鼠李糖脂对梨采后黑斑病的抑制机理

卢玉慧， 刘志恬， 李永才*， 毕 阳， 杨阳阳
（甘肃农业大学 食品科学与工程学院，甘肃 兰州 730070）

摘要：以梨果黑斑病菌 *Alternaria alternata* 为研究对象，研究了鼠李糖脂（rhamnolipids，RLS）对抑制 *A. alternata* 的生长和控制黑斑病的作用，并进一步探讨了其抑菌作用机理。结果表明：RLS 能显著抑制 *A. alternata* 的生长，且其抑制效果随质量浓度的增加而显著提高，其中 30 mg/mL RLS 处理的菌落培养 7 d 时直径仅为对照组的 19.22%，且菌落呈白色、球状。同时，RLS 处理能有效控制梨果黑斑病的扩展，其中 50 mg/mL RLS 处理的果实的病斑直径仅为对照的 21.42%。进一步研究发现 RLS 处理严重破坏了 *A. alternata* 细胞膜和线粒体的完整性，提高了膜电导率，促进了活性氧的产生与积累。超微观察发现 RLS 处理后 *A. alternata* 的菌丝形态、细胞结构均发生了明显改变。

关键词：鼠李糖脂；梨果黑斑病；*Alternaria alternata*；细胞膜；线粒体；活性氧
中图分类号：TS 255.36　**文章编号：**1673-1689(2023)08-0021-10　**DOI：**10.3969/j.issn. 1673-1689.2023.08.003

Inhibition Mechanisms of Rhamnolipid on Black Spot of Postharvest Pear

LU Yuhui， *LIU Zhitian*， *LI Yongcai**， *BI Yang*， *YANG Yangyang*
(College of Food Science and Engineering, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China)

Abstract: The antifungal effect of rhamnolipids (RLS) on the vegetative growth of *Alternaria alternata* and on the black spot control were studied, and the possible mechanism of its antifungal activity was evaluated. The results showed that RLS significantly inhibited the growth of *A. alternata*, and the inhibition effect was significantly increased with the increase of RLS concentration. The mycelium diameters of *A. alternata* treated with 30 mg/mL RLS was only 19.22% of the control group after 7 days' incubation, and mycelium was white and ball in shape. The development of black spot in pear fruit treated with RLS was also inhibited, lesion diameter of 50 mg/mL RLS treatment group was only 21.42% of that in the control group. Further research showed that the RLS treatment severely damaged the integrity of *A. alternata* cell membranes and mitochondria, increased membrane conductivity, and promoted the generation and accumulation of reactive oxygen species. Ultramicroscopic observation showed that the hyphae morphology and cellular structure of *A. alternata* were significantly destroyed by RLS treatment.

Keywords: rhamnolipids, black spot of pear fruit, *Alternaria alternata*, cell membrane, mitochondria, reactive oxygen species

收稿日期：2021-06-22
基金项目：国家自然科学基金项目(31860456，32060567)。
* **通信作者：**李永才(1972—)，男，博士，教授，博士研究生导师，主要从事果蔬采后贮藏研究。E-mail：lyc@gsau.edu.cn

早酥梨(*Pyrus bretchneideri cv.* Zaosu)是1956年由中国农业科学院果树研究所以“苹果梨”为母本、“身不知”为父本进行杂交后选育而成的一个新型的梨品种[1]。因其果肉细腻雪白、酥脆香甜[2],具有生津止咳、润肺化痰等保健功效,深受消费者的喜爱,有很高的经济效益和社会效益[3]。互隔交链孢(*Alternaria alternata*)侵染可引起梨、柑橘、甜椒、杏等多种果蔬采后黑斑病害[4],贮藏后期发病率高达37%[5]。化学杀菌剂是目前控制采后病害的主要手段,但其残留量高、降解周期长、毒性大、环境污染严重且危害人体健康[6]。研发安全的采后病害防腐剂或控制手段已势在必行。

鼠李糖脂(rhamnolipids,RLS)是一种糖脂生物表面活性剂,已有研究表明其对多种作物病原菌具有抗菌活性[7]。因其无毒、两亲、潜在活性高、可生物降解、在极端条件(温度、pH和盐度)下稳定等性质成为环境友好的“绿色”化学品,其食用安全性已通过美国国家环境保护局(EPA)的食用安全认证[8]。鼠李糖脂是由一个或两个鼠李糖分子与C8和C12之间饱和或不饱和烷基链上的一个或两个脂肪酸相连形成的[9]。在对灰霉菌(*Botrytis* sp.)、丝核菌(*Rhizoctonia* sp.)、镰刀菌(*Fusium* sp.)、链格孢菌(*Alternaria* sp.)、腐霉(*Pythium* sp.)等真菌和卵菌的研究中发现,RLS能够溶解游动孢子、抑制孢子萌发和菌丝生长等[10-11]。Varnier等发现,0.1、1 mg/mL的RLS对灰霉病菌的孢子萌发和菌丝生长均有明显的抑制作用,且能有效诱导并增强葡萄的防御反应,保护植物免受灰霉病的侵染[12]。Jonghe等发现,在10、20 μg/mL的RLS质量浓度下,对菊苣孢子囊的形成、游动孢子的产生具有明显的影响,当质量浓度达到100 μg/mL时,对隐孢子菌的菌丝生长影响更显著[13]。RLS在菊苣水培胁迫系统中具有很好的抑制隐孢霉传播的潜力,可作为防治褐根腐病的有效措施。刘菊发现1.0 g/L的RLS对西瓜枯萎病菌的孢子萌发和菌丝生长均有抑制作用,且随着RLS质量浓度的增加,对病原菌的抑制作用越强[14],鼠李糖脂处理还会影响孢子内部结构,细胞壁出现不同程度的消融,原生质分布不均匀,孢子内部出现泡化现象,且浓度越高,这些现象越明显。Yan等发现500 μg/mL的鼠李糖脂能显著抑制致樱桃番茄腐烂的互隔交链孢[15]。Goswami等发现2 g/L的鼠李糖脂对甘蔗镰孢霉菌引起的病害有明显的抑制作用,且能抑制菌丝生长[16]。有关鼠李糖脂对梨果黑斑病菌*A. alternata*的抑制作用及其机理尚未见报道。作者研究了鼠李糖脂对*A. alternata*生长的抑制作用以及对黑斑病的控制作用,并探讨其可能的抑菌机理,为鼠李糖脂替代化学合成药物在果蔬采后病害控制上的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

供试早酥梨:于2020年9月18日采摘自甘肃省白银市景泰县条山农场,挑选无病虫害、机械损伤,且大小形状均匀的健康果实,当天下午运至实验室,去除田间热后,于4 ℃冷库中贮藏待用。

供试链格孢*A. alternata*(JT-3):分离自条山农场自然发病的早酥梨果实,在PDA培养基中纯化3代后保存待用;鼠李糖脂(纯度≥95%):购于西安瑞捷生物科技有限公司。

1.2 仪器与设备

SW-CJ-2FD超净工作台:苏州安泰空气技术有限公司产品;CX21FSIC光学显微镜:奥林巴斯工业有限公司产品;1510-0408型酶标仪:美国赛默飞世尔科技有限公司产品;U-LH100-3型荧光显微镜:上海永科光学仪器公司产品;JEM-1400FLASH透射电子显微镜:日本电子有限公司(JEOL)产品;Inspect扫描电子显微镜:美国FEI公司产品。

1.3 试验方法

1.3.1 *A. alternata*孢子悬浮液的配制 参照高春丽等的方法[17],并略做修改。在无菌条件下将10 mL无菌水注入培养5 d后的*A. alternata*菌落中,用无菌涂布器轻刮后用4层纱布过滤到三角瓶中,无菌水稀释、混匀后,用血球计数板计数,配制成1×10^6个/mL孢子悬浮液。

1.3.2 RLS对*A. alternata*生长的影响

1)RLS对*A.alternata*孢子萌发的影响 将上述浓度为1×10^6个/mL的*A. alternata*孢子悬浮液准确吸取1 mL于2 mL无菌离心管,在5 000 *g*条件下离心5 min后弃上清液,向沉淀中加入1 mL质量浓度分别为0、10、20、30 mg/mL的鼠李糖脂溶液,28 ℃温育,分别在0、2、4、6、8 h取出,加20 μL药处理后的孢子悬浮液于9 mm的质量浓度2 g/dL无菌水琼脂上,然后与蒸馏水润湿的滤纸同时放置于培养皿中,28 ℃恒温培养,在光学显微镜下观察

A. alternata 的孢子萌发率。孢子萌发率计算公式如下:

$$Y=\frac{A}{B}\times 100\%$$

式中:Y 为孢子萌发率,%;A 为孢子萌发数;B 为孢子总数。

2)RLS 对 *A. alternata* 菌落生长的影响　参照岑春艺等的方法测定鼠李糖脂的抑菌效果[18],并略做修改。无菌条件下将质量浓度为 10、20、30 mg/mL 的鼠李糖脂加入无菌融化的 PDA 培养基中,混匀,倒入直径为 7 cm 的培养皿中。吸取 2 μL 的 1×10^6 个/mL *A. alternata* 孢子悬浮液滴到培养基中,28 ℃恒温培养。通过十字交叉法分别测量第 3、5、7、9天的菌落直径,以无添加 RLS 的 PDA 组作为对照组。

3)RLS 对 *A. alternata* 生物量的影响　分别将 0、10、20、30 mg/mL 的鼠李糖脂溶液加入无菌融化的 PDA 培养基中混匀,待其凝固后在培养基表面铺一层无菌玻璃纸,然后在培养基表面接种培养 5 d 的 1×10^6 个/mL *A. alternata* 孢子悬浮液 2 μL 于 28 ℃恒温培养箱中培养,4 d 后取下玻璃纸,称质量并记录数据。

1.3.3　RLS 对早酥梨黑斑病的控制　参照 Moscoso-Ramírez 等的方法[19],并略做修改。果实用质量分数 2%的次氯酸钠溶液消毒处理好后用无菌铁钉(直径 3 mm)在果实赤道部位均匀地打 3 个孔(深 3 mm),待其晾干后接种 1×10^6 个/mL 的 *A. alternata* 孢子悬浮液,待孢子悬浮液晾干后向各个孔中接入 20 μL 质量浓度为 30、40、50 mg/mL 的鼠李糖脂溶液。无菌水处理作为对照。室温晾干后,置于规格为 45 cm×31 cm×16.5 cm 的市售保鲜盒,在保鲜盒 4 个角落放浸湿蒸馏水的滤纸,以保证环境湿度。通过十字交叉法,每 3 d 测量一次果实的病斑直径,并记录数据,测量至第 12 天。每个处理为 9 个梨。

1.3.4　RLS 对 *A. alternata* 膜完整性的影响

1) PI 染色检测对 *A. alternata* 孢子细胞膜完整率的测定　参照董玉鹏等的方法[20],并略做修改。准确吸取 1 mL 的 1×10^6 个/mL *A. alternata* 孢子悬浮液于 2 mL 无菌离心管中,离心弃上清液后,加入 1 mL 质量浓度分别为 0、10、20、30 mg/mL 的鼠李糖脂溶液,28 ℃温育 2 h,离心,弃上清液,向孢子沉淀中加入 1 mL PBS(pH 7.0)溶液,室温下避光静置 30 min 后,继续离心,弃上清液,加入 1 mL PBS (pH 7.0) 溶液洗涤 2 次,接着加入 20 μL 的 PI (20 ng/mL) 染液,振荡 15 s,28 ℃温育 15 min,离心,弃上清液,同样再加入 1 mL PBS(pH 7.0)溶液洗涤 2 次,最后加 1 mL PBS (pH 7.0) 溶液制片,Olympus 荧光显微镜下进行观察拍照并统计染色率。

2)RLS 处理对 *A. alternata* 细胞膜电导率的影响　细胞膜电导率参照刘志恬等的方法[21],并略做修改。取 1 mL 孢子悬浮液(1×10^6 个/mL)于 100 mL 无菌 PDB 培养基中,(25±1) ℃恒温振荡 36 h (150 r/min),过滤收集 1 g 菌丝,分别加入 0、10、20、30 mg/mL 鼠李糖脂溶液 8 mL 至 15 mL 无菌离心管中,28 ℃温育,等梯度测定 30~180 min 内 6 个时间段的电导率。

3)RLS 处理对 *A. alternata* 线粒体的影响　线粒体测定参照 Shi 等的方法[22],并做修改。孢子培养同 1.3.4 节。28 ℃温育后,分别在第 2、4 小时取出,离心 5 min,用 1 mL PBS(pH 7.0)溶液洗涤 3 次,加入 20 μL JC-1(10 μg/mL)染料工作液,室温下避光静置 30 min,离心,加入 1 mL PBS(pH 7.0)溶液洗涤 2 次,离心,最后加入 1 mL PBS(pH 7.0)溶液制片,立即置于上述荧光显微镜下观察拍照。

4)RLS 处理对 *A. alternata* 核酸渗漏的影响参照 Carson 等的方法[23],并略做修改。在 PDB 中培养菌丝后过滤收集 1 g 于 2 mL 无菌离心管中,加入剂量为 0、10、20、30 mg/mL 鼠李糖脂溶液,分别处理 0、1、2、3、4 h 后取样,离心收集上清液,检测波长 260 nm,对照组用 PBS(pH 7.0)溶液进行校正。

5)RLS 处理对 *A. alternata* 蛋白质渗漏的影响蛋白质含量测定方法同文献[23],加入剂量为 0、10、20、30 mg/mL 鼠李糖脂溶液,分别处理 0、1、2、3、4 h 后取样,离心收集上清液,检测波长 280 nm,并记录吸光度值。

6)RLS 处理对 *A. alternata* 可溶性糖的影响参照 Dubois 等的方法[24],并略做修改。可溶性糖测定方法同文献[23],加入 0、10、20、30 mg/mL 鼠李糖脂溶液,分别处理 0、1、2、3、4 h 后取样,离心收集上清液 0.5 mL,依次加入 1.5 mL 蒸馏水、1 mL 苯酚溶液(90 g/L)和 5 mL 浓硫酸,室温下反应 30 min,检测波长 485 nm。

1.3.5　RLS 对 *A. alternata* 活性氧的影响　参照刘佳怡等的方法[25],并略做修改。孢子培养同 1.3.4 节。2 h 后 8 000 *g* 离心 3 min,加入 PBS(pH 7.0)溶液

1 mL 洗涤 3 次，加 30 μL,10 μg/mL DCFH-DA 染色液,28 ℃温育 15 min,离心,弃上清液,再次加入 PBS(pH 7.0)溶液 1 mL 洗涤 2 次,立即置于荧光显微镜下观察拍照并统计染色率。

1.3.6 RLS 对 *A. alternata* 菌丝形态的影响 在扫描电子显微镜下,样本用刀片挑取部分菌丝,将样本轻轻粘在导电胶上,临界点干燥,真空喷镀,最后在镜下选择合适位置,调整到适当倍数,在扫描电镜下进行观察。

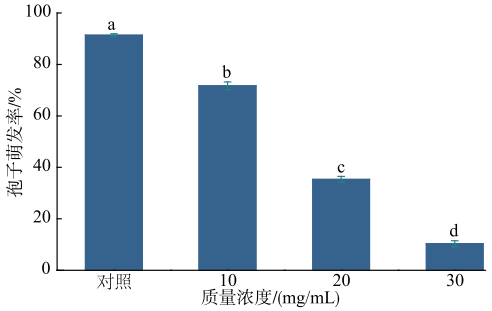
1.3.7 RLS 对 *A. alternata* 孢子显微结构的影响 取于 20、30 mg/mL 的 RLS PDA 培养基上培养 5 d 的 *A. alternata*,无菌水作为对照。样品分别经体积分数 3%戊二醛和质量分数 1%四氧化锇固定。丙酮逐级脱水。脱水后将样品进行处理。将处理后的样品进行包埋,紧接着进行切片后,漂浮于刀槽液面上,再捞至铜网。醋酸铀和枸橼酸铅染色 15~20 min 后,于透射电镜下观察。

1.3.8 数据处理 数据采用 Microsoft Excel 2013 计算,并用 Origin 2017 制图,用 SPSS 26.0 软件对得到的数据进行方差分析，采用 Duncan's 多重差异显著分析。以上实验均做 3 个平行实验,重复 3次。

2 结果与分析

2.1 RLS 对 *A. alternata* 生长的影响

2.1.1 RLS 对 *A.alternata* 孢子萌发的影响 外源 RLS 处理显著抑制了 *A. alternata* 孢子萌发 ($P<0.05$),见图 1,其抑制效果具有浓度效应,其中 30 mg/mL RLS 处理 6 后 *A. alternata* 孢子萌发较对照组降低了 88.69%。



小写字母不同代表差异显著($P<0.05$)。

图 1 RLS 对 A.alternata 孢子萌发的影响

Fig. 1 Effect of Rhamnolipids treatment on spore germination

2.1.2 RLS 对 *A. alternata* 菌落生长的影响 RLS 处理对 *A. alternata* 的菌丝生长有明显的抑制作用($P<0.05$),且抑制效果随处理质量浓度的增加而显著增强(图 2)。如图 2(a),RLS 不仅抑制了菌丝的扩展,而且只形成白色菌落,菌丝隆起,不形成孢子。其中 30 mg/mL RLS 处理 7 d 后,其菌落直径仅为对照组的 19.22%。

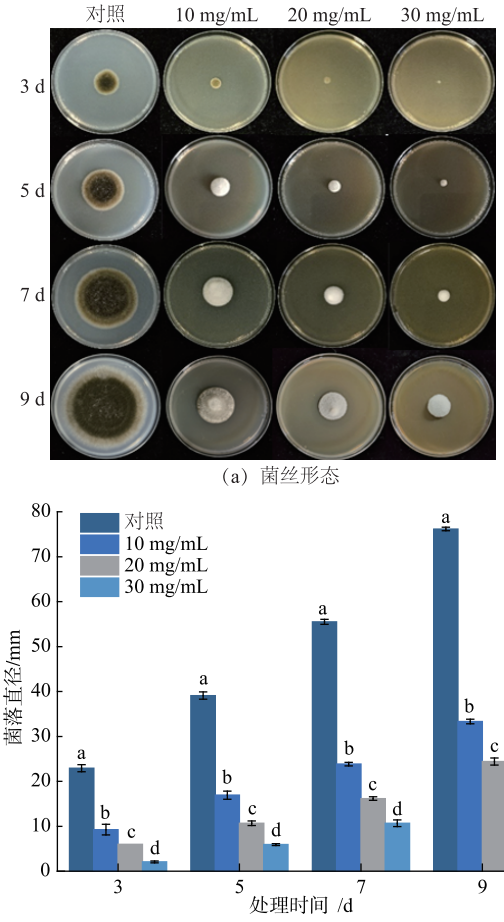


图 2 RLS 处理对 *A.alternata* 菌丝形态和菌落直径的影响

Fig. 2 Effect of RLS treatment on mycelium morphology and colony diameter of *A. alternata*

2.1.3 RLS 对 *A. alternata* 生物量的影响 RLS 处理对 *A. alternata* 的生物量有显著的抑制作用($P<0.05$),其生物量随着处理质量浓度增加呈现下降趋势(图 3)。培养 4 d 后用 30 mg/mL RLS 处理 *A. alternata* 的生物量较对照降低了 86.67%。

2.2 RLS 对早酥梨黑斑病的控制

外源 RLS 处理显著抑制了早酥梨黑斑病的扩展,且随着浓度的增加,抑制效果越明显,见图 4(a),贮藏到 12 d 时,50 mg/mL 的 RLS 处理组果实的病斑直径是对照组的 21.42%,见图 4(b)。

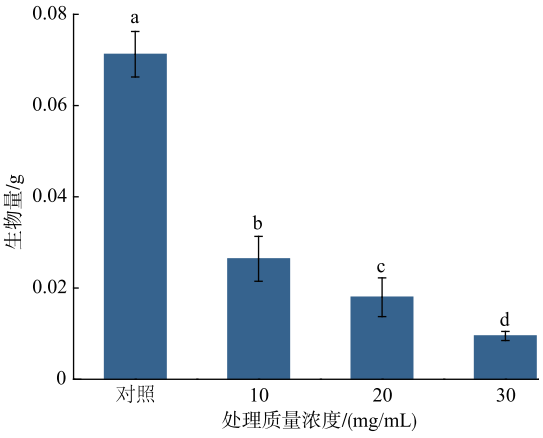


图 3 RLS 处理对 *A.alternata* 生物量的影响

Fig. 3 Effect of RLS treatment on biomass of *A. alternata*

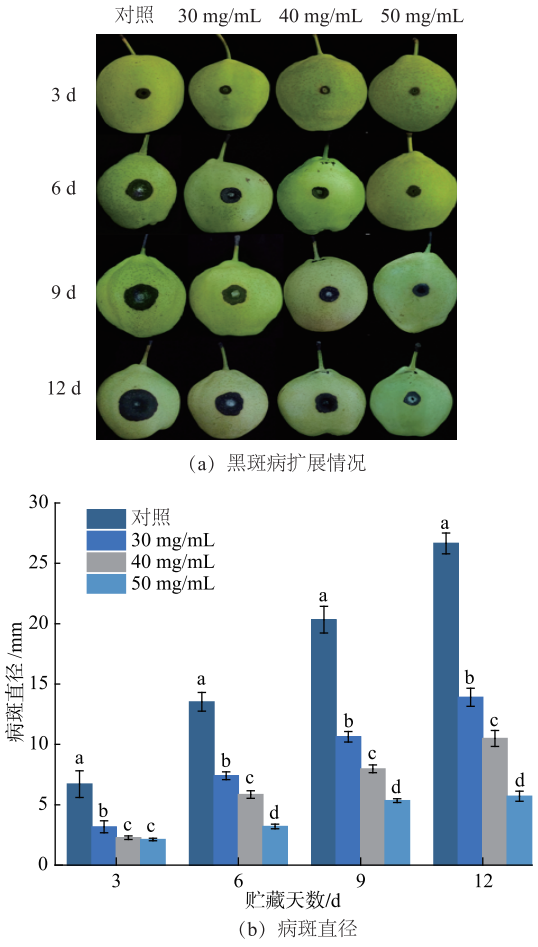


图 4 RLS 处理对早酥梨黑斑病扩展及病斑直径的影响

Fig. 4 Effects of RLS treatment on the development of black spot disease and lesion diameter of Zaosu pear

2.3 RLS 对 *A. alternata* 膜完整性的影响

2.3.1 RLS 改变 *A. alternata* 孢子细胞膜完整性

由图 5 可知,对照组中极少 *A. alternata* 孢子的细胞膜发出较弱的红色荧光,而 RLS 处理质量浓度增加时,其荧光强度随之增强,30 mg/mL RLS 处理组是对照的 7.2 倍,说明 RLS 处理会严重破坏 *A. alternata* 细胞膜的通透性。

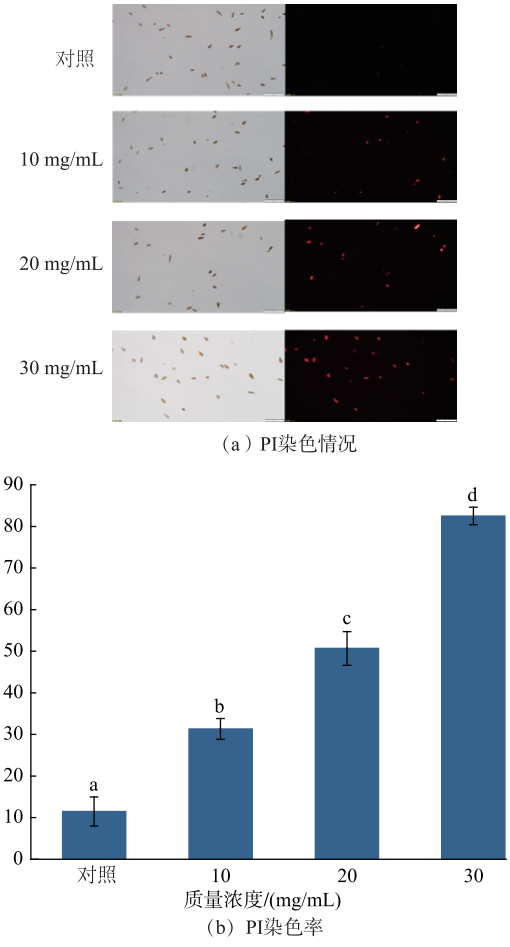


图 5 RLS 处理后 PI 染色检测细胞膜完整性

Fig. 5 Examination of cell membrane integrity after RLS treatment by propidium iodide(PI) staining and PI staining percentage

2.3.2 RLS 对 *A. alternata* 细胞膜电导率的影响

RLS 处理显著提高了 *A. alternata* 细胞膜的电导率,且处理质量浓度越大,其电导率增加越明显,见图 6,尤其在处理前 30 min 变化最为明显,30 mg/mL RLS 处理30 min 后其电导率为对照 37.37 倍,随后各处理 *A. alternata* 细胞膜电导率虽显著高于对照,但变化平稳。

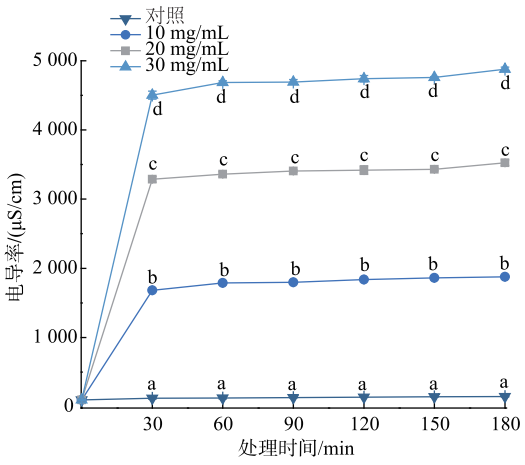


图 6 RLS 处理对 *A. alternata* 细胞膜电导率的影响

Fig. 6 Effect of the RLS on treatment on cell membrane electrical conductivity of *A. alternata*

2.3.3 RLS 对 *A. alternata* 核酸渗透的影响 由图 7 可知,RLS 处理显著加速了 *A. alternata* 核酸外渗,处理质量浓度越高培养液中核酸质量浓度越高($P<0.05$),表明细胞膜被破坏后核酸外渗。30 mg/mL 的 RLS 处理 4 h 后,*A. alternata* 培养液中核酸质量浓度为对照组的 1.1 倍。

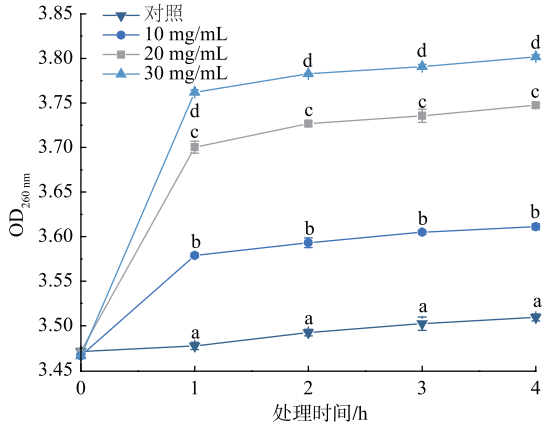


图 7 RLS 处理对 *A. alternata* 核酸渗漏的影响

Fig. 7 Effect of the RLS treatment on leakage of nucleic acid from *A. alternata*

2.3.4 RLS 对 *A. alternata* 蛋白质渗漏的影响 由图 8 可见,RLS 处理前 1 h 培养液中蛋白质质量浓度明显增加,随后变化逐渐平稳,30 mg/mL 的 RLS 处理 4 h 后,*A. alternata* 后蛋白质质量浓度为对照组的 1.16 倍。而对照组培养后期蛋白质质量浓度虽略有增加,但随培养时间不存在显著性差异($P<0.05$)。

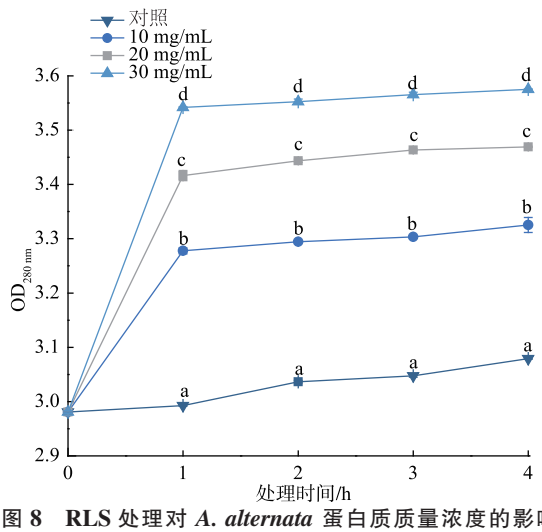


图 8 RLS 处理对 *A. alternata* 蛋白质质量浓度的影响

Fig. 8 Effect of the RLS treatment on protein content from *A. alternata*

2.3.5 RLS 对 *A. alternata* 可溶性糖渗漏的影响 由图 9 可知,随着 RLS 质量浓度增加,处理组的可溶性糖质量浓度明显增加,1 h 后对照组与处理组的差距明显,30 mg/mL RLS 处理 *A. alternata* 4 h 后,可溶性糖质量浓度为对照组的 6.1 倍。

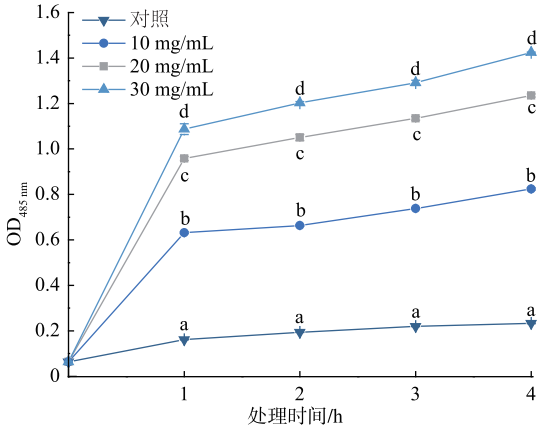


图 9 RLS 处理对 *A. alternata* 可溶性糖质量浓度的影响

Fig. 9 Effect of the RLS treatment on soluble sugar from *A. alternata*

2.3.6 RLS 对 *A. alternata* 线粒体的影响 由图 10 可见,对照组线粒体大小形态正常、结构完整、具有较强的荧光强度。而处理组的荧光强度明显减弱,质量浓度越高,破坏越严重,线粒体分解越快,且随着处理时间的延长,线粒体形态逐渐变模糊。

2.4 RLS 对 *A. alternata* 活性氧的影响

采用 DCFH-DA 探针对 *A. alternata* 细胞内活性氧进行染色,见图 11。培养 2 h 后,细胞内荧光强度随着处理质量浓度增加而增强,染色率也随之

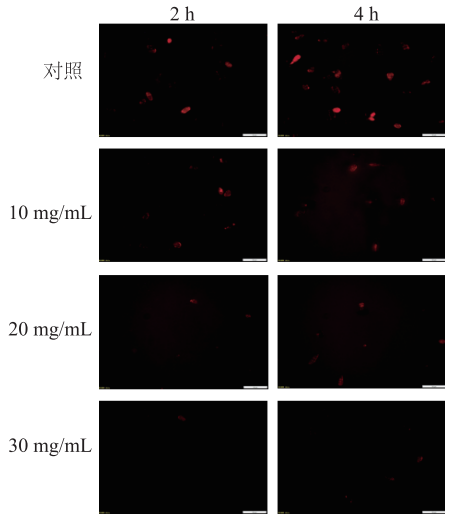
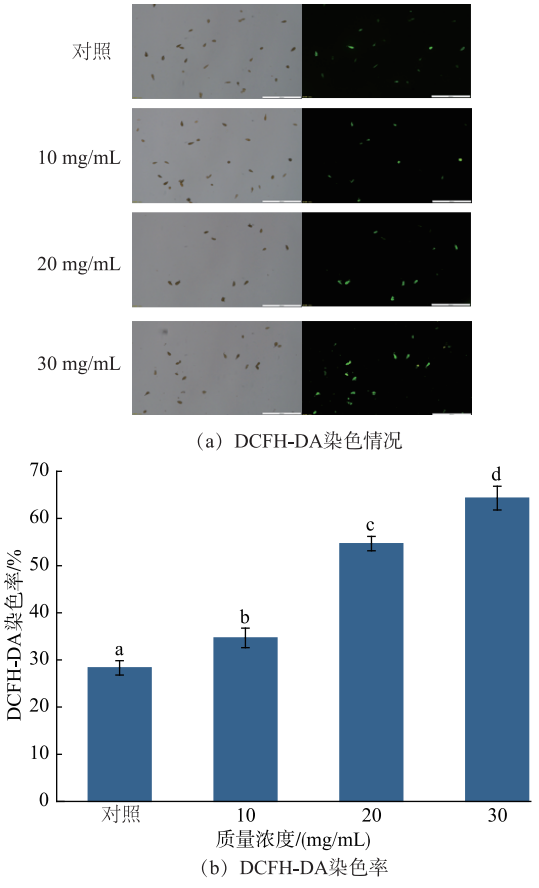


图 10 RLS 处理对线粒体形态的影响

Fig. 10 Effect of RLS treatment on mitochondrial morphology of *A. alternata*

逐渐增大,30 mg/mL RLS 处理的 *A. alternata* 细胞染色率较无菌水处理增加了 55.96%。



(a) DCFH-DA染色情况

(b) DCFH-DA染色率

图 11 RLS 处理后 DCFH–DA 染色情况

Fig. 11 Staining after RLS treatment and DCFH –DA staining percentage

2.5 RLS 对 *A. alternata* 菌丝形态的影响

扫描电镜观察发现未经 RLS 处理的 *A. alternata* 的菌丝粗细均匀、表面光滑,菌丝较为稀疏,而 RLS 处理后部分菌丝变细,且相互缠绕、卷曲,表面凹凸不平,有断裂现象,见图 12。

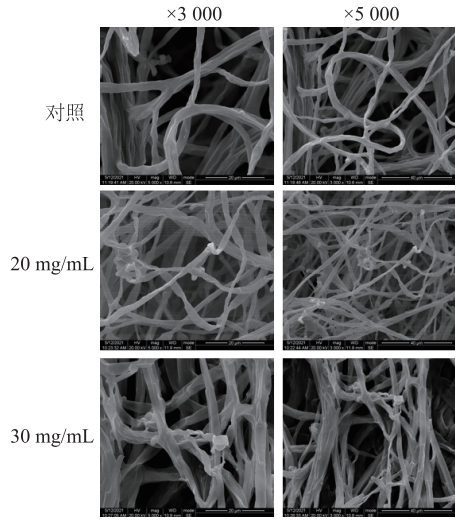


图 12 RLS 处理对菌丝形态的影响

Fig. 12 Effect of RLS treatment on mycelium morphology

2.6 RLS 对 *A. alternata* 孢子显微结构的影响

透射电镜观察发现对照组 *A. alternata* 细胞壁结构均匀连续,胞内隔膜清晰可见,染色质分布均匀,胞浆内可见清晰完整的线粒体和核糖体等细胞器。20 mg/mL RLS 处理的 *A. alternata* 菌体型较小,且胞体内无明显分隔,部分菌体已畸变,呈不规则多边形,但细胞壁和细胞膜结构依旧连续,细胞壁外还附着有一层絮状物,部分 *A. alternata* 胞浆内容物外渗,菌体内部结构模糊不清。30 mg/mL RLS 处理的 *A. alternata* 胞浆内容物丢失严重,多数菌体已接近空泡化,细胞壁结构变薄,细胞膜严重破坏。

3 讨 论

已有报道称鼠李糖脂具有明显的抑菌活性,包括对革兰氏阳性和革兰氏阴性细菌的抗菌作用,但其抑菌浓度在不同菌株中存在较大差异,其对几乎所有的革兰氏阴性菌均有良好的抗菌活性,包括粘质沙雷氏菌、肺炎克雷伯氏菌和产气肠杆菌的最低抑菌浓度(MIC)分别为 4、0.5、8 μg/mL[26],而对革兰氏阳性菌包括枯草芽孢杆菌、表皮葡萄球菌的 MIC 分别高达 16 μg/mL 和 32 μg/mL。Siddhartha 等发现 RLS 对黄色微球菌、金黄色葡萄球菌和蜡样芽孢杆

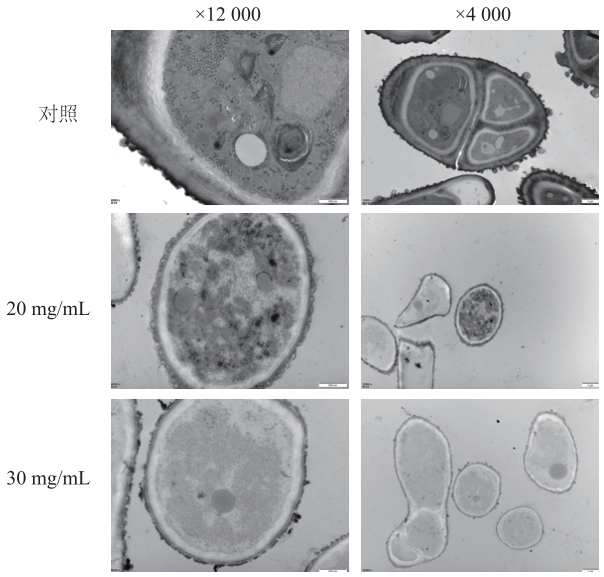


图 13　RLS 处理后对孢子结构的影响

Fig. 13　Effect of RLS treatment on spore structure

菌也具有抗菌活性[27],而对病原真菌辣椒疫霉、黑曲霉、青霉菌、灰霉菌和球毛壳菌,RLS 的 MIC 分别为 10、16、16、18、32 μg/mL[26]。作者发现鼠李糖脂处理能显著抑制 *A. alternata* 的孢子萌发以及菌丝生长,30 mg/mL 的 RLS 处理培养 7 d 时菌落直径仅为对照组 19.22%，表明不同病原物对 RSL 的敏感性存在差异,其具体机理尚需进一步阐明。同时还发现 RSL 能够有效控制梨果黑斑病的扩展,这一结果与 Jiumoni 等在生物防治辣椒炭疽病中的研究结果一致，其发现 500 mg/L 的 RLS 处理可以显著降低辣椒炭疽病的发病率,同时对病原菌也有明显的抑制作用[28]。Borah 等也发现50 mg/L 的 RLS 可以完全抑制由轮状镰刀菌引起的玉米茎腐病和穗腐病[29]。可见 RLS 具有广谱的抑菌活性,但其控制作用因病原物和寄主而异。

细胞膜是保证细胞内环境相对稳定的屏障,大多数抑菌活性物质的靶点为细胞膜。肖鹏飞等发现 0.1 g/L 的 RLS 破坏了细胞质膜的结构并使其裂解,还可通过引起膜活性的改变,干扰微生物正常的摄取同化功能[31]。Stanghellini 等研究发现 30 μg/mL 的 RLS 能使辣椒疫霉病和黄瓜腐霉病孢子在 1 min 内水解完全[32]。本研究中 30 mg/mL 的 RLS 处理严重破坏了 *A. alternata* 细胞膜,改变膜通透性,提高细胞膜电导率,并导致蛋白质、核酸、可溶性糖的渗漏，诱导产生大量活性氧。同样,Yan 等研究发现 RLS 能有效抑制菌丝生长,改变细胞形态,破坏细胞膜磷脂双层结构,显著影响 *A. alternata* 菌丝体的细胞通透性,使上清液电导率增加,大量 DNA 和蛋白质从细胞质中渗出,原生质体收缩,细胞膜和细胞壁发生了改变[33],这与本实验的结果相似。Sotirova 等还发现 RLS 通过破坏微生物细胞膜、减少孢子移动和导致孢子破溃来抑制病原体,从而保护植物宿主免受进一步入侵[34]。鼠李糖脂的分子结构具有亲水性头部和亲脂性尾部,其可能会插入细胞(没有细胞壁)的外膜而直接裂解游动孢子[35]。同时根据膜的脂质成分和浓度的不同,鼠李糖脂也能够透过膜而导致其溶解[36-37]。鼠李糖脂与其他表面活性剂一样也能增溶和降低界面张力，改变细胞表面性质,介入或溶解细胞膜的磷脂层，诱导细胞膜组成和结构变化[38]。另外,作者还发现 RLS 处理会促进 *A. alternata* 胞内活性氧的积累，但 RLS 的具体抑菌机理尚需进一步揭示。

4 结　语

RLS 能显著抑制 *A. alternata* 孢子萌发和菌丝生长,并有效控制梨果黑斑病的扩展,且其作用效果存在浓度依赖性。RLS 处理严重破坏了 *A. alternata* 细胞膜的完整性,提高了膜电导率,增加了细胞膜透性,导致核酸、蛋白质、可溶性糖等细胞内容物外渗,诱导孢子内活性氧的产生与积累,破坏了 *A. alternata* 的形态结构。

参考文献:

[1] 娄汉平,李凤光,吴丽敏. 早酥梨套袋对果实品质的影响[J]. 辽宁农业科学,2006,3(3):78-79.
[2] 刘家琪,程寅胜,张绍铃,等. 早酥梨果实木栓化褐变与矿质营养的关系[J]. 山西果树,2018,182(2):1-4.
[3] 陈大鹏,杨江山,颉敏华,等. 早酥梨果实品质、呼吸速率及乙烯释放的规律研究[J]. 甘肃农业大学学报,2018,53(2):58-63.
[4] 刁春英,毕阳,李永才. 壳聚糖对互隔交链孢菌(*Alternaria alternata*)的离体抑制作用[J]. 中国农学通报,2010,26(10):91-94.
[5] 李永才. 苹果梨(*Pyrus bretchneideri* Rehd.)黑斑病潜伏侵染及其预先合成抗菌物质的变化和诱导[D]. 兰州:甘肃农业大学,

2000.

[6] GATTO M A,IPPOLITO A,LINSALATA V,et al. Activity of extracts from wild edible herbs against postharvest fungal diseases of fruit and vegetables[J]. **Postharvest Biology and Technology**,2011,61(1):72-82.

[7] ABDEL-MAWGOUND A M,LÉPINE F,DÉZIEL E. Rhamnolipids:diversity of structures,microbial origins and roles[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**,2010,86(5):1323-1336.

[8] RIKALOVIC M G,VRVIC M M,KARADZIC I M. Rhamnolipid biosurfactant from *Pseudomonas aeruginosa*-from discovery to application in contemporary technology[J]. **Journal of the Serbian Chemical Society**,2015,80(3):279-304.

[9] HABA E,PINAZO A,JAUREGUI O,et al. Physicochemical characterization and antimicrobial properties of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCBIM 40044[J]. **Biotechnology and Bioengineering**,2003,81(3):316-322.

[10] NAUGHTON P J,MARCHANT R,NAUGHTON V,et al. Microbial biosurfactants:current trends and applications in agricultural and biomedical industries[J]. **Journal of Applied Microbiology**,2019,127(1):13-14.

[11] CROUZET J,ARIAS A A,DHONDT-CORDELIER S,et al. Biosurfactants in plant protection against diseases:rhamnolipids and lipopeptides case study[J]. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**,2020,8:1014-1019.

[12] VARNIER A L,SANCHEZ L,VATSA P,et al. Bacterial rhamnolipids are novel MAMPs conferring resistance to *Botrytis cinerea* in grapevine[J]. **Plant,Cell & Environment**,2009,32(2):178-193.

[13] JONGHE K D,DOBBELAERE I D,SARRAZYN R,et al. Control of Phytophthora cryptogea in the hydroponic forcing of witloof chicory with the rhamnolipid-based biosurfactant formulation PRO1[J]. **Plant Pathology**,2005,54(2):219-226.

[14] 刘菊. 鼠李糖脂对西瓜枯萎病防治作用的研究[D]. 杭州:浙江大学,2012.

[15] YAN F J,HU H,LU L F,et al. Rhamnolipids induce oxidative stress responses in cherry tomato fruit to *Alternaria alternata*[J]. **Pest Management Science**,2016,72(8):1500-1507.

[16] GOSWAMI D,HANDIQUE P J,DEKA S. Rhamnolipid biosurfactant against *Fusarium sacchari*—the causal organism of pokkah boeng disease of sugarcane[J]. **Journal of Basic Microbiology**,2014,54(6):548-557.

[17] 高春丽,李永才,毕阳,等. 采后亚硒酸钠处理对杏果黑斑病的控制及贮藏品质的影响[J]. 食品科学,2016,37(14):258-263.

[18] 岑春艺,黄正学,李善登,等. 西番莲提取物对三七炭疽病菌和黑斑病菌的抑制作用[J]. 湖北农业科学,2016,55(4):912-915.

[19] MOSCOSO-RAMOREZ P A,MONTESINOS-HERRERO C,LLUÍS P. Characterization of postharvest treatments with sodium methylparaben to control citrus green and blue molds[J]. **Postharvest Biology & Technology**,2013,77(2):128-137.

[20] 董玉鹏,孙萍,李永才,等. 反式 -2- 己烯醛对梨果黑斑病菌 *Alternaria alternata* 的抑菌作用及其机理[J]. 食品科学,2020,41(7):191-197.

[21] 刘志恬,董玉鹏,李永才,等. ε- 聚赖氨酸对梨果黑斑病菌 *Alternaria alternata* 的抑制作用及其机理[J]. 食品科学,2021,42(11):213-220.

[22] SHI X Q,LI B Q,QIN G Z,et al. Mechanism of antifungal action of borate against *Colletotrichum gloeosporioides* related to mitochondrial degradation in spores[J]. **Postharvest Biology and Technology**,2012,67:138-143.

[23] CARSON C F,MEE B J,RILEY T V. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill,lysis,leakage,and salt tolerance assays and electron microscopy[J]. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**,2002,46(6):1914-1920.

[24] DUBOIS M,GILLES K A,HAMILTON J K,et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances[J]. **Analytical Chemistry**,1956,28(3):350-356.

[25] 刘佳怡,王嘉欣,宋海超,等. 纳他霉素对芒果采后胶孢炭疽菌的抑菌效果及机理[J]. 植物学报,2019,54(4):455-463.

[26] CHEN J W,WU Q ,HUA Y ,et al. Potential applications of biosurfactant rhamnolipids in agriculture and biomedicine[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**,2017,101(23):8309-8319.

[27] SIDDHARTHA G.V.A.O C,NITSCHKE M ,LEPINE F ,et al. Structure,properties and applications of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* L2-1 from cassava wastewater[J]. **Process Biochemistry**,2010,45(9):1511-1516.

[28] LAHKAR J ,GOSWAMI D ,DEKA S ,et al. Novel approaches for application of biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* for biocontrol of *Colletotrichum capsici* responsible for anthracnose disease in chilli[J]. **European Journal of Plant Pathology**,2018,150(1):57-71.

[29] BORAH S N,GOSWAMI D,SARMA H K,et al. Rhamnolipid biosurfactant against *Fusarium verticillioides* to control stalk and ear rot disease of maize[J]. **Frontiers in Microbiology**, 2016,7:1505.

[30] SHA R,JIANG L,MENG Q,et al. Producing cell-free culture broth of rhamnolipids as a cost-effective fungicide against plant pathogens[J]. **Journal of Basic Microbiology**,2012,52(4):458-466.

[31] 肖鹏飞,尤铁学,宋玉珍,等. 生物表面活性剂鼠李糖脂对白腐真菌降解 DDTs 的影响[J]. 环境科学与技术,2014,37(2):29-33.

[32] STANGHELLINNI M E. Control of root rot of peppers caused by *Phytophthora capsici* with a nonionic surfactant[J]. **Plant Disease**,1996,80(10):1113.

[33] YAN F J,XU S X,GUO J,et al. Biocontrol of post-harvest *Alternaria alternata* decay of cherry tomatoes with rhamnolipids and possible mechanisms of action[J]. **Journal of the Science of Food and Agriculture**,2015,95(7):1469-1474.

[34] SOTIROVA A,AVRAMOVA T,STOITSOVA S,et al. The importance of rhamnolipid-biosurfactant-induced changes in bacterial membrane lipids of *Bacillus subtilis* for the antimicrobial activity of thiosulfonates[J]. **Current Microbiology**,2012,65(5):534-541.

[35] STANGHELLINI M E,MILLER R M. Biosurfactants:their identity and potential efficacy in the biological control of Zoosporic plant pathogens[J]. **Plant Disease**,1997,81(1):4-12.

[36] SÁNCHEZ M,ARANDA F J,TERUEL J A,et al. Permeabilization of biological and artificial membranes by a bacterial dirhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa*[J]. **Journal of Colloid and Interface Science**,2010,341(2):240-247.

[37] ARANDA F J,ESPUNY M J,MARQUÉS A,et al. Thermodynamics of the interaction of a dirhamnolipid biosurfactant secreted by *Pseudomonas aeruginosa* with phospholipid membranes[J]. **Langmuir:the ACS Journal of Surfaces and Colloids**,2007,23(5):2700-2705.

[38] 张栋. 表面活性剂对 PAHs 微生物界面行为的影响及调控机制[D]. 杭州:浙江大学,2013.