

野生山楂上苹果病害生防酵母菌的筛选

郭萍萍¹, 宗兆锋¹, 李同兴², 刘新颖¹, 张 蒙¹, 何其瑞¹

(1 西北农林科技大学 植保学院 陕西省农业分子生物学重点实验室, 陕西 杨凌 712100;

2 山东省烟台龙大食品有限公司, 山东 莱阳 265213)

【摘 要】 【目的】从野生山楂表面分离获得能有效防治苹果病害的生防酵母菌株, 探讨分离筛选生防酵母菌的新途径。【方法】利用活体筛选法选择有效菌株, 研究不同接种体浓度、接种间隔和贮藏温度对酵母菌株抑菌防病作用的影响, 确定生防酵母菌对粉红聚端孢 *Trichothecium roseum*、灰葡萄孢 *Botrytis cinerea* 和胶孢炭疽菌 *Colletotrichum gloeosporioides* 3种靶标真菌的最适抑制条件。【结果】分离获得了4株对苹果病害防治效果较好的生防酵母菌株 S3、A14、A2 和 T1, 将4株生防酵母菌提前24 h接种, 接种体浓度为 10^8 cfu/mL, 在4℃冷藏条件下对3种靶标真菌的抑制效果最好, 均可以达到100%。【结论】从野生山楂果实上分离对苹果病害防治有效的生防酵母菌是可行的, 在冷藏条件下综合应用生防酵母菌是提高防病效果的有效途径。

【关键词】 野生山楂; 生防酵母菌; 苹果采后病害; 生物防治

【中图分类号】 S482.2⁺92; S436.611.1⁺1 【文献标识码】 A 【文章编号】 1671-9387(2008)06-0175-05

Screening of antagonistic yeasts from hawthorn fruits to control postharvest diseases of apple

GUO Ping-ping¹, ZONG Zhao-feng¹, LI Tong-xing², LIU Xin-ying¹,
ZHANG Meng¹, HE Qi-rui¹

(1 College of Plant Protection and Shaanxi Key Laboratory of Molecular Biology for Agriculture, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China; 2 Longda Foodstuff Group Limited Company, Laiyang, Shandong 265213, China)

Abstract: 【Objective】 The hawthorn fruits were selected to isolate more effective antagonistic yeasts against apple diseases and create new approaches to screen the antagonistic yeast. 【Method】 The optimum inhibiting parameters of antagonistic yeasts to three target pathogens, *Trichothecium roseum*, *Botrytis cinerea* and *Colletotrichum gloeosporioides* were determined with healthy apple fruits, in different inoculum concentration of yeast strains, challenge inoculation interval with target pathogens and different storage temperature of tested fruits. 【Result】 Four effective antagonistic yeasts, S3, A14, A2 and T1, were screened. The excellent effects of four strains controlling apple diseases caused by three target pathogens could be observed at 10^8 cfu/mL yeasts inoculation concentration, preinoculation of 24 h and at 4℃ storage condition. 【Conclusion】 Apparently, efficient antagonistic yeasts could be isolated from the surface of healthy hawthorn fruits and the control efficiency to the diseases could be improved through application of antagonistic yeast in cold storage.

Key words: Hawthorn fruit; antagonistic yeast; postharvest diseases; biological control

* [收稿日期] 2007-07-03

[基金项目] 教育部创新团队发展计划项目(200558); 国家高等学校学科创新引智计划项目(B07049); 西北农林科技大学创新团队项目

[作者简介] 郭萍萍(1980—), 女, 内蒙古霍林河人, 在读硕士, 主要从事植物病害生物防治研究。E-mail: ltx03@sohu.com

[通讯作者] 宗兆锋(1956—), 男, 陕西泾阳人, 教授, 主要从事植物病害生物防治研究。E-mail: zfzong@nwsuaf.edu.cn

由多种病原菌引起的苹果病害,在我国大部分苹果产区均有发生,果实黑点病^[1]是伴随苹果套袋技术的应用而出现的一种新病害,直接影响着果品质量,给苹果生产造成了很大影响。目前,控制苹果病害的主要手段是化学杀菌剂处理,但由于农药残留对人类健康的影响及病原菌对化学杀菌剂产生的抗药性,迫切需要研究高效无公害的生防产品以减少化学杀菌剂的使用。在众多有关水果生防菌筛选的研究中^[2-10],多采用直接从果实表面分离拮抗菌进行生物防治。为了扩大生防酵母菌的来源,本研究采集秦岭山区野生山楂,从其果实上分离筛选有效的酵母菌株,并研究了不同接种体浓度、接种时间和培养温度对酵母菌株抑菌防病作用的影响,以期为深入开展水果病害的生防研究及野生菌株的人工改良提供广谱有效的菌株,并为苹果黑点病和贮藏期灰霉病及炭疽病的有效控制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 供试菌株

试验所用的3种靶标真菌分别为粉红聚端孢(*Trichothecium roseum*)、灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*)和胶孢炭疽菌(*Colletotrichum gloeosporioides*),均由西北农林科技大学植物保护学院植物病害生防实验室提供。

1.2 酵母菌的分离

从秦岭山区采集生长健壮、无病虫的野生山楂果实,浸泡在无菌的Ringer溶液中振荡30 min,收集洗液备用。

采集成熟健康的红富士苹果,用质量分数0.1%的NaClO进行表面消毒,清水漂洗后自然风干,于苹果赤道上打3个直径5 mm的小孔,每孔注入20 μ L收集到的野生山楂洗液,24 h后接入靶标真菌孢子悬浮液(10^6 cfu/mL),25 $^{\circ}$ C下保湿培养7 d,从未发病的小孔中获取果肉,用营养酵母(NYDA)培养基分离^[11]酵母菌,经镜检观察后归类保存。

1.3 酵母菌的筛选

取分离获得的酵母菌株用NYDA培养液发酵2~3 d。在表面消毒后的苹果赤道上打3个小孔,每孔注入20 μ L待测酵母菌发酵液(10^8 cfu/mL),室温下培养24 h后接入靶标真菌(10^6 cfu/mL)10 μ L,对照为靶标真菌孢子悬浮液(10^6 cfu/mL),每处理6个苹果,重复3次,于25 $^{\circ}$ C下保湿培养,7 d后统计发病率,测量病斑直径,根据抑制率筛选酵母菌株。

抑制率的计算公式为:

抑制率/%=(对照组病斑直径-处理组病斑直径)/对照组病斑直径 $\times$ 100%。

1.4 入选酵母菌的抑菌效果分析

1.4.1 菌株浓度对抑菌效果的影响 在表面消毒的供试苹果赤道上打直径5 mm的小孔,分别以 10^7 , 10^8 和 10^9 cfu/mL的菌液浓度接种入选酵母菌株发酵液,24 h后分别用3种靶标真菌(10^6 cfu/mL)进行挑战接种,以3种靶标真菌孢子悬浮液(10^6 cfu/mL)为对照,接种7 d后测定不同接种体浓度下的抑菌效果。

1.4.2 培养温度对抑菌效果的影响 为了了解常温及冷藏条件下入选酵母菌的抑菌作用,于苹果表面小孔内提前24 h接种入选菌株发酵液 10^8 cfu/mL,再用3种靶标真菌孢子悬浮液(10^6 cfu/mL)分别进行挑战接种,以3种靶标真菌孢子悬浮液(10^6 cfu/mL)为对照,分别置4 $^{\circ}$ C下培养30 d,25 $^{\circ}$ C下培养7 d后观察发病情况,测量病斑直径,计算防治效果,每处理6个苹果,重复3次^[12]。

1.4.3 挑战接种时间对抑菌效果的影响 为了测定不同接种间隔期对抑菌作用的影响,于苹果表面小孔中接种入选菌株发酵液 10^8 cfu/mL后,分别于0, 24, 48 h后挑战接种靶标真菌,每处理6个苹果,重复3次,于25 $^{\circ}$ C条件下保湿培养,7 d后测量病斑直径,统计发病率。

2 结果与分析

2.1 酵母菌的分离

接种靶标真菌7 d后,由未发病的伤口处共分离获得11株酵母菌,在NYDA培养基上的菌落形态各不相同(表1),显微观察发现这些菌株的孢子形态各异,繁殖方式均为芽殖。

2.2 生防酵母菌的筛选

为了测定分离所得的11个酵母菌株的活体抑菌作用,分别用3种靶标真菌进行了生防效果测定,结果(表2)发现,11个菌株对3种靶标真菌均有不同程度的抑制作用,其中对3种致病真菌的抑制率均超过50%的有5株,对其中2种致病菌的抑制率均超过50%的有8株,占分离获得菌株数的73%;11个菌株对灰葡萄孢(*B. cinerea*)的抑制率均高于45%,其中S3对灰葡萄孢(*B. cinerea*)的抑制效果最好,达到95.1%;有91%的菌株对粉红聚端孢(*T. roseum*)的抑制率大于40%,其中S3和T1对粉红聚端孢(*T. roseum*)的抑制率均高于90%;A14和A2对胶孢炭疽菌(*C. gloeosporioides*)的抑制率

均高于 90％;测定中未发现促进靶标真菌致病性的菌株。邓肯式多重差异比较发现,11 株酵母菌株对 3 种靶标真菌的抑制效果均有明显差异。可见,采

用适宜的方法,可以从野生山楂果实分离到具有抑病效果的酵母菌株。

表 1 从野生山楂分离的 11 株酵母菌的形态特征
Table 1 Morphological characteristic of eleven yeast isolates

酵母菌株 Yeast isolate	菌落颜色 Colony colour	菌落质地 Colony texture	假菌丝 Pseudohypha	孢子形态 Spore shape
S1	白色 White	粘稠、易挑起 Sticky,easy to pick	无 No	椭圆形 Oval
S2	白色,产生色素 Produce pigment	粘稠、易挑起 Sticky,easy to pick	无 No	椭圆形 Oval
S3	橙色 Orange	粘稠、易挑起 Sticky,easy to pick	无 No	圆形 Round
A11	白色 White	有褶皱 Folding	无 No	椭圆形 Oval
A12	白色 White	粘稠、易挑起 Sticky,easy to pick	有 Yes	椭圆形 Oval
A13	粉红色 Pink	粘稠、易挑起 Sticky,easy to pick	无 No	椭圆形 Oval
A14	棕色 Brown	粘稠、易挑起 Sticky,easy to pick	无 No	椭圆形 Oval
A2	深棕色 Nigger-brown	粘稠、易挑起 Sticky,easy to pick	有 Yes	椭圆形 Oval
T1	黄色 Yellow	粘稠、易挑起 Sticky,easy to pick	有 Yes	椭圆形 Oval
T2	黄色 Yellow	粘稠、易挑起 Sticky,easy to pick	无 No	椭圆形 Oval
T3	红色 Red	粘稠、易挑起 Sticky,easy to pick	无 No	椭圆形 Oval

表 2 11 株酵母菌对 3 种致病菌引起的苹果腐烂病的防治效果
Table 2 Inhibiting effect of 11 yeast isolates on three controlled target pathogen

菌株 Isolate	灰葡萄孢 <i>B. cinerea</i>		粉红聚端孢 <i>T. roseum</i>		胶孢炭疽菌 <i>C. gloeosporioides</i>	
	抑制率/% Inhibiting rate	病斑直径/mm Lesion diameter	抑制率/% Inhibiting rate	病斑直径/mm Lesion diameter	抑制率/% Inhibiting rate	病斑直径/mm Lesion diameter
S1	85.9	10.6 g	69.1	12.8 d	36.4	14.3 c
S2	80.7	12.3 fg	75.5	11.4 d	68.7	18.6 f
S3	95.1	7.6 h	95.5	7.0 e	48.0	16.3 d
A11	74.3	14.4 ef	66.8	13.3 d	63.1	7.3 ef
A12	65.8	16.3 de	68.2	13.0 d	58.1	11.8 e
A13	63.6	17.9 d	49.5	17.1 c	44.9	12.2 cd
A14	45.0	23.8 b	68.2	13.0 d	97.5	6.5 g
A2	83.5	11.4 g	75.9	11.3 d	93.4	16.9 g
T1	79.5	12.7 fg	94.5	7.2 e	70.7	13.3 f
T2	55.4	20.6 c	28.3	21.8 b	21.7	21.5 b
T3	65.7	17.2 d	42.3	18.7 c	38.4	18.2 cd
CK		38.7 a		28.0 a		25.8 a

注:数据后标相同字母者表示邓肯式多重检验差异不显著($P=0.05$);标不同字母者表示邓肯多重检验差异显著($P<0.05$)。
Note: After the data, signs with same letters are not statistically different by Duancaan’s Multiple Range Test ($P=0.05$); signs with different letters are statistically different by Duancaan’s Multiple Range Test ($P<0.05$).

2.3 入选菌株浓度对酵母菌防病效果的影响

由图 1 可见,在靶标真菌接种浓度为 10^6 cfu/mL 的条件下,随着酵母菌 S3、A2、A14 和 T1 接种浓度的增加,其对 3 种靶标真菌的抑制作用并无明显提高,但酵母菌浓度为 10^8 和 10^9 cfu/mL 时的抑菌效果普遍优于 10^7 cfu/mL。可见,这 4 种酵母菌的常规接种体浓度应以 10^8 cfu/mL 为宜。

2.4 培养温度对酵母菌防病效果的影响

为了比较常温与冷藏条件下入选酵母菌对苹果贮藏期病害的控制能力,研究了培养温度在 4 和 25 ℃时酵母菌 S3、A14、A2 和 T1 对 3 种靶标真菌的

抑制效果,其结果如表 3 所示。由表 3 可见,在 25 ℃的常温条件下,S3、A2、A14 和 T1 4 株酵母菌均可以有效抑制由粉红聚端孢(*T. roseum*)、灰葡萄孢(*B. cinerea*)和胶孢炭疽菌(*C. gloeosporioides*)3 种靶标真菌引起的病害。但在 4 ℃条件下冷藏 30 d 后,4 株酵母菌几乎完全控制了 3 种病害的发生,其中 A2 和 T1 对 3 种致病真菌的抑制率均达到了 100％。由此可见,培养温度对 4 株酵母菌的控病作用具有显著影响,冷藏条件下综合应用生防酵母菌,可以有效控制由粉红聚端孢、灰葡萄孢和胶孢炭疽菌 3 种苹果贮藏期病害引起的苹果腐烂病。

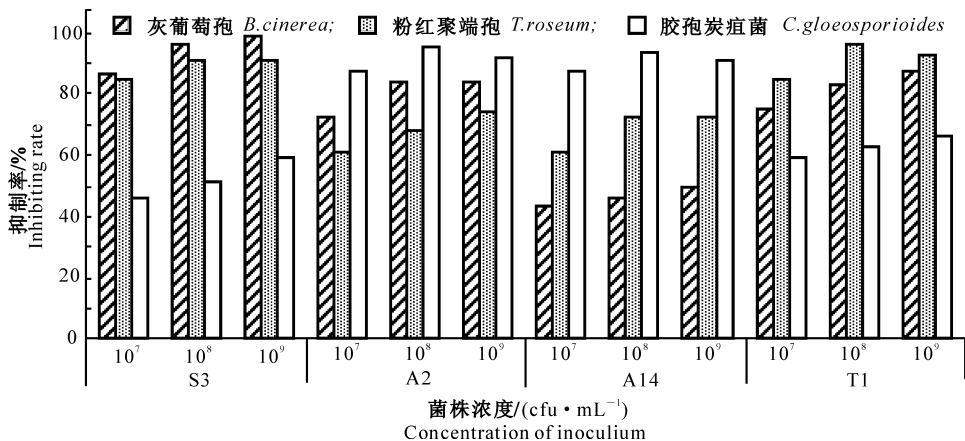


图 1 4 株酵母菌在不同接种浓度下对 3 种致病真菌的防治效果

Fig. 1 Suppressive effect of four yeast isolates at different inoculate concentrations on three pathogens

表 3 4 株酵母菌在不同培养温度条件下对 3 种致病菌的抑制效果

Table 3 Suppressive effect of four yeast isolates on three pathogens at different temperatures

靶标菌 Target pathogen	病斑直径/mm Lesion diameter		抑制率/% Inhibiting rate							
			T1		S3		A2		A14	
	4 °C	25 °C	4 °C	25 °C	4 °C	25 °C	4 °C	25 °C	4 °C	25 °C
灰葡萄孢 <i>B. cinerea</i>	33.3	42.8	100	95.1	100	84.5	73.6	39.4	100	82.9
粉红聚端孢 <i>T. roseum</i>	10.2	25.5	100	91.8	100	74.4	100	75.9	100	93.3
胶孢炭疽菌 <i>C. gloeosporioides</i>	7.3	27.7	76.9	55.3	100	95.4	100	96.8	100	69.1

2.5 入选菌株接种时间对酵母菌防病效果的影响

提前接种酵母菌后,以不同时间挑战接种靶标真菌,抑菌效果的测定结果(图 2)表明,接种时间对 S3、A14、A2 和 T1 4 株酵母菌的抑菌效果均具有显

著影响,与同时接种酵母菌和靶标真菌相比,以提前 24 和 48 h 接种时的抑制效果最好,但此二者间并没有明显差异。可见,提前 24 h 接种酵母菌即可有效控制靶标真菌的危害。

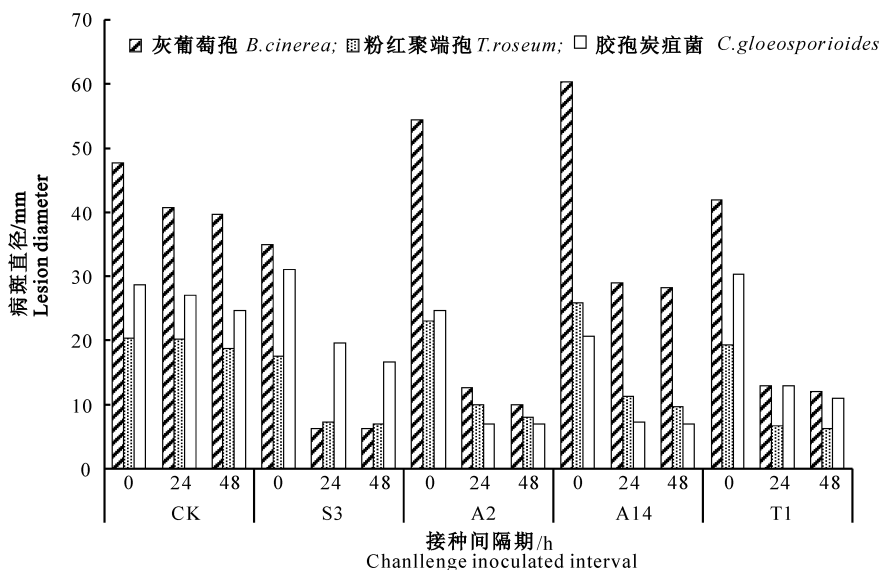


图 2 不同接种间隔时间时 4 株酵母菌对 3 种致病真菌的防治效果

Fig. 2 Suppressive effect of four yeast isolates on three pathogens at different intervals of challenge inoculation

3 讨 论

人们通常选择拟应用生防菌的生态环境分离筛

选生防菌,以提高生防菌对环境的适应性及竞争能力。苹果病害生防酵母菌的筛选,大都直接从苹果表面进行分离。本研究首次选用与苹果同属于蔷薇科

的野生山楂为对象,进行了有生防效果酵母菌的分离筛选,是基于野生山楂抗逆性强,没有人为干扰,无任何化学药剂污染,而且果实表面有丰富的酵母菌资源。本研究结果发现,分离所得的 11 个菌株对供试的 3 种靶标真菌都有不同程度的抑制作用,其中 S3、A14、A2 和 T1 对单一靶标菌的抑制率均在 90% 以上,与冷藏手段相结合其抑制率可达 100%。可见,利用野生山楂分离获得高效的生防菌株是可行的,这无疑为生防菌的获取找到了一条新途径。

本试验研究了接种浓度、培养温度以及挑战接种时间对入选生防酵母菌菌株防病效果的影响,结果发现,在酵母菌接种体浓度高于靶标菌 2 个数量级的条件下,接种体浓度对 S3、A14、A2 和 T1 4 株生防酵母菌菌株的抑菌效果没有显著影响,这与 Droby 等^[13]报道的汉氏德巴利酵母(*Debaryomyces hansenii*)对指状青霉(*Penicillium digitatum*)的抑菌效果随酵母菌浓度的增加而增大的结果有一定差异,可能是由于选用酵母菌接种体的形式不同造成的,但还有待于进一步研究。

本试验证明,挑战接种时间对 S3、A14、A2 和 T1 4 株生防酵母菌菌株的抑菌效果有显著影响,提前 24 h 接种即可达到预期防效,前人的研究也证明了这一点^[14-16]。冷藏是保持果蔬品质的有效方法,故能否在低温条件下生存并有效发挥抑菌作用,是确定一种微生物能否作为生防菌的重要前提。本试验所筛选的 4 株生防酵母菌 S3、A14、A2 和 T1,在冷藏条件下的抑菌效果均可达到 100%,高于其在常温下的防效,因此综合运用冷藏手段是提高生防酵母菌抑制作用的有效途径。

[参考文献]

- [1] 郭云忠,孙广宇,高保卫,等.套袋苹果黑点病原菌鉴定及其生物学特性研究[J].西北农业学报,2005,14(3):18-21.
Guo Y Z, Sun G Y, Gao B W, et al. Studies on the identification of pathogen and the biological characteristics of black-dot disease of bagged apple[J]. Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica, 2005, 14(3): 18-21. (in Chinese)
- [2] Holmes G J, Eckert J W. Sensitivity of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* to postharvest citrus fungicides in California[J]. Phytopathology, 1999, 89: 716-721.
- [3] 范青,田世平,徐勇.丝孢酵母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,2002,34(2):163-168.
Fan Q, Tian S P, Xu Y. Effects of *Tricosporon* sp. on biocontrol efficacy of grey and blue mold on postharvest apple[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2002, 34(2): 163-168. (in Chinese)
- [4] Long C A, Wu Z, Deng B O. Biological control of *Penicillium italicum* of citrus and *Botrytis cinerea* of grape by strain 34-9

- of *Kloeckera apiculata* [J]. European Food Research and Technology, 2005, 221: 197-201.
- [5] 庞学群,张昭其,黄雪梅.果蔬采后病害的生物防治[J].热带亚热带植物学报,2002,10(4):186-192.
Pang X Q, Zhang Z Q, Huang X M. Biological control of post-harvest diseases of fruits and vegetables [J]. Journal of Tropical and Subtropical Botany, 2002, 10(4): 186-192. (in Chinese)
- [6] Ippolito A, El-Ghaouth A, Wilson C L, et al. Control of post-harvest decay of apple fruit by *Aureobasidium pullulans* and induction of defense responses [M]. Postharvest Biology and Technology, 2000, 19: 265-272.
- [7] 梁学亮,郭小密.假丝酵母对柑橘采后绿霉病的抑制效果[J].华中农业大学学报,2006,25(1):26-30.
Liang X L, Guo X M. Efficacy of biological control green mold rot of citrus fruit by *Candida species* CWW24 [J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2006, 25(1): 26-30. (in Chinese)
- [8] Jones R W, P rusky D. Expression of an antifungal peptide in *Saccharomyces* A new approach for biological control of the postharvest disease caused by *Colletotrichum coccodes* [J]. Phytopathology, 2002, 92(1): 33-37.
- [9] Yakoby N, Zhou R, Kobiler I, et al. Development of *Colletotrichum gloeosporioides* REM Imutants as biocontrol agents against anthracnose disease in avocado fruits [J]. Phytopathology, 2001, 91: 143-148.
- [10] 卫亚红,宗兆锋,温劲松,等.苹果炭疽病生防酵母菌的初筛[J].西北农业学报,2000,9(6):33-36.
Wei Y H, Zong Z F, Wen J S, et al. Screening of antagonistic yeasts control *Colletotrichum gloeosporioides* [J]. Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica, 2000, 9(6): 33-36. (in Chinese)
- [11] Wilson C L, Wisniewski M E, Droby S, et al. A selection strategy for microbial antagonists to control postharvest diseases of fruits and vegetables [J]. Scientia Horticulturae, 1993, 53: 183-189.
- [12] 乔红萍,宗兆锋.重寄生菌 F46 和 PR 对苹果采后病害 3 种致病菌的控制作用[J].中国生物防治,2003,19(1):76-79.
Qiao H P, Zong Z F. Control effect with hyperparasites F46 and PR against three pathogens of postharvest diseases in apple [J]. Chinese Journal of Biological Control, 2003, 19(1): 76-79. (in Chinese)
- [13] Droby S, Vinokur V. Induction of resistance to *Penicillium digitatum* in grape fruit by the yeast biocontrol agent *Candida oleophila* [J]. Phytopathology, 2002, 92: 393-399.
- [14] Vero S, Mondino P, Burgueno J, et al. Characterization of bio-control activity of two yeast strains from Uruguay against blue mold of apple [J]. Postharvest Biology and Technology, 2002, 26: 91-98.
- [15] Bouzerda L, Boubaker H, Boudyach E H, et al. Selection of antagonistic yeasts to green mold disease of Citrus in Morocco [J]. Food, Agriculture & Environment, 2003, 1(3-4): 215-218.
- [16] El-Ghaouth A, Wilson C L, Wisniewski M E, et al. Biological control of postharvest diseases of citrus fruits Biological control of crop diseases [M]. New York: Marcel Dekker, 2002: 288-312.