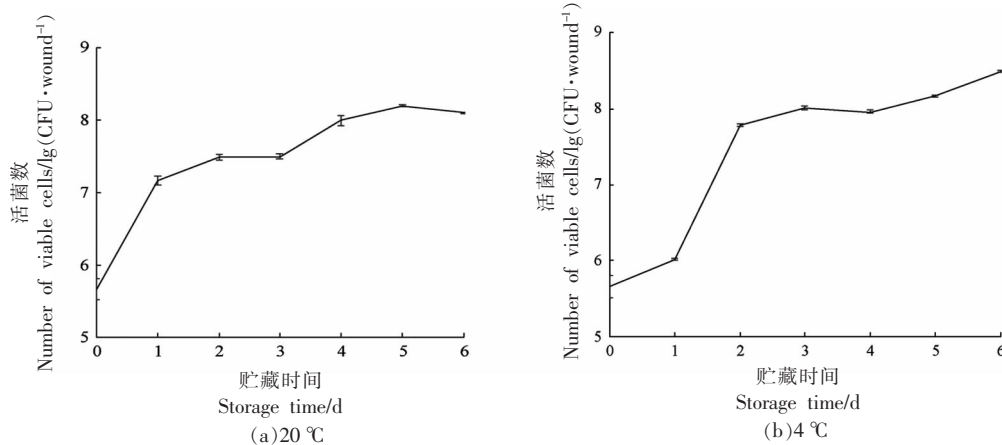


图 5 卡利比克毕赤酵母在樱桃番茄伤口处的生长动态

Fig.5 Population of *P. caribbica* in wounds of cherry tomatoes

2.4.2 卡利比克毕赤酵母在樱桃番茄表面处的生长动态 不同温度(20 ℃,4 ℃)下卡利比克毕赤酵母在樱桃番茄表面的生长动态如图 6 所示。与果实伤口处的生长动态类似,虽然同时接种了链格孢,20 ℃条件下卡利比克毕赤酵母在樱桃番茄表面仍能快速增殖,从 0 d 的 3.08 lg(CFU/circle)快速上升到 3 d 的 5.06 lg(CFU/circle),随后缓慢增加至 6 d 的 5.55 lg(CFU/circle)(图 6a)。4 ℃条件下,果实表面存在链格孢时,卡利比克毕赤酵母

在 0~1 d 增殖较慢,而 1 d 后开始快速增殖,至 2 d 时达到最大值 3.78 lg(CFU/circle),并在之后的贮藏过程中一直维持在较高的水平(图 6b)。

Perez 等^[20]报道葡萄牙棒孢酵母(*Clavispora lusitaniae*)对柠檬绿霉病具有明显的控制作用,该酵母在柠檬伤口上表现出明显的定殖能力,并能在低温和室温下继续生长。本研究中,无论是在樱桃番茄表面还是伤口处,虽然接种了病原菌链格孢,卡利比克毕赤酵母仍然能够在果实上快速增

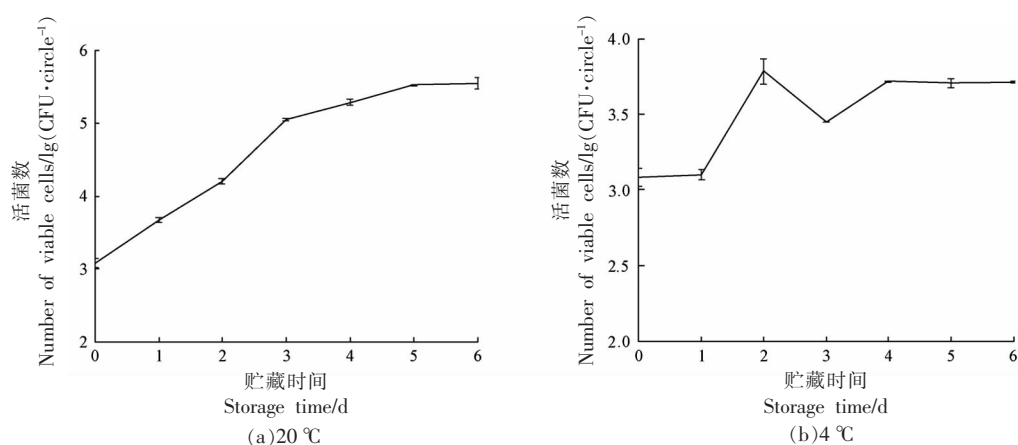


图6 卡利比克毕赤酵母在樱桃番茄表面的生长动态

Fig.6 Population of *P. caribbica* on surfaces of cherry tomatoes

殖并且维持在较高水平。这表明该拮抗酵母可通过在樱桃番茄果实伤口和表面快速定殖,与病原菌竞争营养和空间,从而间接抑制病原菌在果实上的生长^[21-23]。

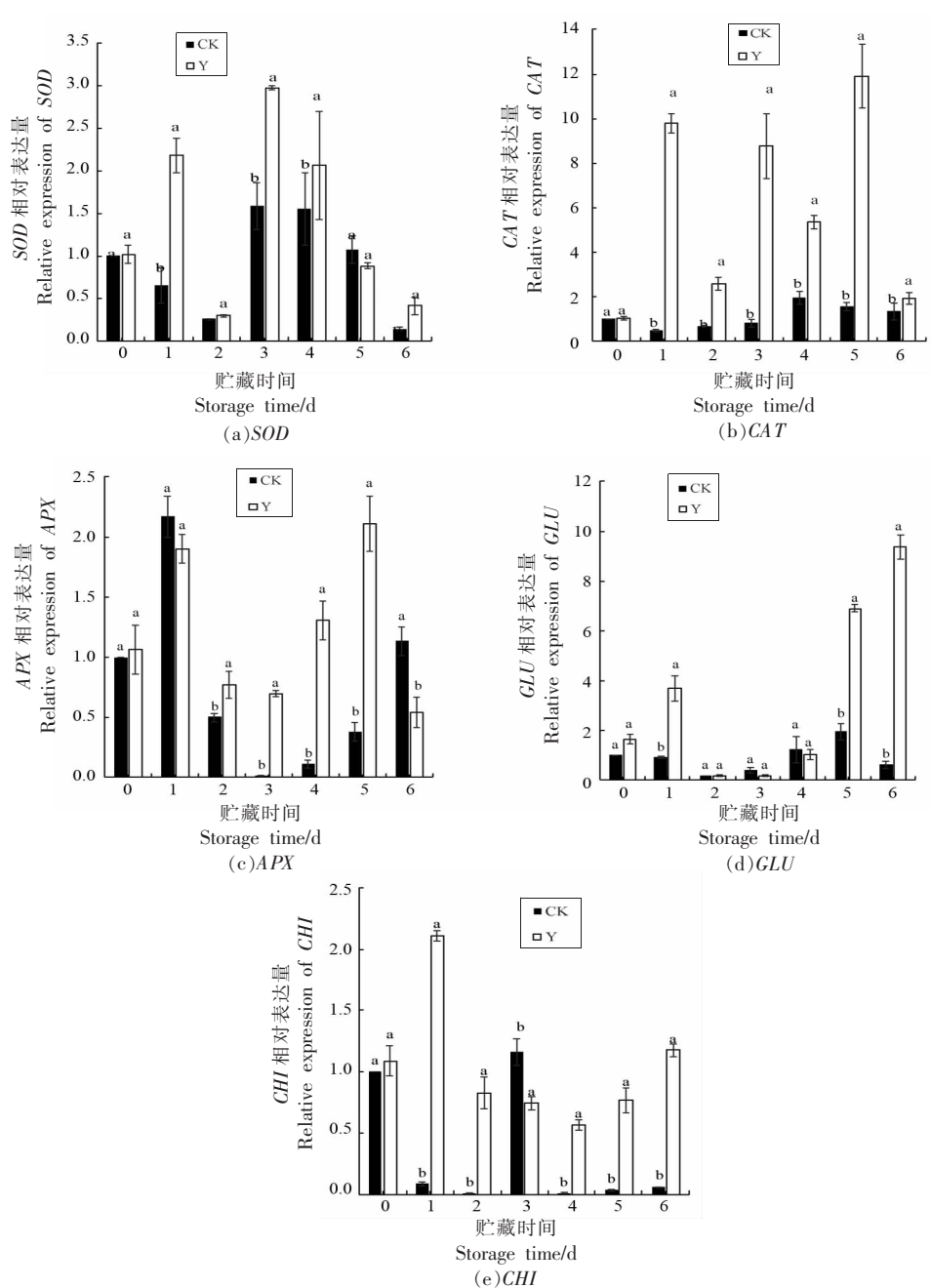
2.5 卡利比克毕赤酵母对樱桃番茄抗病性相关基因表达水平的影响

研究表明,当病原菌侵染水果和蔬菜时,宿主体内会产生大量活性氧(ROS)来应对病原菌的侵染^[24]。然而,过量的ROS会破坏宿主体内的氧化还原平衡,造成严重的氧化损伤^[25]。为了维持果蔬氧化还原的动态平衡,宿主体内ROS清除系统会清除过量的ROS。而宿主对ROS的清除能力往往有限,使得宿主抗病性较弱,最终产生病害。而ROS清除能力的提高则有助于宿主降低氧化损伤,增强其抗病性^[26]。ROS清除系统包括酶促清除系统和非酶清除系统。超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)和抗坏血酸过氧化物酶(APX)是活性氧(ROS)酶促清除系统的重要成员^[25,27]。

从图7a可以看出,除5d外,卡利比克毕赤酵母处理的樱桃番茄中SOD活性在整个贮藏过程中均高于对照组,且在1,3,4,6d具有显著性差异($P < 0.05$)。如图7b所示,与对照组相比,卡利比克毕赤酵母处理的樱桃番茄中CAT表达水平在整个贮藏过程中均显著提高($P < 0.05$);APX表达水平在2d之前与对照组无显著性差异,在贮藏2d后开始显著高于对照组($P < 0.05$),直至贮藏末期(6d)才低于对照组(图7c)。研究发现,壳

寡糖处理可提高黄瓜SOD、CAT和APX等基因的表达水平,抑制其膜脂氧化,从而降低其在4℃冷藏时的冷害和腐烂^[28]。本团队前期研究表明,季也蒙迈耶氏酵母(*Meyerozyma guilliermondii*)对西兰花SOD、POD和CAT活性的诱导有助于其抗病性的提高^[29]。因此,卡利比克毕赤酵母对樱桃番茄SOD、CAT和APX表达水平的提高可降低其氧化损伤,有助于樱桃番茄抗病性的增强。

GLU(β -1,3葡聚糖酶)和CHI(几丁质酶)是植物体内重要的病程相关蛋白(PR蛋白),二者均可破坏或降解真菌细胞壁,抑制真菌的生长繁殖,提高植物的抗侵染能力^[30-31]。由图7d可知,贮藏2~4d时,两组樱桃番茄的GLU表达水平无显著性差异,而在贮藏1,5,6d时,卡利比克毕赤酵母处理的樱桃番茄GLU表达水平显著高于对照组($P < 0.05$)。图7e的结果显示,除3d外,拮抗酵母处理的樱桃番茄中CHI表达水平均显著高于对照组($P < 0.05$)。上述结果表明,卡利比克毕赤酵母可以提高樱桃番茄病程相关基因(PR基因)的表达水平。已有研究表明,L-赖氨酸能够提高早酥梨CHI和GLU活性及*PbrGLU*,*PbrCHI*和*PbrPR-1*基因表达水平,以及CAT等抗氧化酶活性和基因表达水平,从而增强其对病原菌的防御能力^[32]。这与本研究的结果一致,表明卡利比克毕赤酵母可以提高樱桃番茄PR基因的表达水平,从而增强果实的抗病性。



注:CK:无菌生理盐水处理的樱桃番茄;Y:卡利比克毕赤酵母(1×10^8 cells/mL)处理的樱桃番茄。不同小写字母表示具有显著性差异性($P < 0.05$)。

图 7 卡利比克毕赤酵母对樱桃番茄抗性相关基因表达的影响

Fig.7 Effects of *P. caribbica* on the relative expression of resistance-related genes in cherry tomatoes

3 结论

研究表明,卡利比克毕赤酵母能够显著降低樱桃番茄采后黑斑病和自然腐烂的发生,并对果实品质劣变具有减缓作用。该拮抗酵母通过抑制病原菌孢子萌发和菌丝伸长,附着并寄生在病原菌菌丝上破坏其结构,从而直接抑制病原菌生

长;还能够于樱桃番茄表面和伤口处快速增殖并维持在较高水平,从而与病原菌竞争营养和空间,间接抑制病原菌生长;能够诱导樱桃番茄 *SOD*, *CAT* 和 *APX* 等抗氧化基因以及 *GLU* 和 *CHI* 等 PR 基因的表达水平,从而增强樱桃番茄的抗病性。卡利比克毕赤酵母可应用于樱桃番茄采后病

害的控制,减少化学杀菌剂的使用,对于提高果实品质、保障食品安全和环境保护具有重要意义,具有良好的应用前景。

参 考 文 献

- [1] AHMAD A, SHAFIQUE S, SHAFIQUE S, et al. *Penicillium oxalicum* directed systemic resistance in tomato against *Alternaria alternata*[J]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2014, 36: 1231-1240.
- [2] SHU C, ZHANG H D, JIAO W X, et al. Antifungal efficacy of ursolic acid in control of *Alternaria alternata* causing black spot rot on apple fruit and possible mechanisms involved[J]. *Scientia Horticulturae*, 2019, 256: 108636.
- [3] TERAOKAMI S, ADACHI Y, TAKEUCHI Y, et al. Development of an SSR marker set for efficient selection for resistance to black spot disease in pear breeding[J]. *Breeding Science*, 2021, 71: 240-252.
- [4] RIZWANA H, BOKAHRI N A, ALSAHLI S A, et al. Postharvest disease management of *Alternaria* spots on tomato fruit by *Annona muricata* fruit extracts[J]. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 2021, 28: 2236-2244.
- [5] JIAO W X, LI X X, WANG X M, et al. Chlorogenic acid induces resistance against *Penicillium expansum* in peach fruit by activating the salicylic acid signaling pathway[J]. *Food Chemistry*, 2018, 260: 274-282.
- [6] GONCALVES D D, RIBEIRO W R, GONCALVES D C, et al. Recent advances and future perspective of essential oils in control *Colletotrichum* spp.: A sustainable alternative in postharvest treatment of fruits[J]. *Food Research International*, 2021, 150 (Part A): 110758.
- [7] DUKARE A, SANGWAN S, MAHESHWARI H, et al. Chapter 15-utilization of antagonistic microbes for the eco-friendly management of fungal diseases of the harvested fruits during postharvest handling and storage [M]/KUMAR A, DROBY S. *Food Security and Plant Disease Management*. Cambridge: Woodhead Publishing, 2021: 307-322.
- [8] YAN Y, ZHANG X Y, ZHENG X F, et al. Control of postharvest blue mold decay in pears by *Meyerozyma guilliermondii* and its effects on the protein expression profile of pears[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2018, 136: 124-131.
- [9] CZARNECKA M, ŻAROWASK B, POŁOMSKA X, et al. Role of biocontrol yeasts *Debaryomyces hansenii* and *Wickerhamomyces anomalus* in plants' defence mechanisms against *Monilinia fructicola* in apple fruits[J]. *Food Microbiology*, 2019, 83: 1-8.
- [10] ZHAO L N, ZHU H M, LI B, et al. Transcriptomic analysis of the disease-resistance response in mandarins induced by the biocontrol yeast, *Yarrowia lipolytica*[J]. *Biological Control*, 2021, 163: 104607.
- [11] ZHAO L N, WANG Y J, DHANASEKARAN S, et al. Efficacy of *Wickerhamomyces anomalus* yeast in the biocontrol of blue mold decay in apples and investigation of the mechanisms involved[J]. *BioControl*, 2021, 66: 547-558.
- [12] WRIGHT K P, ADEL A K. Effect of controlled-atmosphere storage on the quality and carotenoid content of sliced persimmons and peaches[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 1997, 10(1): 89-97.
- [13] GARCÍA-MARTÍN J F, OLMO M, GARCÍA J M. Effect of ozone treatment on postharvest disease and quality of different citrus varieties at laboratory and at industrial facility [J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2018, 137: 77-85.
- [14] ZHANG X Y, YAN X L, HU W Y, et al. Effects of *Fusarium Proliferatum* infection on the quality and respiratory metabolism of postharvest asparagus [J]. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 2022, 50(2/3): 143-161.
- [15] 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.
- [16] LIU Y, YAO S X, DENG L L, et al. Different mechanisms of action of isolated epiphytic yeasts against *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum* on citrus fruit[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2019, 152: 100-110.
- [17] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [18] 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: 167–173.
- [19] ZHANG J, XIE J, ZHOU Y H, et al. Inhibitory effect of *Pichia membranaefaciens* and *Kloeckera apiculata* against *Monilinia fructicola* and their biocontrol ability of brown rot in postharvest plum[J]. Biological Control, 2017, 114: 51–58.
- [20] PEREAZ M F, DIAZ M A, PEREYRA M M, et al. Biocontrol features of *Clavispora lusitaniae* against *Penicillium digitatum* on lemons[J]. Postharvest Biology and Technology, 2019, 155: 57–64.
- [21] KOHL J, KOLNAAR R, RAVENSBERG W J. Mode of action of microbial biological control agents against plant diseases: Relevance beyond efficacy[J]. Frontiers in Plant Science, 2019, 10: 845.
- [22] LIU J, SUI Y, WISNIEWSKI M, et al. Review: Utilization of antagonistic yeasts to manage postharvest fungal diseases of fruit[J]. International Journal of Food Microbiology, 2013, 167(2): 153–160.
- [23] DUKARE A S, PAUL S, NAMBI V E, et al. Exploitation of microbial antagonists for the control of postharvest diseases of fruits: A review [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2019, 59(9): 1498–1513.
- [24] DAT J, VANDENABEELE S, VRANOVA E, et al. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2020, 57(5): 779–795.
- [25] GILL S S, TUTEJA N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2010, 48: 909–930.
- [26] MITTLER R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance[J]. Trends in Plant Science, 2002, 7(9): 405–410.
- [27] QIN X J, XIAO H M, XUE C H, et al. Biocontrol of gray mold in grapes with the yeast *Hanseniaspora uvarum* alone and in combination with salicylic acid or sodium bicarbonate[J]. Postharvest Biology and Technology, 2015, 100: 160–167.
- [28] RU L, JIANG L F, WILLS R B H, et al. Chitosan oligosaccharides induced chilling resistance in cucumber fruit and associated stimulation of antioxidant and HSP gene expression[J]. Scientia Horticulturae, 2020, 264: 109187.
- [29] ZHANG X Y, YAO Y Q, DHANASEKARAN S, et al. Controlling black spot of postharvest broccoli by *Meyerozyma guilliermondii* and its regulation on ROS metabolism of broccoli[J]. Biological Control, 2022, 170: 104938.
- [30] BALASUBRAMANIAN V, VASHISHT D, CLETUS J, et al. Plant β -1,3-glucanases: Their biological functions and transgenic expression against phytopathogenic fungi[J]. Biotechnology Letters, 2012, 34: 1983–1990.
- [31] SHU P, LI Y J, WANG X Y, et al. Exogenous ferulic acid treatment increases resistance against *Botrytis cinerea* in tomato fruit by regulating nitric oxide signaling pathway[J]. Postharvest Biology and Technology, 2021, 182: 111678.
- [32] LIU Y X, LI Y C, BI Y, et al. Induction of defense response against *Alternaria* rot in Zaosu pear fruit by exogenous L-lysine through regulating ROS metabolism and activating defense-related proteins[J]. Postharvest Biology and Technology, 2021, 179: 111567.

Control Efficacy of Antagonistic Yeast against Postharvest Disease of Cherry Tomato and the Mechanisms Involved

Zhang Xiaoyun¹, Yue Qingrong¹, Zhou You¹, Gu Xiangyu², Zhao Lina¹, Zhang Hongyin^{1*}

¹School of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, Jiangsu

²School of Grain Science and Technology, Jiangsu University of Science and Technology, Zhenjiang 212004, Jiangsu)

Abstract In this study, antagonistic yeast for controlling black spot of postharvest cherry tomato was to be screened by *in vitro* and *in vivo* test, and the biocontrol efficacy of this antagonistic yeast against the natural decay of cherry tomato and its effects on the quality of fruits were then investigated. The direct and indirect inhibition of this yeast on *Alternaria*

ia alternata was explored through its effects on spore germination, germ tube elongation and hyphae structure of this pathogen, and its growth dynamics on wound and surface of cherry tomato, respectively. Then, the effects of antagonistic yeast on the expression levels of resistance-related genes in cherry tomato were determined by RT-qPCR technology to analyze the effect of antagonistic yeast on the disease resistance of the fruits. Results indicated that *Pichia caribbica* showed the best control efficacy against postharvest black spot of cherry tomato, and the disease incidence of yeast-treated fruits was only 16.25% which was significantly lower than that of the control (68.76%). This antagonistic yeast could also significantly reduce the natural decay of postharvest cherry tomato and slow down the deterioration of quality. *P. caribbica* could directly inhibit the growth of *A. alternata* by inhibiting the spore germination and mycelial elongation as well as parasitic on mycelia of *A. alternata*. It also could indirectly inhibit the growth of *A. alternata* by competing with the pathogen for nutrition and space on the wound and surface of cherry tomato. *P. caribbica* could induce the expression levels of antioxidant genes (*SOD*, *CAT* and *APX*) and pathogenesis-related genes (PR genes) (*GLU* and *CHI*) in cherry tomato. *P. caribbica* showed biocontrol efficacy against postharvest black spot and natural rot of cherry tomato, and had no significant adverse effects on fruit quality. It alleviated postharvest diseases of cherry tomato by inhibiting the growth of pathogen and increasing the expression of resistance-related genes.

Keywords cherry tomatoes; postharvest disease; biological control; disease resistance