doi:10.6041/j.issn.1000-1298.2017.05.041

蓝莓采后主要病原真菌的分离鉴定与生物学特性研究

郜海燕　肖尚月　陈杭君　黎云龙　刘瑞玲　吴伟杰
(浙江省农业科学院食品科学研究所, 杭州 310021)

摘要: 霉变是导致蓝莓采后损失、货架期短的主要原因之一,为确定蓝莓贮藏期的主要致腐病原真菌,对浙江省杭州市安吉县蓝莓产区发病果实的病原菌进行分离纯化,得到 5 株病原真菌(LMA、LMB、LMC1、LMC2 和 LMC3)。通过形态学和 rDNA-ITS 序列分析,初步鉴定为 *B. cinerea*、*T. viridescens*、*P. cecidicola*、*P. polonicum* 和 *P. expansum*。分离菌株的生物学特性研究表明,5 株病原菌适宜生长条件为:蓝莓汁-葡萄糖培养基,25 ~ 30℃;菌株 LMA、LMC1 和 LMC2 的最适碳源为果糖,菌株 LMB 和菌株 LMC3 的最适碳源分别为蔗糖和可溶性淀粉;菌株 LMA、LMC1 和 LMC2 的最适氮源为蛋白胨,菌株 LMB 和 LMC3 的最适氮源为酵母浸出粉。光照对菌株 LMA、LMC1 和 LMC2 病原菌菌丝生长有明显影响,而对菌株 LMB 和 LMC3 影响较小。

关键词: 蓝莓; 采后病害; 分离鉴定; rDNA-ITS; 生物学特性

中图分类号: S663; S432.4^{+}4　　**文献标识码**: A　　**文章编号**: 1000-1298(2017)05-0327-08

Identification and Biological Characteristics of Fungal Pathogens in Blueberry during Postharvest Storage

GAO Haiyan　XIAO Shangyue　CHEN Hangjun　LI Yunlong　LIU Ruiling　WU Weijie
(*Food Science Institute*, *Zhejiang Academy of Agricultural Science*, *Hangzhou* 310021, *China*)

Abstract: Mold rot is one of the main factors which lead to the postharvest loss and short shelf-life of blueberry fruits. The objective of this study is to determine the primary fungal pathogens which may cause postharvest decay of blueberry during storage process, and to investigate the biological characteristics of pathogens, providing theoretical basis for disease control and further research. The typical postharvest decay sympotoms of blueberry were described. Five strains designated as LMA, LMB, LMC1, LMC2 and LMC3 were respectively isolated from diseased blueberry fruit harvested in Anji County of Zhejiang Province. Isolates were characterized by colony morphology and conidial characteristics at 28℃ in dark. The internal transcribed spacer (ITS) region of the ribosomal DNA (ITS1/ITS4) from five isolates was amplified and sequenced. The consensus ITS sequences of five isolates were compared with the associated sequences in GenBank. MEGA 5.0 was used to draw the phylogenetic tree of five isolates and other related sequences. The isolated strains were identified as *B. cinerea*, *T. viridescens*, *P. cecidicola*, *P. polonicum* and *P. expansum*, respectively, according to the morphologies of colony and conidial and the rDNA-ITS sequence analysis. The biological characteristics of the isolated strains were further investigated including the effects of different medias, carbon and nitrogen sources, temperatures, pH values and light on mycelial growth of five fungal pathogens using cross method, and the results showed that the suitable culture media and temperature for the five strains were blueberry extract-glucose media and 25 ~ 30℃, respectively. The optimal carbon source was fructose for LMA, LMC1 and LMC2 strains, sucrose for LMB strain, and soluble starch for LMC3 strain. The optimal nitrogen source was peptone for LMA, LMC1 and LMC2 strains, yeast extract powder for LMB1 and LMC3 strains. The effects of light on the mycelia growth of LMA, LMC1 and LMC2 were significant, but that was insignificant on the growth of LMB and LMC3 strains.

Key words: blueberry; postharvest disease; isolation and identification; rDNA-ITS; biological characteristics

收稿日期: 2017-02-13　修回日期: 2017-03-25

基金项目: 国家自然科学基金项目(31601523)、公益性行业(农业)科研专项(201303073)和浙江省重大科技专项重点农业项目(2014C02024)

作者简介: 郜海燕(1958—),女,研究员,博士生导师,主要从事食品物流保鲜与质量控制研究,E-mail: spsghy@163.com

引言

蓝莓果实含有丰富的花青素、类黄酮、维生素 C、叶酸、鞣花酸等多种生理活性物质[1-2],具有抗衰老、降血压、抗氧化、抗癌等功效[3]。蓝莓一般成熟于高温多雨的夏季,采收后,很容易发生结构、营养和生理品质的变化,并且果实富含糖分及其他营养物质,易于微生物的繁殖,低 pH 值属性使其更易受到真菌的侵袭,霉变成为蓝莓采后损失、货架期短的主要原因之一[4-5],严重影响其商品性和经济价值。侵袭采后蓝莓的病原真菌很多,但存在地域的差异性:西班牙、美国、智利、阿根廷等地的病原菌主要是 *Botrytis cinerea*、*Colletotrichum* spp.、*Alternaria* spp.、*Cladosporium* spp.、*Penicillium* spp.、*Fusarium* spp. 和 *Rhizopus* spp.[5-10];周笑犁等[11]的研究表明贵州省蓝莓果实采后贮藏过程中的主要病原菌为拟盘多毛孢(*Pestalotiopsis*)、青霉(*Penicillium*)、地霉(*Geotrichum*)和枝孢霉(*Cladosporium*);白雪等[12]鉴定出大连地区蓝莓主要病原菌为葡萄孢霉(*B. cinema*)。分离鉴定蓝莓采后致腐的主要病原菌是病害防治的首要问题,目前尚未见浙江地区蓝莓霉变真菌的研究。由于病原菌在形态、生理、病理等方面存在复杂性和多态性,常规形态鉴定周期较长,且难以将病原鉴定到种或亚种水平;而真菌在 rDNA-ITS 区既具保守性,又在属间及同属不同种间存在广泛的多态性[13],在病菌分类鉴定方面应用广泛。目前国内外对利用真菌 rDNA-ITS 对霉烂蓝莓病原菌鉴定的研究鲜有报道。

本文对采收于浙江省杭州市安吉县蓝莓基地贮藏发病的蓝莓果实病原菌进行分离纯化,在传统的形态鉴定基础上,结合 rDNA-ITS 测序将菌株鉴定到种的水平,并研究分离株的生物学特性,以期为蓝莓贮藏期真菌病害的防控提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与培养基

1.1.1 试验材料

蓝莓品种为“莱格西”,采自浙江省杭州市安吉县“森之蓝”蓝莓基地,采摘当天用保鲜车运回实验室,4℃贮藏备用。

1.1.2 培养基

PDA 培养基:马铃薯(去皮)200 g、葡萄糖 20 g、琼脂 20 g,pH 值自然。

察氏培养基:蔗糖 30 g、$NaNO_3$ 2 g、K_2HPO_4 1 g、$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g、KCl 0.5 g、$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1 g、琼脂 20 g、蒸馏水 1 000 mL,pH 值 7.0 ~ 7.2。

1.2 病原菌的分离纯化与致病性测定

对典型发病的蓝莓果实,采用常规组织分离法分离病原菌[14],切取病健交界处小块病变组织(5 mm × 5 mm),经 70% 酒精消毒 1 min,再用 0.1% 升汞处理 30 s 后,用无菌水漂洗 3 遍,移至 PDA 平板培养基上,置于 28℃黑暗条件下培养。长出菌丝后挑取菌落边缘接种至 PDA 平板纯化,获纯培养后,再转接到试管培养 7 d,放入 4℃冰箱保存。

按照柯赫氏法则进行致病性测定。将纯化保存的病原菌活化,接种至 PDA 培养基上 28℃黑暗条件下培养 5 d,挑取菌丝块放入无菌水中将孢子洗脱,用血球计数板计数测定孢子悬浮液浓度并调至 10^5 个/mL。将健康的蓝莓果实经 75% 酒精表面消毒后,用经高压蒸汽灭菌的针轻轻刺伤表皮,将制备好的孢子悬液涂布到刺伤部位,将蓝莓果实置于 90 mm 培养皿中,培养皿放有无菌水浸湿的经高压蒸汽灭菌的滤纸保湿培养。每处理 3 次重复,设清水对照。发病后从病斑上再分离病原菌。

1.3 病原菌鉴定

病原菌形态学观察:将病原菌接种到 PDA 平板,28℃黑暗培养,观察记录菌落形态学特征,并对病原菌分生孢子进行显微形态观测、拍照。

ITS 序列分析:将孢子悬浮液接种到 PDB 培养液中培养 3 ~ 4 d,收集菌丝,采用改良的 CTAB 法[15]提取病原菌基因组 DNA。采用真菌核糖体基因转录间隔区通用引物 ITSl(5′-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3′)和 ITS4(5′-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3′)对病原菌的基因组 DNA 进行 PCR 扩增。25 μL PCR 反应体系包括 10 x PCR buffer 2.5 μL,$MgCl_2$(25 mmol/L)2.5 μL,dNTP(10 mmol/L)0.5 μL,模板 DNA 1 μL,5 U/μL TaqDNA 聚合酶 0.2 μL,ITS1 和 ITS4 引物(20 mmol/L)各 0.5 μL,ddH_2O 17.3 μL。

反应程序:95℃预变性 5 min;94℃变性 30 s,55℃退火 30 s,72℃延伸 1 min,共 30 个循环;最后 72℃延伸 10 min。

扩增产物用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测后,在凝胶成像仪上进行观察并拍照,并送杭州利贞生物公司进行测序。将所得序列与 GenBank 中已知序列进行 BLAST 比对和同源性分析,选取与病原菌 ITS 序列同源性高和形态相近的菌株序列,用 MEGA 5.0 软件[16-17]中的 Neighbor - Joining(NJ)方法构建系统发育树,并用 Bootstrap 进行自举检验,500 次重复。

1.4 病原菌生物学特性

将纯化保存的病原菌活化后接种至 PDA 培养

基上 28℃黑暗条件下培养 5 d，用打孔器取直径为 6 mm的菌饼接种至测定培养基，培养 5 d 后用十字交叉法测量菌落直径，分析不同培养基、温度、碳源、氮源、pH 值、光照对菌丝生长的影响。

培养基：病原菌接种到 PDA、PCA（胰蛋白胨 5.0 g、酵母浸膏 2.5 g、葡萄糖 1.0 g、琼脂 15 g、蒸馏水 1 000 mL，pH 值 7.0 ~ 7.2）、孟加拉红培养基（蛋白胨 5.0 g、葡萄糖 10.0 g、K_2HPO_4 1.0 g、$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g、孟加拉红 0.033 g、琼脂 20 g、蒸馏水 1 000 mL）、蓝莓汁-葡萄糖培养基（蓝莓 200 g、葡萄糖 20 g、琼脂 20 g、蒸馏水 1 000 mL，pH 值 7.0 ~ 7.2）和 WA 培养基（琼脂 20 g、蒸馏水1 000 mL）。

温度：病原菌接种到 PDA 培养基后，置于温度为 4、10、15、20、25、30、35℃的条件下恒温培养。

碳、氮源：以察氏培养基为基础培养基，用含等质量的葡萄糖、果糖、可溶性淀粉、麦芽糖、乳糖、甘露醇代替蔗糖作为碳源；用含等质量的牛肉膏、NH_4NO_3、蛋白胨、酵母浸膏、尿素代替 $NaNO_3$ 作为氮源。

pH 值：病原菌接种到用 0.1% NaOH 和 0.1% HCl 溶液调节至 pH 值为 4、5、6、7、8、9、10、11 的 PDA 培养基后，恒温培养。

光照：病原菌接种到 PDA 培养基后，进行 24 h 光照、12 h 光暗交替、24 h 黑暗共 3 个处理。以上试验每处理 3 次重复，除温度和光照试验外，其余均在 28℃条件下黑暗培养 24 h。

1.5　数据分析

数据以平均值 ± 标准差表示，利用 OriginPro 5.8 软件进行单因素方差分析，$p < 0.05$ 作为差异显著性判断标准。

2　结果与分析

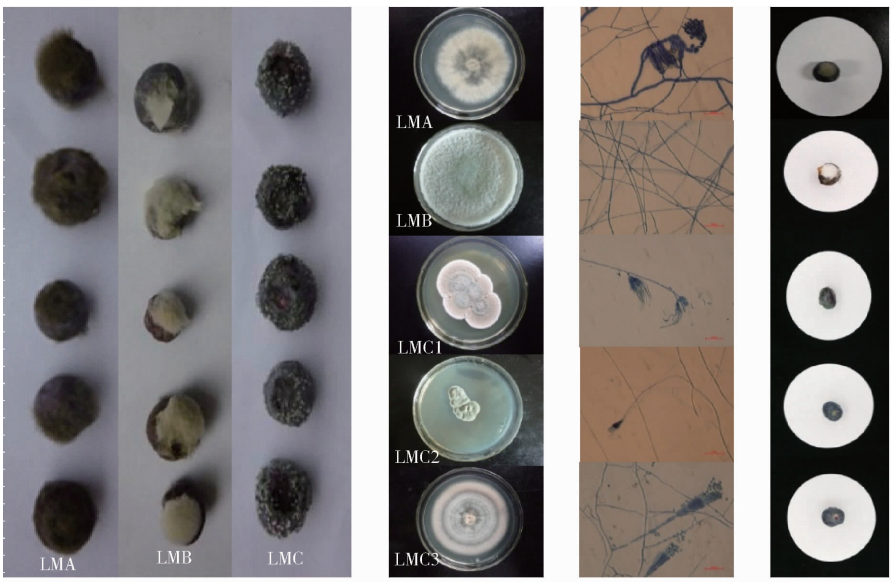
2.1　病害症状及致病性

蓝莓果实在低温贮藏一个月后，果实长出霉菌，典型发病果实分为 3 类（图 1a）。菌斑 LMA：果实上密生灰褐色团粒状柔软霉层，形成大量孢子，易与周围病果形成片状霉层。菌斑 LMB：病果初期有扁平或塌陷的斑点，后期形成大的腐烂区，在腐烂区域的表面有白色菌丝。菌斑 LMC：造成蓝莓的干瘪皱缩，侵染部位最初为水浸状略变色的斑点，形成橄榄绿色或绿色霉层。

用病斑上分离纯化的菌株，人工接种健康的蓝莓果实。在接种部位分别出现灰色霉层、白色菌丝和橄榄绿色或绿色霉斑，病症与自然条件下的发病症状相同（图 1d）。从接种发病的部位可重新分离到与接种菌相同的菌株，而对照不发病，证明所分离接种的菌株为蓝莓致腐病原菌。

2.2　分离菌株的形态学特征

从发病果实样品上经纯化得到 5 株分离菌株，编号为 LMA、LMB、LMC1、LMC2 和 LMC3（图 1b、1c）。菌株 LMA 在 PDA 培养基上 28℃培养 3 ~ 6 d 即可长满平板，初为白色、质密，随着菌丝增长颜色加深变成深灰绿色，老熟时呈灰褐色，菌丝丝绒状，约 7 d 在培养基周围产生黑色菌核，呈球形，分生孢子梗数根丛生，具隔膜，稍弯曲，淡褐色，（123 ~ 287）μm × （10 ~ 14）μm，顶端有分枝，膨大呈圆形，分生孢子聚生于小梗上，呈卵圆形或椭圆形，单胞，（8 ~ 14）μm × （7 ~ 11）μm，无色至淡色透明。菌株



(a) 蓝莓贮藏期发病果实病害症状　(b) 在PDA上的培养性状(7 d)　(c) 菌丝和分生孢子梗形态(20 μm)　(d) 回接症状

图 1　蓝莓贮藏期发病果实病害症状、分离菌株形态特征及其回接症状

Fig. 1　Symptoms of postharvest diseases on blueberry and morphology and pathogenicity of pathogens

LMB 在 PDA 培养基上、28℃条件下菌落生长速度很快,整个菌落整齐而平坦,气生菌丝体绒状或棉絮状,菌丝为白色,生长中期菌落中间出现淡黄色,后期渐变为青绿色,在电子显微镜下观察呈树枝状,疏散,分生孢子呈卵形、椭圆形或近球形,光滑,3.6 μm×4.5 μm。菌株 LMC1 在 PDA 培养基上菌落呈粉末状,具有明显环痕,中间区域呈绿色,生长后期中间有白色,后长成白绒,周围呈金褐色,背面黄褐色。分生孢子梗生于菌丝,一端分生孢子梗顶端呈帚状分枝,分子孢子大多呈圆形,多为三轮生。菌株 LMC2 在 PDA 培养基上菌落平坦,青色呈粉粒状,中间有小白点,有白色的边缘,最后变褐色。基质由白色转为黄褐色,并随着培养时间的延长逐步加深,较薄,易产生小菌落,干燥,呈圆形,生长后期颜色加深。在电镜下观察,帚状枝,通常双轮生,分生孢子呈卵圆形,孢梗茎壁平滑。菌株 LMC3 在 PDA 培养基上形成的菌落平坦,呈绒状,生长后期颜色加深,呈深灰绿色,背面暗红色,最外圈呈粉色,有油状分泌物。菌丝细长丝状,线性,分生孢子梗顶端呈帚状分枝,分枝不规则,排列紧密;小梗平行排列,通常 6 ~ 10 个,(9.0 ~ 15.0) μm × (3.0 ~ 3.5) μm,分生孢子呈链状,椭圆形,表面光滑,单胞,无色,(4.5 ~ 6.5) μm × (3.0 ~ 4.0) μm 分生孢子链集成圆柱形。在罹病果实和人工培养条件下均未见病原菌的有性阶段。依据病原菌的培养性状和形态学特征,参照文献[18 - 20],初步鉴定以分离菌株 LMA 为代表的第 1 类蓝莓果实的病原菌是灰葡萄孢,以分离菌株 LMB 为代表的第 2 类蓝莓果实的病原菌是木霉属,以分离菌株 LMC1、LMC2 和 LMC3 为代表的第 3 类蓝莓果实的病原菌是青霉属。

2.3 rDNA-ITS 序列分析

以真菌 rDNA-ITS 区通用引物 ITS1 和 ITS4,扩增这 5 种代表病原菌菌株的基因组 DNA,在 500 bp 附近有明显的扩增条带(图 2,图中 M、1、2、3、4、5、C 分别表示 DL2000 DNA marker、菌株 LMA、菌株 LMB、菌株 LMC1、菌株 LMC2、菌株 LMC3 和对照),将测序结果与 NCBI 中的基因序列进行比对,用软件 ClustalX 1.8 进行多重序列比较,再用软件 MEGA 5.0 采用邻接法构建系统发育树(图 3)。LMA 与 GenBank 中登记的登录号为 KR080286、KR909190 的灰葡萄孢菌聚为一支;LMB 与登录号为 NR138429、AY380905、AF456922 的绿色木霉聚为一支;LMC1 与 GenBank 中登记的登录号为 AY787844 的 *P. cecidicola* 聚为一支;LMC2 与 GenBank 中登记的登录号为 AJ005492.1、NR103687 的波兰青霉聚为一支;LMC3 与 GenBank 中登记的登录号为 KC456327、NR077154 的扩展青霉聚为一支,相似度分别为 99% ~ 100%。5 种病原菌特异性引物扩增结果再次证明所获代表菌株分别为 *B. cinerea*、*T. viridescens*、*P. cecidicola*、*P. polonicum* 和 *P. expansum*。

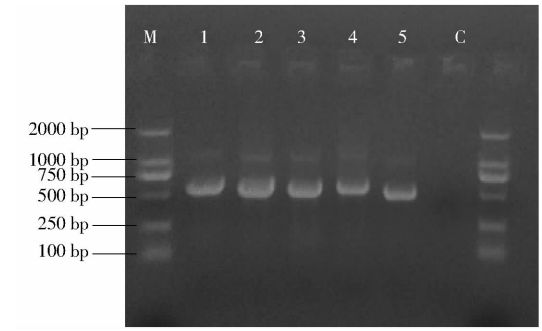


图 2 ITS1 和 ITS4 区域的 PCR 扩增产物电泳图

Fig. 2 Electrophoresis of PCR amplified products in ITS1 and ITS4

2.4 病原菌生物学特性

从图 4 可以看出,不同培养基对 5 种病原菌菌落生长影响有差异,与其他 3 种培养基相比,病原菌均在蓝莓汁 - 葡萄糖培养基中生长最好,其次是 PDA 培养基。培养 5 d 后,5 种病原菌菌丝在 10 ~ 35℃均可生长,且菌落生长直径在 4 ~ 35℃温度梯度范围内均呈现先上升后下降的趋势,最适生长温度为 25 ~ 30℃。LMA、LMC1 和 LMC3 最适生长温度为 25℃,LMB 和 LMC2 最适生长温度为 30℃。LMA、LMB 和 LMC1 5 d 菌落直径分别达到 71.19 mm、83.42 mm 和 57.46 mm,而 LMC2、LMC3 5 d 菌落直径仅为 35.40 mm 和 31.69 mm。LMB 相比其他病原菌有较宽的适宜生长温度。LMA、LMC1 和 LMC2 菌株在以果糖为碳源的培养基中菌丝生长得较好,LMB 菌株在以蔗糖为碳源的培养基中菌丝生长得较好,LMC3 菌株在以可溶性淀粉为碳源的培养基中菌丝生长得较好。病原菌菌丝生长对氮源的要求不同,其中 LMA、LMC1 和 LMC2 菌株菌丝在以蛋白胨为氮源的培养基中生长最好,LMB 和 LMC3 菌株菌丝在以酵母浸出粉为氮源的培养基中生长最好。5 种病原菌在 pH 值为 6 ~ 11 下均能生长,其中 LMB 对 pH 值不敏感,在 pH 值为 6 ~ 11 下均生长良好,但其他 4 种病原菌在 pH 值为 9.0 以上时病原菌菌丝均生长受限。在光照、黑暗和 12 h 光暗交替条件下,光照对 LMA、LMC1 和 LMC2 病原菌菌丝生长的影响有显著差异($p < 0.05$),说明对光照反应敏感,而光照对 LMB 和 LMC3 病原菌菌丝生长的影响没有显著差异($p > 0.05$),说明对光照反应不敏感。

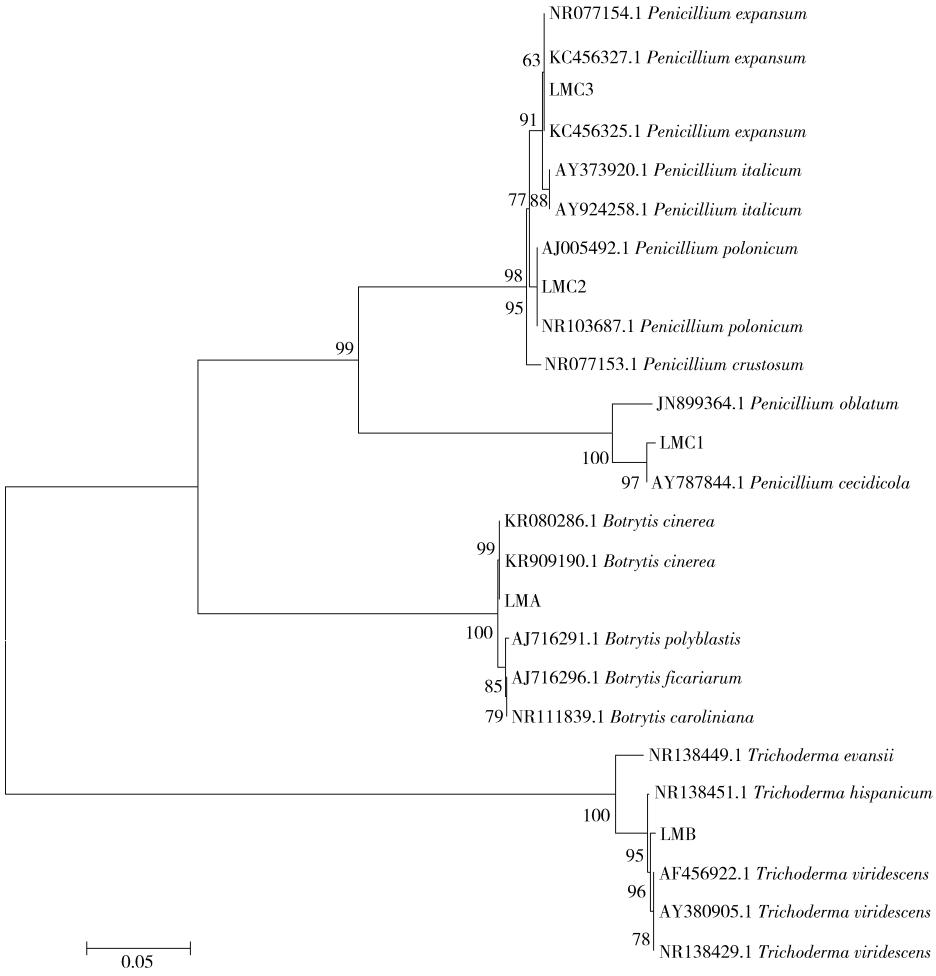


图 3　蓝莓贮藏期主要真菌病害分离株 rDNA-ITS 序列系统发育树

Fig. 3　Phylogenetic tree of rDNA-ITS of fungal pathogens from blueberry during postharvest storage

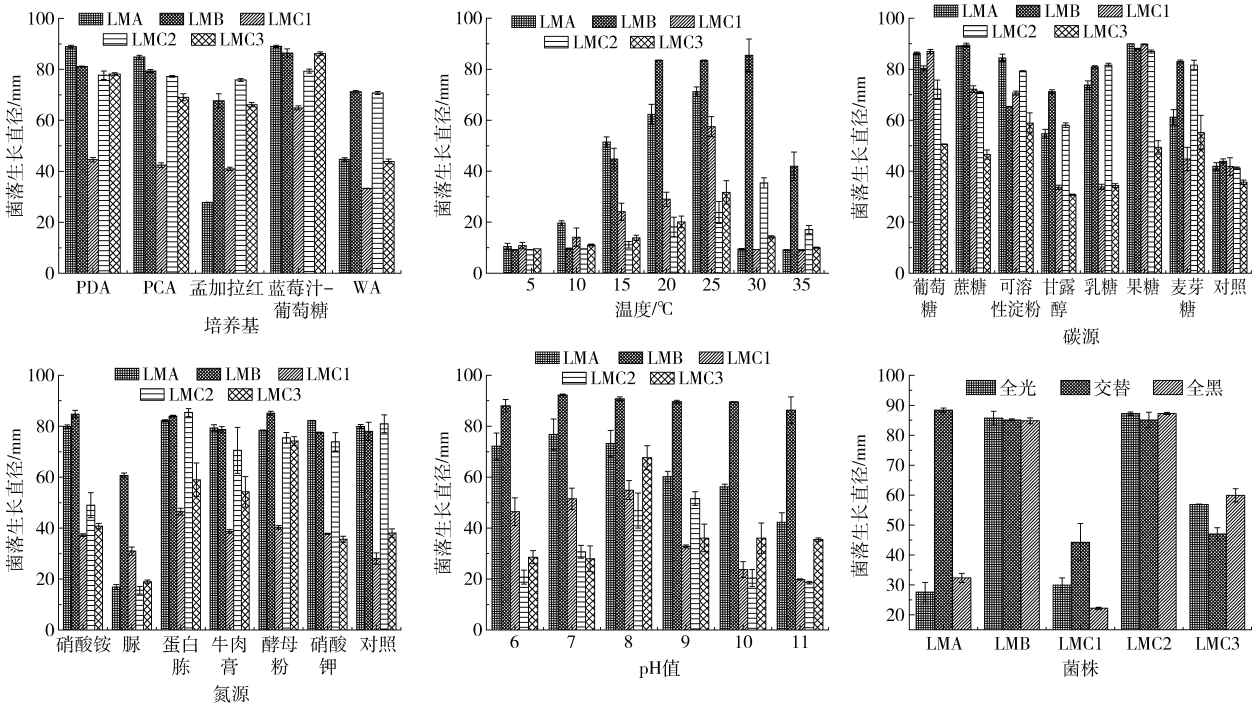


图 4　不同培养基、碳氮源、温度、pH 值和光照对病原真菌菌丝生长的影响

Fig. 4　Effects of different medias, carbon and nitrogen sources, temperatures, pH values and light on mycelial growth of five fungal pathogens

3 讨论

(1)为延长蓝莓的货架期,低温储藏是最常用的方式,而霉菌能在 -0.5℃的条件下生长并通过气生菌丝在浆果间快速传播,导致蓝莓在采后储藏、运输过程中损失严重[21-22]。梁晨等[23]分离鉴定出引起北方地区蓝莓采后病害的主要病原菌包括灰葡萄孢、青霉、褐孢霉、链格孢和枝顶孢等真菌。由于蓝莓品种以及温度和湿度等自然条件的差异,不同地区的蓝莓采后感染的真菌种类不同。本文从浙江地区采后发病蓝莓果实中分离得到主要病原真菌,经形态学及分子生物学鉴定,分别确定为灰葡萄孢霉(*B. cinerea*)、木霉(*T. viridescens*)和青霉(*Penicillium* spp.)。葡萄孢(*Botrytis*)和青霉菌(*Penicillium*)分别导致果蔬发生灰霉病(gray mold)和绿霉病(gray mold)。国内外有研究报道葡萄孢、青霉是引起蓝莓采后贮藏期病害的主要病原菌[6-12,23-24],本研究得到了相类似的结果,灰葡萄孢霉(*B. cinerea*)、青霉(*P. cecidicola*、*P. polonicum* 和 *P. expansum*)也是浙江地区蓝莓采后霉变的主要真菌,另外,本研究还在霉变蓝莓果实中分离鉴定出病原菌 *T. viridescens*。木霉属(*Trichoderma*)被报道是引起猕猴桃贮藏期果实霉烂的主要病原菌之一[13]。张广志等[25]发现 *Trchoderma* sp. 是一类具有较高生防价值的真菌,对防治作物白绢病、立枯病、猝倒病、枯萎病、疫病等土传病害及线虫有良好的效果。本研究中的木霉菌株 LMB 对引起蓝莓霉变的其他病原菌是否有拮抗作用,还有待进一步研究。

(2)灰葡萄孢菌(*B. cinerea*)的寄主范围十分广泛,生物学特性由于寄主、地区等条件不同而略有差异[26]。梁晨等[23]报道的灰葡萄孢菌适宜生长温度范围为 20 ~ 25℃;雷百战等[27]发现灰葡萄孢菌生长温度范围为 5 ~ 30℃,最适温度为 15 ~ 25℃;陈长卿等[28]研究的越橘灰霉病病原菌菌丝生长最适碳、氮源分别为甘露糖和蛋白胨。本研究分离的灰葡萄孢菌 LMA 最适生长温度为 25℃,最适碳、氮源分别为果糖和蛋白胨。木霉菌 LMB 的最适生长温度为 30℃,蔗糖和酵母浸出粉分别为最适碳、氮源,与柯仿钢等[29]研究报道的菌丝最适生长温度范围为 28 ~ 30℃,蔗糖、酵母膏分别为最佳碳、氮源结果类似。青霉属之间的生物学特性有一定差异。*P. polonicum* 的最适温度为 30℃,而 *P. cecidicola* 和 *P. expansum* 的最适温度为 25℃,在高温条件下 *P. polonicum* 为优势种,这与梁晨等[23]研究发现的高温条件有利于青霉菌的侵染结果相似。

(3)多种采后病害的发生与水分、温度和可溶性糖含量有关[30-31],蓝莓果实可溶性糖含量高,成熟采收于 6—7 月份,杭州多雨且温度多为 25 ~ 30℃,为 5 种病原菌的最适宜温度。有些病原菌有潜伏特性,多数病原菌在生长期间就侵入果实,长期潜伏在果实内部,并不表现症状,直至果实成熟采收和环境条件适宜的时候才发病[32-33],5 种病原菌是否具有潜伏特性以及侵染机制的研究还有待进一步研究。采后侵染多是由于在果实的采收、包装、运输过程中划伤或挤压造成的微伤口,是微生物侵染的主要途径[31],我国蓝莓的采收多为人工采摘,为减少采后病害的发生,在采收和贮运过程中要尽量避免机械损伤;蓝莓采收后应尽快运到包装厂进行预冷处理,在低温下贮藏,以减少病原菌的侵染,降低采后病害发生率。

4 结束语

初步研究了浙江地区蓝莓采后贮藏期霉变病原菌,获得 5 株病原菌,结合形态学和分子生物学方法分别鉴定为 *B. cinerea*、*T. viridescens*、*P. cecidicola*、*P. polonicum* 和 *P. expansum*;同时研究分离菌株的生物学特性,确定了其营养基质和生长条件:蓝莓汁-葡萄糖培养基,25 ~ 30℃;菌株 *B. cinerea*、*P. cecidicola* 和 *P. polonicum* 的最适碳、氮源分别为果糖和蛋白胨,且对光照敏感;菌株 *T. viridescens* 和菌株 *P. expansum* 的最适碳源分别为蔗糖和可溶性淀粉,最适氮源均为酵母浸出粉,对光照不敏感。研究结果可为蓝莓贮藏期腐烂病害的防治提供理论基础。

参 考 文 献

1 SELLAPPAN S, AKOH C C, KREWER G. Phenolic compounds and antioxidant capacity of Georgia-grown blueberries and blackberries[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50(8): 2432 - 2438.

2 郜海燕, 徐龙, 陈杭君, 等. 蓝莓采后品质调控和抗氧化研究进展[J]. 中国食品学报, 2013, 13(6): 1 - 8.
GAO Haiyan, XU Long, CHEN Hangjun, et al. Research progress on postharvest quality control and antioxidant activity of blueberries[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2013, 13(6): 1 - 8. (in Chinese)

3 PATEL S. Blueberry as functional food and dietary supplement: the natural way to ensure holistic health[J]. Mediterranean Journal of Nutrition & Metabolism, 2014, 7:133 - 143.

4 YANG G, YUE J, GONG X, et al. Blueberry leaf extracts incorporated chitosan coatings for preserving postharvest quality of fresh

blueberries[J]. Postharvest Biology and Technology, 2014, 92: 46 – 53.

5 TOURNAS V H, KATSOUDAS E. Mould and yeast flora in fresh berries, grapes and citrus fruits[J]. International Journal of Food Microbiology, 2005, 105(1): 11 – 17.

6 BARRAU C, SANTOS B D L, ROMERO F. Susceptibility of southern highbush and rabbiteye blueberry cultivars to postharvest diseases in Huelva, Spain[J]. Journal of Physiology, 2006, 366(1): 197 – 220.

7 MEHRA L K, MACLEAN D D, SHEWFELT R L, et al. Effect of postharvest biofumigation on fungal decay, sensory quality, and antioxidant levels of blueberry fruit[J]. Postharvest Biology & Technology, 2013, 85: 109 – 115.

8 MEHRA L K, SAVELLE A T, MACLEAN D D, et al. Postharvest disease development on southern highbush blueberry fruit in relation to berry flesh type and harvest method[J]. Plant Disease, 2013, 97(2): 213 – 221.

9 ZHU X Q, XIAO C L. Phylogenetic, morphological, and pathogenic characterization of *Alternaria* species associated with fruit rot of blueberry in California[J]. Phytopathology, 2015, 105: 1555 – 1567.

10 RIVERA S A, ZOFFOLI J P, LATORRE B A. Determination of optimal sulfur dioxide time and concentration product for postharvest control of gray mold of blueberry fruit[J]. Postharvest Biology & Technology, 2013, 83(2): 40 – 46.

11 周笑犁, 王瑞, 雷霁卿, 等. 蓝莓采后病原真菌分离及其生物学鉴定[J]. 食品科技, 2015, 40(9): 283 – 293.
ZHOU Xiaoli, WANG Rui, LEI Jiqing, et al. Separation and biological identification of pathogenic fungi on postharvest blueberry [J]. Food Science and Technology, 2015, 40(9): 283 – 293. (in Chinese)

12 白雪, 姜爱丽, 胡文忠, 等. 采后蓝莓果实表面病原菌的分离鉴定及 PCR 检测[J]. 食品工业科技, 2015, 36(23): 297 – 305.
BAI Xue, JIANG Aili, HU Wenzhong, et al. Study on the optimization of PCR detection conditions for pathogen isolated from the postharvest blueberry surface[J]. Science and Technology of Food Industry, 2015, 36(23): 297 – 305. (in Chinese)

13 段爱莉, 雷玉山, 孙翔宇, 等. 猕猴桃果实贮藏期主要真菌病害的 rDNA-ITS 鉴定及序列分析[J]. 中国农业科学, 2013, 46(4): 810 – 818.
DUAN Aili, LEI Yushan, SUN Xiangyu, et al. Molecular identification and rDNA-ITS sequence analysis of fungal pathogens in kiwifruit during storage[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2013, 46(4): 810 – 818. (in Chinese)

14 方忠达. 植病研究方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998.

15 周宗山, 徐成楠, 吴玉星, 等. 欧李炭疽病病原菌鉴定[J]. 植物病理学报, 2011, 41(5): 538 – 541.
ZHOU Zongshan, XU Chengnan, WU Yuxing, et al. Identification of the pathogen causing anthracnose of Chinese dwarf cherry [J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2011, 41(5): 538 – 541. (in Chinese)

16 岳田利, 耿玉丽, 袁亚宏, 等. 陕西省果库中嗜酸耐热菌的分离鉴定[J/OL]. 农业机械学报, 2013, 44(7): 187 – 193. http://www.j-csam.org/jcsam/ch/reader/view_abstract.aspx? file_no=20130733&flag=1. DOI: 10.6041/j.issn.1000-1298.2013.07.033.
YUE Tianli, GENG Yuli, YUAN Yahong, et al. Isolation and identification of *Alicyclobacillus* from Shaanxi apple libraries[J/OL]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2013, 44(7): 187 – 193. (in Chinese)

17 王虎玄, 岳田利, 胡仲秋, 等. 陕西浓缩苹果汁中高渗酵母的分离鉴定[J/OL]. 农业机械学报, 2015, 46(4): 246 – 251. http://www.j-csam.org/jcsam/ch/reader/view_abstract.aspx? file_no=20150436&flag=1. DOI: 10.6041/j.issn.1000-1298.2015.04.036.
WANG Huxuan, YUE Tianli, HU Zhongqiu, et al. Identification of osmotolerant yeast in apple juice concentrate from Shaanxi province[J/OL]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2015, 46(4): 246 – 251. (in Chinese)

18 TAMURA K, PETERSON D, PETERSON N, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods[J]. Molecular Biology and Evolution, 2011, 28(10): 2731 – 2739.

19 戴芳澜. 中国真菌总汇[M]. 北京: 科学出版社, 1979.

20 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979.

21 XU C, ZHANG H, ZHOU Z, et al. Identification and distribution of *Botryosphaeriaceae* species associated with blueberry stem blight in China [J]. European Journal of Plant Pathology, 2015, 143(4): 737 – 752.

22 JUNQUEIRA-GONÇALVES M P, ALARCÓN E, NIRANJAN K. The efficacy of potassium sorbate-coated packaging to control postharvest gray mold in raspberries, blackberries and blueberries[J]. Postharvest Biology & Technology, 2016, 111: 205 – 208.

23 梁晨, 刘翠, 赵洪海. 蓝莓贮藏期病原菌的鉴定及病菌的温度效应[C]// 中国植物病理学会 2010 年学术年会论文集, 2010: 108 – 113.
LIANG Chen, LIU Cui, ZHAO Honghai. Identification and temperature effect of the pathogens from blueberry in storage[C]// Proceedings of the 2010 Annual Conference of the Chinese Society for Plant Pathology, 2010: 108 – 113. (in Chinese)

24 徐城南, 王亚南, 胡同乐, 等. 蓝莓炭疽病病原菌鉴定及致病性测定[J]. 中国农业科学, 2014, 47(20): 3992 – 3998.
XU Chengnan, WANG Ya'nan, HU Tongle, et al. Identification and pathogenicity of pathogen casuing anthracnose on *Vaccinium* [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2014, 47(20): 3992 – 3998. (in Chinese)

25 张广志, 文成敬. 木霉对玉米纹枯病的生物防治[J]. 植物保护学报, 2005, 32(4): 1 – 4.
ZHANG Guangzhi, WEN Chengjing. Biocontrol of maize sheath blight with *Trichoderma* spp. [J]. Acta Phytophylacica Sinica, 2005, 32(4): 1 – 4. (in Chinese)

26 LI X, KERRIGAN J, CHAI W, et al. *Botrytis caroliniana*, a new species isolated from blackberry in South Carolina[J]. Mycologia, 2012, 104(3): 650 – 658.

27 雷百战, 李国英, 石在强. 葡萄灰霉病病原鉴定和生物学特性研究[J]. 石河子大学学报,2004,22(增刊):145 – 149.
LEI Baizhan, LI Guoying, SHI Zaiqiang. Identification and biological characteristics of the pathogen of *Botrytis cinerea* on grape [J]. Journal of Shihezi University, 2004, 22(Supp.): 145 – 149. (in Chinese)

28 陈长卿, 张博, 杨丽娜, 等. 越橘灰霉病病原菌鉴定及其生物学特性研究[J]. 吉林农业大学学报, 2012, 34(5):511 – 516.
CHEN Changqing, ZHANG Bo, YANG Li'na, et al. Identification and biological characteristics of pathogenic *Bacteria* of blueberry gray mold[J]. Journal of Jilin Agricultural University, 2012, 34(5):511 – 516. (in Chinese)

29 柯仿钢, 黄思良, 付岗,等. 西贡蕉枯萎病生防木霉菌株 gz-2 的鉴定及生物学特性研究[J]. 西南农业学报, 2010, 23(5):1533 – 1539.
KE Fanggang, HUANG Siliang, FU Gang, et al. Identification and biological characteristics of *Trichodermastrain* in gz-2, abiocontrol agent against Saigon banana Fusarium wilt[J]. Southwest China Journal of Agricultural Science, 2010, 23(5): 1533 – 1539. (in Chinese)

30 林月莉. 陕西省苹果轮纹病菌的致病性分化及其对果实的侵染过程研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2010.
LIN Yueli. Study on the differentiation of pathogenicity and infection process on fruits of *Botryosphaeria dothidea* in Shaanxi[D]. Yangling: Northwest A&F University,2010.

31 王艳娜. 鸭梨果实轮纹病寄生-病原菌互作机理[D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2007.
WANG Yanna. Interaction of host-pathogen on 'Ya' pear ring rot disease[D]. Beijing:Chinese Academy of Forestry, 2007. (in Chinese)

32 李广旭, 沈永波, 高艳敏,等. *Botryosphaeriadothidea* 在苹果果实上的侵染过程[J]. 果树学报, 2006, 23(1):69 – 72.
LI Guangxu, SHEN Yongbo,GAO Yanmin, et al. Infection process of *Botryosphaeriadothidea* in apple fruit[J]. Journal of Fruit Science, 2006, 23(1):69 – 72. (in Chinese)

33 胡美姣. 芒果果实潜伏侵染、*Botryodiplodiatheobromae* 致腐机理及蒂腐病防治技术基础研究[D]. 海口: 海南大学, 2013.
HU Meijiao. Study on latent infection, pathogenic mechanism of *Botryodiplodiatheobromae* and control for stem-end rot of mango fruit[D]. Haikou: Hainan University, 2013. (in Chinese)

(上接第 319 页)

25 YU Hongyan, ZENG Guangming, HUANG Danlian, et al. Microbial community succession and lignocellulose degradation during agricultural waste composting[J]. Biodegradation, 2007, 18(6):793 – 802.

26 DIGNAC M F, HOUOT S, FRANCOU C, et al. Pyrolytic study of compost and waste organic matter[J]. Organic Geochemistry, 2005, 36(7): 1054 – 1071.

27 ZENG Guangming, HUANG Danlian, HUANG Guohe, et al. Composting of lead contaminated solid waste with inocula of white-rot fungus [J]. Bioresource Technology, 2007, 98(2):320 – 326.

28 郑丽萍, 龙涛, 林玉锁, 等. Biolog – ECO 解析有机氯农药污染场地土壤微生物群落功能多样性特征[J]. 应用与环境生物学报, 2013, 19(5): 759 – 765.
ZHENG Liping, LONG Tao, LIN Yusuo, et al. Biolog – ECO analysis of microbial community functional diversity on organochlorine contaminated soil[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2013, 19(5):759 – 765. (in Chinese)

29 史龙翔, 谷洁, 潘洪加, 等. 复合菌剂提高果树枝条堆肥过程中酶活性[J]. 农业工程学报, 2015, 31(5):244 – 251.
SHI Longxiang, GU Jie, PAN Hongjia, et al. Improving enzyme activity by compound microbial agents in compost with mixed fruit tree branches and pig manure during composting[J]. Transactions of the CSAE, 2015, 31(5): 244 – 251. (in Chinese)

30 FRANCESCO S, JOSEBA S. Arizmendiarrieta, ignacio irigoyenmeat waste as feedstock for home composting: effects on the process and quality of compost[J]. Waste Management, 2016, 7(4):22 – 26.