

研究报告

桃褐腐病拮抗酵母菌的筛选及防治机理

侯亚倩¹, 张晓红¹, 张澍¹, 赵雅婷¹, 陈双建², 段国锋^{*1}

1 山西农业大学 园艺学院, 山西 晋中 030801

2 山西农业大学 果树研究所, 山西 晋中 030801

侯亚倩, 张晓红, 张澍, 赵雅婷, 陈双建, 段国锋. 桃褐腐病拮抗酵母菌的筛选及防治机理[J]. 微生物学通报, 2024, 51(11): 4604-4616.

HOU Yaqian, ZHANG Xiaohong, ZHANG Shu, ZHAO Yating, CHEN Shuangjian, DUAN Guofeng. Screening and controlling mechanism of antagonistic yeast against peach brown rot[J]. Microbiology China, 2024, 51(11): 4604-4616.

摘要: 【背景】桃褐腐病是一种危害严重的病害, 能对桃产业造成巨大的经济损失。【目的】明确山西省太谷区桃褐腐病的主要致病菌, 并筛选出对桃褐腐病有明显生防效果的拮抗酵母菌。【方法】从有症状的“脆玉”桃果实中分离出引起桃采后褐腐病的真菌, 通过形态特征、致病性试验和分子生物学鉴定对其进行鉴定; 采用体外和体内试验筛选拮抗酵母菌, 利用形态学、生理生化和分子生物学方法对拮抗酵母菌进行鉴定; 此外, 通过测定防御相关酶活性指标, 评价拮抗酵母菌处理对桃果实腐烂抗病性的影响。【结果】美澳型核果链核盘菌(*Monilinia fructicola*)是山西省太谷区桃褐腐病的致病菌, 筛选获得的最优拮抗酵母菌株 HYA-4.1 为异常威克汉姆酵母(*Wickerhamomyces anomalus*), 对 *M. fructicola* 的菌丝抑制率达 78.31%, 可以诱导桃果内抗氧化酶活性的增高, 显著抑制桃褐腐病。【结论】研究揭示了桃褐腐病的致病菌, 并筛选出抑菌效果显著的拮抗酵母, 为生防菌的筛选及应用提供参考。

关键词: 桃; 异常威克汉姆酵母; 褐腐病; 诱导抗病性; 生防酵母

资助项目: 山西农业大学博士科研启动项目(2023BQ65)

This work was supported by the Doctor Scientific Research Start-up Project of Shanxi Agricultural University (2023BQ65).

*Corresponding author. E-mail: danner@sxau.edu.cn

Received: 2024-03-26; Accepted: 2024-04-27; Published online: 2024-05-28

Screening and controlling mechanism of antagonistic yeast against peach brown rot

HOU Yaqian¹, ZHANG Xiaohong¹, ZHANG Shu¹, ZHAO Yating¹, CHEN Shuangjian², DUAN Guofeng^{*1}

1 College of Horticulture, Shanxi Agricultural University, Jinzhong 030801, Shanxi, China

2 Institute of Pomology, Shanxi Agricultural University, Jinzhong 030801, Shanxi, China

Abstract: [Background] Brown rot is one of the most destructive diseases in peaches worldwide, causing serious economic loss of the peach industry. [Objective] To identify the causative agent of peach brown rot in Taigu District of Shanxi Province and screen efficient antagonistic yeast against the pathogen causing peach brown rot. [Methods] The fungus causing brown rot was isolated from the symptomatic fruits of the peach variety ‘Cuiyu’ and identified by morphological observation, pathogenicity test, and molecular methods. The antagonistic yeast strains were screened by *in vitro* and *in vivo* assays and identified based on morphological, physiological, biochemical characteristics and molecular evidence. Moreover, the activities of defense-related enzymes and other indicators were determined to evaluate the effects of the antagonistic yeast treatment on peach resistance to brown rot. [Results] *Monilinia fructicola* was identified as the main fungus causing the brown rot of peach fruits in Taigu District of Shanxi Province. The optimal antagonistic yeast strain HYA-4.1 was identified as *Wickerhamomyces anomalus*, which showed an inhibition rate of 78.31% on the mycelia of *M. fructicola* and increased the activities of antioxidant-related enzymes in peach fruits. The results suggested that the strain inhibited peach brown rot. [Conclusion] We identified the causative agent of peach brown rot and screened out an antagonistic yeast strain with significant inhibitory effect, which provided a reference for the screening and application of biocontrol strains.

Keywords: peach; *Wickerhamomyces anomalus*; brown rot; induced resistance to diseases; biocontrol yeast

桃是我国北方地区栽培的主要果树, 据统计截至 2022 年, 全国桃栽培面积为 95.73 万 hm^2 , 总产量 1 800 万 $\text{t}^{[1]}$, 其中山西的栽培面积为 4.8 万 hm^2 , 总产量 151.3 万 t , 单产为 31.52 t/hm^2 , 位居全国第一^[2]。然而, 由于子囊菌链核盘菌(*Monilinia* spp.)的侵染而引起的褐腐病, 造成了许多桃产量及果实品质的下降^[3]。该病害在桃整个生长发育期均可发生, 严重时会造成大量落果, 在贮藏和运输过程中也极易发生, 造成巨大的经济损失^[4]。有研究发现, 美澳型核果

链核盘菌(*Monilinia fructicola*)、云南链核盘菌(*Monilinia yunnanensis*)、果生链核盘菌(*Monilinia fructigena*)和梅生丛梗孢(*Monilinia mumeicola*)是我国桃褐腐病的主要病原菌, 其中美澳型核果链核盘菌是我国优势种, 分布比较广泛^[5-6]。

目前, 生产上对桃褐腐病的防治主要是化学防治, 虽然能降低桃褐腐病的发生, 但长期使用容易对人类和动物健康及环境造成负面影响, 并诱导植物病原菌产生耐药性^[7-8]。因此寻找有效环保、清洁健康的防治手段成为研究的热

点。近年来,越来越多的生防菌被发现、研究并用于生产。目前应用于褐腐病的生防菌主要有芽孢杆菌属(*Bacillus*)、放线菌属(*Actinomycetes*)和篮状菌属(*Talaromyces*)等^[5,9]。韩凯迪等^[5]研究发现枯草芽孢杆菌使云南链核盘菌(*M. yunnanensis*)菌丝出现扭曲、膨大和缢缩现象,以此达到对桃褐腐病的生防作用。放线菌雷帕霉素链霉菌(*Streptomyces rapamycinicus*) HCD1-10 和稻瘟毒素链霉菌(*S. blastmyceticus*) S108 对桃褐腐病常见病原菌 *M. fructicola* 的生长具有较强的抑制作用^[10-11]。草甸山岗单胞菌(*Collimonas pratensis*) IZL261 菌株对核果褐腐病病原菌 *M. fructicola* 具有专一性的抑制作用,可显著降低桃褐腐病的发病率和严重度^[12]。但国内外对桃褐腐病有抑制作用的拮抗酵母菌研究较少。

本研究从山西农业大学果树所采集有症状的桃褐腐病果并分离鉴定其致病菌,以病原菌为供试靶标菌筛选出对桃褐腐病具有明显抑制作用的拮抗酵母菌,并进行抑菌活性和相关机理研究,以期获得对桃褐腐病有较强防治作用的拮抗酵母菌。

1 材料与方 法

1.1 样品

供试桃品种为“脆玉”,采自山西省太谷区山西农业大学果树所;采集有褐腐病症状的果实进行病原菌的分离,健康果实和叶子若干作为拮抗酵母菌筛选和离体接种的试验材料。

1.2 主要试剂和仪器

TSINGKE 植物 DNA 提取试剂盒,北京擎科生物科技有限公司。紫外分光光度计,岛津公司;超净工作台,上海跃进医疗器械有限公司;光学显微镜,上海艾研缔伦科技有限公司。

1.3 培养基

孟加拉红培养基和马铃薯葡萄糖琼脂培养

基(potato-dextrose agar medium, PDA)培养基,青岛高科技工业园海博生物技术有限公司。营养酵母葡萄糖固体培养基(nutrient yeast dextrose agar, NYDA)、营养酵母葡萄糖液体培养基(nutrient yeast dextrose broth, NYDB)参考曹璇等^[13]的配方。

1.4 病原菌的分离纯化

病原菌从有症状的桃果实中分离。采用常规组织分离法^[14]在病果的病健果交界处用无菌刀切取约 5 mm×5 mm 的组织,在 1%次氯酸钠中浸泡消毒 3 min,并用无菌水清洗 3 次,在无菌干燥滤纸上风干。将样品置于 PDA 培养基上,每个平板上 3 个样品,呈三角形,28 °C 恒温培养箱黑暗培养 5-6 d,挑取菌落边缘反复传代培养 4-5 代,直至获得纯化菌株,转接至 PDA 斜面 4 °C 保存。选取 15 个有症状果实(分为 5 组,每组 3 个样品)进行试验比较。

1.5 病原菌回接(柯赫氏法则)

选取大小均匀、成熟健康的“脆玉”桃作为接种材料。试验前将果实在 0.1%次氯酸钠溶液中浸泡 15 min,消毒后用无菌水冲洗 3 次,室温干燥。

打孔接种菌饼法:将分离菌株在 PDA 培养基上培养至菌丝茂盛,用无菌打孔器沿菌落边缘打取直径为 5 mm 的菌饼,备用。用无菌打孔器在果实赤道部位打 2 个 3 mm 深的孔,将上述菌饼接种到果实伤口部位并使菌丝面紧贴于孔内,以空白 PDA 菌饼为对照,接种 1 d 后观察样品症状,设置 6 个生物学重复。

1.6 病原菌的形态鉴定

将纯化菌株接种于 PDA 上,在 28 °C、75% 相对湿度条件下培养 5 d。观察菌落形态特征(形状、颜色),显微镜下观察菌丝和孢子形态特征,参照《真菌鉴定手册》^[15]作为病原菌形态学分类依据。

1.7 病原菌的分子生物学鉴定

将纯化病原菌在 PDA 培养基上培养 5 d 后收集菌丝并在液氮下磨成粉末, 采用 TSINGKE 植物 DNA 提取试剂盒提取菌株基因组并进行 PCR 扩增。引物为真菌通用引物 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')。PCR 反应体系 (50 μ L): DNA 模板 (30 ng/ μ L) 1 μ L, 引物 (10 μ mol/L)各 2 μ L, 1 \times TSE101 Mix 45 μ L。PCR 反应条件: 98 $^{\circ}$ C 2 min; 98 $^{\circ}$ C 10 s, 53 $^{\circ}$ C 10 s, 72 $^{\circ}$ C 10 s, 38 个循环。

将 PCR 产物送往北京擎科生物有限公司进行测序, 测序结果利用 BLAST 与 NCBI 数据库中的序列进行比对, 检索出相似性较高的序列进行系统发育分析。并用 MEGA 5.0 软件的邻接法构建系统发育树, 采用 1 000 次 bootstrap 重复。

1.8 拮抗酵母菌的筛选

将成熟健康的桃果实冲洗干净, 用 75%乙醇浸泡 30 s, 2%次氯酸钠消毒 1 min, 无菌水冲洗 3 次, 以桃褐腐病病原菌为靶标菌, 通过平板对峙法^[16]从桃叶片和果实表面筛选拮抗酵母菌。将组织样本切碎研磨并称取 5 g 放置在 PDB 液体培养基中, 28 $^{\circ}$ C、200 r/min 培养 12 h。连续稀释培养物以获得 10^{-5} 、 10^{-6} 和 10^{-7} 的稀释液, 每种稀释液吸取 0.1 mL 用无菌玻璃涂布器涂布在孟加拉红培养基上, 所有培养基在 28 $^{\circ}$ C 培养 48 h。根据不同的形态特征选择酵母菌落在 NYDA 培养基上重新培养, 直至获得纯培养物。

将分离的拮抗菌株与病原菌一起培养在 PDA 培养基上进行拮抗能力评价。从病原菌的菌落边缘取直径 5 mm 的菌饼, 将其接种于 PDA 培养基中央。然后在距平板中央 2.5 cm 处接种活化 2 d 的拮抗酵母菌, 对照为空白, 每平板 4 点, 重复 3 次, 于 28 $^{\circ}$ C 培养 7 d 后根据以下公式计算抑菌率。

抑菌率(%)=

$$\frac{(\text{对照菌落直径}-0.5)-(\text{处理菌落直径}-0.5)}{\text{对照菌落直径}-0.5} \times 100。$$

1.9 离体果实防效的测定

参考 Zhang 等^[17]的方法用健康的“脆玉”桃果实测定拮抗酵母菌对褐腐病的抑制效果。用无菌打孔器在表面消毒的桃果实上打 3 个圆形伤口(直径 5 mm, 深 3 mm), 将 20 μ L 不同浓度的拮抗酵母菌菌悬液(1×10^5 、 1×10^6 、 1×10^7 、 1×10^8 、 1×10^9 个/mL)分别接种于伤口, 对照为 20 μ L 的蒸馏水。2 h 后, 每个伤口加入 20 μ L 的病原菌孢子悬浮液(1×10^5 个/mL)。自然晾干后, 将处理后的果实置于保鲜盒中, 25 $^{\circ}$ C 12 h 光暗交替培养, 6 d 后测量桃果实的发病率和病变直径。每个处理包括 3 个重复, 每个重复 10 个果实。

1.10 拮抗酵母菌的形态学及生理生化指标的测定

将拮抗酵母菌的单个菌落接种于 NYDA 和 PDA 培养基上, 28 $^{\circ}$ C 黑暗培养 24 h, 进行形态学及生理生化指标的测定。细胞形态特征观察参照沈萍^[18]提供的方法, 生理生化特征按照《酵母菌的特征与鉴定手册》^[19]进行。

1.11 拮抗酵母菌的分子生物学鉴定

使用 TSINGKE 植物 DNA 提取试剂盒提取拮抗酵母菌 DNA 并进行 PCR 扩增, 使用真菌通用引物 ITS1 和 ITS4 进行 rDNA ITS 序列的 PCR 扩增, PCR 扩增反应体系和条件同 1.7。PCR 产物送往北京擎科生物有限公司进行测序, 测序结果进行 BLAST 比对分析, 并用 MEGA 5.0 软件的邻接法构建系统发育树, 采用 1 000 次 bootstrap 重复。

1.12 桃果实防御性酶活性的测定

桃处理方式同 1.9, 在桃伤口处接种 30 μ L 1×10^8 个/mL 的拮抗酵母菌悬浮液和无菌水, 在

25 °C、相对湿度(relative humidity, RH) 95%的培养箱中储藏, 分别于处理后 0 (2 h)、1、2、3、4、5、6 和 7 d 检测酶活性, 每天定时取样测量。

酶提取液的制备: 将约 2 g 组织样本放入灭菌的研钵中, 加入 10 mL 4 °C 预冷磷酸盐缓冲液(pH 7.8)和少量石英砂, 并将样品在冰上研磨。涡旋振荡均匀后于 4 °C、8 000×g 离心 20 min, 收集上清并 4 °C 保存。

参照 Mohammadi 等^[20]的方法测定多酚氧化酶(polyphenol oxidase, PPO)活性; 参照 Xiao 等^[21]的方法测定过氧化物酶(peroxidase, POD)活性; 参照 Zhang 等^[22]的方法测定 β -1,3-葡聚糖酶(β -1,3-glucanase, GLU)活性; 参照 Javadi 等^[23]的方法测定苯丙氨酸解氨酶(phenylalanine ammonia-lyase, PAL)活性。

1.13 数据处理

数据用 Excel 2007 处理后, 采用 SPSS 25.0 对各组数据进行单因子方差分析, 以 $P < 0.05$ 作为判断显著性的标准。

2 结果与分析

2.1 桃褐腐病病原菌的分离鉴定及致病性测定结果

2.1.1 病原菌的形态特征

从桃发病果实中分离得到的菌株 M-1 在 PDA 培养基上生长良好, 菌落边缘较整齐、无

玫瑰花状结构、颜色呈灰黄色, 菌落中间颜色较深(图 1A); 培养皿背面为白色(图 1B); 分生孢子梗成串珠状, 不分枝或二叉状分枝, 分枝呈锐角形, 产孢梗较短(图 1C)。分生孢子为无色单胞, 多呈柠檬状, 呈支链状, 部分顶部有平末端(图 1D、1E)。结合周芳^[24]的褐腐病菌种群结构分析和魏景超^[15]的《真菌鉴定手册》, 可初步判断分离菌株 M-1 为 *M. fructicola*。

2.1.2 病原菌的 rDNA ITS 序列扩增与系统发育分析

分离得到的菌株的 ITS 序列为 513 bp, BLAST 分析结果显示, 分离菌株 M-1 (GenBank 登录号为 PP526970)与 NCBI 数据库中的美澳型核果链核盘菌(*M. fructicola*)相似度在 99%以上。菌株 M-1 基于 ITS 序列构建的系统发育树分析结果表明(图 2), 菌株 M-1 与美澳型核果链核盘菌(*M. fructicola*)属于系统发育树的同一分支。表明桃褐腐病的病原菌为 *M. fructicola*。

2.1.3 病原菌的致病性检验

健康桃果实上接种 M-1 后(图 3A), 接种部位 2 d 后开始发病, 接种部位附近出现圆形水渍状小斑点(图 3B), 3 d 后接种部位溃状斑点迅速扩大并出现分生孢子梗(图 3C、3D), 5 d 时果实一侧已全部腐烂, 果实表面出现大量分生孢子(图 3E)。发病症状与自然条件下发病症状一致且对照(不含 M-1 的无菌 PDA)接种均未发病(图 3F-3J)。

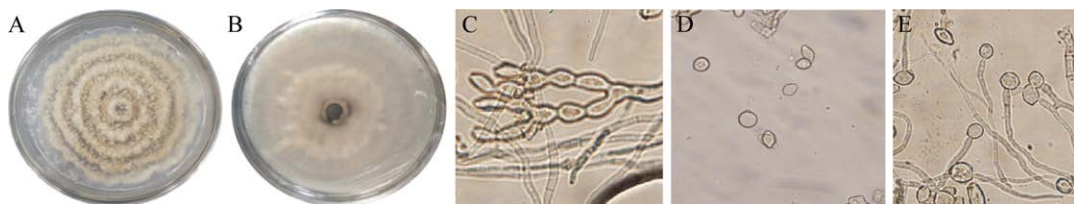


图 1 桃褐腐病菌的菌落形态及分生孢子形态 A: 在 PDA 上培养的菌落正面; B: 在 PDA 上培养的菌落背面; C: 分生孢子梗(10×40); D: 分生孢子(10×40); E: 萌发的分生孢子

Figure 1 Colony morphology and conidial morphology of peach brown rot pathogen. A: Fronts of colonies cultured on PDA. B: Backs of colonies cultured on PDA. C: Conidiophores (10×40). D: The conidium (10×40). E: Germinated conidia.

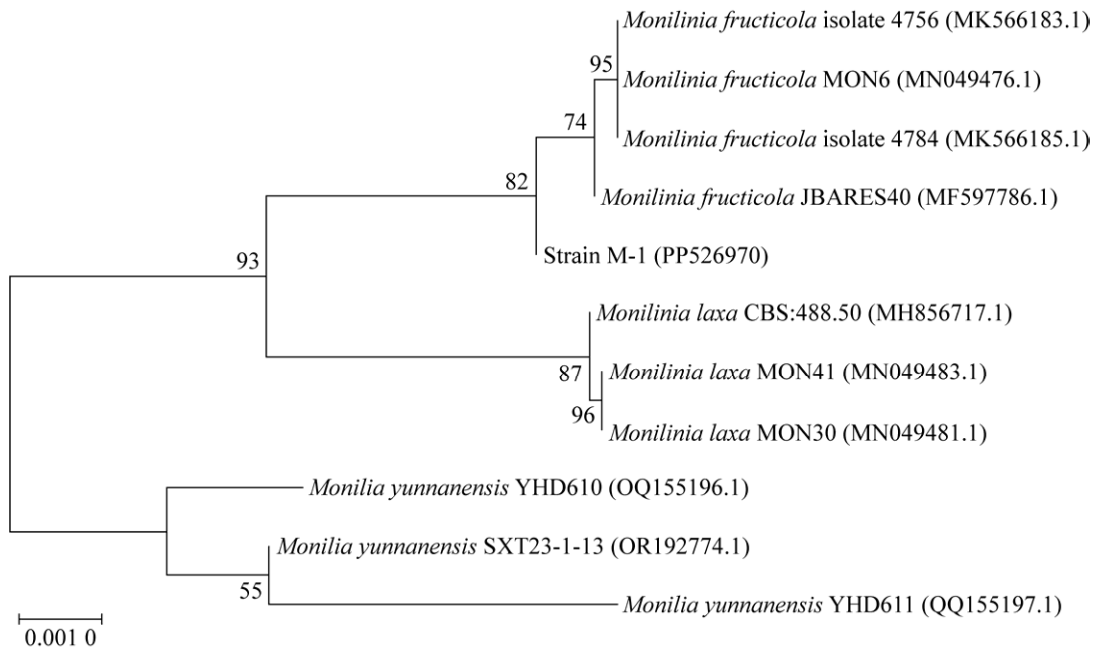


图 2 基于 ITS 序列构建的菌株 M-1 的系统发育树 括号中的序号为 GenBank 登录号；分支点上的数字为置信程度；左下角的标尺 0.001 0 为系统发育树的遗传距离

Figure 2 Phylogenetic tree of strain M-1 constructed based on ITS sequence. The serial number in bracket: GenBank accession number; Numbers on branch points: The self expanding value; The scale 0.001 0 in the lower left corner is the genetic distance of the evolutionary tree.

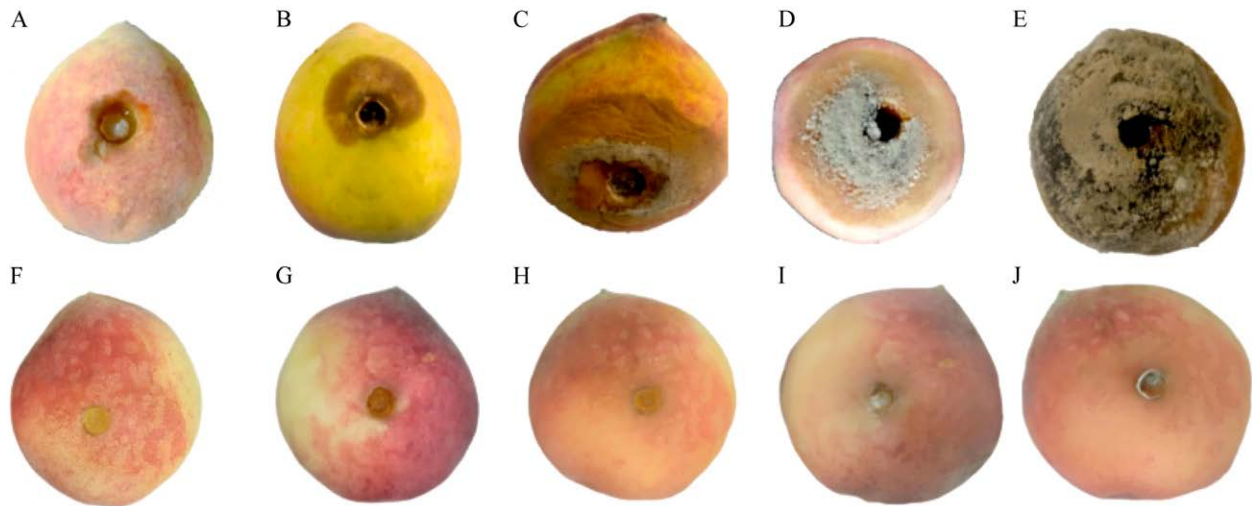


图 3 接种病原菌 M-1 后不同天桃果样致病性试验的症状 A-E: 接种病原菌后桃果实 1-5 d 的症状。F-J: 不含 M-1 的无菌 PDA 接种后 1-5 d 的症状(对照)

Figure 3 Symptoms from the pathogenicity tests on peach fruit samples at different days after inoculation with the pathogen M-1. A-E: The symptoms at 1-5 days after inoculation with the M-1. F-J: The control peach at 1-5 days after inoculation with sterile PDA plugs without the M-1 (control).

2.2 拮抗酵母菌的生防效果与鉴定结果

2.2.1 拮抗酵母菌对桃褐腐病菌的生防效果

从桃果实分离的拮抗菌中筛选到 5 株对病原菌抑制效果良好的菌株。其中,有 3 株拮抗酵母菌株对美澳型核果链核盘菌抑制率在 50.00%以上,菌株 HYQ-4.1 的抑菌效果最好,对时培养 7 d 后抑菌率为(78.31±0.93)% (表 1)。

菌株 HYQ-4.1 对病原菌的平板对峙结果如图 4 所示。由图 4 可知,菌株 HYQ-4.1 对病原菌的生长有明显抑制作用。

2.2.2 拮抗酵母菌 HYQ-4.1 的离体果实防效测定结果

拮抗酵母菌 HYQ-4.1 对褐腐病菌的抑制效果如图 5 所示。28 °C 光暗交替培养 6 d 后桃果实对照组的发病率高达 86.33%,显著高于处理组,并且随着拮抗酵母菌浓度的增加,桃果实的发病率不断降低(图 5A)。1×10⁹ 个/mL 浓度的菌株 HYQ-4.1 对褐腐病菌的抑制效果最好,为 23.33%,其次为 1×10⁸ 个/mL 浓度的菌株 HYQ-4.1,对褐腐病菌的抑制效果与 1×10⁹ 个/mL 浓度之间无

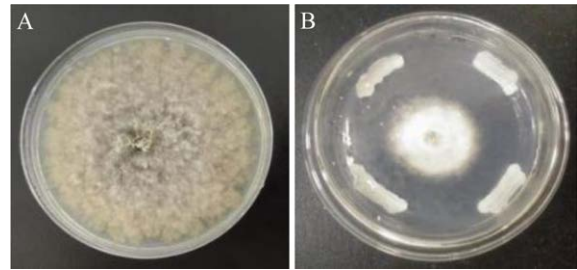


图 4 菌株 HYQ-4.1 对美澳型核果链核盘菌 M-1 的抑制作用 A: 美澳型核果链核盘菌 M-1 菌落 (CK); B: 菌株 HYQ-4.1 对美澳型核果链核盘菌 M-1 的抑制作用

Figure 4 Inhibitory effect of strain HYQ-4.1 on *Monilinia fructicola* M-1. A: *M. fructicola* M-1 colonies (CK). B: Inhibitory effect of strain HYQ-4.1 on *M. fructicola* M-1.

显著性差异,为 26.67%,1×10⁵ 个/mL 浓度时抑制效果最差,为 56.67%。

此外,拮抗酵母菌对桃褐腐病病斑直径的抑制效果与其对褐腐病的抑制效果趋势一致,随着浓度的增加,桃褐腐病病斑直径不断降低(图 5B)。不同浓度的菌株 HYQ-4.1 都显著降低了褐腐病的病斑直径,其中,在高浓度(1×10⁸ 个/mL 和 1×10⁹ 个/mL)时菌株 HYQ-4.1 显示出对桃中褐腐病菌的有效抑制。

接种 6 d 的桃果实在 25 °C、RH 95%条件下培养 6 d 后,酵母菌株 HYQ-4.1 对桃褐腐病的抑制能力如图 6。结果显示,酵母菌株 HYQ-4.1 对桃褐腐病有明显的拮抗作用(图 6)。

2.2.3 菌株 HYQ-4.1 的形态学鉴定及生理生化特性

NYDA 培养基上培养 2 d 后,发现菌落 HYQ-4.1 呈乳白色,圆形,表面放射状隆起,质地黏稠且具有芳香味(图 7A)。通过显微镜观察该菌株,发现其细胞呈卵形、椭圆形(图 7B)。根据 Liu 等^[25]对异常威克汉姆酵母(*W. anomalus*)特性的描述,发现该拮抗酵母菌与 *W. anomalus* 的生理生化特性一致(表 2)。

表 1 拮抗酵母对桃褐腐病菌的抑制作用

Table 1 Inhibitory activity of antagonistic yeast strains on the growth of the peach brown rot pathogen

菌株编号 Strain No.	抑菌率 Inhibition rate (%)
HYQ-4.1	78.31±0.93a
HYQ-3.5	66.47±1.02b
HYQ-2.0	53.65±0.69c
HYQ-1.3	40.98±0.85d
HYQ-5.5	38.74±0.68d
CK	0.00

不同小写字母表示不同菌株的抑菌率在 0.05 水平上的差异显著性

The different lowercase letters indicate the significant difference in the inhibition rate of different strains at the 0.05 level.

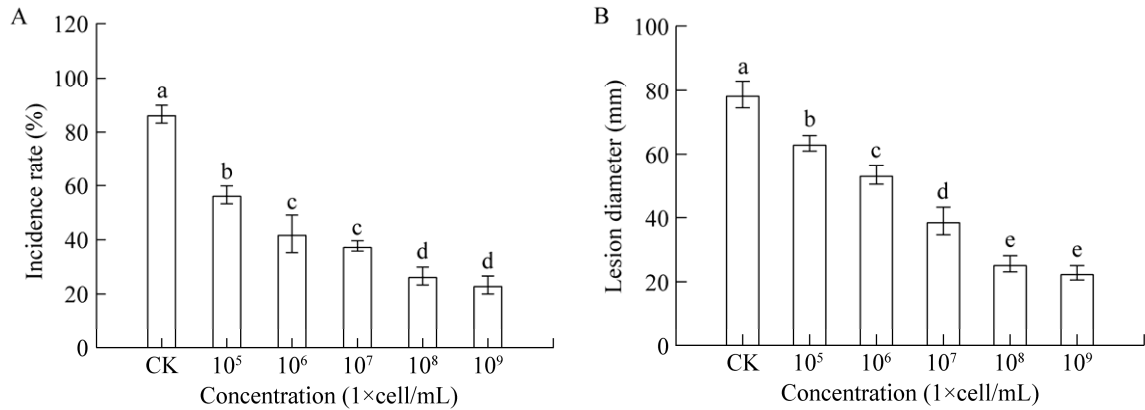


图5 不同浓度拮抗酵母菌对桃褐腐病的发病率(A)和病变直径(B) 不同小写字母代表差异显著($P<0.05$)
Figure 5 Incidence rate (A) and lesion diameter (B) of peach brown rot caused by different concentrations of antagonistic yeast. Different lowercase letters indicate significant differences among the data ($P<0.05$).

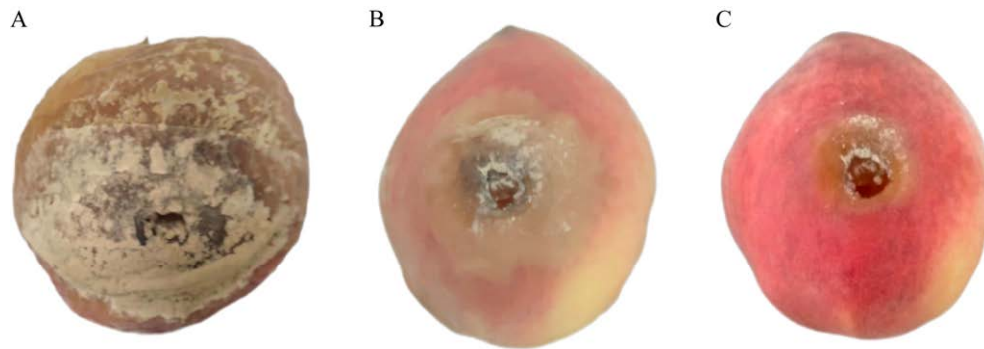


图6 接种拮抗酵母菌对桃褐腐病的抑制作用 A: 未经菌株 HYQ-4.1 接种的 6 d 后桃果实. B 和 C: 菌株 HYQ-4.1 接种 6 d 的桃果实

Figure 6 Inhibitory effect of inoculation of antagonistic yeast on peach brown rot. A: Peach wound without antagonistic yeast HYQ-4.1 treatment for 6 days. B and C: Peach wound treated with HYQ-4.1 after 6 days.

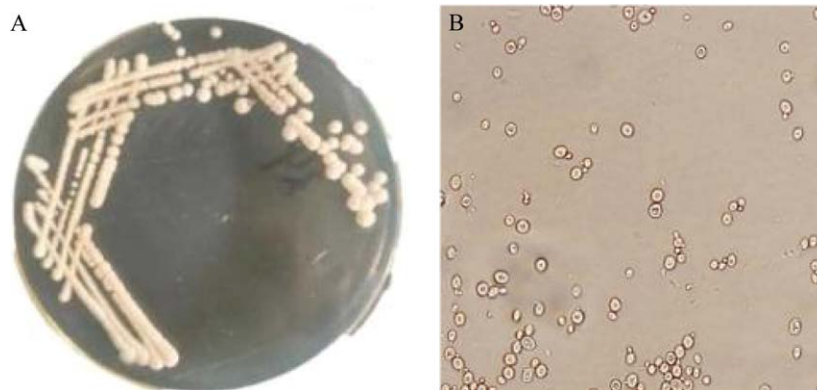


图7 拮抗酵母 HYQ-4.1 的菌落形态(A)和细胞形态(B)

Figure 7 Colony morphology (A) and cell morphology (B) of antagonistic yeast HYQ-4.1.

表 2 拮抗酵母 HYQ-4.1 的生理生化特性
Table 2 Physiological and biochemical characteristics of antagonistic yeast HYQ-4.1

Item	Result
糖发酵试验 Carbohydrate degradation test	
D-葡萄糖 D-glucose	+
蔗糖 Sucrose	+
淀粉 Starch	-
麦芽糖 Maltose	+
D-半乳糖 D-galactose	+
纤维二糖 Cellobiose	-
乳糖 Lactose	-
棉子糖 Raffinose	+
碳源同化 Carbon source assimilation	
D-葡萄糖 D-glucose	+
D-半乳糖 D-galactose	+
淀粉 Starch	+
蔗糖 Sucrose	+
D-木糖 D-xylose	+
D-阿拉伯糖 D-arabinose	-
海藻糖 Trehalose	+
山梨醇 Sorbitol	+
麦芽糖 Maltose	+
柠檬酸 Citric acid	+
琥珀酸 Succinic acid	+
肌醇 Inositol	-
甘油 Glycerol	+
棉子糖 Raffinose	+
L-鼠李糖 L-rhamnose	-
氮源同化 Nitrogen assimilation	
L-赖氨酸 L-lysine	+
硫酸铵 Ammonium sulfate (NH ₄) ₂ SO ₄	+
硝酸钾 Potassium nitrate KNO ₃	+
亚硝酸钠 Sodium nitrite NaNO ₂	-
其他 Others	
淀粉生产 Starch production	-
尿素水解实验 Urea hydrolysis	-
明胶液化实验 Gelatin liquification	-

+: 阳性; -: 阴性

+: Positive; -: Negative.

2.2.4 菌株 HYQ-4.1 的分子生物学鉴定结果

分离得到的菌株的 ITS 序列为 589 bp, 在 NCBI 数据库中 BLAST 比对分析发现, 菌株

HYQ-4.1 与异常威克汉姆酵母同属近缘种, 相似性达 99%以上, 采用 MEGA 5.0 软件构建系统发育树, 结合形态学鉴定结果, 鉴定菌株 HYQ-4.1 (GenBank 登录号为 PP526971)为异常威克汉姆酵母(*Wickerhamomyces anomalus*) (图 8)。

2.3 菌株 HYQ-4.1 对桃抗氧化酶类活性的影响

拮抗酵母菌株 HYQ-4.1 处理桃果实后抗氧化酶活性的变化如图 9 所示。酵母菌株 HYQ-4.1 处理过的桃果实 POD 活性普遍高于对照组 (图 9A), 两组 POD 活性均先升高后降低, 之后再升高。处理组的 POD 活性在第 2 天最高, 为 61.34 U/g, 2-5 d 开始下降, 5 d 后又上升, 而对照组的 POD 活性在第 3 天最高, 为 45.89 U/g, 3-6 d 开始下降, 6 d 后又上升。

如图 9B 所示, 菌株 HYQ-4.1 处理的桃果实 PPO 活性先上升后下降, 对照组的 PPO 活性整体较平稳。处理组的桃果实在贮藏前期酶活性逐渐增加, 在第 5 天达到峰值, 随后 PPO 活性急剧下降。在整个贮藏期间, 菌株 HYQ-4.1 处理的桃果实 PPO 酶活性与对照相比显著增加。处理组的桃果实 PPO 活性最大值是对照组的 1.45 倍。

酵母菌株 HYQ-4.1 处理的桃果实 GLU 活性与对照组变化趋势一致, 都是先升高后降低。二者酶活性都在第 3 天达到峰值, 此时处理组的桃果实 GLU 活性是对照组的 1.12 倍。但在第 5 天的桃 GLU 活性对照组高于处理组, 其他贮藏期都是处理组高于对照组(图 9C)。

除第 0 天外, 酵母菌株 HYQ-4.1 处理的桃果实 PAL 活性均显著高于对照组(图 9D)。处理组和对照组的 PAL 活性均在第 4 天达到最大值。此时处理组的 PAL 活性为 103.71 U/g, 比对照组高 52%。

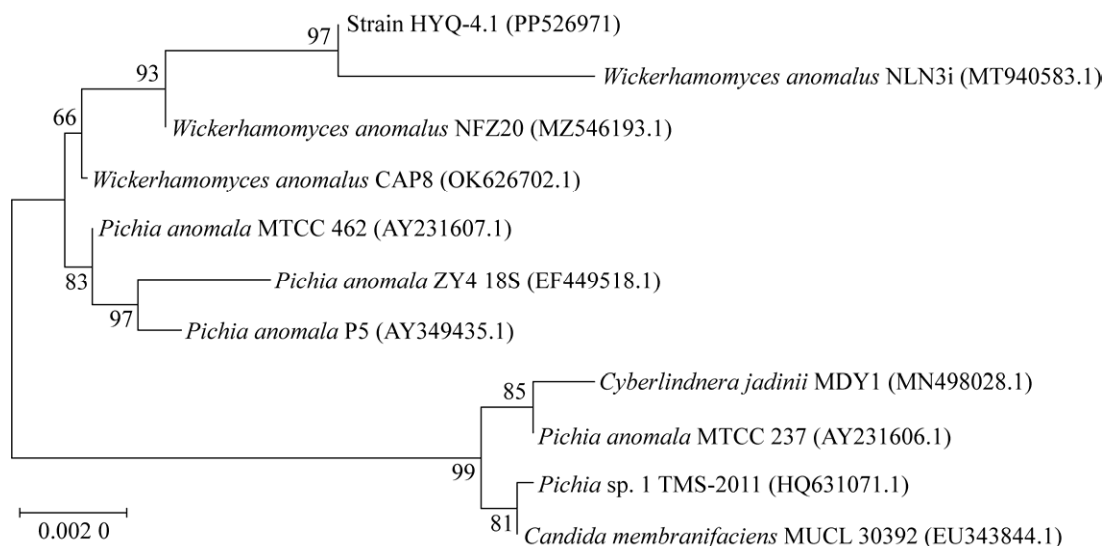


图 8 基于 ITS 序列构建的菌株 HYQ-4.1 系统发育树 括号中的序号为 GenBank 登录号；分支点上的数字代表自展值；左下角的标尺 0.002 0 为系统发育树的遗传距离

Figure 8 Phylogenetic tree of strain HYQ-4.1 constructed based on ITS gene sequence. The serial number in bracket: GenBank accession number; Numbers on branch points: The self expanding value; The scale 0.002 0 in the lower left corner is the genetic distance of the evolutionary tree.

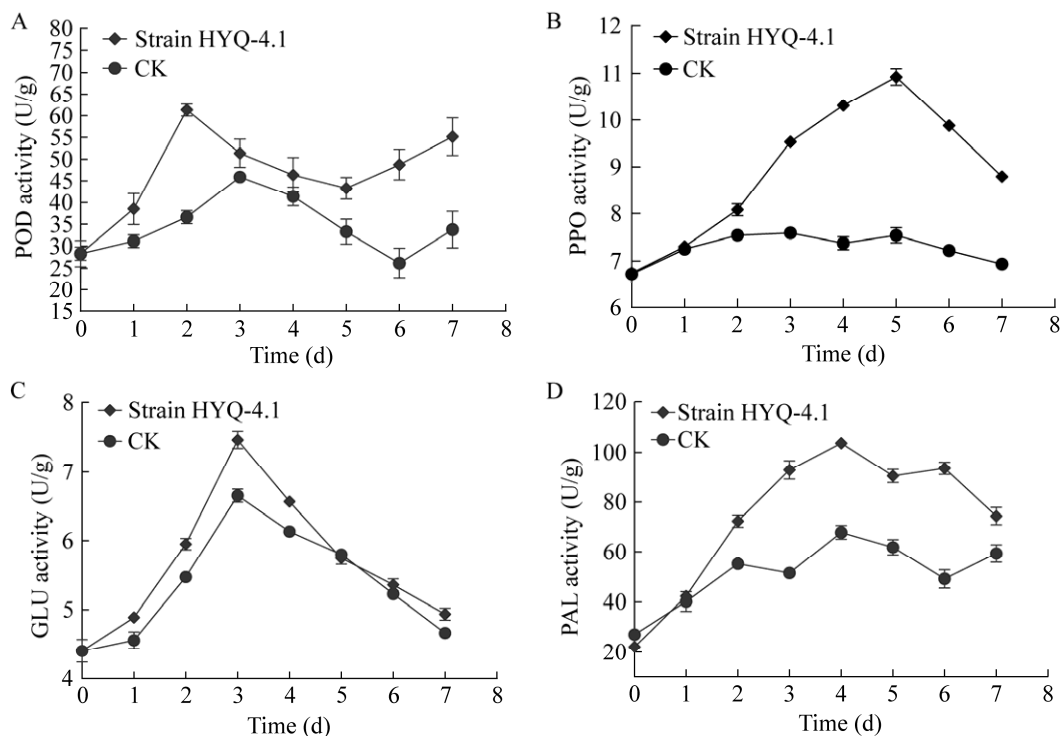


图 9 拮抗酵母菌株 HYQ-4.1 对 25 °C 贮藏过程中桃果实酶活性的影响

Figure 9 Effects of enzyme activities in pears treated with antagonist yeast HYQ-4.1 during the storage at 25 °C. CK: Pears treated with sterile distilled water.

3 讨论与结论

本研究从采自山西农业大学果树所的桃褐腐病果上分离菌株,并进行菌落形态观察及 ITS 序列比对分析确定其为美澳型核果链核盘菌(*M. fructicola*)。研究结果与李志伟等^[4]报道的美澳型核果链核盘菌(*M. fructicola*)为山东桃褐腐病的优势种相符,但是与周芳^[24]研究的引起山西省褐腐病的主要病原菌是果生链核盘菌(*M. fructigena*)的结论不同。这可能与研究材料有关,周芳的研究材料是以苹果和梨等仁果类果实为主,而本研究是以桃为试验材料,这与朱小琼等^[26]发现的褐腐病菌种群中果生链核盘菌(*M. fructigena*)主要侵染仁果类果实、美澳型核果链核盘菌(*M. fructicola*)主要侵染核果类果实的研究一致。

曾有文献报道,异常威克汉姆酵母(*W. anormalus*)对猕猴桃采后蓝霉病和灰霉病害均有较强的生防活性^[27],Zhu 等^[28]研究也发现, 1×10^8 个/mL 的 *W. anormalus* 有降低链格孢菌(*Alternaria alternata*)孢子萌发和抑制芽管生长的能力,其挥发性物质对病原真菌也具有抑制作用,可以显著控制番茄黑斑病。但是目前国内尚无关于 *W. anormalus* 拮抗褐腐病的相关报道。本研究通过体外试验筛选到了 3 株对桃褐腐病菌 *M. fructicola* 拮抗作用高于 50% 的拮抗酵母菌,其中 *W. anormalus* 抑菌效果最显著,对 *M. fructicola* 的生长抑制率达到 78.31%。有研究表明,*W. anormalus* 能够在番茄的伤口和表面快速定殖并稳定繁殖,与病原菌争夺营养和空间,增强番茄的多酚氧化酶(polyphenol oxidase, PPO)、过氧化物酶(peroxidase, POD)和超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)等多种酶的活性,并且能延缓总酚和黄酮类等次生代谢产物含量的降低^[29]。

拮抗菌的生物防治效果可以通过增加拮抗菌

的浓度来提高。在本研究中还观察到施用拮抗酵母菌的浓度与抑菌效果之间呈现负相关。Zhang 等^[30]也证明了在离体培养条件下,较高浓度的纺锤形拟酵母(*Pseudozyma fusiformata*)、梅奇酵母属(*Metschnikowia*)和出芽短梗霉菌(*Aureobasidium pullulans*)在抑制桃采后病原菌核果链核盘菌(*Monilinia laxa*)的孢子萌发或胚管伸长方面均有显著效果。这些情况表明拮抗酵母菌和病原体为生存而竞争相同的营养。一般来说,当施用 1×10^7 – 1×10^8 个/mL 时,拮抗微生物作为生物防治剂最有效,很少需要更高的浓度^[31]。

拮抗酵母菌诱导植物抵抗病原菌侵染也是其发挥生物防治功效的重要机制之一,包括刺激防御相关酶活性,增加次生代谢物含量,提高植物抗氧化能力^[32]。Raynaldo 等^[33]研究发现 *W. anormalus* 诱导了樱桃番茄抗坏血酸过氧化物酶(ascorbate peroxidase, APX)和几丁质酶(chitinase, CHI)活性,降低了樱桃番茄丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量,增强了番茄对黑斑病的抗性。本研究发现 *W. anormalus* 处理的桃果实可以增强桃果 POD、PPO、GLU 和 PAL 的活性,而对由 *M. fructicola* 引起的褐腐病达到防治作用。这与 Li 等^[34]研究结果相似,海洋酵母锁掷酵母(*Sporidiobolus pararoseus*)和褐藻胶寡糖(alginate oligosaccharides, AOS)单独或联合使用均显著提高了 PAL、POD 和 PPO 等抗性相关酶的活性和基因表达量,促进总酚的积累,降低了桃褐腐病的发生。

本研究明确了山西省晋中市太谷区桃褐腐病的病原菌为美澳型核果链核盘菌(*M. fructicola*)。以该病原菌为靶标,筛选到一株对桃褐腐病菌抑制效果高达 78.31% 的拮抗酵母菌,经鉴定确定其为异常威克汉姆酵母(*W. anormalus*)。该菌株通过与 *M. fructicola* 竞争空间和营养以及提高桃果实 PPO、POD、GLU 和 PAL 的活性降低桃

褐腐病害严重程度。综上所述, *W. anormalus* 对桃褐腐病菌具有拮抗作用, 可以用于开发桃褐腐病的生防制剂。

REFERENCES

- [1] 梁瑞邦, 李海炎, 朱鹏翔, 陆泰良, 万保雄. 广西桃产业现状、发展趋势与对策建议[J]. 南方园艺, 2023, 34(4): 60-64.
LIANG RZ, LI HY, ZHU PX, LU TL, WAN BX. Current status, development trends, and countermeasures in the peach industry of Guangxi[J]. Southern Horticulture, 2023, 34(4): 60-64 (in Chinese).
- [2] 王力荣. 我国桃产业现状与发展建议[J]. 中国果树, 2021(10): 1-5.
WANG LR. Current situation and development suggestions of peach industry in China[J]. China Fruits, 2021(10): 1-5 (in Chinese).
- [3] MUSTAFA M, BASSI D, CORRE M, LINO LO, SIGNORET V, QUILOT-TURION B, CIRILLI M. Phenotyping brown rot susceptibility in stone fruit: a literature review with emphasis on peach[J]. Horticulturae, 2021, 7(5): 115.
- [4] 李志伟, 汪少丽, 刘保友, 杜建峰, 王英姿. 山东桃褐腐病原菌种群鉴定及致病性分析[J]. 果树学报, 2023, 40(2): 327-339.
LI ZW, WANG SL, LIU BY, DU JF, WANG YZ. Population identification and pathogenicity analysis of peach brown rot pathogens in Shandong Province[J]. Journal of Fruit Science, 2023, 40(2): 327-339 (in Chinese).
- [5] 韩凯迪, 刘佳, 张树武, 徐秉良, 吕世民, 翟一凡, 汪洁. 桃褐腐病菌 *Monilia yunnanensis* 生防细菌筛选及其拮抗机制解析[J]. 中国果树, 2023(10): 89-94.
HAN KD, LIU J, ZHANG SW, XU BL, LÜ SM, ZHAI YF, WANG J. Screening of biocontrol bacteria against peach brown rot pathogen *Monilia yunnanensis* and analysis of its antagonistic mechanism[J]. China Fruits, 2023(10): 89-94 (in Chinese).
- [6] RUNGJINDAMAI N, JEFFRIES P, XU XM. Epidemiology and management of brown rot on stone fruit caused by *Monilinia laxa*[J]. European Journal of Plant Pathology, 2014, 140(1): 1-17.
- [7] AGATHOKLEOUS E, CALABRESE EJ. Fungicide-induced hormesis in phytopathogenic fungi: a critical determinant of successful agriculture and environmental sustainability[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2021, 69(16): 4561-4563.
- [8] 贾祥子, 叶建, 王诚, 熊正文, 孔祥伟, 张清霞, 纪兆林. 桃褐腐病生防细菌 JY-d1 种类鉴定及其对桃褐腐病菌生防机制研究[J]. 扬州大学学报(农业与生命科学版), 2021, 42(4): 128-134.
JIA XZ, YE J, WANG C, XIONG ZW, KONG XW, ZHANG QX, JI ZL. Identification of biocontrol agent JY-d1 and biological control mechanism of this bacterium against peach fruit brown rot pathogen *Monilinia fructicola*[J]. Journal of Yangzhou University (Agricultural and Life Science Edition), 2021, 42(4): 128-134 (in Chinese).
- [9] 侯旭, 关伟, 胡晓, 袁雪, 张国庆, 刘悦萍. 桃树根部内生真菌 ZJ-4 的分离鉴定及其对桃褐腐病的抑制效果[J]. 微生物学杂志, 2018, 38(2): 63-69.
HOU X, GUAN W, HU X, YUAN X, ZHANG GQ, LIU YP. Isolation and identification of endophytic fungus ZJ-4 from peach roots and its inhibitory effect against *Monilinia fructicola*[J]. Journal of Microbiology, 2018, 38(2): 63-69 (in Chinese).
- [10] JIA F, CHEN MJ, LIU CY, CHEN S, LIU WN, HUANG KZ, SUN XC, MA GH, CHEN GK. *Streptomyces rapamycinicus* HCD1-10: an effective biocontrol actinomycetes against postharvest Chinese flat peach brown rot caused by *Monilinia fructicola*[J]. Scientia Horticulturae, 2024(327): 112836.
- [11] NI M, WU Q, WANG HL, LIU WC, HU B, ZHANG DP, ZHAO J, LIU DW, LU CG. Identification of a novel strain, *Streptomyces blastmyceticus* JZB130180, and evaluation of its biocontrol efficacy against *Monilinia fructicola*[J]. Journal of Zhejiang University: Science B, 2019, 20(1): 84-94.
- [12] WU HL, LI JQ, LIU WC, BAI XL, LIU DW, ZHANG JW. Identification and characterization of ZL261, a novel *Collimonas pratensis* strain with antagonistic activity toward *Monilinia fructicola*[J]. Science China Life Sciences, 2016, 59(12): 1345-1347.
- [13] 曹璇, 郑晓冬. 盐胁迫培养下季也蒙毕赤酵母的转录组学差异分析[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2020, 46(4): 400-406.
CAO X, ZHENG XD. Transcriptomic difference analysis of *Meyerozyma guilliermondii* in response to salt stress[J]. Journal of Zhejiang University (Agriculture and Life Sciences), 2020, 46(4): 400-406 (in Chinese).
- [14] ZHANG Y, NAN MN, XUE HL. Isolating, identifying, and analyzing the biological characteristics of pathogens causing postharvest disease in fresh *Radix Astragali*[J]. Horticulturae, 2023, 9(9): 1019.
- [15] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979.
WEI JC. Handbook of Fungal Identification[M]. Shanghai: Shanghai Scientific & Technical Publishers, 1979 (in Chinese).
- [16] 蒋晶晶, 周昭旭, 杜蕙, 吕昭龙, 王春明, 郭建国, 张新

- 瑞, 李继平. 甘肃部分地区苹果褐腐病病原分离鉴定及拮抗细菌筛选[J]. 生物技术通报, 2023, 39(10): 209-218.
- JIANG JJ, ZHOU ZX, DU H, LYU ZL, WANG CM, GUO JG, ZHANG XR, LI JP. Isolation and identification of apple brown rot pathogen in parts of Gansu and screening of antagonistic bacteria[J]. Biotechnology Bulletin, 2023, 39(10): 209-218 (in Chinese).
- [17] ZHANG X, WU F, GU N, YAN X, WANG K, DHANASEKARAN S, ZHANG H. Postharvest biological control of Rhizopus rot and the mechanisms involved in induced disease resistance of peaches by *Pichia membranefaciens*[J]. Postharvest Biology and Technology, 2020, 163: 111146.
- [18] 沈萍. 微生物学实验[M]. 3版. 北京: 高等教育出版社, 1999.
- SHEN P. Microbiological Experiment[M]. 3rd ed. Beijing: Higher Education Press, 1999 (in Chinese).
- [19] 巴尼特, 佩恩, 亚罗. 酵母菌的特征与鉴定手册[M]. 胡瑞卿译. 青岛: 青岛海洋大学出版社, 1991: 60-117.
- BARNETT JA, PAYNE RW, YARROW D. Yeasts: Characteristics and Identification[M]. Translated by HU RQ. Qingdao: Qingdao Ocean University Press, 1991: 60-117 (in Chinese).
- [20] MOHAMMADI M, KAZEMI H. Changes in peroxidase and polyphenol oxidase activities in susceptible and resistant wheat heads inoculated with *Fusarium graminearum* and induced resistance[J]. Plant Science, 2002, 162(4): 491-498.
- [21] XIAO JW, ZHAO LN, BAI YH, LIN RL, LEGRAND NGOLONG NGEA G, DHANASEKARAN S, LI B, GU XY, ZHANG XY, ZHANG HY. The biocontrol efficacy of *Sporidiobolus pararoseus* Y16 cultured with gamma-aminobutyric acid and its effects on the resistant substances of postharvest grapes[J]. Biological Control, 2022, 169: 104900.
- [22] ZHANG XY, ZHOU Y, DHANASEKARAN S, WANG JY, ZHOU HY, GU XY, LI B, ZHAO LN, ZHANG HY. Insights into the defense mechanisms involved in the induction of resistance against black spot of cherry tomatoes by *Pichia caribbica*[J]. LWT, 2022, 169: 113973.
- [23] JAVADI KHEDERI S, KHANJANI M, GHOLAMI M, PANZARINO O, de LILLO E. Influence of the erineum strain of *Colomerus vitis* (Acari: Eriophyidae) on grape (*Vitis vinifera*) defense mechanisms[J]. Experimental and Applied Acarology, 2018, 75(1): 1-24.
- [24] 周芳. 山西省褐腐病菌种群结构及致病性研究[D]. 太谷: 山西农业大学硕士学位论文, 2015.
- ZHOU F. Population structure and pathogenicity of *Monilinia* in Shanxi Province[D]. Taiyu: Master's Thesis of Shanxi Agricultural University, 2015 (in Chinese).
- [25] LIU X, LI Y, ZHAO H, YU Z, HARDIE J W, HUANG M. Identification and fermentative properties of an indigenous strain of *Wickerhamomyces anomalus* isolated from *Rosa roxburghii* Tratt[J]. British Food Journal, 2021, 123(12): 4069-4081.
- [26] 朱小琼, 段维军, 胡勤郡, 国立耘. 核果和仁果褐腐病病原菌研究进展[J]. 菌物学报, 2022, 41(3): 331-348.
- ZHU XQ, DUAN WJ, HU MJ, GUO LY. Research progress on brown rot pathogens of stone and pome fruit[J]. Mycosystema, 2022, 41(3): 331-348 (in Chinese).
- [27] ZHAO QH, SHI Y, XU CW, JIANG ZH, LIU J, SUI Y, ZHANG HY. Control of postharvest blue and gray mold in kiwifruit by *Wickerhamomyces anomalus* and its mechanism of antifungal activity[J]. Postharvest Biology and Technology, 2023, 201: 112345.
- [28] ZHU MR, YANG QY, GODANA EA, HUO YN, HU SY, ZHANG HY. Efficacy of *Wickerhamomyces anomalus* in the biocontrol of black spot decay in tomatoes and investigation of the mechanisms involved[J]. Biological Control, 2023, 186: 105356.
- [29] LANHUANG BE, YANG QY, GODANA EA, ZHANG HY. Efficacy of the yeast *Wickerhamomyces anomalus* in biocontrol of gray mold decay of tomatoes and study of the mechanisms involved[J]. Foods, 2022, 11(5): 720.
- [30] ZHANG DP, SPADARO D, GARIBALDI A, GULLINO ML. Selection and evaluation of new antagonists for their efficacy against postharvest brown rot of peaches[J]. Postharvest Biology and Technology, 2010, 55(3): 174-181.
- [31] HASSAN H, MOHAMED MTM, YUSOFF SF, HATA EM, TAJIDIN NE. Selecting antagonistic yeast for postharvest biocontrol of *Colletotrichum gloeosporioides* in papaya fruit and possible mechanisms involved[J]. Agronomy, 2021, 11(4): 760.
- [32] YAN Y, ZHENG XF, APALIYA MT, YANG HJ, ZHANG HY. Transcriptome characterization and expression profile of defense-related genes in pear induced by *Meyerozyma guilliermondii*[J]. Postharvest Biology and Technology, 2018, 141: 63-70.
- [33] RAYNALDO FA, ACKAH M, NGEA GLN, YOLANDANI, REHMAN SA, YANG QY, WANG KL, ZHANG XY, ZHANG HY. The potentiality of *Wickerhamomyces anomalus* against postharvest black spot disease in cherry tomatoes and insights into the defense mechanisms involved[J]. Postharvest Biology and Technology, 2024, 209: 112699.
- [34] LI JM, WEI YY, CHEN Y, YE JF, JIANG S, XU F, SHAO XF. Combined application of alginate oligosaccharide and marine yeast *Sporidiobolus pararoseus* to control brown rot of peach fruit[J]. Postharvest Biology and Technology, 2024, 208: 112677.