

文章编号: 1674-7054(2015)01-0047-06

1 株新分离拮抗酵母菌株对芒果炭疽病 生防效果及其分类鉴定

高云慨¹, 张荣意¹, 钟利文², 宋海超¹, 史学群¹

(1. 海南大学 环境与植物保护学院, 海南 海口 570228; 2. 海南大学 园艺与园林学院, 海南 海口 570228)

摘要: 从海南芒果园取样分离到1个新拮抗酵母菌株(LZ5), 通过离体和活体抑菌实验, 发现其对芒果采后炭疽病菌(*Colletotrichum gloeosporioides* Penz. and Sacc)有明显的抑菌效果。活体接种实验结果表明, 1×10^8 cfu \cdot mL⁻¹的酵母菌对刺伤接种的芒果采后炭疽病具有显著的生防效果。接种第4天和第6天对照组的病斑直径分别为5.80、26.3 mm, 而处理组仅分别为0.33、17.6 mm。接种第4天对照组的发病率已达100%, 而处理组仅为20%。此外, 该菌株可以在芒果伤口处快速繁殖, 在接种24 h后酵母细胞数为初始值的62.6倍, 随后基本保持稳定。经鉴定该拮抗酵母菌属于季也蒙毕赤酵母(*Meyerozyma guilliermondii*)。

关键词: 芒果; 炭疽病; 季也蒙毕赤酵母; 生物防治

中图分类号: Q 939.5; S 436.67

文献标志码: A

芒果(*Mangifera indica* Linn.)采后炭疽病由芒果胶胞炭疽菌(*Colletotrichum gloeosporioides* Penz. and Sacc)引起, 是目前全世界芒果产区主要的采后病害, 占果实病害总量的70%以上^[1]。目前化学杀菌剂仍然是该病采后防治的常用措施^[2-3], 但解决农药残留、环境污染以及病菌的抗药性等问题需要采取更安全可靠的防治措施^[4-6]。分离和使用生物拮抗菌是目前的研究热点^[7-9], 近年来, 拮抗酵母菌在多种果实采后病害防治上取得一定的进展^[10-11]。然而, 尽管有少量利用拮抗酵母菌防治芒果采后炭疽病的报道, 但由于这些拮抗酵母菌多是从非热带地区果实上分离获得的, 其适应热带气候能力和防治效果都不理想。为提高芒果采后炭疽病的生物防治效果, 笔者从海南乐东芒果园芒果表面分离到1株具有生防潜力的拮抗酵母菌, 采用室内平板抑菌实验和果实活体接种测定其抑菌作用, 并采用形态学特征、生理生化特征和分子生物学分析相结合的方法对其进行鉴定, 旨在为芒果采后炭疽病的生物防治提供理论基础和菌种资源。

1 材料与方法

1.1 芒果果实 拮抗酵母菌分离来源芒果取自海南乐东芒果园。活体接种实验使用的芒果品种为“澳芒”, 购自海南昌江芒果园, 果实成熟度为7~8成、大小均一、无病虫害, 用20 g \cdot L⁻¹的次氯酸钠消毒2 min后, 自来水冲洗, 自然晾干后备用。

1.2 培养基

1.2.1 培养基的制备 YPD培养基: 葡萄糖20 g, 酵母膏10 g, 蛋白胨20 g, 水1 000 mL, 121 °C温度条件下灭菌15 min。PDA培养基: 马铃薯200 g \cdot L⁻¹, 葡萄糖20 g \cdot L⁻¹, 琼脂粉15 g \cdot L⁻¹。PDB培养基: 马铃薯200 g \cdot L⁻¹; 葡萄糖20 g \cdot L⁻¹。无碳基础培养基: 硫酸铵5 g; 磷酸二氢钾1 g; 氯化钠0.1 g; 七水合

收稿日期: 2014-03-03

基金项目: 海南省自然科学基金(312061); 海南大学与昌江县合作项目“昌江芒果安全高效生产关键技术研究与应用”

作者简介: 高云慨(1988-), 男, 海南大学环境与植物保护学院2011级硕士研究生, E-mail: 827951452@qq.com

通信作者: 史学群(1972-), 男, 副教授, 博士, 从事采后病理学, E-mail: shixuequn@163.com

硫酸镁 0.5 g; 氯化钙 0.1 g; 酵母膏 0.1 g; 蒸馏水 1 000 mL; 121 °C 20 min 灭菌。无氮基础培养基: 葡萄糖 20 g; 磷酸二氢钾 1 g; 七水合硫酸镁 0.5 g; 酵母膏 0.1 g; 无氮蒸馏水 1 000 mL; 115 °C 30 min 灭菌。用于配制培养基的试剂为化学纯或分析纯。

1.3 病原菌 芒果采后炭疽病菌为实验室分离保存的菌株, 前期已经单孢分离和分子鉴定为 *C. gloeosporioides* Penz. and Sacc, 致病性测定表明为强致病力菌株。将其接种于 PDA 培养基上 25 °C 下培养 7 d, 然后用含有 0.05% Tween 80 的无菌水配制成浓度为 5×10^4 cfu · mL⁻¹ 的孢子悬浮液。

1.4 菌株 LZ5 菌株 LZ5 按范青^[8]的方法从健康芒果果实表面分离获得, 将其接种于 YPD 培养基中, 在 28 °C 下振荡培养 48 h, 培养液在 8 000 r · min⁻¹ 下离心 10 min 后, 弃上清液, 加入无菌水, 最后用血球计配制成浓度为 1×10^8 cfu · mL⁻¹ 的 LZ5 菌悬液。

1.5 菌株 LZ5 对 *C. gloeosporioides* 的抑制作用

1.5.1 菌株 LZ5 的体外 (in vitro) 抑菌试验 采用平板对峙法, 用移液枪吸取 100 μL 1×10^8 cfu · mL⁻¹ LZ5 菌悬液均匀涂布于 9 cm 的 PDA 平板左半侧, 对照涂布相等体积无菌水。从培养 7 d 的 PDA 平板上用消毒的打孔器 (直径为 5 mm) 取带有病原菌 *C. gloeosporioides* 的 PDA 培养基对称放置于右侧, 于 28 °C 下培养 6 d, 观察病原菌生长情况。每处理 3 个重复, 试验重复 2 次。

1.5.2 菌株 LZ5 对芒果果实的防治效果 参考 Scherm 等^[12]的方法。果实用 2% 的次氯酸钠消毒晾干后, 用接种针在其腰部刺 1 个 4 mm (深) × 3 mm (宽) 的伤口, 室温下干燥 1 h 后, 再分别接种 30 μL 1×10^8 cfu · mL⁻¹ 的 LZ5 菌悬液, 对照接种无菌水, 4 h 后再接种 15 μL 5×10^4 cfu · mL⁻¹ 的 *C. gloeosporioides* 孢子悬浮液, 在 25 °C, 湿度约 95% 的条件下贮藏, 分别于接种 4 d 和 6 d 后测量各果实的病斑直径及其发病率。每处理 20 个果实, 3 次重复, 实验重复 2 次。

1.5.3 菌株 LZ5 在芒果果实伤口定殖能力的测定 参照 Janisiewicz 等^[13]的方法测定菌株 LZ5 在果实伤口处的生长动态。取 1×10^7 cfu · mL⁻¹ LZ5 菌悬液 20 μL 接种到伤口内, 1 h 后测定的菌株 LZ5 数量作为起始值 (0 h), 12 h 后测定第 2 次, 其后每 24 h 测定 1 次, 共测定 5 次, 72 h 内拮抗菌的生长情况。测定方法为用灭过菌的打孔器从伤口处取直径和高度都为 10 mm 的果肉组织, 放在已加入 1.0 mL 0.05 mol · L⁻¹ (pH6.5) 的磷酸缓冲液的研钵中, 研磨后采用稀释平板法测定拮抗菌的数目。每处理 4 个果实, 3 次重复, 实验重复 2 次。最后将统计的菌株 LZ5 细胞数转化成 Log₁₀ cfu。

1.6 细胞形态特征观察与生理生化试验 细胞形态特征观察参照沈萍等^[14]提供的方法, 生理生化特征按照《酵母菌的特征与鉴定手册》^[15]进行。用于生理生化测试部分试剂购自北京索莱宝科技有限公司, 其它均为国产分析纯。

1.7 26S rDNA D1/D2 序列分析分子生物学鉴定

1.7.1 基因组 DNA 的提取和 PCR 扩增 菌株 LZ5 基因组 DNA 的提取, 按照酵母基因组 DNA 提取试剂盒 (购自北京天根生物工程有限公司) 的说明书步骤提取。26S rDNA D1/D2 序列的 PCR 扩增采用通用引物对: NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') 和 NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'), 由北京六合华大基因科技股份有限公司合成。PCR 反应体系 (50 μL): 10 × PCR 缓冲液 5.0 μL; Mg²⁺ (5 mmol · L⁻¹) 3.0 μL; dNTP (各 5 mmol · L⁻¹) 2.0 μL; 引物 (20 μmol · L⁻¹) 各 1.0 μL; Taq DNA 聚合酶 (1 U · μL⁻¹) 1.0 μL; 模板 2.0 μL; 去离子水 35 μL。扩增程序为: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 30 s; 52 °C 30 s; 72 °C 1.0 min; 35 个循环后, 72 °C 10 min。取 8 μL 产物于 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳。在紫外灯下观察结果。PCR 扩增反应所用的分子生物学试剂均购自北京全式金生物技术有限公司。

1.7.2 PCR 扩增产物的纯化、测序与系统发育分析 扩增的 PCR 产物用北京天根生物工程有限公司生产的凝胶回收试剂盒纯化。纯化产物委托上海生工生物工程技术有限公司进行测序。将菌株 LZ5 的 ITS 序列测序结果通过 BLAST 进行对比分析, 然后采用 Clustalx 及 MEGA 5.0 软件进行同源性分析, 采用邻接法构建系统发育树, 确定菌株 LZ5 的分类地位。

1.8 试验数据的统计分析 实验数据用 SPSS 软件进行统计处理, 采用 ANOVA 进行邓肯氏多重差异分析。

2 结果与分析

2.1 菌株 LZ5 对 *C. gloeosporioides* 的抑制作用

2.1.1 菌株 LZ5 的体外抑菌试验结果 由图 1 可知 28 ℃ 培养 6 d 后对照组 *C. gloeosporioides* 生长旺盛,其菌丝几乎蔓延生长至平板 50%,而处理组 *C. gloeosporioides* 生长相对于 CK 组则十分迟缓,而且在 2 菌株之间有明显拮抗带,说明菌株 LZ5 抑制了 *C. gloeosporioides* 的蔓延生长,抑菌效果明显。

2.1.2 菌株 LZ5 对芒果果实的防治效果 在上述实验的基础上,对果实进行果实刺伤接种实验,结果见图 2。图 2 表明,接种 1×10^8 cfu · mL⁻¹ LZ5 菌悬液对芒果采后炭疽病具有明显的防治效果。其中接种第 4 天和第 6 天对照组的病斑直径分别为 5.80、26.3 mm,而菌株 LZ5 处理组仅分别为 0.33、17.6 mm。另外,接种第 4 天处理组的发病率仅为 20%,而对照组达 100%。

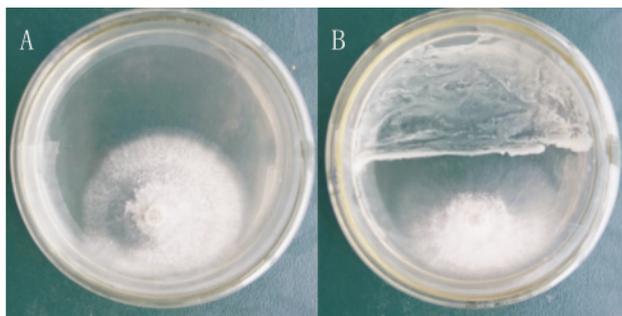


图 1 菌株 LZ5 对 *C. gloeosporioides* 的拮抗作用
A: CK; B: 菌株 LZ5

Fig. 1 Antagonistic action of strain LZ5 on *C. gloeosporioides*.

A: CK; B: strain LZ5

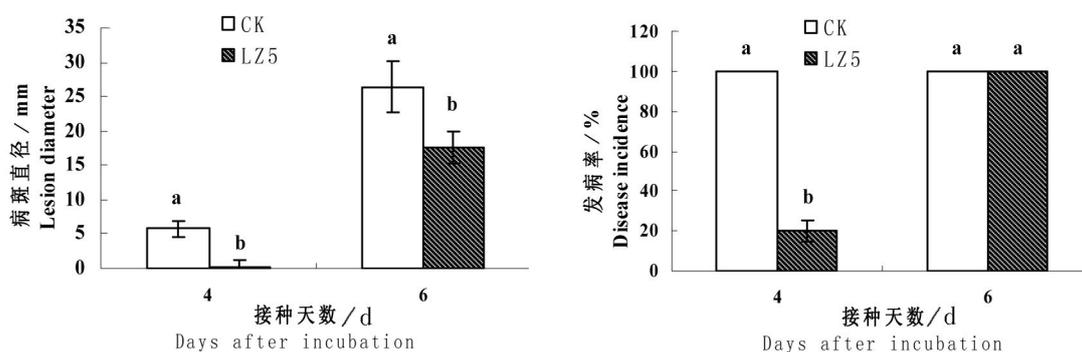


图 2 菌株 LZ5 对芒果果实病斑直径 (A) 和发病率 (B) 的影响

图中误差棒代表两次重复试验的标准差。柱状图上的不同小写字母表示通过邓肯多重范围分析差异显著 ($P = 0.05$)

Fig. 2 Effects of strain LZ5 on lesion diameter (A) and disease incidence (B) of mango fruit.

Bars represent standard errors of two replications. Values followed

by different letters were significantly different ($P = 0.05$ Duncan's Multiple Range Test)

2.1.3 菌株 LZ5 在芒果果实伤口定殖能力的测定结果 图 3 表明,在芒果果实伤口处菌株 LZ5 在接种 24 h 后迅速繁殖,酵母数量由 1.23×10^5 cfu · mL⁻¹ 增加到 7.75×10^6 cfu · mL⁻¹,并达到最高值,增加了 62.6 倍,随后基本保持稳定。结果表明,菌株 LZ5 能够在芒果伤口处快速定殖并保持稳定,具有很好的生物防治潜质。

2.2 菌株 LZ5 的形态学特征 普通光学显微镜下,菌株 LZ5 的形态学特征见图 4。由图 4 可见,菌株 LZ5 在 YPD 固体培养基上培养 3 d 后菌落为乳白色,圆形,隆起,表面光滑,边缘规则(图 4 - A)。细胞形态较小,为 $(1.5 \sim 2) \times (5 \sim 6)$ μm,呈卵圆形,无性繁殖为出芽生殖,且无假菌丝形成(图 4 - B)。

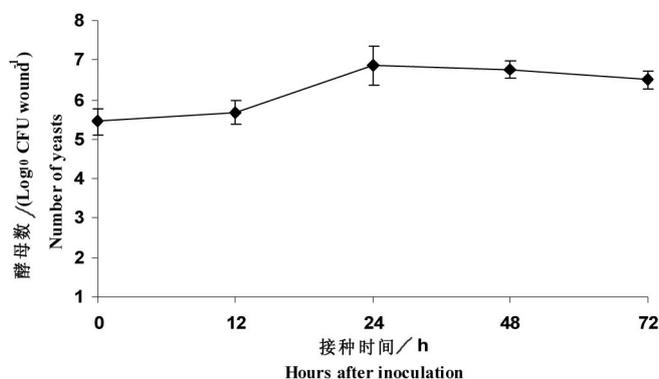


图 3 菌株 LZ5 在芒果果实伤口的生长动态
误差棒表示 2 次重复试验的标准差

Fig. 3 Population dynamics of strain LZ5 in wounds of mango fruit Bars represent standard errors of two replications

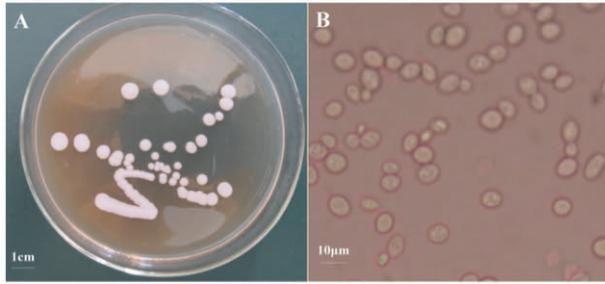


图4 菌株 LZ5 菌落形态(A)和细胞形态(B)
Fig.4 Photographs of colonies (A) and cells (B) of the strain LZ5

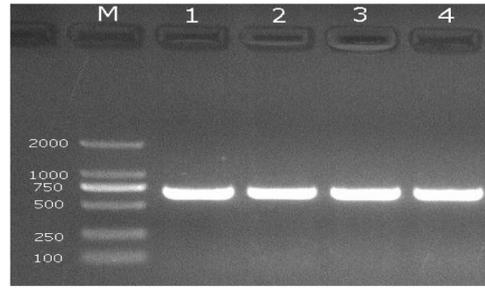


图5 菌株 LZ5 26S rDNA D1/D2 序列的 PCR 扩增产物
M;DNA 标记;1-4;菌株 LZ5 的 PCR 结果
Fig.5 PCR amplification of 26S rDNA D1/D2 sequence of the strain LZ5
M;DNA Marker;1-4;mean PCR results of the strain LZ5

2.3 生理生化试验结果 菌株 LZ5 的生理生化特征见表 1。对照《酵母菌的特征与鉴定手册》^[15] 检索表,菌株 LZ5 应该属于毕赤酵母属的成员,与季也蒙毕赤酵母(*M. guilliermondii*) 的特征相似。

表 1 菌株 LZ5 的生理生化特征

Tab.1 Physiological and biochemical traits of the strain LZ5

糖发酵 Sugar fermentation		碳源同化 Carbon source assimilation		氮源同化 Nitrogen source assimilation		其他 others					
葡萄糖 Glucose	+	半乳糖 Galactose	+	菊糖 Inulin	+	核糖醇 Ribitol	+	硝酸盐 Nitrate	+	37 °C 生长 Growth at 37 °C	+
半乳糖 Galactose	+	蔗糖 Sucrose	+	可溶性淀粉 Soluble starch	+	甜醇 Galactitol	+			40 °C 生长 Growth at 40 °C	-
蔗糖 Sucrose	+	麦芽糖 Maltose	+	D - 木糖 D - Xylose	+	琥珀酸 Succinic acid	+				
麦芽糖 Maltose	-	纤维二糖 Cellobiose	+	D - 甘露醇 D - Mannitol	+	山梨醇 Sorbitol	+				
乳糖 Lactose	-	海藻糖 Trehalose	+	肌醇 Inositol	+	柠檬酸 Citric acid	+				
棉子糖 Raffinose	+	乳糖 Lactose	+	L - 阿拉伯糖 L - Arabinose	+	水杨苷 Salicin	+				
		蜜二糖 Melibiose	+	甘油 Glycerol	+	DL - 乳酸 DL - Lactic acid	+				
		棉子糖 Raffinose	+	L - 鼠李糖 L - Rhamnose	+	D - 甘露醇 D - Mannitol	+				
		松三糖 Melezitose	+	赤藓糖醇 Erythritol	+						

注: + 为阳性, - 为阴性。

Noté “+” positive, “-” negative.

2.4 26S rDNA D1/D2 序列的 PCR 扩增及序列比对分析结果 PCR 扩增结果(见图 5)显示,扩增得到的序列大小约 540 bp,与预期的大小基本符合。将扩增得到的产物经过纯化、转化后对其 26S rDNA D1/D2 序列进行测序,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 LZ5 与 GenBank 中 *M. guilliermondii* 的 26S rDNA D1/D2 序列相似性高达 99%。根据同源性比较结果,可以初步确定菌株 LZ5 为季也蒙毕赤酵母(*M. guilliermondii*)。从 GenBank 中选择与菌株 LZ5 相似性较高的 6 个属的酵母菌株 26S rDNA D1/D2 序列进行同源性比较,构建系统进化树。由图 6 可知,菌株 LZ5 与 *M. guilliermondii* 处于同一分支,说明它们亲缘关系最近,由此进一步证明,菌株 LZ5 为 *M. guilliermondii*。

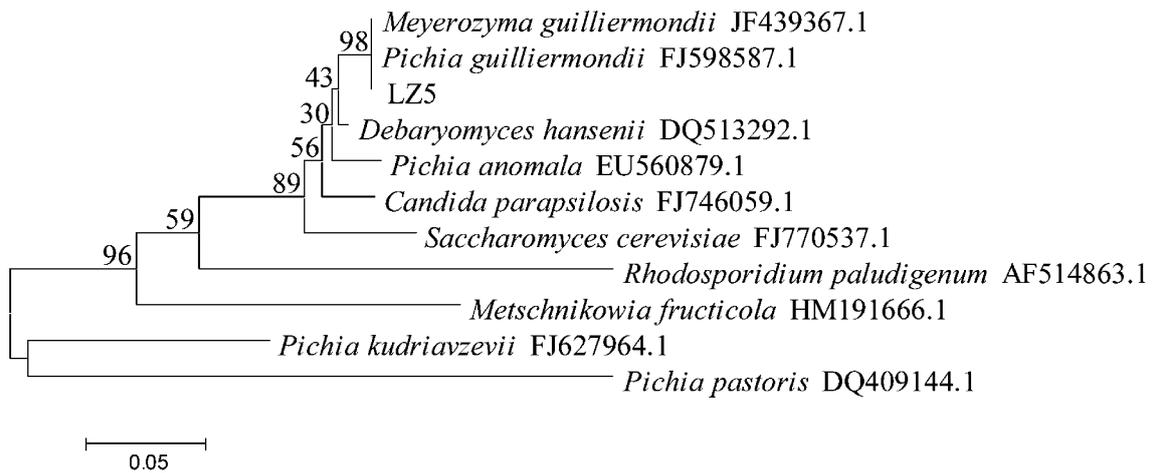


图 6 菌株 LZ5 的系统发育树

Fig. 6 Phylogenetic tree of the strain LZ5

3 讨论

酵母拮抗菌在多种水果如苹果、梨、柑桔、桃、甜樱桃、猕猴桃、葡萄、草莓等的主要采后病害防治上都取得一定程度的效果,但由于不同菌种对不同种病害的生防效果有很大差异^[16],因此,筛选对某种病原菌具有高度抑制作用的拮抗菌对该病害的采后生物防治来说至关重要。室内平板对峙试验、刺伤接种试验都证实菌株 LZ5 对芒果采后炭疽病菌具有明显的抑制作用。菌株 LZ5 在芒果果实伤口生长动态的测定结果显示,菌株 LZ5 不仅具有较强的繁殖能力而且能在果实表面或伤口处有较强的定殖能力,说明热带地区分离的拮抗酵母适应当地的气候条件。菌株 LZ5 鉴定为 *M. guilliermondii* LZ5。

据前人报道,已发现拮抗菌 *M. guilliermondii* 能够有效抑制苹果采后青霉病和灰霉病的发生^[17],同时对辣椒炭疽病菌及番木瓜炭疽病菌也具有较好的抑制效果^[18-19]。本实验筛选得到的菌株对芒果采后炭疽病具有较好的防治效果,且目前尚未发现关于 *M. guilliermondii* 对芒果采后炭疽病菌有拮抗作用的报道。因此,本实验结果对芒果采后炭疽病的生物防治具有一定指导意义,将来可以结合其他采后病害防治技术如冷库、气调库和低毒杀菌剂或无机盐类等进行防治,有望取得更好的防治效果。

参考文献:

- [1] DODD J C, PRUSKY D, JEFFRIES P. Fruit diseases [M]. //LITZ R E (Ed.), The Mango: Botany, Production and Uses. Cambridge: CAB International, UK, 1997: 257 - 280.
- [2] JOHNSON G I, SHARP J L, MILNE D L, et al. Postharvest technology and quarantine treatments [M]. //LITZ R E (Ed.), The mango: Botany, Production and Uses. Cambridge: CAB International, 1997: 447 - 507.
- [3] KOBILER I, SHALOM Y, ROTH I, et al. Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on the incidence of side and stem end rots in mango fruits [J]. Postharvest Biol Technol, 2001, 23(1): 23 - 32.
- [4] DROBY S, WISNIEWSKI M, MACARISIN D, et al. Twenty years of postharvest biocontrol research: is it time for a new paradigm? [J]. Postharvest Biol Technol, 2009, 52(2): 137 - 145.
- [5] JANISIEWICZ W J, CONWAY W S. Combining biological control with physical and chemical treatments to control fruit decay after harvest [J]. Stewart Postharvest Revie, 2010, 6(1): 1 - 16.
- [6] SHARMA R R, SINGH D, SINGH R. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: a review [J]. Biol Control, 2009, 50(3): 205 - 221.
- [7] LIU H M, GUO J, LUO L, et al. Improvement of Hanseniaspora uvarum biocontrol activity against gray mold by the addition of ammonium molybdate and the possible mechanisms involved [J]. Crop Prot, 2010, 29(1): 277 - 282.
- [8] 范青, 田世平, 姜爱丽, 等. 采摘后果实病害生物防治拮抗菌的筛选和分离 [J]. 中国环境科学, 2001, 21(4): 313 - 316.
- [9] JANISIEWICZ W J, KORSTEN L. Biological control of postharvest diseases of fruits [J]. Annu Rev Phytopatho, 2002, 40: 411 - 441.

- [10] WANG Y , REN X , SONG X , et al. Control of postharvest decay on cherry tomatoes by marine yeast *Rhodospiridium paludigenum* and calcium chloride [J]. *J Appl Microbiol* , 2010 , 109(2) : 651 – 656.
- [11] SANZANI S M , NIGRO F , MARI M , et al. Innovations in the control of postharvest diseases of fresh fruit and vegetables [J]. *Arab Journal of Plant Protection* , 2009 27(2) : 240 – 244.
- [12] SCHERM B , ORTU G , MUZZU A , et al. Biocontrol activity of antagonistic yeasts against *Penicillium expansum* on apple [J]. *J Plant Path* , 2003 85(3) : 205 – 213.
- [13] JANISIEWICZ W J , USALL J , BORS B. Nutritional enhancement of biocontrol of blue mold on apples [J]. *Phytopathology* , 1992 82(11) : 1364 – 1370.
- [14] 沈萍 , 范秀容 , 李广武. 微生物学实验 [M]. 3 版. 北京: 高等教育出版社 , 1999.
- [15] 巴尼特 J A , 佩恩 R W , 亚罗 D . 酵母菌的特征与鉴定手册 [M]. 胡瑞卿译 , 青岛: 青岛海洋大学出版社 , 1991: 60 – 117.
- [16] FILONOW A B , VISHNIAC H S , ANDERSON J A , et al. Biological control of *Botrytis cinerea* in apples by yeast from various habitats and their putative mechanisms of antagonism [J]. *Biol Control* , 1996 , 7: 212 – 220.
- [17] JANISIEWICZ W J. 1988. Biological control of postharvest diseases of apple with antagonists' mixtures. *Phytopathology* , 78: 194 – 198.
- [18] CHANCHAICHAOVIVAT A , RUENWONGSA P , PANIJPAN B. Screening and identification of yeast strains from fruits and vegetables: Potential for biological control of postharvest chilli anthracnose (*Colletotrichum capsici*). *Biol Control* , 2007 42: 326 – 335.
- [19] LIMA J R , GONDIM D M F , OLIVEIRA J T A , et al. Use of killer yeast in the management of postharvest papaya anthracnose. *Postharvest Biol Technol* , 2013: 58 – 64.

Classification and Identification of a New Isolated Yeast Strain and Its Biocontrol Activity against Postharvest Anthracnose of Mango Fruit

GAO Yunkai¹ , ZHANG Rongyi¹ , ZHONG Liwen² , SONG Haichao¹ , SHI Xuequn¹

(1. College of Environment and Plant Protection , Hainan University , Haikou 570228 , China;

2. College of Horticulture and Landscape Architecture , Hainan University , Haikou 570228 , China)

Abstract: A new antagonistic yeast strain (LZ5) was isolated from a mango orchard in Hainan Province. Antagonistic activity of this yeast strain was evaluated against postharvest anthracnose of mango fruit caused by *Colletotrichum gloeosporioides* through *in vitro* and *in vivo* assays. *In vivo* inoculation assay revealed that 1×10^8 cfu \cdot mL⁻¹ of the yeast strain had significant biocontrol activity against *C. gloeosporioides*. The lesion diameter of the anthracnose pathogenic fungi was 5.80 mm in the control and 0.33 mm in the test group after 4 days of inoculation at 25°C , and 26.3 mm in the control and 17.6 mm in the test group after 6 days at 25°C , respectively , and the disease incidence was 100% in the control and 20% in the test group after 4 days of inoculation. Moreover , it was observed that the yeast strain LZ5 grew rapidly on the wounds of mango fruit. The yeast cell population increased 62.6-fold 24 h after inoculation and was then stabilized for the rest of the storage period. The yeast strain LZ5 was identified as *Meyerozyma guilliermondii*.

Key words: mango; *Colletotrichum gloeosporioides*; *Meyerozyma guilliermondii*; biological control