

马克斯克鲁维酵母对柑橘采后绿霉病的抑制效果

耿鹏 陈少华 胡美英 瞿菲 张彦博 安国栋

华南农业大学天然农药与化学生物学教育部重点实验室, 广州 510642

摘要 通过活体(*in vivo*)和离体(*in vitro*)试验,研究拮抗酵母菌株 *Kluyveromyces marxianus* 与不同浓度钼酸铵混合使用对柑橘采后绿霉病(*Penicillium digitatum*)的防治效果,以及钼酸铵对 *K. marxianus* 菌株生长和繁殖的影响。结果表明:不同浓度的钼酸铵对 *K. marxianus* 的生长和繁殖没有不利影响;钼酸铵对酵母菌在柑橘果实伤口处的生长和繁殖有刺激作用;当 *K. marxianus* 与浓度为 1 mmol/L 钼酸铵混合使用时对控制柑橘果实绿霉病的效果最好,3 和 6 d 的发病率分别为 28.33% 和 60.00%,显著低于对照处理的 93.33% 和 100% 的发病率,表明 *K. marxianus* 与钼酸铵混合使用在控制柑橘绿霉病方面具有潜在的应用价值。

关键词 拮抗酵母菌; 绿霉病; 生防效果; 采后病害; 钼酸铵; 柑橘

中图分类号 S 436.33; S 482.2 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2011)06-0712-05

我国是世界柑橘生产大国,种植面积达 150 万 hm^2 。柑橘采后极易受到青霉菌(*Penicillium* spp.)侵害而引起腐烂,一般烂果率为 10%~30%,严重时可达 60%以上,特别是因柑橘青霉菌和绿霉菌引起的果实腐烂一般占腐烂率的 70%~80%^[1]。长期以来,控制柑橘采后病害的主要措施是使用化学杀菌剂如抑霉唑、噻苯咪唑、二甲嘧菌胺、咯菌腈等^[2-3]。虽然化学杀菌剂效价高、效果稳定,但长期使用化学杀菌剂会造成环境污染;此外,长期使用单一种类的杀菌剂会导致病原菌抗药性的产生,从而大大降低其防治效果^[4-5]。因此,寻求安全、无毒、有效的控制柑橘采后腐烂的方法成为具有重大经济和社会意义的科研命题。

生物防治是近年来被证明卓有成效的控制果蔬采后病害的新途径^[6-7]。拮抗微生物是一种重要的生防因子,它主要是利用微生物之间的拮抗作用,选择对环境和人体健康不造成危害的微生物来抑制果蔬采后病原菌的生长^[8-9],尤其是拮抗酵母菌,由于具有拮抗效果好、不产生毒素、可以和化学杀菌剂混用等优点而成为采后病害生物防治研究的热点^[10]。然而,研究表明,拮抗酵母菌只有在较高浓度时才能有效地控制果蔬采后病原菌的侵染^[11-13],而且单独

使用一种酵母菌来防治各种病害效果往往不如化学杀菌剂显著^[14]。因此,人们在寻找高效拮抗酵母菌的同时,也在不断寻找能够提高拮抗菌生防活性的方法。

目前,已报道的能够显著提高拮抗酵母菌生物防治活性的外源物质主要包括碳酸盐类(NaHCO_3 等)^[12]、金属盐类(CaCl_2 等)^[15]、植物激素(赤霉素等)^[16]等。笔者从木瓜表面筛选到 1 株对柑橘绿霉病具有较好生防效果的拮抗酵母菌,经鉴定为马克斯克鲁维酵母(*Kluyveromyces marxianus*),通过活体试验(*in vivo*)和离体试验(*in vitro*)分析钼酸铵(NH_4Mo)对 *K. marxianus* 拮抗 *P. digitatum* 的效果和对该酵母菌生长动态的影响,旨在为开展柑橘采后病害生物防治技术的研究提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1)供试果实。供试柑橘果实为四会沙糖桔,采用外观整齐、大小一致、无病虫害、无机械损伤的果实,所有水果均未经过采后处理。受试果实运到实验室后立即进行处理,2%次氯酸钠溶液消毒 2 min,

收稿日期: 2011-03-22

基金项目: 国家自然科学基金项目(30871660)和广东省科技计划项目(2008B020900007)

耿鹏,硕士研究生,研究方向: 天然源农药研究, E-mail: gengpeng5186@163.com

通讯作者: 胡美英,教授,研究方向: 天然源农药、农药残留与环境保护、昆虫生理毒理, E-mail: humy@scau.edu.cn

用自来水冲洗、晾干后待用。

2) 试剂及培养基。钼酸铵购自天津市化学试剂四厂, 分析纯。NYDA 培养基: 牛肉膏 8 g, 酵母浸膏 5 g, 葡萄糖 10 g, 琼脂 20 g, 水 1 000 mL, 121 ℃ 高压灭菌 20 min, 待用。NYDB 培养基: NYDA 培养基不加琼脂。PDA 培养基: 200 g 去皮马铃薯加水煮 30 min 后过滤, 滤液中加入 20 g 葡萄糖和 20 g 琼脂, 用蒸馏水定容至 1 000 mL, 121 ℃ 高压灭菌 20 min, 待用。

3) 拮抗酵母菌。拮抗酵母菌株 HP-10 分离于华南农业大学园艺果园, 经鉴定为马克斯克鲁维酵母, 将拮抗酵母菌 *K. marxianus* 菌株活化后接入含有 50 mL NYDB 的三角瓶中, 置于恒温摇床上振荡培养 (26 ℃、120 r/min) 48 h。得到的发酵液在 8 000 r/min 下离心 20 min, 收集菌体, 用无菌水洗涤酵母菌体, 将其制成酵母菌悬浮液, 血球计数板计数, 用无菌水或不同浓度的 NH_4Mo 溶液调整浓度为 1×10^8 cfu/mL, 待用。

4) 病原菌。柑橘绿霉病菌 (*Penicillium digitatum*) 分离于自然发病的柑橘果实。在马铃薯葡萄糖琼脂培养基 (PDA) 上培养 7~14 d, 用含有 0.05% 的 Tween-80 无菌水配成孢子悬浮液, 用血球计数板配制成浓度为 5×10^4 个/mL 的孢子悬浮液。

1.2 试验方法

1) NH_4Mo 在离体条件下对酵母菌生长动态的影响。参照 Cao 等^[12] 的方法, 采用摇床培养试验研究不同浓度 NH_4Mo (浓度为 0、1、2、5、10 mmol/L) 对拮抗酵母菌 *K. marxianus* 在液体培养基上生长的影响。将灭菌处理的各个处理液加入到含有 50 mL NYDB 培养基的 250 mL 三角瓶中, 使其达到最终浓度, 然后加入 *K. marxianus* 使酵母菌起始浓度为 1×10^5 cfu/mL。25 ℃, 200 r/min 的转速振荡培养, 0、24、48、72 和 96 h 分别取样, 在 NYDA 上用稀释平板法测定酵母拮抗菌的数目。每个处理设置 3 个重复, 整个试验重复 2 次, 结果以每毫升总酵母数量为单位 (log cfu/mL)。

2) 不同浓度的 NH_4Mo 与拮抗菌混合使用对柑橘绿霉病的防治效果。参照 Janisiewicz 等^[13] 的方法, 用消毒处理的接种针在柑橘的赤道部位刺 1 个 4 mm (深) $\times$ 3 mm (宽) 的伤口, 伤口晾干后, 接种 30 μL 不同处理液, 处理液分别为: ① 2 mmol/L NH_4Mo ; ② 1×10^8 cfu/mL *K. marxianus* 细胞悬

浮液; ③ 1 mmol/L $\text{NH}_4\text{Mo} + 1 \times 10^8$ cfu/mL *K. marxianus* 细胞悬浮液; ④ 2 mmol/L $\text{NH}_4\text{Mo} + 1 \times 10^8$ cfu/mL *K. marxianus* 细胞悬浮液; ⑤ 5 mmol/L $\text{NH}_4\text{Mo} + 1 \times 10^8$ cfu/mL *K. marxianus* 细胞悬浮液; ⑥ 10 mmol/L $\text{NH}_4\text{Mo} + 1 \times 10^8$ cfu/mL *K. marxianus* 细胞悬浮液; ⑦ CK: 无菌水。4 h 后, 各处理分别接入 15 μL 浓度为 5×10^4 个/mL 的柑橘绿霉病原菌孢子悬浮液, 果实晾干后 25 ℃ 下贮藏, 并保持 95% 左右的湿度, 分别于 3 和 6 d 统计绿霉病的发病率及病斑直径。每处理 30 个果实, 试验重复 3 次。

3) NH_4Mo 对拮抗酵母菌 *K. marxianus* 在果实伤口生长动态的影响。通过本文 “1.2 2)” 步骤获得提高 *K. marxianus* 生防效果的最佳 NH_4Mo 溶液浓度, 采用血球计数法研究该浓度下 NH_4Mo 溶液对 *K. marxianus* 在柑橘果实伤口处生长动态的影响。参照 Janisiewicz 等^[13] 的方法, 每个处理选取 20 个果实, 用灭菌接种针在果实腰部刺 1 个伤口 (5 mm $\times$ 5 mm), 接种 20 μL 用无菌水或 NH_4Mo 溶液配制的 10^6 cfu/mL 的 *K. marxianus* 悬浮液。果实处理后不同时间 (0、24、48、72 和 96 h) 取样测定拮抗菌的生长动态, 用灭菌处理的打孔器将果实伤口处组织取出, 放在预先加有 5 mL 无菌水的研钵中, 研磨后用稀释平板法测定酵母菌细胞数量, 每个处理重复 3 次, 整个试验重复 2 次, 结果以每毫升总酵母数量为单位 (log cfu/mL)。

4) 数据分析。采用 SAS 软件 (Version 8.01, SAS Institute Inc., Cary, NC) 进行数据统计, 试验结果用邓肯氏新复极差多重比较法 (Duncan's multiple range test, DMRT) 进行差异显著性分析 ($P < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 NH_4Mo 在离体条件下对 *K. marxianus* 生长动态的影响

在 NYDB 培养基中, 不同浓度的 NH_4Mo 对 *K. marxianus* 生长动态的影响见图 1。

从图 1 中可以看出, 在 NYDB 培养基中, 浓度为 1、2 mmol/L 的 NH_4Mo 对 *K. marxianus* 生长和繁殖没有明显的抑制作用, 当 NH_4Mo 浓度分别为 5、10 mmol/L 时, *K. marxianus* 生长和繁殖受到显著抑制。

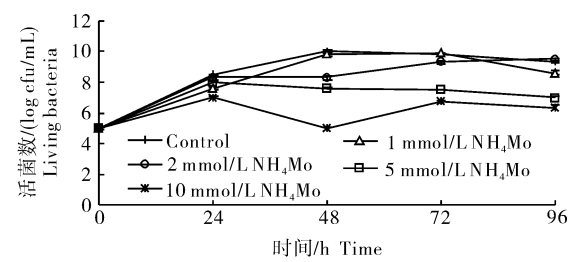


图 1 NH_4Mo 对 *K. marxianus* 在 NYDB 中生长的影响

Fig. 1 Effect of NH_4Mo at various concentrations on yeast growth and proliferation in NYDB

2.2 不同浓度的 NH_4Mo 与 *K.marxianus* 混合使用对柑橘绿霉病的防治效果

将 NH_4Mo 与 *K. marxianus* 结合起来处理柑橘果实,结果见表 1。清水对照组 3 和 6 d 的发病率

为 93.33%和 100.00%,病斑直径为 27.89 和 63.13 mm;单独使用 *K. marxianus* ,3 和 6 d 的发病率为 58.33%和 81.67%,病斑直径为 10.88 和 30.42 mm;浓度为 1 mmol/L 的 NH_4Mo 与 *K. marxianus* 结合使用生防效果最好,柑橘果实 3 和 6 d 的发病率分别为 28.33%和 60.00%,病斑直径为 4.20 和 17.31 mm。

由表 1 可知,单独使用 NH_4Mo 并不能有效防止柑橘绿霉病的发生,但当 *K. marxianus* 与不同浓度的 NH_4Mo 混配时均能够显著地降低绿霉病的发病率($P<0.05$),1 mmol/L 的 NH_4Mo 溶液能显著增加 *K. marxianus* 对柑橘绿霉病的生防效果。

表 1 NH_4Mo 与 *K. marxianus* 混合使用对柑橘绿霉病的防治效果¹⁾

Table 1 Effect of NH_4Mo on biocontrol activity of *K. marxianus* against green mold

处理 Treatment	3 d 防效 Control effect of 3 days		6 d 防效 Control effect of 6 days	
	发病率/%	病斑直径/mm	发病率/%	病斑直径/mm
	Disease incidence	Lesion diameter	Disease incidence	Lesion diameter
A	93.33±0.06 a	27.89±1.69 b	100.00±0.00 a	63.13±3.36 a
B	100.00±0.00 a	32.56±1.37 a	100.00±0.00 a	61.11±3.28 a
C	58.33±0.03 b	10.88±0.45 c	81.67±0.03 c	30.42±2.52 b
D	28.33±0.06 c	4.20±1.60 d	60.00±0.05 d	17.31±0.93 d
E	33.33±0.15 c	5.23±1.23 d	76.67±0.06 c	26.56±3.21 c
F	66.67±0.03 b	13.42±0.33 c	91.67±0.03 b	34.14±3.64 b
G	70.00±0.09 b	12.41±3.11 c	93.33±0.03 b	31.74±3.18 b

1) A:清水对照 CK; B:2 mmol/L NH_4Mo ; C:*K. marxianus* (1×10^8 cfu/mL); D: *K. marxianus* +1 mmol/L NH_4Mo ; E: *K. marxianus* +2 mmol/L NH_4Mo ; F: *K. marxianus* +5 mmol/L NH_4Mo ; G: *K. marxianus* +10 mmol/L NH_4Mo ;同一栏不同字母表示具有显著性差异($P<0.05$) Values followed by the different letter differ at $P<0.05$.

2.3 NH_4Mo 对拮抗酵母菌 *K.marxianus* 在果实伤口生长动态的影响

将 *K. marxianus* 与 1 mmol/L NH_4Mo 溶液混合后接种于柑橘果实伤口,观察其在柑橘伤口的生长动态,结果见图 2。拮抗酵母菌 *K. marxianus* 接种到柑橘伤口后迅速繁殖,0~48 h 时,1 mmol/L

NH_4Mo 对 *K. marxianus* 的生长没有明显的影响作用,而 48~96 h 时,1 mmol/L NH_4Mo 对 *K. marxianus*在柑橘伤口处的生长有明显的促进作用。混合处理 96 h 时,*K. marxianus* 数量为 1.2×10^9 cfu/mL,单独接种 *K. marxianus* 菌落数为 9.9×10^7 cfu/mL。

3 讨 论

目前,将拮抗酵母菌用于果蔬采后病害的生物防治已有大量报道。拮抗酵母菌生防机理非常复杂,研究者普遍认可的机理主要包括营养或空间的竞争、酵母菌对病原菌的直接寄生作用、影响寄主抗性^[17-19],酵母菌的生防效力与其浓度存在直接的相关性,浓度越高,生防效果越好;另一方面,单独使用拮抗酵母菌生防效果不如化学杀菌剂显著^[13],而将酵母菌与其他外源物质混配提高其防治效果成为

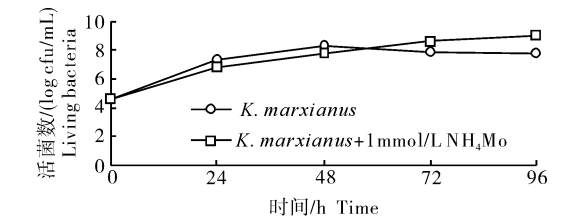


图 2 1 mmol/L NH_4Mo 对拮抗酵母菌 *K. marxianus* 在果实伤口生长动态的影响

Fig. 2 Effect of NH_4Mo (1 mmol/L) on population dynamics of *K. marxianus* in wounds of citrus fruit

近期国内外研究的热点。

已报道的毒力试验表明, NH_4Mo 对人体健康不存在潜在威胁, 且对环境友好^[20]。笔者通过将不同浓度 NH_4Mo 与 *K. marxianus* 混配, 研究其对拮抗酵母菌生防效力的改良, 进一步验证 NH_4Mo 在控制果蔬采后病害方面所发挥的重要作用。试验结果表明, NH_4Mo 可以提高拮抗酵母菌 *K. marxianus* 对柑橘绿霉病的防治效果, 当 NH_4Mo 浓度为 1 mmol/L 时, 其增效作用最为明显。同时, 本试验研究了 NH_4Mo 对 *K. marxianus* 在果实伤口生长动态的影响, 表明 NH_4Mo 能刺激 *K. marxianus* 在果实伤口处的大量繁殖, 这可能是拮抗菌生防效果提高的原因之一。

NH_4Mo 与 *K. marxianus* 混配处理柑橘采后病害是一种安全有效的生物防治新途径, 与其他科研工作者的研究结果基本吻合, 如 Wan 等^[20] 的研究表明 NH_4Mo 能够提高罗伦隐球酵母 (*Cryptococcus laurentii*) 生防效力; Nunes 等^[21] 研究了 NH_4Mo 与清酒假丝酵母 (*Candida sake*) 混配对梨果采后病害腐烂的防治效果。

总之, 新型拮抗酵母菌 *K. marxianus* 可通过与 NH_4Mo 的混配进一步提高其生物防治效果, 是一株很有前途的生物防治拮抗菌, 而关于拮抗菌与 NH_4Mo 配合的协同抑病机理有待于进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 吕庆, 徐志德, 夏金初. 柑桔贮藏期病害及药剂防腐保鲜技术研究[J]. 湖南农业科学, 2000(4): 44-45.
- [2] SMILANICK J I, MANSOUR M F, MARGOSAN D A, et al. Influence of pH and NaHCO_3 on effectiveness of imazalil to inhibit germination of *Penicillium digitatum* and to control postharvest green mold on citrus fruit[J]. Plant Disease, 2005, 89: 640-648.
- [3] ISMAIL M, ZHANG J. Post-harvest citrus diseases and their control[J]. Outlooks Pest Manage, 2004, 15: 29-35.
- [4] DROBY S. Improving quality and safety of fresh fruits and vegetables after harvest by the use of biocontrol agents and natural materials[J]. Acta Horticulture, 2006, 709: 45-51.
- [5] HOLMES G J, ECKERT J M. Sensitivity of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* to postharvest citrus fungicides in fungicides in California[J]. Phytopathol, 1999, 89: 716-721.
- [6] FILONOW A B. Buty acetate and yeasts interact in adhesion and germination of *Botrytis cinerea* in vitro and in fungal decay of Golden Delicious apple[J]. Journal of Chemical Ecology, 2001, 27: 831-844.
- [7] 冯岩, 杨静美, 王晓容, 等. 韭菜和葱汁液对香蕉枯萎病菌的抑制作用[J]. 华中农业大学学报, 2010, 29(3): 292-294.
- [8] IPPOLITO F, NIGRO F. Impact of preharvest application of biological control agents on postharvest diseases of fresh fruits and vegetables[J]. Crop Protection, 2000, 19: 715-723.
- [9] 范青, 田世平, 徐勇, 等. 丝孢酵母 (*Trichosporon* sp.) 的不同处理和接种时间对苹果采后灰霉病和青霉病抑制效果的影响[J]. 中国农业科学, 2001, 34(2): 163-168.
- [10] 张红印, 蒋益虹, 郑晓东, 等. 酵母菌对果蔬采后病害防治的研究进展[J]. 农业工程学报, 2003, 19(4): 23-27.
- [11] FAN Q, TIAN S P. Postharvest biological control of grey mold and blue mold on apple by *Cryptococcus albidus* (Sait) Skinner[J]. Postharvest Biology and Technology, 2001, 21: 341-350.
- [12] CAO S F, YUAN Y J, HU Z C, et al. Combination of *Pichia membranifaciens* and ammonium molybdate for controlling blue mould caused by *Penicillium expansum* in peach fruit[J]. International Journal of Food Microbiology, 2010, 141: 173-176.
- [13] JANISIEWICZ W J, SAFTNER R A, CONWAY W S, et al. Control of blue mold decay of apple during commercial controlled atmosphere storage with yeast antagonists and sodium bicarbonate[J]. Postharvest Biology and Technology, 2008, 49: 374-378.
- [14] CHAND-GOYAL T, SPOTTS R A. Control of postharvest pear diseases using natural saprophytic yeast colonists and their combination with a low dosage of thiabendazole[J]. Postharvest Biology and Technology, 1996, 7: 51-64.
- [15] 孙萍, 郑晓东, 张红印, 等. 粘红酵母与金属离子结合使用对柑橘采后青霉病的抑制效果[J]. 果树学报, 2003, 20(2): 169-172.
- [16] YU T, CHEN J, CHEN R, et al. Biocontrol of blue and gray mold diseases of pear fruit by integration of antagonistic yeast with salicylic acid[J]. International Journal of Food Microbiology, 2007, 116(3): 339-345.
- [17] CAO S F, ZHENG Y H, WANG K T, et al. Effect of yeast antagonist in combination with methyl jasmonate treatment on postharvest anthracnose rot of loquat fruit[J]. Biological Control, 2009, 50(1): 73-77.
- [18] CASTORIA R, DE-CURTIS F, LIMA G, et al. *Aureobasidium pullulans* (LS-20) an antagonist of postharvest pathogens of fruits: study on its mode of action[J]. Postharvest Biology and Technology, 2001, 22: 7-17.
- [19] DROBY S, VINOLUR V, WEISS B. Induction of resistance to *Penicillium digitatum* in grape fruit by the yeast biocontrol agent *Candida oleophila*[J]. Phytopathology, 2002, 92(4): 393-399.
- [20] WAN Y K, TIAN S P. Integrated control of postharvest diseases of pear fruits using antagonistic yeasts in combination with ammonium molybdate[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2005, 85: 2605-2610.

[21] NUNES C, USALL J, TEIXIDO N, et al. Improvement of *Candida sake* biocontrol activity against post-harvest decay by addition of ammonium molybdate[J]. Journal of Applied Microbiology, 2002, 92: 927-935.

Combination of *Kluyveromyces marxianus* and ammonium molybdate for control of green mold caused by *Penicillium digitatum* on citrus fruits

GENG Peng CHEN Shao-hua HU Mei-ying QU Fei ZHANG Yan-bo AN Guo-dong

Key Laboratory of Natural Pesticide and Chemical biology, Ministry of Education, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China

Abstract With the methods of *in vivo* and *in vitro*, the potential enhancement of *Kluyveromyces marxianus* by ammonium molybdate (NH₄Mo) to control green mold caused by *Penicillium digitatum* on citrus fruit was investigated. Meanwhile, the effect of NH₄Mo on growth and proliferation of *K. marxianus* was tested. The results showed that NH₄Mo at different concentration did not inhibit the growth and proliferation of *K. marxianus* in culture medium or wounds of citrus fruits. The combination of *K. marxianus* and NH₄Mo had suppressive effect on green mold caused by *P. digitatum*. Treatment of citrus fruits with *K. marxianus* plus NH₄Mo (1 mmol/L) resulted in a consistent biocontrol activity, the disease incidence after 3 and 6 days were 28.33% and 60.00%, respectively. While the control treatment resulted in a disease incidence as high as 93.33% and 100%, suggesting that the combination of *K. marxianus* with NH₄Mo may have great potential against green mold of citrus fruits.

Key words *Kluyveromyces marxianus*; *Penicillium digitatum*; biocontrol efficacy; postharvest diseases; ammonium molybdate; citrus fruits

(责任编辑:陆文昌)