

拮抗酵母菌 与

果蔬采后病害防治

ANTAGONISTIC YEAST & BIOCONTROL OF
POSTHARVEST DISEASE OF FRUITS AND VEGETABLES



王友升◎著

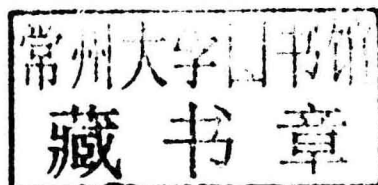
知识产权出版社

全国百佳图书出版单位

拮抗酵母菌与果蔬采后病害防治

ANTAGONISTIC YEAST & BIOCONTROL OF POSTHARVEST
DISEASE OF FRUITS AND VEGETABLES

王友升 著



内容提要

本书共分为8章,首先,从果蔬采后病害生物防治目前的研究现状入手,结合拮抗酵母菌的来源、作用谱、作用方式等生物学特性,重点阐述了拮抗酵母菌的作用机理及影响因素;其次,本书从是否产生抑菌物质、是否对人体存在致病性、对环境以及果实品质有无影响方面论述了拮抗酵母菌的安全性;最后,本书介绍了拮抗酵母菌的增效途径、规模化生产的培养基配方构建、液体剂型的制备等内容,为拮抗酵母菌的规模化生产及工厂化应用提供理论依据。

责任编辑:邢艳萍

图书在版编目(CIP)数据

拮抗酵母菌与果蔬采后病害防治/王友升著. —北京:知识产权出版社,2012.8
ISBN 978-7-5130-1458-8

I. ①拮… II. ①王… III. ①拮抗微生物—酵母菌—研究 IV. ①TQ92

中国版本图书馆CIP数据核字(2012)第190860号

拮抗酵母菌与果蔬采后病害防治

JIEKANG XIAOMUJUN YU GUOSHU CAIHOU BINGHAI FANGZHI

王友升 著

出版发行: 知识产权出版社

社址: 北京市海淀区马甸南村1号

网 址: <http://www.ipph.cn>

发行电话: 010-82000860 转 8101/8102

责编电话: 010-82000860 转 8180

印 刷: 三河市国英印刷厂

开 本: 787mm × 1092mm 1/16

版 次: 2012年8月第1版

字 数: 297千字

ISBN 978-7-5130-1458-8/TQ · 002(10381)

邮 编: 100088

邮 箱: bjb@cnipr.com

传 真: 010-82000893

责编邮箱: xingyanping@cnipr.com

经 销: 新华书店及相关销售网点

印 张: 14.75

印 次: 2012年8月第1次印刷

定 价: 45.00元

出版权专有 侵权必究

如有印装质量问题,本社负责调换。

前言

作为生物防治的一个重要分支，果蔬采后病害的生物防治始于 20 世纪 50 年代，至 20 世纪 80 年代，以枯草芽孢杆菌为代表的拮抗细菌的研究发展迅速，目前已有一些拮抗细菌产品可实现商业化应用。然而，由于拮抗细菌的主要抑病机理是产生抗菌素，人们对抗菌素可诱发病原菌产生抗药性以及对食用者健康可能产生不利影响的担忧，促使研究者转向更安全、高效、低毒、低抗性的控制果蔬采后病害新技术——拮抗酵母菌的研发。酵母菌主要通过和病原菌进行营养和空间竞争来防治病害，且拮抗酵母菌能够适应低温、低氧、高二氧化碳等果实采后贮藏条件，20 世纪 90 年代以来，利用酵母菌防治果蔬采后病害成为国内外的研究热点。

中国科学院植物研究所率先在国内开展利用拮抗酵母菌控制果蔬采后病害的研究。10 年前，在植物所攻读博士学位期间，笔者有幸开始涉入这一新兴领域，系统学习了拮抗酵母菌的抑病机理和菌剂制备等知识。随后，在国家自然科学基金、北京市自然科学基金、北京市科技新星、北京市教委科技计划等多个研究项目的支持下，笔者围绕拮抗酵母菌的菌株特性、营养需求、抑病机理、增效途径、菌剂制备及稳定性等方面，开展了较为系统的研究工作。同时在讲授《食品贮藏与保鲜》、《食品生物安全》等课程期间，笔者专门开设“果蔬采后病害生物防治”专题，与学生们一起分享拮抗酵母菌领域的最新研究成果。然而，在实际接触中笔者发现，虽然这一新兴领域的国内外研究成果众多，但缺乏系统总结、形成体系、易于理解和掌握的著作。基于此，在广泛查阅国内外研究成果的基础上，笔者结合自己多年的研究成果，整理完成了本著作，希望能为本科生、研究生全面了解食品保鲜、生物防治等领域的研究背景、研究思路提供指导，也为相关领域科研工作者提供有价值的参考。

本书共分为 8 章，第一章介绍了果蔬采后病害发生的特点及防治措施，重点讲述了利用生物拮抗菌防治果蔬采后病害的研究进展；第二章论述拮抗酵母菌的来源、作用谱、作用方式等生物学特性；第三章揭示拮抗酵母菌、病原菌与寄主的互作效应，重点阐述拮抗酵母菌的作用机理及影响因素；第四章从是否产生抑菌物质、是否对人体存在致病性、对环境以及果实品质的影响三方面论述了拮抗酵母菌的安全性；第五章介绍了包括化学物质、生物活性物质、采后处理及贮藏条件等方面的拮抗酵母菌的增效途径，并提供抗坏血酸钠的增效实例；第六章提供了拮抗酵母菌培养基配方构建及培养条件优化的研究实例；第七章介绍拮抗酵

母菌冷冻干燥制品的制备及货架期的研究成果；第八章论述了拮抗酵母菌液体剂型的制备思路及生活力丧失的机理。

在本书即将出版之际，我要感谢为这本书的出版付出辛勤劳动的老师 and 学生们。首先，我要真诚地感谢我的导师中国科学院植物研究所田世平研究员，是她带领我进入果蔬采后生物防治这一新兴领域，本书既是我3年博士工作的系统总结，也包含着7年的工作沉淀。其次，我要感谢同我一起成长的北京工商大学的学生们，赵重甲、朱昱燕、焦雯、黄雅、刘广玥、张忠福、翟宪玲、姚子鹏、胡俊兰、王子敬、王郅媛等在完成毕业论文、参与科研创新实践过程中，在拮抗酵母菌的生物学特性、安全性以及制品稳定性等方面的研究成果，为本书提供了坚实的材料；尤其是要感谢在这个酷暑参与文献资料整理、文字编写的研究生们，她们是陈玉娟、张燕、谷祖臣、安琳、田元元、何欣萌。

本书在编写过程中得到了北京工商大学食品学院、食品添加剂与配料北京高校工程中心、北京市食品风味化学重点实验室的大力支持，在此表示衷心的感谢！同时，特向本书所引用资料的研究者致以诚挚的谢意！由于水平所限，书中难免存在疏漏和不足，恳请同行和读者能给予批评和指正。

王友升
2012年8月

目 录

前 言	(1)
第一章 果蔬采后病害的防治	(1)
第一节 果蔬采后病害的发生特点及防治	(1)
第二节 生物拮抗菌防治果蔬采后病害	(4)
第三节 拮抗酵母菌防治果蔬采后病害的研究	(7)
本章结论	(11)
第二章 拮抗酵母菌的生物学特性	(12)
第一节 拮抗酵母菌的生物学特征及来源	(12)
第二节 拮抗酵母菌的抑病效果及特点分析	(25)
第三节 拮抗酵母菌的菌株特异性研究	(47)
本章结论	(53)
第三章 拮抗酵母菌、病原菌与寄主的互作效应	(54)
第一节 拮抗酵母菌的作用机理	(54)
第二节 温度对拮抗酵母菌、病原菌与果实互作效应的影响	(64)
第三节 拮抗酵母菌与不同病原菌在果实上的互作效应	(76)
本章结论	(90)
第四章 拮抗酵母菌的安全性	(92)
第一节 拮抗酵母菌是否产生抑菌物质	(92)
第二节 拮抗酵母菌对人体的致病性	(103)
第三节 拮抗酵母菌对环境及果实品质的影响	(105)
本章结论	(109)
第五章 拮抗酵母菌的增效途径	(110)
第一节 拮抗酵母菌与化学物质配合	(110)
第二节 拮抗酵母菌与其他生物源组分配合	(115)
第三节 拮抗酵母菌与采后处理及贮藏条件配合	(119)
第四节 抗坏血酸钠提高拮抗酵母菌对甜樱桃褐腐病的抑病效力	(121)
本章结论	(126)

第六章 拮抗酵母菌培养基组方及培养条件优化·····	(127)
第一节 拮抗酵母菌的培养基组方·····	(127)
第二节 拮抗酵母菌的培养条件优化·····	(142)
本章结论·····	(150)
第七章 拮抗酵母菌冷冻干燥制品的制备及货架期·····	(151)
第一节 拮抗酵母菌冷冻干燥制品的制备·····	(151)
第二节 拮抗酵母菌冷冻干燥制品的货架期·····	(160)
本章结论·····	(164)
第八章 拮抗酵母菌液体剂型制备及生活力丧失机理·····	(165)
第一节 不同保护剂对拮抗酵母菌液体菌剂生活力的影响·····	(165)
第二节 柠檬酸钠诱导拮抗酵母菌的细胞凋亡·····	(172)
第三节 活性氧在柠檬酸钠诱导罗伦隐球酵母生活力丧失中的作用·····	(179)
本章结论·····	(184)
参考文献·····	(185)
缩略词·····	(221)

第一章 果蔬采后病害的防治

第一节 果蔬采后病害的发生特点及防治

我国是世界水果生产第一大国，每年水果产量约占全球的 14%，但水果采后损失严重，高达 20% ~ 30%，造成巨大的经济损失。尽管新鲜果蔬的品质劣变受诸多因素的影响，但病害是最主要的原因。采后病害（Postharvest Disease）是指果蔬从采收到消费者手中期间所发生的病害，包括收获、分级、包装、贮藏、运输、销售等各环节中发生的病害。

采后病害按其病因可分为两大类：一类是非生物因素造成的生理性病害，另一类为寄生物侵染引起的传染性病害。本研究所涉及的采后病害是指传染性病害。

1 果蔬采后病害的发生特点

一般说来，导致果蔬采后病害的病原物主要来源于以下途径：田间无症状，但已被侵染的果蔬产品；产品污染的带菌土壤或病原菌；贮藏期间已发病的果蔬产品；广泛分布在贮库及工具上的某些腐生菌或弱寄生菌。这些病原物导致的果蔬采后病害的发生特点主要有以下 6 个方面。

1.1 病原物主要是真菌与细菌

水果类产品多数酸度较低（ $\text{pH} < 5$ ），对细菌具备较好的抗性，不宜细菌生长，但却对采后真菌的生长有利，因而水果采后期间的腐烂几乎全由真菌引起。

真菌的主要特点有：营养体简单，大多为菌丝体；细胞壁主要成分为几丁质，有的为纤维素，少数真菌的营养体为不具细胞壁的原质团；由于没有叶绿素或其他可进行光合作用的色素，需要从外界吸收营养物质；通过有性或无性繁殖，产生各种类型的孢子；具有营腐生、寄生、共生、超寄生等习性。

蔬菜腐烂多与细菌有关，这是由于多数蔬菜的根、茎、叶的酸度相对较高（ $\text{pH} 4.5 \sim 7.0$ ），因而易受软腐细菌的侵袭。

引起果蔬采后病害的细菌主要是薄壁菌门的欧氏杆菌属（*Erwinia*）中的两个亚种：一个是软腐欧氏杆菌（*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*），可导致白

菜、辣椒、胡萝卜等蔬菜发生软腐病，有时还可危害水果；另一个是黑胫病杆菌 (*Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*)，该菌除引起马铃薯黑胫病外，还导致多种蔬菜发生病害。

另外，边缘假单胞杆菌 (*Pseudomonas marginalis*) 可引起黄瓜、芹菜、莴苣、番茄和甘蓝的软腐病。假单胞杆菌引起的软腐病症状与欧氏杆菌相似，但不良气味相对较弱。在番茄、圆椒等果菜类以及瓜类中，细菌性腐烂也较常见。例如，番茄的软腐病病斑中 pH 值较高 ($\text{pH} > 5.0$)，而周围健康组织的 pH 值较低 ($\text{pH} = 4.3 \sim 4.5$)，说明细菌具备对环境的缓冲能力。

有明显病毒病害特征的产品，采后容易被剔除；而未显示症状的产品，则由于在采后贮藏环境下缺乏传播媒介，并且发病也需要较长的时间，因此采后很难发病。

一般说来，果蔬采后需要经过严格的清洗、涂膜、包装等商品化处理措施，而植物病原线虫的生存基本上离不开土壤，因而采后线虫病害并不多见。

1.2 伤害经常是病害发生的前提

果蔬产品采后处理易造成伤口，伤口的存在更易于病原菌的侵入，也可以直接侵入寄主的大多数病原真菌。

此外，一些微小的擦伤或磨损，肉眼不易看清，只有当病原菌侵入发病后才会被发现。

1.3 采后病害大多数来自于田间

病原菌来自于田间的途径主要有：(1) 病原菌有潜伏侵染或被抑侵染的特性，病原菌侵入很早，因各种原因长期潜伏，直到环境适宜或产品成熟才发病。(2) 病原菌在田间侵入很早，但病程长，在贮藏期间陆续发病，产品内部被破坏。(3) 病原菌侵染较晚，一时因外界环境条件不适合而未发病，貌似正常。

1.4 生物与非生物因素的界限不明显

果蔬在采后贮藏过程中会发生截然分明的生理病害，如柑桔褐斑病、梨黑心病、苹果褐烫病、苦痘病、白菜干烧心，这些病害在发生初期的症状容易判别，但这一过程持续的时间较短，很快就会被病原菌侵入而成为传染性病害，导致症状难以辨别。

1.5 复合侵染具有重要地位

第一次侵入的病原菌一般要求有较强的致病力，它们能够直接侵入或通过伤口、孔口侵入。而第二次侵入的病原菌往往腐生性较强，或是致病力非常弱的病

原菌，它们需要在寄主的抗病能力被破坏后才能成功侵入。但第二次侵入的病原菌破坏能力往往超过第一次，它们能够大大加速产品的腐败。

1.6 果蔬采后的病原菌毒素污染问题较严重

产生毒素是病原菌侵染寄主的重要手段之一。毒素不但对寄主具有特定的生理作用，也能对人和其他动物产生一定伤害。果蔬贮藏期间可产生毒素的真菌主要有曲霉属 (*Aspergillus* spp.)、镰刀霉属 (*Fusarium* spp.)、青霉属 (*Penicillium* spp.) 等。

2 果蔬采后病害的防治措施

防治果蔬采后病害的途径很多，主要分为农业防治、物理防治、化学防治和生物防治等，上述防治的作用原理均主要涉及：(1) 减少菌源；(2) 最大限度地预防或减少田间感染；(3) 导致伤口感染的病原菌失活；(4) 抑制病害的扩展和传播；(5) 延缓果蔬的成熟和衰老，维持其抗病性。

2.1 农业防治

通过采用适当的田间管理措施，可以降低病原物的数量，提高果蔬的抗病性。例如，对伤口引起的采后病害，应尽量避免擦伤磨损，可减少病原菌侵入机会；对于易产生青霉病 (*Penicillium italicum*) 和绿霉病 (*Penicillium digitatum*) 的柑桔果实，可采用纸或薄膜单果包装。

2.2 物理防治

物理防治主要指调控果蔬的采后贮藏环境条件，例如，控制温度、湿度，调节空气成分及提高寄主的抗病性。具体的措施有采后热处理、辐射处理、涂膜处理，以及低温贮藏、气调贮藏 (controlled atmosphere storage, CA) 等。

2.3 化学防治

化学防治是指通过使用化学杀菌剂来防治果蔬采后病害，杀菌剂可在采前、采后等各环节使用。目前控制水果采后病害的主要措施是化学防治 (Eckert & Ogawa, 1985, 1988)。化学防治的优点是高效、迅速、使用方便、(局部) 经济效益高。然而，长期使用化学农药不但导致病原菌产生耐药性而降低杀菌效果 (Prusky *et al.*, 1985; Viñas *et al.*, 1991; Holmes & Eckert, 1999)，而且频繁地使用高浓度的化学药剂也增加了果实上的农药残留从而导致农产品安全问题，并造成环境污染 (Gullino & Kuijpers, 1994)。

第二节 生物拮抗菌防治果蔬采后病害

在无污染食品日益受到人们重视的今天,新鲜水果在食品中占有越来越高分量的同时,化学防治果蔬采后病害存在的上述缺点而导致的安全性问题也得到了密切关注。当前,开发安全、高效、无毒、低抗性、无公害的控制果蔬采后病害新技术成为当前世界各国的研究重点 (Falik *et al.*, 1995; Tian *et al.*, 2001a; Kulakiotu *et al.*, 2004), 其中利用生物拮抗菌防治果蔬采后病害是目前被证明安全有效的新方法 (Wilson & Wisniewski, 1989; Janisiewicz & Koersten, 2002)。

1 生物拮抗菌防治的定义及特点

生物拮抗菌防治,即生物防治,是指利用微生物之间的拮抗作用,选择对农作物或农产品不造成危害的微生物来抑制病原菌的生长。果蔬生物防治即采用对果实致病菌起拮抗作用的微生物来控制果实病害发生。

一种理想的生物拮抗菌,应具有如下特性:(1)遗传性稳定;(2)低浓度即发挥防治效果;(3)作用谱广;(4)对寄主不致病;(5)能抵抗各种逆境;(6)对杀虫剂具有一定抗性;(7)不产生对人体有害的代谢物质;(8)能与采后物理或化学防治措施配合使用;(9)营养需求不苛刻;(10)具有有效贮藏、运输和使用的产品形式 (Wilson & Wisniewski, 1989)。

与其他防治措施相比,生物拮抗菌防治的特点有以下方面:(1)防治机理基于微生物生态学原理,包括竞争、寄生及其综合作用等,符合天然、环保的理念;(2)微生物的生长增殖速度快,易于规模化制备;(3)单独采用生物拮抗菌的抑菌效果往往比不上化学杀菌剂,这限制了生物拮抗菌的产业化应用;(4)与一般化学杀菌剂贮存2年以上也能保持稳定的防治效果相比,生物拮抗菌剂存放1年以上防治效果会明显下降,甚至丧失,这也是限制生物拮抗菌剂产业化应用的主要瓶颈之一。

2 生物拮抗菌的类型

迄今为止,各国科学家已经筛选出了许多对水果采后病原真菌具有明显抑菌效果的细菌、酵母菌和小型丝状真菌 (田世平和范青, 2000)。下面简单介绍一些具有生防效果的拮抗细菌和小型丝状真菌,拮抗酵母菌作为本书的主要内容,将在后面各章节中详细介绍。

2.1 细菌

Gutter & Littauer (1953) 报道枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 对柑橘病害

的抑制作用,是利用生物拮抗菌进行果蔬采后病害防治的最早记录。到 20 世纪 80 年代,随着农作物大田病害生物防治的发展,已逐步证实 *B. subtilis* 对油桃、桃、李、杏等核果类果实褐腐病 (*Monilinia fructicola*) (Pusey & Wilson, 1984)、柑橘绿霉病 (*P. digitatum*)、酸腐病 (*Geotrichum candidum* Link)、蒂腐病 (*Botryodiplodia theobromae*, *Phomopsis citri* Fawc, *Alternaria citri* Ell. & Pierce) (Singh & Deverall, 1984; 范青等, 2000a)、樱桃灰霉病 (*Botrytis cinerea*) (Utkhede & Sholberg, 1986; Zhao *et al.*, 2007)、甜瓜黑斑病 (*Alternaria alternata*) (Yang *et al.*, 2006)、鳄梨蒂腐病 (*Botryodiplodia theobromae* Pat.) (Demoz & Korsten, 2006) 以及草莓灰霉病 (*B. cinerea*) (Utkhede & Sholberg, 1986; Zhao *et al.*, 2007) 等均具有良好的防治效果。

此外,芽孢杆菌属其他细菌的生防效果也已被证实。例如,短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilus*) 可抑制梨果实灰霉病 (*B. cinerea*) (Mari *et al.*, 1996),地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis* (Weigmann) Verhoeven) 可有效抑制芒果炭疽病 (*Colletotrichum gloeosporioides*) 和蒂腐病 (*Dothiorella gregaria* Sacc.) (Govender *et al.*, 2005)。

目前,以 *B. subtilis* 为有效成分的生物拮抗菌制剂已经得到商业化应用。例如,杀菌剂 Serenade (Agro Quess Inc., USA) 的有效成分为 *B. subtilis*, 用于防治苹果、梨、葡萄以及一些蔬菜的白粉病 (powdery mildew)、晚疫病 (late blight)、褐腐病 (brown rot)、火疫病 (fire blight); 杀菌剂 Rhio - plus (KFZB Biotechnick, Germany) 的有效菌株为 *B. subtilis* FZB 24, 可防治马铃薯等蔬菜的白粉病和根腐病 (root rots)。

另一个报道较多的是假单胞菌属的细菌,例如,可防治苹果、梨等果实青霉病 (*Penicillium expansum*)、灰霉病 (*B. cinerea*) 的洋葱假单胞菌 (*Pseudomonas cepacia* Burkh) (Janisiewicz & Roitman, 1988)、荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens* migula) (Mikani *et al.*, 2008) 和丁香假单胞菌 (*Pseudomonas syringae* Van Halt) (Janisiewicz, 1987; Zhou *et al.*, 2001, 2002); 对柑橘绿霉病 (*P. digitatum*) 和青霉病 (*P. italicum*) 有抑制作用的 *P. syringae* (Wilson & Chalutz, 1989)、*P. cepacia* (Huang *et al.*, 1993) 和 *Pseudomonas glathei* (Huang *et al.*, 1995); 对桃、油桃等果实褐腐病 (*M. fructicola*) 有生防效果的 *P. cepacia*、皱纹假单胞菌 (*Pseudomonas corrugata* Roberts & Scarlett) 和 *P. syringae* (Smilanik *et al.*, 1993; Zhou *et al.*, 1999); 此外,还有防治卷心菜细菌性软腐病 (*Erwinia carotovora* subsp. *Carotovora*) 的铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa* (Schroter) migula) (Adeline & Sijam, 1999) 以及防治香蕉炭疽病 (*Colletotrichum musae*) 的假单胞菌属细菌 (*Pseudomonas* sp.) (Costa & Subasinghe, 1998)。

在美国登记的生物拮抗菌产品 Biosave (Eco Science Corporation, USA), 有效菌株为 *P. syringae* (strain 10 LP, 110), 可防治苹果、梨、柑橘、樱桃、马铃薯等果蔬的青霉病、灰霉病、毛霉病、酸腐病等。生物拮抗菌产品 Blight Ban A

506 (Nu Farm, Inc., USA) 的有效菌株为 *P. fluorescens* A506, 可防治苹果、梨、草莓、马铃薯等果蔬的火疫病 (fire blight) 和软腐病 (soft rot)。

2.2 小型丝状真菌

Janisiewicz (1988) 最早发现 1 株分离于苹果叶的真菌能有效抑制苹果 *B. cinerea*, 经鉴定为短小枝顶孢霉 (*Acremonium breve*)。目前报道较多的是木霉属丝状真菌, 例如, 哈茨木霉 (*Trichoderma harzianum* Rifai) 可有效控制香蕉炭疽病 (*C. musae*) (Devi & Arumugam, 2005), 梨、葡萄、猕猴桃和草莓等果实灰霉病 (*B. cinerea*) (Batta, 2007), 以及红毛丹果实的炭疽病 (*C. gloeosporioides*)、褐斑病 (*Glioclathotrichum microchlamydosporum*) 和蒂腐病 (*B. theobromae*); 绿色木霉 (*Trichoderma viride* Persoon: Fries) 可有效控制草莓灰霉病 (*B. cinerea*) (Tronsmo & Denis, 1977)、柑橘绿霉病 (*P. digitatum*) (de - Matos, 1983) 和芒果蒂腐病 (*B. theobromae*) (Kota *et al.*, 2006) (图 1-1)。

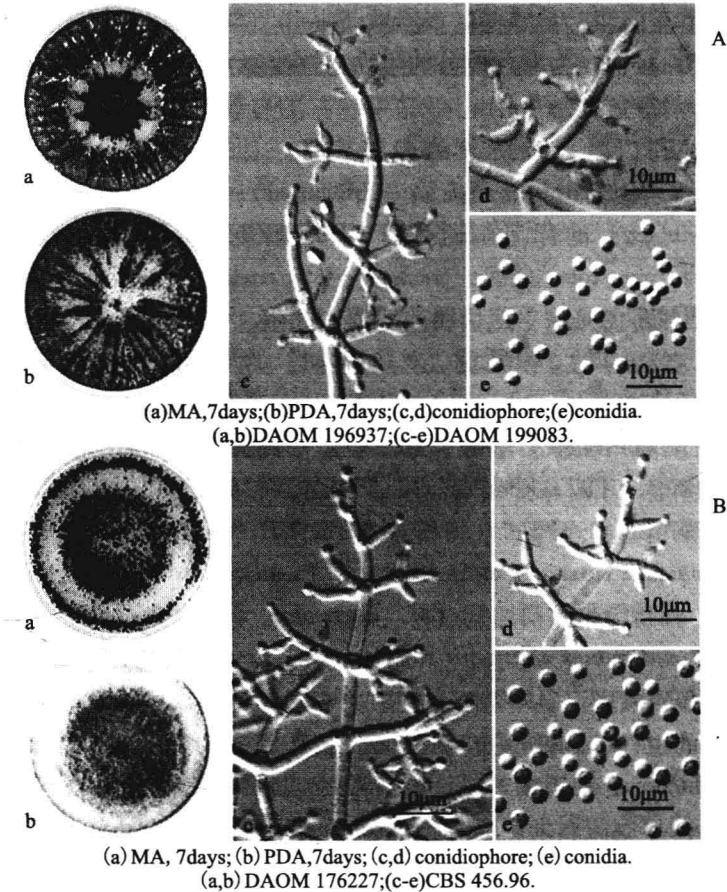


图 1-1 哈茨木霉 *T. harzianum* (A) 和绿色木霉 *T. viride* (B) 的菌落及显微结构 (来自 Biolog Identification System)

此外,露湿漆斑菌 (*Myrothecium roridum*) 可抑制柠檬果实绿霉病 (*P. digitatum*) (Appel *et al.*, 1988)。据报道, *Penicillium* sp. 弱株 (*Penicillium* sp. *Attenuated*) 可降低菠萝果实的青霉病 (*Penicillium* sp.) (Lim & Rohrbock, 1980); *Penicillium frequentans* Westling 可控制桃果实褐腐病 (*Monilinia* sp.) (Guijarro *et al.*, 2007)。

第三节 拮抗酵母菌防治果蔬采后病害的研究

利用酵母菌来防治果蔬采后病害是近 20 年来采后生物学的研究热点,原因主要基于 3 个方面:(1) 大多数病原菌通过伤口入侵果实,而酵母菌主要通过与病原菌进行营养和空间竞争来防治病害。(2) 拮抗酵母菌大多从果实表面与伤口处分离到 (Wilson & Chalutz, 1989), 而且能够适应低温、低氧、高二氧化碳等果实采后贮藏条件 (Tian *et al.*, 2002b, 2004b; Qin *et al.*, 2004b; Feng *et al.*, 2004)。(3) 拮抗细菌或小型丝状真菌产生的抗菌素可诱发病原菌产生抗药性 (Wilson *et al.*, 1993), 且抗菌素对食用者健康也可能产生不利影响 (Mari *et al.*, 1996); 与之相比,拮抗酵母菌不产生抗菌素,也避免了某些抗菌素对人体的不利影响 (这有待于进一步证实,本书将在第四章第一节专题论述)。

1 拮抗酵母菌的研究历史

Janisiewicz (1987) 首次报道 1 株酵母菌 F-43-31 能抑制苹果青霉病 (*Penicillium expansum*)。Chalutz *et al.* (1988) 随后发现季也蒙毕赤酵母菌 (*Pichia guilliermondii*) 能有效抑制葡萄的灰霉病 (*B. cinerea*)、根腐病 (*Rhizopus stolonifer*) 以及西红柿的灰霉病 (*B. cinerea*) 和黑斑病 (*A. alternata*)。此后各国研究者纷纷跟进,目前已报道具有生防能力的酵母菌有 40 余种,主要分布在假丝酵母属 (*Candida*)、隐球酵母属 (*Cryptococcus*)、梅奇酵母属 (*Metschnikowia*)、毕赤酵母属 (*Pichia*) 和红酵母属 (*Rhodotorula*)。

全世界第一个拮抗酵母菌产品 Aspire™ (Ecogen 公司) 1995 年在美国登记,其有效菌株为橄榄假丝酵母菌 (*Candida oleophila* I-812), 用于控制苹果、梨、柑橘等果实的青霉病、灰霉病、绿霉病,已进入美国市场,但并没有在全球范围内广泛使用。2009 年 6 月, *C. oleophila* O (Bionext 公司) 在美国临时登记,用于控制苹果和梨果实采后灰霉病和霜霉病。2012 年,欧盟因需要更多的时间进行登记评估,同意将 BioNext 公司在法国和英国获批的生物农药 *C. oleophila* O 为期 3 年的原药临时登记期延长至 2014 年 7 月 31 日。

在南非登记的拮抗酵母菌产品 YieldPlus (Anchor Yeast, South Africa) 的有效菌株为浅白隐球酵母 (*Cryptococcus albidus*), 用于防治苹果、梨等果实的青霉病和

灰霉病。在巴西登记的拮抗酵母菌产品“Candifruit”的有效菌株为清酒假丝酵母菌 (*Candida sake*)，主要用于控制梨果类果实采后病害。Neova Technologies (Abbotsford, British Columbia, Canada) 正在将拮抗酵母菌 *Candida saitoana* 商品化。

在以色列登记的拮抗酵母菌菌剂“Shemer”(Koppert Biological Systems 公司)的有效菌株为 *Metschnikowia fructicola* Kurtzman & Droby，主要用于控制甘薯和胡萝卜的采后贮藏病害 (Kurtzman & Droby, 2001; Blachinsky *et al.*, 2008)。2012 年，拜尔公司已与 Koppert 公司就“Shemer”的营销、登记及生产达成独家授权协议。

到目前为止，我国还没有关于拮抗酵母菌的商业化产品。研究表明，罗伦隐球酵母 (*Cryptococcus laurentii*) 可有效防治葡萄 (刘海波等, 2002)、桃 (Wan *et al.*, 2002)、甜樱桃 (王友升和田世平, 2007)、苹果和梨 (Chand - Goyal & Spotts, 1997) 等果实采后病害，能与碳酸氢钠 (Yao *et al.*, 2004)、水杨酸 (Yu *et al.*, 2007)、细胞分裂素 (Zheng *et al.*, 2007) 以及低剂量防腐剂 (Lima *et al.*, 2006) 等配合使用，可在采前田间喷施 (Tian *et al.*, 2004b)，并能与采后热处理 (Zhang *et al.*, 2007) 以及低温、低氧和高二氧化碳等采后贮藏条件配合使用 (Feng *et al.*, 2004)，是一种有良好应用前景的拮抗酵母菌。在菌剂制备方面，我们通过条件优化得到了 *C. laurentii* 的最佳营养和环境培养条件并进行了中试生产 (田世平等, 2008)，获得了 *C. laurentii* 的冷冻干燥菌剂 (田世平和王友升, 2007)，由于其生防效果稳定性和产品货架期的问题亟待解决，目前 *C. laurentii* 还未能商业化应用。

2 拮抗酵母菌菌剂的开发程序

拮抗酵母菌作为活体杀菌剂，从开始研制到产品进入商业化，需要在抑菌活性、作用机理、规模化培养成本、制品配方的合理性、产品的货架期及有效性、遗传稳定性、对人体与环境的安全性以及商业化应用前景等各方面进行系统研究和严格评估 (Wilson & Wisniewski, 1994)。根据我国农业部 2007 年 (第 10 号令) 颁布的《农药资料登记规定》(自 2008 年 1 月 8 日起施行)，可归纳拮抗酵母菌的开发应包括以下方面：

(1) 生物学特性

无论候选拮抗酵母菌是从自然界分离的，还是引种的，在初步确定生防效果之后，需要进行鉴定，确定通用名称、分类地位和品系、微生物在自然界的存在形式等，这是系统开展下一步工作的前提。

(2) 生防效果研究

需要对拮抗酵母菌的作用效果、作用谱、作用机理进行系统研究。对于特异性强的拮抗酵母菌，在登记阶段可按防治对象提供药效试验资料；作为活体微生物制剂，得到稳定生防效果的前提是对拮抗酵母菌、病原菌和寄主之间的互作效

应进行系统解析。

(3) 放大试验

放大试验主要考察拮抗酵母菌在采前田间应用以及与果蔬的采后处理、贮藏条件的配合效果。主要包括拮抗酵母菌的使用条件（温度、湿度等）、使用方式（采前、采后）及其有效使用浓度，根据果蔬采后贮藏或进入市场的实际需求，研究拮抗酵母菌对果实品质及货架期的影响，建立与拮抗酵母菌相配套的果蔬贮藏保鲜技术规程。

(4) 毒理学评价

一般而言，首先应确认有效成分不是人或其他哺乳动物的已知病原体。如为拮抗酵母菌原药，需要进行急性经口毒性、急性经皮毒性、急性吸入毒性、眼睛刺激性、致敏性、致病性试验；如为制剂，需要提供急性经口毒性、急性经皮毒性、急性吸入毒性试验数据及中毒急救措施等。

(5) 菌剂制备

生物菌剂的制备，主要根据拮抗酵母菌的生理生化特征，使细胞处于代谢不活泼、生长繁殖受到抑制的休眠状态。固体菌剂是常见剂型，是指通过各种干燥方式除去细胞中水分，制成各种粉状或颗粒状菌体，目前最有效的干燥方式是真空冷冻干燥，但冷冻干燥的效果受悬浮液浓度、预冻速度、保护剂种类和浓度以及复水方式等各方面的影响。需要特别指出的是，由于拮抗酵母菌的主要作用机理是与病原菌在果实伤口处进行营养与空间竞争，因此，在拮抗酵母菌菌剂制备所添加的保护剂筛选中，需要考虑这些保护剂对拮抗酵母菌生防效果的影响。

(6) 环境、残留

环境影响试验主要确定拮抗酵母菌在采前田间喷施对局部生态系统的影响，包括鸟类急性经口毒性试验、鱼类急性毒性试验、蜜蜂急性经口毒性试验、蜜蜂急性接触毒性试验、水蚤急性毒性试验、藻类急性毒性试验和家蚕急性毒性试验。可根据拮抗酵母菌的特性、剂型、使用范围和使用方式等特点，对上述试验进行适当删减。

对于残留试验，根据农药特性和使用方法，按规定应进行2年以上的残留试验。对应用于不同寄主的微生物农药，可在不同自然条件或耕作方式下有所差别。

(7) 专利申请

获取专利保护是生物农药持续创新的关键，由于拮抗酵母菌的抑菌谱较小，而且因果实不同而效果差异较大，因此申请专利保护应特别注意专利所保护的范

(8) 产品登记

对微生物农药新药的登记，要经过田间试验、临时登记和正式登记3个阶段，每一阶段都需要提供详细的资料。

在临时登记阶段,原药临时登记除提供毒理学方面基本的毒理学资料外,还需提供确认有效成分不是人或其他哺乳动物的已知病原体的证明资料。如果发现微生物农药产生毒素、出现明显的感染症状或者持久存在等迹象,可以视情况补充试验资料,如亚慢性毒性、致突变性、生殖毒性、慢性毒性、致癌性、免疫缺陷、灵长类动物致病性。制剂临时登记,在残留方面,根据农药特性和使用方法,需要提供在我国进行2年以上的残留试验报告。

正式登记阶段,原药还需补充人群接触情况调查资料;制剂正式登记,在毒理学方面,需要确认微生物农药制剂不含作为污染物或突变子存在的病原体。

2012年,为鼓励生物农药的发展,我国减免了生物农药的登记材料、手续,缩短登记年限。原药登记方面,对于生产中确无生产原药或生产原药工艺难度较大的微生物农药,在提交产品生产工艺和其他必要说明材料的前提下,可以减免原药。药效试验资料,对于特异性强的微生物农药,可按防治对象提供药效试验资料。残留资料,低毒或微毒的微生物农药可减免残留试验资料。环境影响资料,微生物源农药原(母)药登记,均可用制剂环境资料办理。

3 问题与展望

经过20多年的努力,各国科学家已经分离、筛选和鉴定了几十种对不同果实采后病害具有显著抑制效果的拮抗酵母菌,但由于生物制剂抗菌活性不稳定、抑菌效果差、抑菌时间短,从实验室研究到商业化应用还有很多困难。因此,目前绝大多数仍处于实验室研发阶段,影响拮抗酵母菌杀菌剂进入商业化应用的瓶颈,主要存在于以下3个方面。

3.1 作用机理还没有完全阐明清楚

深入探讨拮抗酵母菌的作用机理,可为提高拮抗菌的生防效果提供理论依据,同时也有助于拮抗酵母菌杀菌剂的制备与商品化应用,还可以为研发新一代杀菌剂提供技术平台。更重要的是,生物杀菌剂进行产业化注册登记时,需要对其作用机理进行详细阐明。虽然各国科学家在筛选拮抗酵母菌的过程中,都对其作用机制进行了探讨,但目前拮抗酵母菌的作用机制还没有完全弄清楚,尤其是如何从微生物生态学的角度探讨拮抗酵母菌、病原菌与寄主之间的互作效应。因此,为了能够大规模制备商品化拮抗酵母菌制剂,还需对其作用机制,尤其是在果实伤口处拮抗酵母菌、病原菌与寄主之间的互作效应及其影响因子需进行深入探讨。

3.2 规模化制备条件需要进一步探索

当拮抗酵母菌的生防能力得到确定后,研究者的注意力就开始向产业化方面转移。但与拮抗酵母菌上游阶段的研究相比,拮抗酵母菌规模化生产条件的研究报道不多,一方面,可能由于这方面研究相对滞后;另一方面,对拮抗酵母菌来