

柑橘采后绿霉病生防酵母菌的筛选、鉴定及其生防效果研究

耿 鹏,张彦博,胡美英,陈少华,瞿 菲

(华南农业大学 天然农药与化学生物学教育部重点实验室,广东 广州 510642)

【摘 要】 【目的】筛选能有效防治柑橘采后绿霉病菌(*Penicillium digitatum*)的拮抗酵母菌,为柑橘的采后保鲜提供参考。【方法】从园艺果园采集不同的水果样品,用稀释平板法分离筛选生防酵母菌株,并进行鉴定;采用 PDB 液体培养试验和刺伤接种的方法,研究不同浓度酵母菌悬浮液对离体和活体柑橘绿霉病菌的防治效果。【结果】获得 1 株拮抗酵母菌 HP-10,结合生理生化特性及 18S rDNA 序列同源性分析,将其鉴定为马克斯克鲁维酵母(*Kluyveromyces marxianus*)。离体和活体抑菌试验表明,菌株 HP-10 悬浮液能有效抑制绿霉病菌孢子的萌发;用 10^8 CFU/mL HP-10 悬浮液处理病原菌孢子时,其萌发率仅为 3.61%,而对照的萌发率为 88.06%;25 °C 条件下,用 10^8 CFU/mL 的酵母悬浮液处理柑橘果实 2 d 后,发病率仅为 6.67%,病斑直径仅为 2.14 mm,显著低于对照的发病率(93.33%)和病斑直径(53.31 mm)。【结论】不同浓度 HP-10 菌悬液对柑橘绿霉病菌均具有一定的防治效果,表现出良好的生防潜力。

【关键词】 柑橘绿霉病;生防酵母菌;采后病害;生防潜力

【中图分类号】 S666.109⁺.3

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2011)06-0191-06

Screening, identification of antagonistic yeast and its biocontrol efficacy against green mold caused by *Penicillium digitatum* of citrus fruit

GENG Peng, ZHANG Yan-bo, HU Mei-ying, CHEN Shao-hua, QU Fei

(Key Laboratory of Natural Pesticide and Chemical Biology, Ministry of Education,
South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong 510642, China)

Abstract: 【Objective】 The study focused on isolating and characterizing yeast with abilities to control diseases of citrus fruits, to provide an alternative strategy to control postharvest disease of citrus fruits. 【Method】 An antagonistic yeast HP-10 was preliminarily identified as *Kluyveromyces marxianus* based on physiological-biochemical characteristics and the similarity analysis of its 18S rDNA sequence. The efficacy of HP-10 to *Penicillium digitatum* *in vitro* and *in vivo* was studied by PDB trials and wounding inoculation. 【Result】 The spore germination of *P. digitatum* was significantly inhibited by the yeast cell suspensions in the tests on potato dextrose broth (PDB). High efficacy was achieved when fruits were treated with suspension of HP-10 at 10^8 CFU/mL. Disease incidence was reduced by 84.45% compared with control after 2 days incubation. When antagonistic yeast *K. marxianus* was treated at a concentration of 10^8 CFU/mL under 25 °C for 2 days, the decay incidence occurred by 6.67% and lesion diameter 2.14 mm, while the control fruits had 93.33% disease incidence and 53.31 mm lesion diameter. 【Conclusion】 It was suggested that HP-10 had a great potential to control green mold of citrus fruit, and can be used as a new strategy for the biocontrol of postharvest diseases.

* [收稿日期] 2010-11-23

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30871660);广东省科技计划项目(2008B050100045)

[作者简介] 耿 鹏(1987—),男,山东青州人,在读硕士,主要从事天然源农药研究。E-mail:gengpeng5186@163.com

[通信作者] 胡美英(1954—),女,广东兴宁人,教授,博士生导师,主要从事天然源农药、农药残留与环境保护、昆虫生理毒理研究。E-mail:hmy@scau.edu.cn

Key words: *Penicillium digitatum*; antagonist yeast; post-harvest disease; biological control

柑橘绿霉病是柑橘果实贮藏期间的主要病害。目前,柑橘采后病害的防治主要依赖于化学杀菌剂,如抑霉唑、噻苯咪唑、二甲嘧菌胺、咯菌腈等,但长期使用化学杀菌剂易造成环境和食品污染,同时也易诱发病原菌产生抗药性^[1]。随着人们对果品质量要求的不断提高和环保意识的增强,很有必要开辟能够代替化学药剂的安全、无毒且有效的生物试剂,微生物生防剂即是其中的一种。

用于采后生物防治的拮抗微生物包括细菌^[2]、放线菌^[3]以及酵母菌^[4],其中酵母菌以其拮抗效果好、不产生毒素、可以和化学杀菌剂混用等优点成为采后病害生物防治研究的热点^[5]。近年来,国内外学者就拮抗酵母菌用于果蔬采后病害防治进行了广泛研究。Zahavi 等^[6]用假丝酵母(*Cryptococcus oleophila*)防治由灰葡萄孢霉(*Botrytis cinerea*)及黑曲霉(*Aspergillus niger*)引起的腐烂病,取得了良好的防治效果;Janisiewicz 等^[7]用罗伦隐球酵母(*Cryptococcus laurentii*)处理苹果果实,可有效地预防青霉病的发生;梁学亮等^[8]研究了假丝酵母(*Candida* Sp.) CWW-4 对柑橘采后绿霉病的防治效果;陈丽锋等^[9]筛选到 1 株拮抗酵母菌,经鉴定为欧诺比假丝酵母,并首次将该酵母菌应用于果蔬的保鲜。目前,拮抗酵母菌假丝酵母(*Candida oleophila*)、白色隐球酵母(*C. albidus*)在美国和南非已实现了商品化^[10-11],并已广泛用于果蔬采后的病害防治。本研究通过离体及果实接种试验,对能有效防治柑橘绿霉病的拮抗酵母菌进行了筛选和鉴定,并对其抑菌效果进行了研究,以期对柑橘绿霉病的生物防治及综合防治技术的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料

1.1.1 供试果实 选择外观整齐、大小一致、无病虫害、无机械损伤且未经过采后处理的砂糖柑果实,运到实验室后立即用质量分数 2% 的次氯酸钠溶液消毒 5 min,自来水冲洗,晾干后待用。

1.1.2 柑橘病原菌及孢子悬浮液的制备 柑橘绿霉病菌(*P. 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,用含有质量分数 0.05% Tween 80 的无菌水配成孢子悬浮液后,用血球计数板配制成浓度为 10^6 mL⁻¹ 的孢子悬液。

1.2 酵母菌株的分离与筛选

参考 Wilson 等^[12]的方法,并作一定调整。从华南农业大学园艺果园采集木瓜、梨、柑橘果实样品,采集后立即用刀片切成 2 cm×2 cm 的小块,每份样品称取 10 g,加入到装有 90 mL 豆芽汁葡萄糖液体培养基的三角瓶中,然后加入几滴质量分数 0.1% 的硫酸链霉素,置于恒温摇床上振荡培养(26 °C、120 r/min) 48 h。用移液枪移取 1 mL 菌液,用浓度梯度法稀释后,分别取稀释 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} 倍的菌液 100 μ L,涂布于豆芽汁葡萄糖琼脂培养基平板上,置于 25 °C 恒温培养箱中培养 48 h,然后挑取培养特征相异的单菌落,经反复纯化培养后编号,保存备用。

菌株筛选采用酵母菌与柑橘绿霉病菌混菌试验^[9],用无菌水制备 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 CFU/mL 的酵母菌悬浮液,将柑橘绿霉病菌制成 10^6 , 10^5 , 10^4 mL⁻¹ 的孢子悬浮液,分别各吸取 1 mL 移入 20 mL 50 °C 左右的豆芽汁葡萄糖培养基中,混匀后倒入无菌平皿中置水平位置冷却。于 28 °C 培养 2~10 d,每处理 3 个重复,试验重复 2 次,分别于培养的第 2, 6, 10 天观察并记录菌落生长情况,筛选对柑橘绿霉病菌具有较强拮抗作用的拮抗酵母菌株。

1.3 酵母菌株的鉴定

1.3.1 生理生化特征 参照文献[13-16]的方法,鉴定菌株 HP-10 的生理生化特征。

1.3.2 18S rDNA 片段扩增及测序 采用酵母菌 18S rDNA 的通用引物 EF3(5'-TCCTAAATGACCAAGTTTG-3')和 EF4(5'-GGAAGGGRTGTATTTATTAG-3')^[15]进行 PCR 扩增。酵母菌总 DNA 的提取,参照上海生工生物工程技术服务有限公司的植物基因组 DNA 提取试剂盒进行。反应体系(50 μ L)为:模板 DNA 1 μ L,引物 EF3(10 μ L/L)和 EF4(10 μ L/L)各 1.5 μ L, 2×PCR MasterMix 20 μ L,双蒸水 26 μ L。PCR 程序如下:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 1 min,48 °C 退火 1 min,72 °C 延伸 2 min,共循环 35 次;最后 72 °C 延伸 10 min,4 °C 保存。PCR 产物纯化后测序,测序由上海英潍捷基生物技术有限公司完成。

在 GenBank 数据库,中利用 Blast 对所测定的 18S rDNA 序列与已报道的酵母菌菌株的 18S rDNA 全序列进行同源性比较,然后应用 MEGA 3.1 和 DNAMAN 软件进行同源性比对,并构建系统进化树。

1.4 拮抗酵母菌 HP-10 对柑橘绿霉病的生防效果

1.4.1 HP-10 对柑橘绿霉病菌孢子萌发率的影响
参照 Janisiewicz 等^[7]的方法,分别吸取浓度为 10⁶,10⁷,10⁸ CFU/mL 的酵母菌悬浮液 100 μL,放入盛有 5 mL PDB 培养基的试管中,以 100 μL 灭菌蒸馏水为对照;再在各试管中加入 100 μL 浓度为 10⁸ mL⁻¹的柑橘绿霉病菌孢子悬浮液,置于恒温摇床上在 25 ℃下 80 r/min 振荡培养 24 h,显微镜下镜检孢子的萌发情况,用无菌水梯度稀释孢子浓度至每视野为 100~120 个,以孢子萌发产生的芽管长度超过孢子平均宽度时视为萌发,按此标准统计各处理孢子萌发情况,计算孢子萌发率。每处理重复 3 次,取平均值。

1.4.2 活体下菌株 HP-10 对柑橘绿霉病发病率和病斑直径的影响
参照 Janisiewicz 等^[7]的方法,用消毒的接种针在柑橘的赤道部位刺 1 个 4 mm(深)×3 mm(宽)的伤口,于伤口晾干后分别接种 30 μL 10⁶,10⁷,10⁸ CFU/mL 的拮抗酵母菌悬浮液,

以无菌水为对照,3 h 后再接种 20 μL 10⁶ mL⁻¹的柑橘绿霉病菌孢子悬浮液。果实晾干后于 25 ℃贮藏,并保持 95%左右的湿度,分别于 2,4,6 d 后测定发病率 and 病斑直径。每处理 8 个果实,试验重复 3 次。

1.5 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 柑橘绿霉病菌拮抗酵母菌的筛选

从果实样品分离获得具有酵母菌性状的菌株 13 株,通过混菌试验筛选出了对柑橘绿霉病菌有较好抑菌效果的酵母菌株 HP-10(表 1)。10⁸ CFU/mL HP-10 菌株悬浮液与不同浓度柑橘绿霉病菌混合培养 10 d 以上,均未见病原菌菌落生长,因此用菌株 HP-10 进行后续研究。

表 1 酵母菌株 HP-10 与柑橘绿霉病菌的混菌培养结果
Table 1 Result of mixture of *P. digitatum* and yeast strain HP-10

HP-10 浓度/ (CFU · mL ⁻¹) Concentration of HP-10	柑橘绿霉病菌浓度/mL ⁻¹ Concentration of <i>P. digitatum</i>								
	10 ⁶			10 ⁵			10 ⁴		
	2 d	6 d	10 d	2 d	6 d	10 d	2 d	6 d	10 d
10 ⁸	++/-	++/-	++/-	++/-	++/-	++/-	++/-	++/-	++/-
10 ⁷	++/-	++/-	++/-	++/-	++/-	++/-	++/-	++/-	++/-
10 ⁶	++/-	++/-	++/+	++/-	++/-	++/+	++/-	++/-	++/-
10 ⁵	+/-	+/+	-/+	+/-	+/-	+/+	+/-	+/+	+/+

注:“/”前后分别表示酵母菌和柑橘绿霉病菌的生长情况;“++”表示菌落占培养皿 2/3 以上面积,“+”表示菌落占培养皿 1/3 面积,“-”表示未见菌落生长。
Note:Before “/” means growth of yeast,after “/” means growth of *P. digitatum*;“++” means growth higher than 2/3,“+” means growth lower than 1/3,“-” means no growth.

2.2 柑橘绿霉病菌拮抗酵母菌 HP-10 的鉴定

2.2.1 菌落性状与生理生化特征
酵母菌 HP-10 在 PDA 平板上形成的菌落呈圆形,乳白色,表面隆

起,边缘整齐,直径 3~4 mm,表面无光泽,质地黏稠,有芳香型气味。扫描电镜观察结果显示,菌体单细胞呈卵圆形或椭圆形。其生理生化特征见表 2。

表 2 酵母菌 HP-10 的生理生化特征
Table 2 Physiological and biochemical characteristics of HP-10 yeast strain

测试项目 Test	测定指标 Indicator	HP-10	测试项目 Test	测定指标 Indicator	HP-10
糖发酵 Fermentation	葡萄糖 Glucose	+	氮源同化 Nitrogen source	NH ₄ NO ₃	+
	麦芽糖 Maltose	+		KNO ₃	+
	蔗糖 Sucrose	+		NaNO ₃	-
	D-半乳糖 D-galactose	V		酪氨酸 Tyrosine	+
	乳糖 Lactose	+		组氨酸 Histidine	-
	可溶性淀粉 Starch	-		天冬酰胺 Aspartate	+
碳源同化 Carbon source	葡萄糖 Glucose	+	其他 Additional tests	淀粉水解 Amylolysis	-
	麦芽糖 Maltose	+		产酸 Acids production	-
	乳糖 Lactose	V		尿素水解 Proteolysis	-
	木糖 Xylose	V			
	D-半乳糖 D-galactose	+			
	鼠李糖 Rhamnose	-			

注:“+”表示阳性反应,“-”表示阴性反应,“V”表示可变反应。
Note:“+” represents positive reaction,“-” represents negative reaction,“V” represent variable reaction.

2.2.2 18S rDNA 序列分析 以 EF3 和 EF4 为引物,通过酵母菌特异性 PCR 反应扩增 18S rDNA 序列,所得 DNA 片段为单一条带,长度约为 1 496 bp (图 1)。将该序列与 GenBank 中的相应序列进行比对,结果(图 2)显示,HP-10 菌株与马克斯克鲁维酵母(*Kluyveromyces marxianus*) W103 的同源性为 100%,结合 2.2.1 结果,初步确定 HP-10 菌株为马克斯克鲁维酵母,其 GenBank 登录号为 HQ414234。

2.3 拮抗酵母菌 HP-10 对柑橘绿霉病的生防效果

2.3.1 HP-10 对柑橘绿霉病菌孢子萌发的影响

PDB 试验结果表明(图 3),不同浓度拮抗菌悬浮液均可抑制柑橘绿霉病菌孢子的萌发。酵母菌浓度越

大其抑制效果越明显,且各处理组的孢子萌发率均显著低于对照($P<0.05$)。

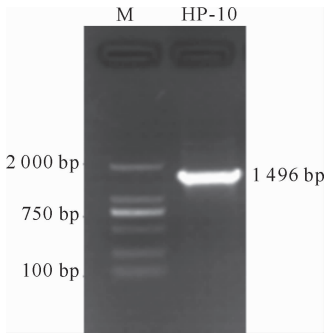


图 1 酵母菌 HP-10 的 18S rDNA PCR 扩增结果
Fig.1 18S rDNA agarose elec-trophoretogram of HP-10 yeast strain

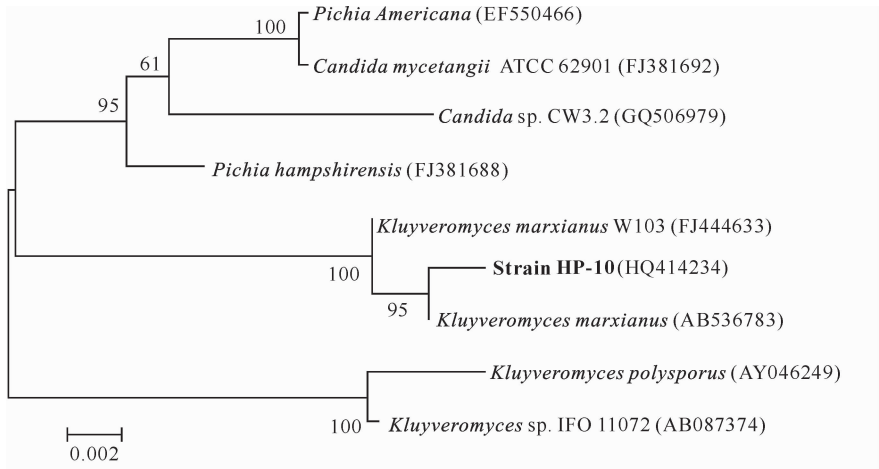


图 2 酵母菌 HP-10 18S rDNA 序列的系统发育进化树
Fig.2 Phylogenetic tree based on 18S rDNA sequence of HP-10 yeast strain

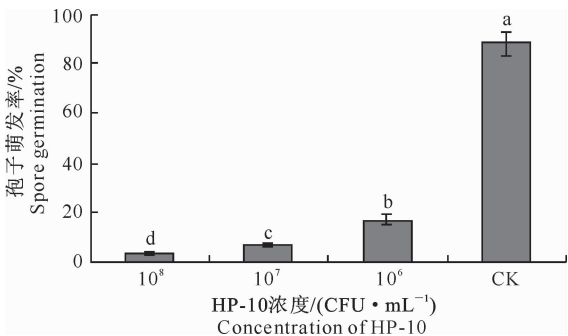


图 3 拮抗酵母菌 HP-10 悬浮液对柑橘绿霉病菌孢子萌发的影响

图中不同小写字母表示经 DMRT 法统计,各处理于 $P<0.05$ 水平差异显著,下图同

Fig.3 Influences of antagonistic yeast HP-10 on spore germination of *P. digitatum*

Data in columns with different letters are statistically different according to Duncan's multiple range test at $P<0.05$, the same below

2.3.2 活体下 HP-10 对柑橘绿霉病发病率和病斑直径的影响 试验结果(图 4,图 5)表明,拮抗酵母菌 HP-10 悬浮液的浓度越高,其对绿霉病原菌(*P. digitatum*)引起的柑橘果实绿霉病发病率和病斑大小的抑制效果越好。HP-10 处理果实贮藏 2 d 后,以 10^8 CFU/mL HP-10 悬浮液的抑制效果最好,发病率仅为 6.67%,平均病斑直径为 2.14 mm,与其他浓度酵母菌悬浮液的处理效果存在显著差异; 10^7 和 10^6 CFU/mL 酵母菌 HP-10 悬浮液的处理效果也明显优于对照,贮藏 4 d 以后, 10^7 和 10^6 CFU/mL HP-10 悬浮液处理果实的发病率与对照相比无显著差异,但果实的病斑直径仍显著低于对照; 10^8 CFU/mL HP-10 悬浮液处理的果实,在处理第 4 和 6 天的发病率分别为 37.71%和 82.22%,病斑直径分别为 16.32 和 38.61 mm,而对照的发病率均为 100%,病斑直径为 85.06 和 86.37 mm,二者存在显著差异。

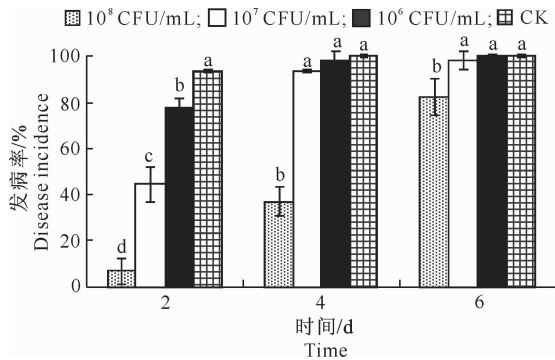


图 4 拮抗酵母菌 HP-10 悬浮液对柑橘绿霉病发病率的影响

Fig. 4 Effect of different concentrations of HP-10 on disease incidence of citrus fruits

3 讨 论

酵母菌作为生防因子用于果蔬采后的防腐保鲜,一般具有遗传稳定、抑菌谱广、抗逆性强、可以与化学杀菌剂混用等特点^[17-18],而且其作为一种有益微生物已在食品加工、饮料发酵等产业得到广泛应用,不会产生危害人和寄主的代谢产物,其安全性已经得到了广泛证实。本研究从木瓜、梨、柑橘表面分离筛选到 13 株酵母菌,经过混菌试验筛选得到拮抗酵母菌 HP-10,并通过生理生化特征结合 18S rDNA 序列分析,将其鉴定为马克斯克鲁维酵母(*K. marxianus*),该菌株对柑橘绿霉病菌表现出了良好的离体和活体抑制效果。目前,马克斯克鲁维酵母菌主要用于发酵饮料、发酵产乙醇等方面^[19-20],具有很高的安全性,但尚未见其用于果蔬采后病害防治的相关报道。

本研究筛选的酵母菌 HP-10 的拮抗效果与浓度呈正相关,当 HP-10 悬浮液浓度为 10⁸ CFU/mL 时,用其接种柑橘绿霉 2 d 后,柑橘绿霉病菌的发病率仅为 6.67%,平均病斑直径仅为 2.14 mm,均显著低于对照;处理 6 d 以后,10⁸ CFU/mL HP-10 悬浮液处理果实的发病率虽有所升高,但病斑直径仍然较小,为 38.61 mm,也显著低于对照。以上试验结果表明,拮抗酵母菌 HP-10 主要通过抑菌作用延缓柑橘绿霉病的发生,而不会直接杀死病原菌,这与 Hashem 等^[21]、Ge 等^[22]的研究结果一致。菌株 HP-10 在较高浓度时对柑橘绿霉病害的防治效果才能达到最佳,这与 Fan 等^[23]报道的酵母菌的特点相吻合。

本研究筛选到的拮抗酵母菌 HP-10 对柑橘绿霉病菌具有较好的防治效果,具有一定的应用潜力,

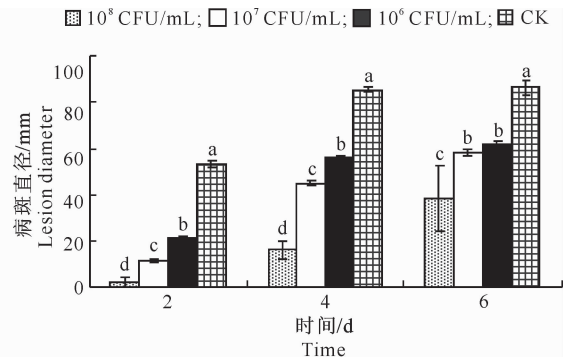


图 5 拮抗酵母菌 HP-10 悬浮液对柑橘绿霉病病斑的抑制效果

Fig. 5 Inhibition effect of different concentrations of HP-10 on lesion diameter of citrus fruits

但本试验只是对其应用于柑橘采后绿霉病的生物防治进行了初步探究,而要将该菌株最终应用于生产实践,并达到化学杀菌剂的防治效果,还需要将其与其他外源物质进行混配,如碳水化合物、金属盐类、植物激素、壳聚糖、氨基酸等^[24-25],以达到提高酵母菌生防效力的目的,而这些均还有待于后续的深入试验,同时也需对该菌株发挥生防效力的拮抗机理进行进一步深入研究。

【参考文献】

- [1] El-Ghaouth A. Biologically-based alternatives to synthetic fungicides for the control of post-harvest diseases [J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 1997, 19(3): 160-162.
- [2] Hao W N, Li H, Hu M Y, et al. Integrated control of citrus green and blue mold and sour rot by *Bacillus amyloliquefaciens* in combination with tea saponin [J]. Postharvest Biology and Technology, 2011, 59(3): 316-323.
- [3] 李 辉,耿 鹏,郝卫宁,等. 柑橘绿霉病菌拮抗放线菌 MY-5 的筛选与鉴定 [J]. 中国农学通报, 2010, 26(19): 280-284.
Li H, Geng P, Hao W N, et al. Screening and identification of actinomyces MY-5 antagonistic against *Penicillium digitatum* Sacc [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2010, 26(19): 280-284. (in Chinese)
- [4] Cao S F, Yuan Y J, Hu Z H, 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(3): 173-176.
- [5] 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.
Zhang H Y, Jiang Y H, Zheng X D, et al. Research advances on the biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables with yeast [J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2003, 19(4): 23-27. (in Chinese)

- [6] Zahavi T, Cohen L, Weiss B. Biological control of *Botrytis*, *Aspergillus* and *Rhizopus* rots on table and wine grapes in Israel [J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2000, 20: 115-124.
- [7] Janisiewicz W J, Saftner R A, William 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(3): 374-378.
- [8] 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 CWW-4 [J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2006, 25(1): 26-30. (in Chinese)
- [9] 陈丽锋, 闵晓芳, 邓伯勋, 等. 柑橘采后蒂腐病生防酵母菌的筛选及鉴定 [J]. *中国生物防治*, 2007, 23(增刊): 47-52.
- Chen L F, Min X F, Deng B X, et al. Screen and identification of biocontrol yeast against postharvest stem-end rot of citrus [J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 2007, 23(Supple.): 47-52. (in Chinese)
- [10] Janisiewicz W J, Korsten L. Biological control of postharvest diseases of fruits [J]. *Annual Review of Phytopathology*, 2002, 40: 411-441.
- [11] Fravel D R. Commercialization and implementation of biocontrol [J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2005, 43: 337-359.
- [12] 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 Horticulture*, 1993, 53(3): 183-189.
- [13] 巴尼特 J A, 佩恩 R W. 酵母菌的特征与鉴定手册 [M]. 胡瑞卿, 方善康, 译. 山东 青岛: 青岛海洋大学出版社, 1991.
- Barnet J A, Payne R W. Characteristics and identification of yeast Handbook [M]. Hu R Q, Fang S K. translated. Qingdao, Shandong: Ocean University of Qingdao Press, 1991. (in Chinese)
- [14] 周德庆. 微生物学实验手册 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1986.
- Zhou D Q. Microbiology lab manual [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 1986. (in Chinese)
- [15] Barnett J A, Payne R W, Yarrow D. Yeast: Characteristics and identification [M]. 3rd ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2000.
- [16] 张文学, 乔宗伟, 胡 承, 等. 浓香型白酒糟醅中真菌菌群的多样性分析 [J]. *四川大学学报: 工程科学版*, 2006, 38(5): 27-29.
- Zhang W X, Qiao Z W, Hu C, et al. Fungal diversity of fermented grains during the production of Chinese strong aromatic spirits [J]. *Journal of Sichuan University: Engineering Science Edition*, 2006, 38(5): 27-29. (in Chinese)
- [17] Wang X, Chi L Z, Li Y J. Purification and characterization of killer toxin from a marine yeast *Pichia anoala* YF07b against the pathogenic yeast in crab [J]. *Current Microbiol*, 2007, 55(3): 396-401.
- [18] Janisiewicz W J, Roitman J. Biological control of apple blue mold with *Pseudomonas fluorescens* [J]. *Microbiology*, 2005, 51(7): 591-598.
- [19] Bellaver L H, Barbosa N M, Carvalho D, et al. Ethanol formation and enzyme activities around glucose-6-phosphate in *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 exposed to glucose or lactose excess [J]. *FEMS Yeast Research*, 2004, 4(7): 691-698.
- [20] Tomás-Pejó E, Oliva J M, Gonzalez A, et al. Bioethanol production from wheat straw by the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875 in a simultaneous saccharification and fermentation fed-batch process [J]. *Fuel*, 2009, 88(11): 2142-2147.
- [21] Hashem M, Alamri S. The biocontrol of postharvest disease (*Botrydiploia theobromae*) of guava (*Psidium guajava* L.) by the application of yeast strains [J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2009, 53(3): 123-130.
- [22] Ge L L, Zhang H Y, Chen K P, et al. Effect of chitin on antagonistic activity of *Cryptococcus laurentii* against *Penicillium expansum* in pear fruit [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2008, 122(1/2): 44-48.
- [23] Fan Q, Tian S P. Postharvest biological control of grey mold and blue mold on apple by *Cryptococcus albidus* (Saito) Skinner [J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2001, 21(3): 341-350.
- [24] Cao S F, Zheng Y H, Tang S S, et al. Improved control of anthracnose rot in loquat fruit by a combination treatment of *Pichia membrani faciens* with CaCl_2 [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2008, 126(1/2): 216-220.
- [25] Cao S F, Zheng Y H, Wang K T, et al. Effect of antagonist in combination with methyl jasmonate treatment on postharvest anthracnose rot of loquat fruit [J]. *Biological Control*, 2009, 50(1): 73-77.