

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
55(11):1418–1426; 4 November 2015
ISSN 0001–6209; CN 11–1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20150090

寡雄腐霉发酵液的动物毒性及其对柑橘果实贮藏期青、绿霉病的防治效果

谭艳¹, 彭良志², 袁玲^{1*}, 王少博²

¹西南大学资源环境学院, 重庆 400716

²中国农业科学院柑橘研究所, 重庆 400712

摘要:【目的】研制安全、无毒、高效的生物保鲜剂,降低意大利青霉(*Penicillium italicum*, 青霉)和指状青霉(*Penicillium digitatum*, 绿霉)引起的柑橘烂果。【方法】试验利用自主选育的寡雄腐霉优良菌株(*Pythium oligandrum* CQ2010),制备发酵液,测试了对小鼠的急性毒性,并设置对照(液体培养基,CK)、寡雄腐霉发酵液(*P. oligandrum* Broth, POB)、咪鲜胺(Prochloraz, PC)、咪鲜胺+POB(PC+POB)等4种处理,研究了它们对青、绿霉菌的抑制作用及其对柑橘防腐保鲜的作用。【结果】用大剂量的POB灌胃给药对小鼠体重增长无显著影响,供试动物的外观和行为均无异常,心、肝、肾、肺、肠等组织器官也未见病理改变。POB显著抑制青、绿霉菌丝生长和孢子萌发,抑制率分别为70.24%–93.74%(菌丝生长)和44.91%–87.82%(24 h孢子萌发)。柑橘果实接种青霉后,烂果率CK>POB、PC>PC+POB,防治效果PC+POB>POB、PC。在模拟柑橘商品化贮藏保鲜试验中,青、绿霉发病率占总发病率的50%以上,CK、POB、PC和PC+POB的烂果率依次为26.40%、15.03%、16.61%和4.21%。此外,POB对果实品质无显著影响,但显著提高果皮中的超氧化物歧化酶、过氧化物酶和过氧化氢酶活性,有益于提高柑橘果实的抗病性和贮藏性。【结论】在柑橘贮藏过程中,POB对果实青、绿霉病有显著的防治作用,并与咪鲜胺的防病效果有叠加作用。

关键词:寡雄腐霉, 柑橘, 青霉, 绿霉

中图分类号: Q938 **文章编号:** 0001-6209(2015)11-1418-09

在柑橘贮藏过程中,病原微生物侵染导致烂果。其中,青、绿霉是引起柑橘果实腐烂的常见病原菌,发病率一般在20%左右,重则高达70%以上^[1]。使用化学杀菌剂抑制病原微生物的生长繁殖是预防果实腐烂的主要手段。但是,残留于水果中的化学杀菌剂危害人体健康^[2],研制安全、无毒、高效的新型杀菌剂对于保护人体健康有重要意义。

寡雄腐霉(*Pythium oligandrum*)属卵菌门

(Heterokontophyta), 腐霉科(Pythiaceae), 腐霉属(*Pythium*),能释放纤维素酶、几丁质酶、蛋白酶、 β -1,3-葡聚糖酶等多种酶类,降解植物病原真菌的细胞壁;分泌抗菌物质,抑制病菌的生长繁殖^[3–4];寡雄蛋白(oligandrin)和拟激素素(elicitinlike)还能激发作物的抗病性防御反应和诱导抗病性^[5–8];寡雄腐霉还能合成吲哚乙酸(IAA)、色胺、激动素等生长活性物质,促进植物生理代谢,生长发育和伤口愈

基金项目:重庆市科委重点应用开发项目(cstc2013yykfB80011)

* 通信作者。Tel: +86-23-68251249; E-mail: lingyuanh@aliyun.com

作者简介:谭艳(1989–),女,重庆涪陵人,硕士研究生,研究方向为农业微生物。E-mail: shaobotanyan@163.com

收稿日期:2015-02-28; **修回日期:**2015-03-29

合^[9]。因此,在农业生产中,已有寡雄腐霉孢子制剂用于促进作物生长和真菌病害防治的报道^[10-11]。

在欧美发达国家,使用化学杀菌剂对水果进行防腐保鲜正逐年减少,物理保鲜和生物制剂保鲜日益普及^[12-13],我国能替代化学杀菌剂对水果进行有效防腐保鲜的生物制剂不多^[14]。根据寡雄腐霉对作物的促生防病机理,推测其分泌物也可能抑制青、绿霉的生长繁殖,诱导果实产生抗病性,促进果皮伤口快速愈合,防治后续感染。但是,国内外目前仅有利用寡雄腐霉孢子菌剂防治作物真菌病害的报道,尚无用于水果保鲜的研究。本文采用自主分离的寡雄腐霉生防菌株(*P. oligandrum* CQ2010)制备发酵液,研究了对小鼠的急性毒性,以及对青、绿霉菌的抑制作用和柑橘贮藏保鲜中的应用,为研制无毒、安全的柑橘保鲜剂提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试动物:清洁级昆明小鼠,饲养于重庆市中药研究院实验动物研究所。

1.1.2 供试柑橘:哈姆林甜橙(*Citrus sinensis* L. Osbec),采自于重庆市北碚中国农业科学院柑橘研究所白鹤林果园,大小近似,果皮无损伤、无病虫害的成熟果实。

1.1.3 供试菌株:寡雄腐霉生防菌株(*P. oligandrum* CQ2010),2010年自主分离获得,保存于西南大学资源环境学院微生物实验室;意大利青霉(*Penicillium italicum*,青霉)和指状青霉(*Penicillium digitatum*,绿霉),均由中国农业科学院柑橘研究所

综合防治课题组提供。

1.2 寡雄腐霉无菌发酵液(*P. oligandrum* Broth, POB)制备

取1000 mL水,15 g葡萄糖,0.5 g谷氨酰胺,1.0 g酒石酸铵,1.0 mL微量元素混合液[每L含8.4 mg H_3BO_3 、5.0 mg $MnSO_4 \cdot 7H_2O$ 、6.0 mg $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 、0.62 mg $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 、2.7 mg $ZnCl_2$ 和0.27 mg $(NH_4)_2Mo_4O$]配制液体培养基(pH5.5),灭菌(121 °C, 10³ kPa, 30 min)后接种*P. oligandrum* CQ2010,利用50 L发酵罐,设置37 °C发酵温度、50 r/min搅拌速率,10 mL/(min·L)通气量,发酵120 h,5120 × g离心,0.45 μm滤膜过滤,滤液即为POB。

1.3 病原菌活化和孢子悬浮液制备

配制PDA固体培养基(1000 mL水,200 g土豆,20 g葡萄糖,20 g琼脂,自然pH),分别接种青、绿霉,28 °C暗培养7 d活化病原菌,无菌水洗涤孢子,稀释制备3 × 10⁶个/mL孢子悬液。

1.4 POB对小鼠的急性毒性试验

在国家食品药品监督管理局(State Food and Drug Administration, SFDA)认证的,重庆市中药研究院药物安全GLP(Good Laboratory Practice)实验室进行POB急性毒性试验。受试动物饲养及试验遵循中华人民共和国国家标准GB15670-1995毒理学试验标准程序(Standard Operation Procedure, SOP)^[15]。在22.7-26.3 °C,12 h明暗交替,动物房间每小时8次换气的受控环境中,供试动物自由摄食标准饲料。

试验开始前,动物在试验房间内适应3 d。然后,根据体重随机将小鼠30只分为2组,试验组20只和对照组10只,雌雄各半。给药前禁食2 h,称体重,按表1分组给药,连续14 d^[16]。

表1. 试验动物分组与给药

Table 1. Test animal groups and drug delivery

Groups	Test substances	Test dose / (mL/kg)	Delivery volume / (mL/kg)	Delivery way	Delivery frequency
Test group	POB	60	30	Gastric lavage	Twice a day and 6 h interval
Control	Purified water	60	30	Gastric lavage	Twice a day and 6 h interval

1.5 POB对青、绿霉菌丝生长和孢子萌发的影响

取青、绿霉菌落边沿的菌块(直径6 mm),分别接种于PDA培养基上,并在周围用灭菌消毒后的注射器均匀地滴加1.0 mL POB。考虑到在预备试验

中,无菌水和灭菌的POB(121 °C, 2.03 kg/m², 20 min)对青、绿霉生长均无显著影响,故试验设置在菌块周围滴加等量灭菌的POB处理为对照。然后,28 °C暗培养4 d,重复5次。

采用 NY/T1156.1-2006 农药室内生物测定试验方法,取 POB 按 1:0、2:3、1:3 加无菌水稀释,再取不同稀释度的 POB,按 1:1 分别与 3×10^6 个/mL 青霉孢子悬浮液混合,滴入凹玻片,以孢子悬浮液加等量灭菌的 POB 为对照,26 °C 保湿培养 12 h 和 24 h,试验重复 3 次。按照研究青霉孢子萌发相同的方法,研究 POB 对绿霉孢子萌发的影响。

1.6 人工接种情况下 POB 对柑橘青霉病的防治试验

人工接种青霉试验:用 2% 次氯酸钠溶液浸泡柑橘果实 2 min,洗净、晾干。用消毒后的专用铁针($\phi = 1.2$ mm)蘸取青霉孢子悬浮液(3×10^6 个/mL),沿柑橘果实赤道部均分 8 点刺破果皮(深度 2 mm),晾干后分别用无菌水(CK)、POB、125 mg/L 咪鲜胺(商品名称 Prochloraz,有效含量 25%,德国拜耳公司生产,相当于正常使用浓度的半值,用 PC 表示)、125 mg/L 咪鲜胺与 POB 的混合液(PC + POB),浸果 1 min,晾干。每个处理 100 个柑橘果实,重复 4 次。模拟柑橘果实商品化贮藏保鲜条件,即用柑橘保鲜袋单果包装,放入商品包装的纸箱中,置 6-19 °C 室内贮藏,试验重复 3 次。

1.7 POB 对柑橘防腐保鲜的作用

模拟商品化贮藏保鲜试验:取柑橘果实,用无菌水(CK)、POB、PC、PC + POB 分别浸果 1 min,晾干,余同人工接种青霉试验,每个处理 300 个柑橘果实,试验共做 4 批。

1.8 测定项目与方法

在 POB 的动物毒性试验中,每天笼旁观察供试动物的外观体征、行为、饮食、对刺激的反应、分泌物、排泄物等情况,称体重。试验结束后,对所有动物进行大体解剖,观察动物组织器官的体积、颜色、质地等。

在抑菌试验中,用菌落扫描计数仪测定菌落面积;用显微镜观察孢子萌发情况,即各处理镜检 200 个游动孢子,芽管长度超过孢子直径一半视为孢子萌发,计算孢子萌发率和抑制率。在人工接青霉试验中,贮藏期间每 2 d 观察一次柑橘果实发病情况,记录病果数和病级值^[17]。在模拟商品化贮藏保鲜试验中,观察柑橘果实发病情况的时间间隔同人工接青霉试验。在贮藏第 15 天和 30 天,依次用氮蓝四唑还原法、愈创木酚法和高锰酸钾滴定法测定果皮中的超氧化物歧化酶活性(Superoxide dismutase,

SOD)、过氧化物酶(Peroxidase,POD)和过氧化氢酶(Catalase,CAT)^[18-19]。在处理第 30、60 和 90 d,每处理取 10 个柑橘果实,重复 3 次。用 GB8210-87 法测定柑橘果汁可滴定酸、维生素 C 和总糖;用便携式折光测糖仪(Pocket refractometer PAL-1,日本 ATAGO 公司)测定果汁可溶性固形物含量。

1.9 数据处理

菌丝生长的抑制率、孢子萌发率和孢子萌发抑制率分别用公式(1)、(2)、(3)计算。

$$\text{菌丝生长的抑制率}/\% = \frac{\text{对照菌落面积} - \text{处理菌落面积}}{\text{对照菌落面积}} \times 100 \quad \text{公式(1)}$$

$$\text{孢子萌发率}/\% = \frac{\text{孢子萌发数}}{\text{观察孢子数}} \times 100 \quad \text{公式(2)}$$

$$\text{孢子萌发抑制率}/\% = \frac{\text{对照孢子萌发率} - \text{处理孢子萌发率}}{\text{对照孢子萌发率}} \times 100 \quad \text{公式(3)}$$

观察统计贮藏过程中,柑橘果实的发病率、病情指数和防治效果等按照公式(4)、(5)、(6)进行计算。

$$\text{发病率}/\% = \frac{\text{病果数}}{\text{总果数}} \times 100 \quad \text{公式(4)}$$

$$\text{病情指数}/\% = \frac{\text{病级数} \times \text{处理病情指数}}{\text{总果数} \times \text{最高病级数}} \times 100 \quad \text{公式(5)}$$

$$\text{防治效果}/\% = \frac{\text{对照病情指数} - \text{处理病情指数}}{\text{对照病情指数}} \times 100 \quad \text{公式(6)}$$

用 Excel 2003 进行基本计算,SPSS18.0 进行统计分析,Duncan 法对不同处理的数据进行差异性比较,显著性水平设置为 $P < 0.05$ 。

2 结果和分析

2.1 POB 对小鼠的急性毒性

在灌胃给药 POB 后的第 1、2、3、7 和 14 d,试验组与对照组小鼠体重增长无显著差异。在试验期间,对照组的小鼠体重从 20.45 g 增加至 23.83 g,试验组的小鼠体重从 20.19 g 增加至 25.08 g(表 2),供试动物的外观和行为均无异常。此外,在试验结束后,对所有动物进行了大体解剖,动物的心、肝、肾、肺、肠等组织器官未出现体积、颜色、质地等的改变。

表 2. 供试小鼠体重(g)均数表

Table 2. The mean weight (g) of test mice

Groups	Per-test	1 st day	2 nd day	3 rd day	7 th day	14 th day
CK (n = 10)	20.45 ± 1.34a	22.58 ± 2.78a	23.39 ± 3.82a	24.45 ± 3.89a	22.33 ± 3.32a	23.38 ± 4.77a
Test (n = 20)	20.19 ± 1.31a	21.90 ± 1.88a	23.89 ± 2.21a	25.21 ± 2.49a	23.70 ± 2.01a	25.08 ± 4.84a

In each column, data followed by different small letters are significantly different at $P < 0.05$ and same below unless stated otherwise.

2.2 POB对青、绿霉菌丝生长和孢子萌发的影响

图1可见,POB显著的抑制青、绿霉菌丝的生长。与对照相比,POB对青、绿霉菌丝生长抑制率分别达到70.24%和93.74%。此外,加入POB后,培养基中出现大量的紫色分泌物。

在供试浓度范围内,POB抑制青、绿霉孢子萌发,浓度愈高,抑制作用愈强。在孢子悬浮液中,在培养孢子12h后,POB原液对青、绿霉孢子萌发的抑制率分别为96.14%和76.12%;在培养孢子24h后,POB原液对青、绿霉孢子萌发的抑制率分别为87.82%和44.91%(表3)。

2.3 人工接种情况下POB对柑橘青霉病的防治试验

在接种青霉的处理中,随着时间延长,柑橘果实发病率和病情指数逐渐增加(图2)。贮藏至34d,对照(接种青霉)的果实发病率达到100%,POB为56.02%,PC是53.14%,PC+POB的仅6.02%。此外,病情指数的变化趋势与发病率相似,CK最高,POB和PC次之,PC+POB最低;防治效果PC+POB最高,PC略高于POB。贮藏34d后,PC+POB、POB和PC对柑橘青霉菌的防治效果依次为92.56%、45.81%和51.17%。

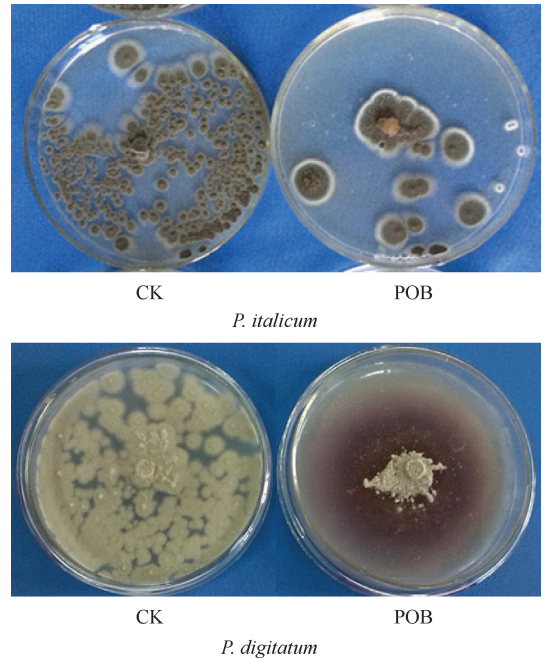


图 1. POB对青、绿霉菌丝的生长影响

Figure 1. Effect of POB on the hyphae growth of *P. italicum* and *P. digitatum*.

表 3. 发酵液对青、绿霉孢子萌发的抑制作用

Table 3. Inhibition of POB on the spore germination of *P. italicum* and *P. digitatum*

Pathogens	Treatment	12 h after treatment		24 h after treatment	
		Germination rate/%	Inhibition rate/%	Germination rate/%	Inhibition rate/%
<i>P. italicum</i>	CK	72.67 ± 3.21a	–	91.67 ± 4.04a	–
	1/3 POB	7.83 ± 7.01b	88.65 ± 10.15a	62.17 ± 3.79b	32.18 ± 4.13c
	2/3 POB	3.00 ± 2.60b	95.65 ± 3.77a	18.33 ± 4.31c	80.00 ± 4.70b
	100% POB	2.67 ± 1.15b	96.14 ± 1.67a	11.17 ± 1.61d	87.82 ± 1.75a
<i>P. digitatum</i>	CK	96.33 ± 3.21a	–	99.83 ± 0.29a	–
	1/3 POB	32.67 ± 3.62b	32.18 ± 7.51b	90.83 ± 1.44ab	9.02 ± 1.45b
	2/3 POB	33.67 ± 1.89b	30.10 ± 3.93b	84.83 ± 0.29b	15.03 ± 0.29b
	100% POB	11.50 ± 1.32c	76.12 ± 2.75a	55.00 ± 5.00c	44.91 ± 5.01a

2.4 POB在柑橘模拟商品化贮藏保鲜中的效果

2.4.1 柑橘果实发病率及防治效果:在模拟商品化贮藏过程中,发病率也随贮藏时间延长而提高。在

不同试验处理中,CK的总发病率和青、绿霉发病率最高,POB和PC次之,PC+POB最低。在贮藏结束时,CK、POB、PC和PC+POB处理的总发病率分别

为 26.40%、16.61%、15.03% 和 4.21%；青、绿霉病的发病率依次是 17.67%、11.51%、10.11% 和

2.45%。防治效果则以 PC + POB 最高，POB 和 PC 显著低于 PC + POB(图 3)。

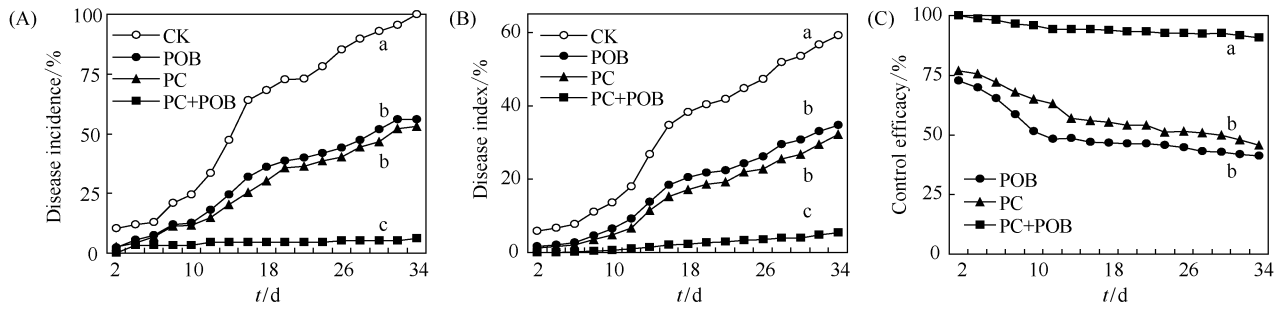


图 2. 接种青霉孢子的试验中,柑橘果实发病率、病情指数和防治效果(不同字母表示处理间差异显著, $P < 0.05$)

Figure 2. Incidence, index and control efficiency of blue mold rot disease of orange fruit in pathogenic inoculation experiment. A: disease incidence; B: disease index; C: control efficiency. Curves followed by different small letters are significantly different at $P < 0.05$.

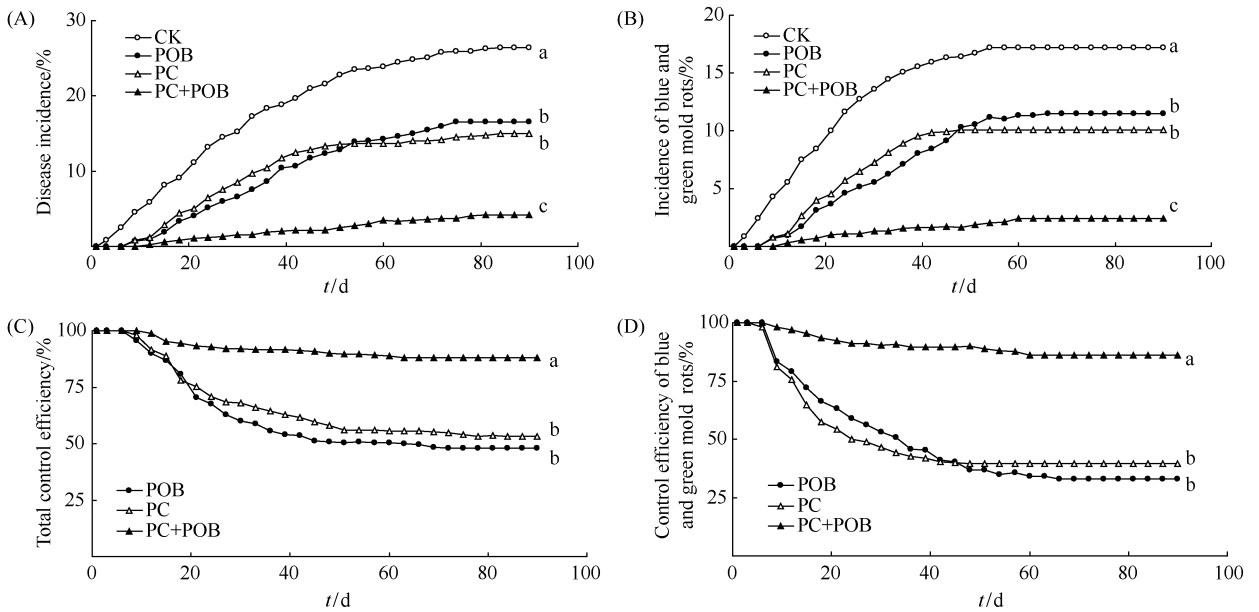


图 3. 商品化模拟保鲜试验中,柑橘果实发病率和防治效果的影响(不同字母表示处理间差异显著, $P < 0.05$)

Figure 3. Disease incidence rate of orange fruit and control efficiency in commercial simulation storage. A: disease incidence; B: incidence of blue and green mold rots; C: total control efficiency; D: control efficiency of blue and green mold rots. Curves followed by different small letters are significantly different at $P < 0.05$.

2.4.2 柑橘果实品质:在贮藏过程中,柑橘果实中可溶性固形物、可滴定酸、维生素 C 和总糖含量等均随贮藏时间的延长而不同程度地降低(表 4)。例如在贮藏 90 d 时,对照柑橘果实中的可溶性固形物、可滴定酸、维生素 C 和总糖含量分别降低 13.35%、46.31%、29.32% 和 19.27%。但是,防腐保鲜处理对果实中的可溶性固形物、维生素 C、总糖和可滴定酸无显著影响。

2.4.3 柑橘果皮中的抗病性相关酶活性:表 5 可见,POB 和 PC + POB 处理显著提高果皮中的 SOD、POD 和 CAT 活性(贮藏 15 d 的 POB 处理 POD 例外,与 CK 相似),贮藏 30 d,POB 和 PC + POB 处理的 SOD、POD 和 CAT 活性分别比对照高了 44.98% - 52.10%、20.61% - 23.82% 和 60.80% - 61.85%。此外,贮藏 30 d 的 POD、SOD 和 CAT 活性总体上低于贮藏 15 d 的柑橘果实。

表 4. 在贮藏过程中,不同处理对柑橘果实品质的影响

Table 4. Changes in the quality of orange fruit under different treatments in storage

Storage time/d	Treatments	TSS/%	Acidity/%	Vitamin C (mg/100mL)	Total sugar/%
0		11.16 a	0.95 a	54.12 a	8.82 a
30	CK	10.67 b	0.74 b	50.38 b	8.45 b
	POB	10.60 b	0.75 b	49.89 b	8.45 b
	PC	10.56 b	0.71 b	50.07 b	8.47 b
	PC + POB	10.66 b	0.79 b	48.99 b	8.46 b
60	CK	9.57 c	0.61 c	45.38 c	8.11 c
	POB	9.59 c	0.64 c	45.89 c	8.05 c
	PC	9.71 c	0.63 c	46.07 c	8.05 c
	PC + POB	9.61 c	0.64 c	46.99 c	8.07 b
90	CK	9.17 d	0.51 d	38.25 d	7.12 d
	POB	9.02 d	0.54 d	35.21 d	7.21 d
	PC	9.03 d	0.53 d	36.07 d	7.18 c
	PC + POB	8.96 d	0.54 d	36.15 d	7.15 d

表 5. 贮藏过程中,不同处理对柑橘果皮抗病性相关酶活性的影响

Table 5. Activities of enzymes related to disease resistance in orange peels in storage

Storage time/d	Treatment	Superoxide dismutase/(U/g)	Peroxidase[$\Delta OD_{470}/(\text{min}\cdot\text{g})$]	Catalase/(U/g)
15	CK	57.95c	29.15b	2.95b
	POB	91.57a	33.25ab	5.37a
	PC	42.74d	31.64ab	2.37b
	PC + POB	92.14a	34.89a	6.35a
30	CK	42.17d	16.02d	1.24d
	POB	76.65b	20.18c	3.25c
	PC	37.31d	18.18cd	1.07d
	PC + POB	88.03a	21.03c	3.16c

3 讨论

众多学者认为,寡雄腐霉及其分泌物对人畜无毒,环境友好^[20-21]。在动物急性毒性试验中,小鼠一日内灌胃给予 POB 60 mL/kg,达到该动物的最大给药量。观察 14 d 表明,POB 对供试动物的外观、行为、体重均无显著影响,心、肝、肾、肺、肠等脏器等体积、颜色、质地等也未出现改变。说明利用 *P. oligandrum* CQ2010 制备的 POB 属于无毒物质,对动物安全无害,类似前人对寡雄腐霉活菌剂的研究结果^[22]。

寡雄腐霉能抑制子囊菌门、担子菌纲、卵菌门、半知菌门的疫霉属、灰霉菌属、轮枝菌属、镰刀菌属等多种作物的病原真菌的生长繁殖。在纯培养条件下,POB 显著抑制青、绿霉菌丝生长和孢子萌发。寡雄腐霉能分泌纤维素酶、蛋白酶、几丁质酶和 β -1,3-葡聚糖酶等多种酶类,分解真菌细胞壁中的纤维素、葡聚糖、几丁质^[3-4],这可能是 POB 抑制青、绿霉生

长繁殖重要原因之一。此外,寡雄腐霉产生的小分子抗菌物质^[5-8]也可能对青、绿霉的生长繁殖产生直接抑制作用。

柑橘果实接种青霉之后,POB 处理显著降烂果率,说明 POB 对感染柑橘果实的青霉同样具有抑制作用。此外,我们还观察到 POB 使柑橘果实的伤口迅速愈合,这有益于防治病原菌的后续感染。在 POB 中,有学者检测到生长素、激动素、色胺等生长活性物质,可刺激细胞分裂,促进细胞生长和伤口愈合^[8-9]。在模拟柑橘商品化贮藏保鲜试验中,青、绿霉是引起柑橘烂果的主要病原菌,与前人研究结果相同^[23]。POB 和低浓度的 PC 显著降低了青、绿霉引起的烂果,但烂果率高达 15.03% - 16.61%,PC + POB 处理的烂果率仅 4.21% - 6.02%,说明 POB 和 PC 具有正交互叠加效应,POB 可提高咪鲜胺的防病效果。用 POB 或 PC + POB 处理柑橘后,果皮中的 SOD、POD 和 CAT 抗病性相关酶活性提高,类似烤烟、番茄、辣椒等多种作物对 POB 的生理反

应^[24-25],说明POB也能激发柑橘果实的抗病性防御反应,有益于拮抗病菌危害^[26]。SOD、POD和CAT能有效清除活性氧自由基,减少膜脂过氧化作用,延缓衰老,其活性高低可指示果实的耐贮藏性^[27]。从柑橘果实品质看,各处理与对照无显著差异,说明POB对柑橘品质无显著影响。

在欧美发达国家,寡雄腐霉的卵孢子制剂已经用于防治作物的真菌病害^[28],我国尚未攻克大规模繁殖寡雄腐霉卵孢子的技术难题。但是,卵孢子制剂的生防效应依赖于孢子萌发和菌丝生长,易受环境因素的影响,效果迟缓,稳定性欠佳^[29]。利用其次生代谢产物进行生物防治可减少环境干扰,提高生防效果和稳定性^[30]。因此,利用 *P. oligandrum* CQ2010 制备POB,用于柑橘果实的贮藏保鲜,不仅应用方便,成本低廉,而且可降低环境因素的干扰,提高生防效果的稳定性。

4 结论

POB无动物毒性,显著抑制青、绿霉菌丝生长和孢子萌发,可激发柑橘果实产生抗病性防御反应,快速愈合损伤,显著降低烂果率,提高咪鲜胺的防病效果,且对果实品质无显著影响,在柑橘贮藏保鲜中可能有一定的应用前景。

参考文献

- [1] Wu LS, Ye XQ, Xu LH. Several measures to improve fresh-keeping effectiveness of citrus. *Fujian Agriculture*, 2010, (1): 23. (in Chinese)
吴联生,叶喜琴,徐丽华. 提高柑橘贮藏效果的几项计数措施. 福建农业, 2010, (1): 23.
- [2] Yang M, Wang RK. The review of citrus storage. *Academic Periodical of Farm Products Processing*, 2011, (9): 104-107, 110. (in Chinese)
杨明,王日葵. 柑橘贮藏保鲜研究进展. 农产品加工·学刊, 2011, (9): 104-107, 110.
- [3] Horner NR, Grenville-Briggs LJ, Van West P. The oomycete *Pythium oligandrum* expresses putative effectors during mycoparasitism of *Phytophthora infestans* and is amenable to transformation. *Fungal Biology*, 2012, 116 (1): 24-41.
- [4] Takenaka S, Tamagake H. Foliar spray of a cell wall protein fraction from the biocontrol agent *Pythium*

oligandrum induces defence-related genes and increases resistance against *Cercospora* leaf spot in sugar beet. *Journal of General Plant Pathology*, 2009, 75(5): 340-348.

- [5] Takenaka S, Nishia Z, Nakamura Y. Induction of defense reactions in sugar beet and wheat by treatment with cell wall protein fractions from the mycoparasite *Pythium oligandrum*. *Phytopathology*, 2003, 93(10): 1228-1232.
- [6] Picard K, Ponchet M, Blein JP, Rey P, Tirilly Y, Benhamou N. Oligandrin. A proteinaceous molecule produced by the mycoparasite *Pythium oligandrum* induces resistance to *Phytophthora parasitica* infection in tomato plants. *Plant Physiology*, 2000, 124(1): 379-395.
- [7] Picard K, Tirilly Y, Benhamou N. Cytological effects of cellulases in the parasitism of *Phytophthora parasitica* by *Pythium oligandrum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(10): 4305-4314.
- [8] Takahashi H, Hase S, Kanayama Y, Takenaka S. Identification of a protein that interacts with LeATL6 ubiquitin-protein ligase E3 upregulated in tomato treated with elicitor-like cell wall protein of *Pythium oligandrum*. *Journal of Phytopathology*, 2010, 158(2): 132-136.
- [9] Benhamou N, le Floch G, Vallance J, Gerbore J, Grizard D, Rey P. *Pythium oligandrum*: an example of opportunistic success. *Microbiology*, 2012, 158(11): 2679-2694.
- [10] Sun H, Wang XQ, Li YL, Hu B, Zheng JQ. Evaluation of application time for *Pythium oligandrum* against cucumber downy mildew in greenhouse. *Current Biotechnology*, 2014, 4(1): 63-65. (in Chinese)
孙海,王晓青,李云龙,胡彬,郑建秋. 寡雄腐霉施用时期对设施黄瓜霜霉病的防治试验. 生物技术进展, 2014, 4(1): 63-65.
- [11] Hu B, Huang ZQ, Liu XL, Zhao LH, Yao DD, Shi YC. Control efficacy of 9 fungicides against Chinese chives gray mold. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2014, 30(4): 293-298. (in Chinese)
胡彬,黄中乔,刘西莉,赵连宏,姚丹丹,师迎春. 9种杀菌剂对韭菜灰霉病的防治效果. 中国农学通报, 2014, 30(4): 293-298.
- [12] Manso T, Nunes C. *Metschnikowia andauensis* as a new biocontrol agent of fruit postharvest diseases. *Postharvest Biology and Technology*, 2011, 61(1): 64-71.
- [13] Barret DM, Lloyd B. Advanced preservation methods and nutrient retention in fruits and vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2012, 92(1): 7-22.

- [14] Zhangyang JN, Zhang RG, Jiao WX, Wu DL, Feng BK, Du XM. Research progress on biological preservative. *Academic Periodical of Farm Products Processing*, 2013, (4): 18-22. (in Chinese)
张杨俊娜, 张润光, 焦文晓, 吴东亮, 封斌奎, 杜西民. 生物保鲜剂研究进展. 农产品加工(学刊), 2013, (4): 18-22.
- [15] Song HY, Wang J, Xu JH. Toxicological evaluation of pesticide. *Pesticides*, 2000, 39(4): 44-45. (in Chinese)
宋宏宇, 王捷, 许吉花. 农药的毒理学安全评价. 农药, 2000, 39(4): 44-45.
- [16] 肖杭, 恽时锋, 刘年双. 实验动物科学与应用. 南京: 江苏科学技术出版社, 2008: 79.
- [17] Ren YF, Liu C, He JY, Wang SM, Zhang LL. Fresh-keeping and antibacterial technology of citrus fruits based on ethanol extracts from Chinese herbs. *Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery*, 2012, 43(5): 122-129. (in Chinese)
任艳芳, 刘畅, 何俊瑜, 王思梦, 张兰兰. 基于中药乙醇提取物的柑橘采后保鲜与抑菌技术. 农业机械学报, 2012, 43(5): 122-129.
- [18] 曹建康, 姜微波, 赵玉梅. 果蔬采后生理生化实验指导. 北京: 中国轻工业出版社, 2007: 101-125.
- [19] 刘萍, 李明军. 植物生理学实验技术. 北京: 科学出版社, 2007: 128-129.
- [20] Kurzawińska H, Mazur S. The effect of Chitosan and *Pythium oligandrum* used in protection of potato tubers against late blight and the occurrence of fungal diseases on tuber peel. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences*, 2007, 72(4): 967-971.
- [21] Ouyang YN, Xia LX, Zhu LF, Yu SM, Jin QY. The effect of *Pythium oligandrum* used in rice for controlling the disease and promoting the growth. *China Rice*, 2007, (6): 48-51. (in Chinese)
欧阳由男, 夏陆欣, 朱练峰, 禹盛苗, 金千瑜. 寡雄腐霉制剂“多利维生”对水稻的促长与防病增产效果. 中国稻米, 2007, (6): 48-51.
- [22] Biological Company of the Czech. *Pythium oligandrum*. *Pesticide Science and Administration*, 2010, 31(8): 58. (in Chinese)
捷克生物制剂股份有限公司. 寡雄腐霉菌. 农药科学与管理, 2010, 31(8): 58.
- [23] Long CA, Deng BX, He XJ. Characteristics and identification of an antagonistic yeast 34-9 against blue and green mold of citrus. *Scientia Agricultura Sinica*, 2005, 38(12): 2434-2439. (in Chinese)
龙超安, 邓伯勋, 何秀娟. 柑橘青、绿霉病高效拮抗菌 34-9 的筛选及其特性研究. 中国农业科学, 2005, 38(12): 2434-2439.
- [24] Zhao J, Wu YK, Yuan L, Du RW, Yang YH, Huang JG. Effects of the fermentation broth of *Pythium oligandrum* on the growth and black shank control of flue-cured tobacco. *Acta Phytophylacica Sinica*, 2013, 40(1): 68-72. (in Chinese)
赵建, 吴叶宽, 袁玲, 杜如万, 杨宇虹, 黄建国. 寡雄腐霉发酵液对烤烟生长的影响及对烟草黑胫病的防治作用. 植物保护学报, 2013, 40(1): 68-72.
- [25] Zhao J, Huang JG, Yuan L, Shi AD, Du RW, Xing XJ. Influence of the fermentation broth of *Pythium oligandrum* on the growth and botrytis control of tomato seedlings. *Acta Ecologica Sinica*, 2014, 34(23): 7093-7100. (in Chinese)
赵建, 黄建国, 袁玲, 时安东, 杜如万, 邢小军. 寡雄腐霉发酵液对番茄生长的影响及对灰霉病的防治作用. 生态学报, 2014, 34(23): 7093-7100.
- [26] Yin YL, Guo YJ, Ni Y, Han L, Tang L. Changes in physiological and biochemical indexes of alfalfa leaves under procym idone stress and sclerotinia challenge. *Acta Phytophylacica Sinica*, 2010, 37(3): 283-284. (in Chinese)
尹亚丽, 郭彦军, 倪郁, 韩龙, 唐龙. 腐霉利与菌核病菌胁迫下紫花苜蓿理化指标的变化. 植物保护学报, 2010, 37(3): 283-284.
- [27] Feng YX, Ji H, Li LM. Relationship between ripening and senescence of fruits and antioxidase. *Storage & Process*, 2007, 7(2): 11-13. (in Chinese)
冯云霄, 及华, 李丽梅. 保护酶与果蔬成熟衰老的关系. 保鲜和加工, 2007, 7(2): 11-13.
- [28] Gerbore J, Benhamou N, Vallance J, Le Floch G, Grizard D, Regnault-Roger C, Rey P. Biological control of plant pathogens: advantages and limitations seen through the case study of *Pythium oligandrum*. *Environmental Science and Pollution Research*, 2014, 21(7): 4847-4860.
- [29] Walters DR, Ratsep J, Havis ND. Controlling crop diseases using induced resistance: challenges for the future. *Journal of Experimental Botany*, 2013, 64(5): 1263-1280.
- [30] Punja ZK, Utkhede RS. Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases. *Trends in Biotechnology*, 2003, 21(9): 400-407.

Toxicity of *Pythium oligandrum* broth to animal and its control effect on rot diseases caused by *Penicillium italicum* and *Penicillium digitatum* in orange fruit storage

Yan Tan¹, Liangzhi Peng², Ling Yuan^{1*}, Shaobo Wang²

¹ College of Resource and Environment, Southwest University, Chongqing 400716, China

² Orange Research Institute, Academy of Agricultural Science of China, Chongqing 400712, China

Abstract: [**Objective**] In order to develop a safe, nontoxic and efficient biological antistaling agent and to decrease the incidence of rot diseases caused by the *Penicillium italicum* and *Penicillium digitatum* in orange fruit storage, [**Methods**] the present experiment was carried out with *Pythium oligandrum* broth (POB) produced by our self- isolated strain (*P. oligandrum* CQ2010) to study the toxicity to animal. Thereafter, mycelium growth and spore germination of both *P. digitatum* and *P. italicum* and control effect of rot disease in orange storage were compared after treated by liquid culture medium (control), POB, prochloraz (PC), and PC + POB. [**Results**] Gastric lavage with large amount POB did not influence mouse weight. The animals also showed no abnormality in appearance, behaviors and pathology changes in heart, liver, kidney, lung and intestine. POB decreased the hyphal growth by 70.24% – 93.74% and spore germination by 44.91% – 87.82% (24 h after POB addition) of these two pathogenic fungi. Disease incidence of orange fruit following *P. italicum* inoculation changed in the sequence: CK > POB > PC > PC + POB and the control efficacy behaved otherwise. In commercial simulation storage, the disease incidence of orange fruit caused by *P. digitatum* and *P. italicum* was above 50% of the total. The fruit rot rate was 26.40% (CK), 15.03% (POB), 16.61% (PC) and 4.21% (PC + POB). There were no significant differences in fruit quality under different treatments. [**Conclusion**] POB was safe to animal and could decrease rot disease incidence caused by *P. italicum* and *P. digitatum* in orange storage whereby producing a positive interaction with prochloraz and controlling rot diseases caused by these two fungi.

Keywords: *Pythium oligandrum*, orange, *Penicillium italicum*, *Penicillium digitatum*

(本文责编:张晓丽)

Supported by the key applied and developed research of Chongqing Science and Technology Commotion (cstc2013yykfB80011)

* Corresponding author. Tel: +86-23-68251249; E-mail: lingyuanh@aliyun.com

Received: 28 February 2015/Revised: 29 March 2015