

采后芒果炭疽病拮抗酵母菌的分离和筛选

王润茵, 井敏敏, 赵红, 徐孝兰, 邵远志*
(海南大学 食品学院, 海南海口 570228)

摘要: 从海南昌江芒果园果树根际土壤中分离出 71 株酵母菌, 采用平板对峙法筛选出对胶孢炭疽菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)拮抗作用最明显的酵母菌为 LW, 其抑菌带宽为 12.25 mm。活体防效试验表明, 经 1×10^8 cfu/mL 浓度的 LW 菌悬液处理的芒果果实(红玉品种)炭疽病病斑直径仅为 11.67 mm, 显著低于对照组的 29.63 mm, 拮抗效果明显。LW 对芒果自然发病的抑制试验表明, 在 25 °C 下, 1×10^8 cfu/mL 浓度的 LW 处理芒果, 20 d 后果实炭疽病病情指数仅为 9.2; 在 15 °C 下, LW 处理 24 d 后果实炭疽病病情指数仅为 9.87。通过菌落和菌体形态及 26 s rDNA 序列分析鉴定, 确定 LW 为美极梅奇酵母(*Metschnikowia pulcherrima*)。

关键词: 胶孢炭疽菌; 酵母菌; 筛选; 鉴定

Isolation and Screening of Antagonism Yeast against Postharvest Mango Anthracnose

WANG Run-hua, JING Min-min, ZHAO Hong, XU Xiao-lan, SHAO Yuan-zhi

(College of Food Science and Technology, Hainan University, Haikou 570228, Hainan, China)

Abstract: A total of 71 strains of yeast were isolated from the rhizosphere soil of mango tree in Changjiang orchard of Hainan province. Through the method of confront culture, the yeast strain named 'LW' was screened out, which had the most antagonistic effect to *Colletotrichum gloeosporioides*, the inhibition zone diameter of it was 12.25 mm. The vivo test showed that lesion diameter of mango fruits (cv. 'Hongyu') treated by LW at concentration of 1.0×10^8 cfu/mL was only 11.67 mm, it was much lower than the control fruits of 29.63 mm, the antagonistic effect was very significant. The experiment of inhibiting effect on natural disease by LW showed that anthracnose disease index of fruits treated by LW at concentration of 1.0×10^8 cfu/mL was only 9.2 under 25 °C after 20 days, and was 9.87 under 15 °C after 24 days. Through the analysis of colony, cell morphology, and 26s rDNA sequence, LW was identified as *Metschnikowia pulcherrima*.

Key words: *colletotrichum gloeosporioides*; yeast; screening; identification

采后芒果炭疽病主要是由半知菌亚门胶孢炭疽病菌(*Colletotrichum gloeosporioides* Penz)引起的, 是芒果采后贮藏运输过程中的主要病害, 引起的芒果腐烂损失可达 20%~30%^[1]。目前, 在芒果炭疽病的防治方面主要是依赖化学杀菌剂, 如多菌灵、苯来特和甲基硫菌灵等^[2]。然而, 化学杀菌剂的长期使用易引起抗药

性, 破坏生态系统, 也不利于果蔬的品质和出口。多年来, 利用拮抗微生物来防治果蔬病害一直是研究热点。拮抗酵母菌是其中的一种, 其主要优点是在果蔬表面生存能力强, 能利用营养迅速繁殖, 不产生毒素, 而且可以和其他杀菌方法共同使用。

现已报导的拮抗酵母菌有几十种, 如 Lutz 等从冷藏梨表面分离出浅白隐球酵母、膜璞毕赤酵母等能明显抑制梨的青霉病和灰霉病^[3], 葡萄酒汉逊酵母能完全抑制葡萄灰霉病^[4], 海洋红酵母能明显减少桔子绿霉病发病^[5]等等。在美国等国家, 有的拮抗酵母菌已经制成商品投放市场。为此, 本课题组从海南昌江芒果园土壤中分离筛选对胶孢炭疽菌具有拮抗作用的酵母菌, 为进一步应用酵母菌防治芒果炭疽病奠定基础。

基金项目: 农业部南亚热作项目(14RZNJ-59); 海南省重大科技专项(ZDZX-2013011)

作者简介: 王润茵(1990—), 女(汉), 硕士研究生, 研究方向: 果蔬保鲜与贮藏。

* 通信作者: 邵远志(1969—), 男(汉), 副教授, 研究方向: 果蔬保鲜与贮藏。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 土壤

取自海南省昌江县芒果园,从红玉和紫花两个品种的果树根系周围取深度为 5 cm~20 cm 的土壤。

1.1.2 芒果果实

从海南省昌江县芒果园采果,品种为红玉,选取七成熟、大小一致的果实。

1.1.3 胶孢炭疽病菌

由中国热带农业科学研究院环境与植物病害研究所提供。

1.1.4 培养基

马铃薯葡萄糖液体培养基,马铃薯葡萄糖固体培养基。

1.1.5 其它试剂

细菌学琼脂粉(分析纯):广东环凯微生物科技有限公司;无水葡萄糖(分析纯):国药集团化学试剂有限公司。

1.1.6 仪器

ZEALWAYGR60DA 高压灭菌器:厦门致微仪器有限公司;LRH-150B 生化培养箱:广东省医疗器械厂;SW-CJ-2FD 超净工作台:苏州尚田洁净技术有限公司;BHWV-200 变频摇床:宁波海曙赛福实验仪器厂;AL-204 电子分析天平:梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;101-2 型电热鼓风干燥箱:常州市华普达教学仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 酵母菌的分离纯化

向 200 mL 马铃薯葡萄糖液体培养基中加入 0.003 g 链霉素和 10.0 g 土壤样品,摇床培养 48 h 后取培养液进行梯度稀释,稀释至 10^5 、 10^6 、 10^7 倍,采用平板涂布法分离酵母菌,平板划线法纯化^[6-7],在 28 °C 恒温箱培养酵母菌,直至获得纯培养物,经镜检后保存于试管斜面中。

1.2.2 拮抗酵母菌的筛选

用灭菌的滤纸片浸泡酵母菌菌悬液,放在 PDA 平板的一边。用灭菌的打孔器制胶孢炭疽病菌菌块,放在 PDA 平板的另一边,进行对峙试验^[8],放置在 28 °C 恒温箱培养。

1.2.3 活体防效试验

将芒果用灭菌过的打孔器打洞(3 mm 深×4 mm 宽),将芒果分为 3 组,分别接入 30 μ L 无菌水、浓度为 1×10^7 cfu/mL 的酵母菌悬液和浓度为 1×10^8 cfu/mL 的酵母菌悬液,2 h 后全部接种 15 μ L 浓度为 1×10^6 个/mL

的炭疽菌孢子悬浮液^[9]。接种好的芒果在室温晾干后用保鲜袋密封,放入 25 °C 的恒温箱中,每 4 天观察各个果实的病斑直径。

1.2.4 拮抗酵母菌对芒果自然发病的抑制试验

将芒果分为 3 组,分别在无菌水、浓度为 1×10^7 cfu/mL 的酵母菌悬液和浓度为 1×10^8 cfu/mL 的酵母菌悬液中浸泡 10 min,晾干后用保鲜袋密封,分别放入 15 °C 和 25 °C 的恒温箱中,观察各组处理芒果的病情指数^[10]。

$$\text{病情指数} = \frac{\sum(\text{各级病果} \times \text{该病级})}{\text{总调查数} \times \text{最高病情级数}} \times 100$$

1.2.5 拮抗酵母菌的鉴定

采用 26s rDNA 序列分析对酵母菌进行分子生物学鉴定,结合菌体和菌落形态特征观察,确定酵母菌。

1.2.6 数据分析

试验中所有数据采用 SPSS Statistics 17.0 统计软件进行处理,采用 ANOVA 进行 Duncan 多重差异分析^[11]。

2 结果与分析

2.1 拮抗酵母菌的筛选

从土壤中共分离出酵母菌 71 株,通过平板对峙法初筛,共筛选出对胶孢炭疽菌有拮抗作用的酵母菌 10 株,再进行复筛(表 1)。根据抑菌带宽,最后选择编号为 LW 的酵母菌,拮抗效果最好,抑菌带宽为 12.25 mm。

表 1 拮抗胶孢炭疽菌的酵母菌离体复筛结果

Table 1 Results of *in vitro* inhibition of *C.gloeosporioides* by yeasts

菌株名称	抑菌带宽/mm				平均值 (差异显著性)
	重复 I	重复 II	重复 III	重复 IV	
LW	12.70	11.20	13.00	12.10	12.25 ^a
1-LT	5.30	4.20	3.30	4.10	4.23 ^b
5-WT	4.10	3.70	3.80	3.50	3.78 ^{bc}
6-LT	4.00	3.70	3.60	3.60	3.73 ^{bc}
W9	3.90	2.50	3.00	3.70	3.28 ^{cd}
CW	2.80	3.50	3.10	2.60	3.00 ^d
4-WT	3.00	3.00	3.10	2.70	2.95 ^{cd}
W8	2.50	2.30	2.00	2.40	2.30 ^{de}
SW	2.10	2.70	1.90	2.30	2.78 ^{de}
JW	2.20	2.10	1.60	1.80	1.93 ^e

注:同列字母不同表示差异显著($P < 0.05$)。

拮抗酵母菌(LW)在 PDA 平板上对胶孢炭疽菌的抑菌效果如图 1 所示。

2.2 拮抗酵母菌活体防效结果

以加入无菌水和炭疽菌孢子悬浮液的分组做为对照组 CK,12 d 后观测病斑的直径(图 2)。



图1 拮抗酵母菌(LW)在PDA平板上对胶孢炭疽菌的抑菌效果

Fig.1 Antagonistic action of yeast strains (LW) on *C.gloeosporioides* in PDA medium

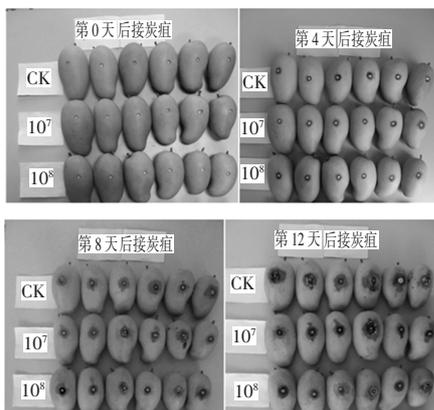


图2 酵母菌 LW 的活体防效结果

Fig.2 Results of in vivo test of strain LW

结果显示,经浓度为 1×10^7 cfu/mL 的酵母菌悬液处理的芒果,其病斑直径为 18.37 mm;经浓度为 1×10^8 cfu/mL 的酵母菌悬液处理的芒果,其病斑直径为 11.67 mm,均显著低于 CK 的 29.63 mm。

2.3 拮抗酵母菌对芒果自然发病的抑制结果

以无菌水浸泡的分组为对照组 CK,观察不同浓度酵母菌悬液在不同温度下对芒果自然发病的抑制情况。结果表明,经过酵母菌悬液浸泡的芒果放置在 15°C 和 25°C 后,其果实的炭疽病病情指数均小于无菌水处理的芒果,经浓度为 1×10^8 cfu/mL 的酵母菌悬液处理的芒果病情指数减小尤其明显。

在 25°C 贮藏的芒果(图3),20d后,CK组病情指数为 32.37,经浓度为 1×10^7 cfu/mL 的酵母菌悬液处理的芒果病情指数为 18.79,经浓度为 1×10^8 cfu/mL 的酵母菌悬液处理的芒果病情指数仅为 9.2。

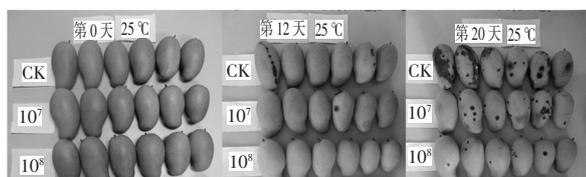


图3 25°C 贮藏的抑制结果

Fig.3 The inhibition effect under 25°C

在 15°C 贮藏的芒果(图4),24 d后,CK组病情指

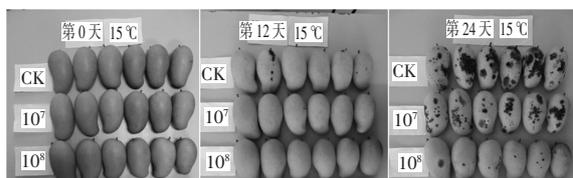


图4 15°C 贮藏的抑制结果

Fig.4 The inhibition effect under 15°C

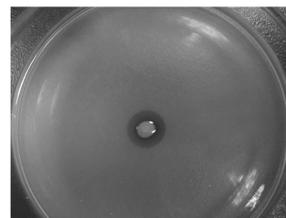


图5 酵母菌 LW 菌落形态

Fig.5 Photographs of colonies of LW

数为 58.66,经浓度为 1×10^7 cfu/mL 的酵母菌悬液处理的芒果病情指数为 27.38,经浓度为 1×10^8 cfu/mL 的酵母菌悬液处理的芒果病情指数仅为 9.87。

2.4 拮抗酵母菌的鉴定结果

酵母菌 LW 在 PDA 平板上菌落为浅红色(图5),不透明,表面湿润光滑,周围围绕一圈红色透明物质,有极其浓郁的发酵气味。

将酵母菌 LW 交由上海生工生物工程股份有限公司进行 26s rDNA 序列分析(图6),所测得序列经过与 GenBank 数据库中的已有序列进行 Blast 分析后发现,菌株 LW 与 GenBank 中 *Metschnikowia pulcherrima* 的 rDNA-26S 序列相似性为 99%(JN083816.1)。根据同源性比较结果,可以初步确定菌株 LW 为美极梅奇酵母(*Metschnikowia pulcherrima*)。

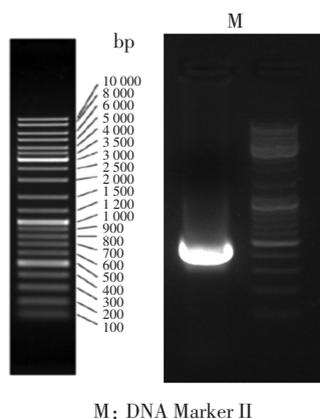


图6 酵母菌 LW rDNA-26S 电泳图谱

Fig.6 PCR amplification of rDNA-26S sequence of LW

综合菌落形态学观察和 26s rDNA 序列分析结果,酵母菌 LW 被鉴定为美极梅奇酵母(*Metschnikowia pulcherrima*)。

3 讨论与结论

生物防治在果蔬的采后病害控制过程中有很高的应用前景,酵母菌作为拮抗菌在干燥的果蔬表面生存繁殖能力强,可取代化学杀菌剂,有效控制病害,减少环境污染。目前,利用拮抗酵母防治芒果的采后病害已有一些研究。何秀娟筛选出有效抑制芒果炭疽病的拮抗酵母菌 X-1,浓度为 10^8 cfu/mL 的酵母菌悬浮液的防治效果与 200 mg/L 多菌灵药剂无明显差异^[12]。许春青从芒果叶片上分离出季也蒙毕赤酵母,能够明显抑制芒果炭疽病致病菌的生长^[13]。罗珊珊等从芒果园土壤中分离出尼泊尔德巴利,对胶孢炭疽菌也有明显的拮抗效果^[11]。

本研究从土壤中分离筛选出的酵母菌 LW 菌株在离体和活体防效试验对芒果胶孢炭疽菌都具有明显的拮抗效果,对芒果的自然发病的控制也有明显效果。通过形态学和分子生物学相结合的方法鉴定该菌株为美极梅奇酵母,目前尚无美极梅奇酵母抑制果蔬炭疽病的相关报道。

虽然初步得到美极梅奇酵母对芒果胶孢炭疽菌有明显的拮抗作用,但是如何将美极梅奇酵母进行实际应用,保持美极梅奇酵母的高效性和稳定性还有很多问题值得探索。特别是美极梅奇酵母的拮抗机理和增加其拮抗效力的途径等方面还需要做进一步研究。

参考文献:

- [1] 刘普,方静凡,程运江,等.生防酵母菌防治果品采后病害机理的研究进展[J].华中农业大学学报,2013(2):134-140
- [2] Chrys N A. Mango anthracnose disease: present status and future re-

- search priorities[J]. Plant Pathology Journal, 2006, 53: 266-273
- [3] Lutz M C, Lopes C A, Rodriguez M E, et al. Efficacy and putative mode of action of native and commercial antagonistic yeasts against post harvest pathogens of pear[J]. International Journal of Food Microbiology, 2013,164(2/3):166-172
- [4] Liu H, Guo J, Cheng Y, et al. Control of gray mold of grape by *Hanseniaspora uvarum* and its effects on postharvest quality parameters[J]. Ann Microbiol, 2010,60(1):31-35
- [5] Lu L, Ye C, Guo S, et al. Preharvest application of antagonistic yeast *Rhodospiridium paludigenum* induced resistance against postharvest diseases in mandarin orange[J]. Biological control, 2013, 67(2): 130-136
- [6] Ma Ying, Mani Rajkumar, Yong M L, et al. Inoculation of endophytic bacteria on host and non-host plants Effects on plant growth and Ni uptake[J]. Journal of Hazardous Materials, 2011, 195: 230-237
- [7] Cristiane M, Cervantes A, Filho A B, et al. Integrated control of green mold to reduce chemical treatment in postharvest citrus fruits [J]. Scientia Horticulturae, 2013, 165: 433-438
- [8] 王笑梅,范飞,李新国,等.香蕉炭疽病优势拮抗酵母菌的分离及筛选[J].热带作物学报,2013,34(2):339-343
- [9] 王坚.哈密瓜采后病原菌的分离及其生物防治技术的研究[D].石河子:石河子大学,2013
- [10] 柳凤,詹儒林,何衍彪,等.抑菌物质肉桂醛防治芒果炭疽病机制研究[J].果树学报,2011,28(4):651-656
- [11] 罗珊珊,王润菡,万斌,等.具有拮抗胶孢炭疽菌活性酵母菌的分离与筛选[J].食品工业科技, 2015,7(14):216-219
- [12] 何秀娟.筛选芒果采后炭疽病和蒂腐病的生防菌研究[D].武汉:华中农业大学,2006
- [13] 许春青.芒果炭疽病菌拮抗酵母的筛选、鉴定及其保护剂的评价[D].武汉:华中农业大学,2013

收稿日期:2015-11-20

社会主义核心价值观

【国家】富强 民主 文明 和谐
 【社会】自由 平等 公正 法治
 【公民】爱国 敬业 诚信 友善