

左盼盼,付苏,彭丽桃,等.猕猴桃采后软腐病原菌鉴定及香芹酚对其控制效果[J].华中农业大学学报,2020,39(6):15-22.

DOI:10.13300/j.cnki.hnlkxb.2020.06.003

## 猕猴桃采后软腐病原菌鉴定及香芹酚对其控制效果

左盼盼,付苏,彭丽桃,范刚,杨书珍,李杰

华中农业大学食品科技学院,武汉 430070

**摘要** 为明确猕猴桃软腐病原菌种类及香芹酚对其控制效果,依据传统真菌形态学观察法和 rDNA-ITS 序列分析技术对发病猕猴桃果实中的致病菌进行病原菌的分离鉴定,并探讨香芹酚对分离得到的猕猴桃软腐病原菌的控制效果。结果表明:引起猕猴桃采后果实软腐病的主要致病菌为葡萄座腔菌(*Botryosphaeria dothidea*)与拟茎点霉菌(*Phomopsis* sp.),其次为灰葡萄孢菌(*Botrytis cinerea*)、层出镰刀菌(*Fusarium proliferatum*)和链格孢菌(*Alternaria* sp.);香芹酚对 8 株猕猴桃软腐病原真菌均表现出良好的抑菌活性,对葡萄座腔菌和拟茎点霉菌的抑制作用尤为显著,半抑制质量浓度( $EC_{50}$ )为  $8.87 \mu\text{g/L}$ 。同时,香芹酚有效控制模拟销售环境下猕猴桃果实软腐病的发生,放置 8 d 时处理组发病率仅为对照果实的 50.17%,且对猕猴桃果实的品质指标影响不显著( $P>0.05$ )。因此,香芹酚在控制猕猴桃果实采后软腐病方面具有潜在的应用价值。

**关键词** 猕猴桃;软腐病;菌种鉴定;植物精油;香芹酚;绿色防控

**中图分类号** S 482.99 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2020)06-0015-08

猕猴桃(*Actinidia chinensis*)又名藤梨、奇异果,因其富含维生素 C、维生素 E、叶酸等营养成分,热量低,营养价值高,味道酸甜可口,深受消费者的喜爱<sup>[1]</sup>。猕猴桃作为我国新兴的经济林树种之一,近年来得到了快速发展,我国已经成世界上猕猴桃优势主产国,其产量和种植面积均位居世界第一<sup>[2]</sup>。但由于猕猴桃果实皮薄汁多、营养丰富,在果实贮运和销售过程中极易遭受病原微生物感染而腐烂变质,给生产带来巨大损失。其中,猕猴桃软腐病是猕猴桃采后贮运和销售过程中危害最为严重的真菌病害,在陕西、贵州等主产区的发病率高达 20%~50%,严重制约了猕猴桃产业的健康发展<sup>[3]</sup>。猕猴桃软腐病菌在幼果期感染果实后长期潜伏在果实组织中,至成熟期发病,尤其在贮藏后期、销售和消费过程中发病严重。猕猴桃软腐病的病原菌多属内生菌,很难从果实外部判断病害发生;同时,引起猕猴桃软腐病的病原菌种类多,且病菌类型和致病力易受宿主生长地域、气候条件和品种抗性等因素影响,发病情况复杂,以上因素均为猕猴桃软腐病的防控带来很大困难<sup>[4]</sup>。但目前有关猕猴桃软腐病的病原

菌鉴定和病害控制方面的研究报道相对较少,且存在一定争议。因此,研究猕猴桃采后软腐病的病原菌种类及其控制措施对于猕猴桃产业的健康发展具有重要意义。

精油是从植物中提取的一种次生代谢物质,具有强烈芳香性的挥发性油状混合物,目前已经发现的植物精油超过 3 000 种,其中约 1 340 种植物精油具有抗菌活性,是开发新型安全抗菌剂的优质资源<sup>[5]</sup>。香芹酚(2-甲基-5-异丙基苯酚)又称香荆芥酚,是香芹、牛至和百里香的主要活性成分,由于安全性好,在美国已被批准为“GRAS”类别的天然香料<sup>[6]</sup>。研究发现香芹酚具有抗癌、抗氧化、抗菌等多种生物活性,不仅对肠道沙门氏菌、大肠杆菌、蜡样芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌等细菌具有显著的抑制效果<sup>[7]</sup>,对青霉菌、匍茎根霉菌、灰霉菌和曲霉菌也表现出良好的抑菌作用,在食品防腐保鲜领域展现出良好的应用前景<sup>[8-9]</sup>,但有关香芹酚在猕猴桃采后软腐病的控制效果方面的研究鲜见报道。本研究从发病猕猴桃果实中分离、鉴定软腐病的主要致病菌,并在此基础上测定离体条件下和模拟商业销售环境

收稿日期:2020-05-11

基金项目:国家重点研发计划项目(2019YFD1002300)

左盼盼,硕士研究生.研究方向:食品工程. E-mail: zongqi@mail.hzau.edu.cn

通信作者:杨书珍,博士,副教授.研究方向:果蔬采后贮藏保鲜与加工中品质的发生机制及其安全控制. E-mail: yszhen@mail.hzau.edu.cn

中香芹酚对猕猴桃软腐病菌的控制效果,以期为探究猕猴桃采后软腐病的发病规律和绿色防控提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

发病猕猴桃果实分别采集于湖北省襄阳市谷城县万丰园猕猴桃基地、陕西周至县猕猴桃基地及华中农业大学周边超市。用于模拟销售贮藏实验的猕猴桃采自周至县猕猴桃基地,品种为“徐香”。培养基为马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基;2×Taq PCR Master Mix 购自天一辉远生物科技有限公司。香芹酚购自上海麦克林生化科技有限公司;所用其他试剂均为分析纯,购自国药集团化学试剂有限公司。

### 1.2 病原菌分离与纯化

采用组织分离法<sup>[10]</sup>对致病真菌进行分离,具体步骤如下:用清水洗猕猴桃病果表面,用灭菌解剖刀切取病健交接处组织,将组织小块在 75%乙醇中浸泡 5 s,无菌水清洗 3 次,最后接在 PDA 培养基上,于 26 °C 恒温条件下倒置培养,当菌落直径为 1 cm 时,挑取菌落边缘菌丝转接到新的 PDA 培养基内于 26 °C 恒温条件下倒置培养,经 3~5 次划线分离,直至获得纯病原菌菌落,4 °C 冰箱保存。

### 1.3 致病性测定

根据柯赫氏法则进行致病性测定:挑选健康、无损伤的“徐香”猕猴桃果实,用 75%乙醇溶液表面消毒,取菌落边缘的菌饼(直径为 5 mm),采用针刺法将菌饼接种于伤口处。以接种无菌的 PDA 培养基作为对照,于 26 °C 恒温培养,记录发病情况并采用十字交叉法测量病斑直径。发病后于病斑处再次分离培养病原菌,并与原接种菌株进行对比,形态学鉴定一致则确定为该病原菌。

### 1.4 病原菌鉴定

1)形态学鉴定。根据各致病菌株在 PDA 上的菌落特征、光学显微镜下菌丝形态、分生孢子及分生孢子梗的形状、色泽、菌丝隔膜等性状进行初步鉴定。

2)分子生物学鉴定。参照 Edwards 等<sup>[11]</sup>的 CTAB 法提取菌株 DNA。真菌 rDNA -ITS 区的通用引物 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') 和 ITS2 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') 作为 PCR 扩增引物。引物扩增体系为:15 μL

2×Taq PCR Master Mix, 1 μL DNA, 1 μL 10 mmol/L 上游引物与 1 μL 10 mmol/L 下游引物,12 μL 超纯水。PCR 循环条件为 95 °C 预变性 5 min, 95 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 30 s 共 35 个循环,72 °C 修复延伸 5 min, 4 °C 保存。PCR 产物用 1%琼脂糖进行凝胶电泳,电压 120 V,时间 20 min,在凝胶成像分析仪中进行拍照检测。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测后,由天一辉远生物科技(武汉)有限公司进行测序,测序结果在 NCBI 数据库中进行 BLAST 比对分析,确定菌株的分类地位。

### 1.5 香芹酚对猕猴桃软腐病原菌的抑制作用

采用生长速率法<sup>[12]</sup>测定香芹酚对猕猴桃软腐病原真菌的抑制效果。将病原菌孢子接种至 PDA 培养基上于 26 °C 培养 3 d 后,于菌落边缘处用 7 mm 的打孔器取菌饼,将菌饼反贴于 PDA 培养基上;然后,在无菌滤纸片上滴加 0、0.29、0.58、0.87、1.16、1.45、1.74 μg 香芹酚并反贴于培养皿内盖中央,快速用封口膜将培养皿密封,使香芹酚的终质量浓度分别为 0、2.9、5.8、8.7、11.6、14.5、17.4 μg/L。以不含香芹酚作为对照;每个浓度设置 3 个重复,置于 26 °C 条件下培养 72 h 后测定病原菌的菌落直径。

### 1.6 模拟销售条件下香芹酚对猕猴桃软腐病的控制效果

挑选大小、色泽及成熟度一致且无机械损伤的健康徐香猕猴桃果实,将 50 μL 58 mg/L 香芹酚溶液均匀喷施在包装纸表面,晾干后包裹猕猴桃果实,然后将猕猴桃置于聚乙烯保鲜袋中,并于模拟常温货架环境(温度为 25 °C、相对湿度为 90%)条件下放置。以上每个处理设置 3 个重复,每个重复 30 个果实。放置期间每隔 2 d 统计猕猴桃果实的软腐病发病率,并取样用于品质指标测定。果实硬度使用 GY-4 型水果硬度计测定,可溶性固形物(SSC)含量使用手持测糖仪测定,可滴定酸(TA)含量参照文献<sup>[13]</sup>的酸碱滴定法测定。V<sub>c</sub>含量采用磷钼酸法测定,总酚(TP)和总类黄酮(TF)分别参考朱仙慕等<sup>[14]</sup>和陆蓓等<sup>[15]</sup>的紫外分光光度法进行测定。

## 2 结果与分析

### 2.1 猕猴桃果实软腐病病原菌的显微形态特征

本研究从 50 个不同来源的猕猴桃软腐病发病

果实中分离获得8种病原菌共96株,依次编号为MH-1~MH-8,各种类病原菌分别检出23、31、17、10、5、4、4和2株。病原菌的菌落特征和显微结构如图1所示,根据菌落特征、生长速率和菌丝孢子形态等初步鉴定出5种。

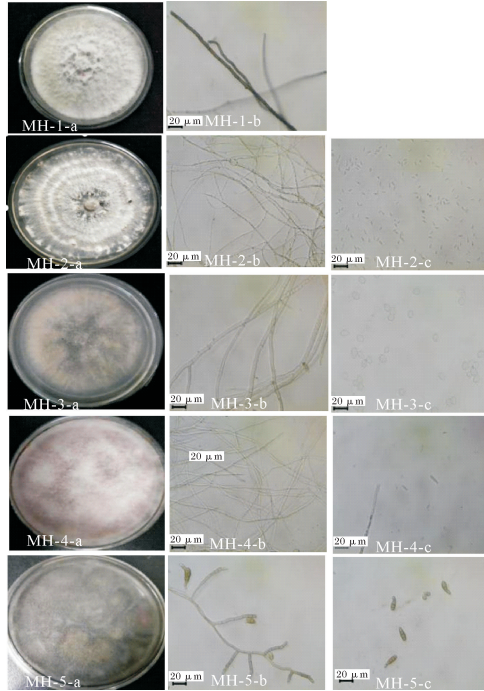


图1 5种病原真菌在PDA培养基上菌落特征(a)、显微菌丝形态(b)和孢子形态(c)观察

Fig.1 Colony growth in PDA media(a), morphological mycelium(b) and spore characteristics(c) of five pathogenic fungi

MH-1:菌丝初为白色,培养3 d后从菌落中央渐转为墨绿色,菌落边缘不整齐,气生菌丝发达,7 d后,菌落颜色加深至黑色;菌丝有节状隔膜,多核,直径约 $3.55\sim 5.69\ \mu\text{m}$ ,依据上述特征并结合文献[16]初步鉴定为葡萄座腔菌(*Botrytis dothidea*)。

MH-2:菌丝为白色,边缘较整齐,呈明显轮状生长,气生菌丝不发达,紧贴培养基生长且生长速度较慢,5 d后产生菌核;菌丝较细, $2.45\sim 3.86\ \mu\text{m}$ ,分生孢子器暗褐色、分散、球形或扁球状、单腔;分生孢子梗分隔、细长,孢子形状似麦粒,孢子大小为 $(2.07\sim 2.88)\ \mu\text{m}\times(6.21\sim 7.89)\ \mu\text{m}$ 。依据上述特征并结合文献[17]初步鉴定为拟茎点霉菌(*Phomopsis* sp.)。

MH-3:菌丝为灰白色绒状,然后转为浅褐色,菌落边缘较整齐,气生菌丝旺盛,3 d后菌落直径达

到90 mm,可产生黑色菌核;菌丝有节状隔膜,直径为 $6.05\sim 8.28\ \mu\text{m}$ ,具隔膜,顶端呈1~2次分枝,分枝的末端膨大,上密生小梗,小梗上聚生大量分生孢子;孢子为椭圆形,大小为 $(11.08\sim 13.23)\ \mu\text{m}\times(7.88\sim 9.35)\ \mu\text{m}$ ,依据上述特征并结合文献[18]初步鉴定为灰葡萄孢菌(*Botrytis cinerea*)。

MH-4:菌落初为白色,从底部逐渐变为红色,边缘呈放射状,气生菌丝为白色且旺盛;菌丝宽度约为 $3.45\sim 5.52\ \mu\text{m}$ ,分生孢子为弯月形或纺锤形,有2~5个隔膜,大小为 $(3.59\sim 4.91)\ \mu\text{m}\times(25.45\sim 33.06)\ \mu\text{m}$ ,依据上述特征并结合文献[19]初步鉴定为层出镰刀菌(*F. proliferatum*)。

MH-5:菌落初为白色,后变为灰绿色,3 d后转为墨绿色,气生菌丝不发达,边缘整齐,生长速度适中;菌丝有横隔,宽度约为 $4.27\sim 5.87\ \mu\text{m}$ ;分生孢子呈纺锤形、棍棒形或梨形,褐色,大小为 $(7.21\sim 8.54)\ \mu\text{m}\times(19.02\sim 23.07)\ \mu\text{m}$ ,依据上述特征并结合文献[17]初步鉴定为链格孢菌(*Alternaria* sp.)。

## 2.2 猕猴桃果实软腐病病原菌的致病性

将分离纯化的病原菌回接至健康猕猴桃果实,室温放置7 d后,5株病原菌造伤接种的猕猴桃果实均出现了明显的软腐病病状,而对照组的则不发病(图2A)。对发病组织的病原菌重新分离再培养后,其培养特性和菌丝形态与原病菌一致。由图2B可知,MH-1与MH-2两种病原真菌的病斑直径最大,分别为 $(40.37\pm 0.55)$ 和 $(37.6\pm 3.31)$  mm,致病性最强,而MH-3和MH-4致病性最弱。因此,本研究进一步利用ITS基因序列对MH-1、MH-2进行分子鉴定。

## 2.3 猕猴桃果实软腐病病原菌的分子鉴定

以通用引物进行PCR扩增得到MH-1和MH-2菌株的rDNA-ITS序列,电泳图谱显示2个菌株的rDNA-ITS序列长度大小为500~750 bp(图3)。测序结果显示MH-1、MH-2菌株的rDNA-ITS序列大小分别为552、587 bp,与电泳图谱结果一致。将获得的序列与GenBank中已有序列进行同源性比较,发现MH-1、MH-2与葡萄座腔菌*B. dothidea* (KP183175.1)、拟茎点霉菌*Phomopsis* sp. (KJ739493.1)的同源性均达到99%。因此,MH-1与MH-2两种病原菌分别鉴定为葡萄座腔菌(*B. dothidea*)与拟茎点霉菌(*Phomopsis* sp.)。



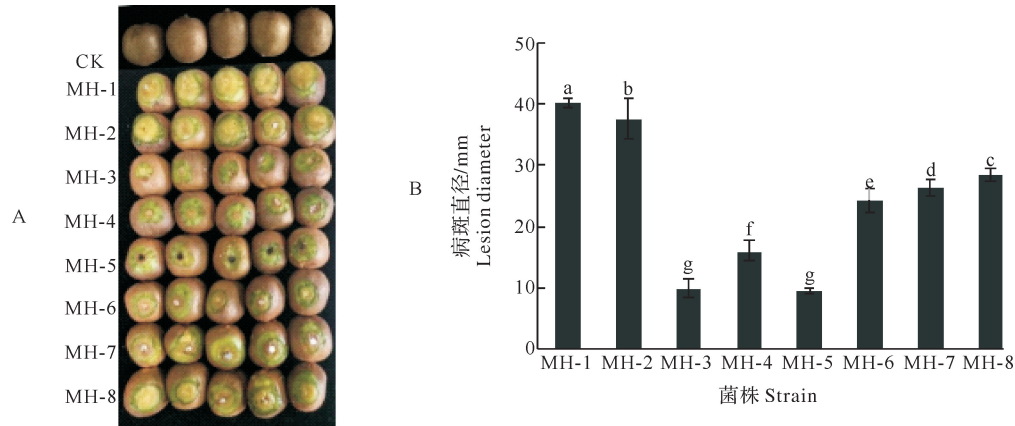


图 2 猕猴桃软腐病原菌的回接病症(A)及致病性测定(B)

Fig.2 Infective symptoms (A) and pathogenicity evaluation (B) of kiwifruit soft rot pathogen

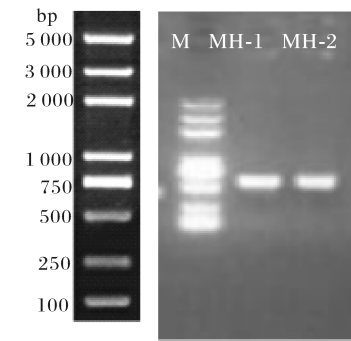


图 3 MH-1 与 MH-2 rDNA-ITS 序列琼脂糖凝胶电泳图谱

Fig.3 Agarose gel electrophoresis of rDNA-ITS sequence of MH-1 and MH-2

#### 2.4 香芹酚对猕猴桃软腐病菌的抑制作用

香芹酚对 8 种猕猴桃软腐病菌菌丝生长的体外抑制效果见表 1。由表 1 可知,香芹酚处理对 8 种猕猴桃软腐病菌均有显著抑制作用,其中香芹酚对 MH-2 和 MH-7 的抑制效果最强,其次是 MH-1 和 MH-6,其相应的  $EC_{50}$  分别为 8.78、10.72、12.15、12.15  $\mu\text{g/L}$ ,对其余 4 种病原菌的  $EC_{50}$  值均在 14~26  $\mu\text{g/L}$ 。表明香芹酚在离体条件下可以有效抑制猕猴桃软腐病菌的生长。

#### 2.5 香芹酚在模拟销售条件下对猕猴桃软腐病的发病率的影响

由图 4 可以看出,随着放置时间延长,处理组和

表 1 香芹酚对 8 种猕猴桃软腐病菌的体外抑制作用

Table 1 Inhibition of carvacrol on the eight kiwifruit soft rot pathogens *in vitro*

菌株 Strain	毒力回归方程 Virulence regression equation	P 值 P value	相关系数( $R^2$ ) Correlation coefficient	$EC_{50}$ 值/ $(\mu\text{g/L})$ $EC_{50}$ value
MH-1	$y=4.354\ 4x - 2.901$	0.020 9	0.936 3	12.15
MH-2	$y=5.154\ 5x + 4.255$	0.017 6	0.963 8	8.78
MH-3	$y=4.146\ 2x - 6.550$	0.046 8	0.988 5	25.44
MH-4	$y=6.438\ 9x - 1.266\ 9$	0.009 3	0.982 4	14.03
MH-5	$y=5.386\ 3x-1.691\ 4$	0.007 8	0.992 5	18.69
MH-6	$y=5.428\ 3x + 23.380$	0.000 7	0.949 8	12.15
MH-7	$y=8.920\ 6x + 3.389$	0.004 9	0.920 6	10.72
MH-8	$y=5.081\ 3x + 25.422$	0.000 5	0.972 9	12.58

对照组果实在模拟销售条件下的发病率均逐步增高,但香芹酚处理果实的软腐病发生率始终显著低于对照( $P<0.05$ )。在放置 2 d 时,对照组猕猴桃果实开始有软腐病发生,6 d 时对照组猕猴桃果实软腐病发病率明显提高,达 32.22%,而此时处理组猕

猴桃果实发病率仅为 11.11%;8 d 时对照组果实的发病率为 64.44%,而处理组果实的发病率为 32.22%,仅为对照的 50.17%(图 4)。因此,香芹酚显著降低模拟销售条件下猕猴桃果实软腐病的发生。

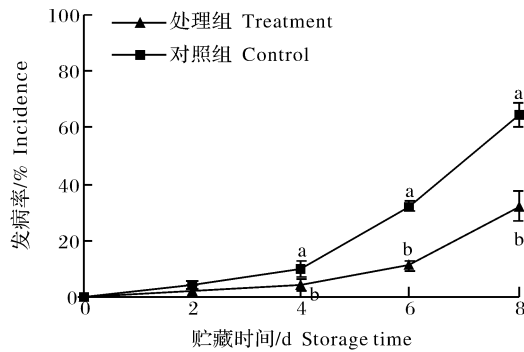


图 4 香芹酚对模拟销售条件下猕猴桃果实软腐病发病率的影响

Fig.4 Effect of carvacrol on the disease incidence of kiwifruit under simulated sales conditions

## 2.6 香芹酚处理对模拟销售条件下猕猴桃果实品质的影响

为了评价香芹酚处理对猕猴桃果实品质的影响,本研究测定了处理组和对照组果实硬度、可溶性固形物、可滴定酸、V<sub>C</sub>含量、总酚含量、总类黄酮含量等相关品质指标,结果如表 2 所示。经香芹酚处理的猕猴桃果实的硬度、TSS、TP 及 TF 与对照果实无显著差异,而经香芹酚处理的猕猴桃果实 V<sub>C</sub>含量和 TA 含量显著高于对照组果实,表明香芹酚处理对果实硬度等无不良影响且能够有效保持猕猴桃果实的采后品质。因此,香芹酚处理可使猕猴桃果实在采后销售和消费期间保持较高营养物质和贮藏品质。

表 2 香芹酚对猕猴桃采后品质的影响(温度 25 ℃,相对湿度 90%)

Table 2 Effect of carvacrol on quality attributes of kiwifruits at 25 ℃ and RH 90%

贮藏时间/d Storage time	组别 Group	硬度/(kg/cm <sup>2</sup> ) Hardness	TSS/%	TA/%	V <sub>C</sub> 含量/(mg/g) V <sub>C</sub> content	TP/(mg/g)	TF/(mg/g)
0		0.345±0.032a	10.3±0.3a	2.93±0.04a	0.291±0.007a	3.51±0.06a	0.17±0.02a
2	对照组 Control	0.345±0.032a	10.3±0.3a	2.93±0.04a	0.291±0.007a	3.51±0.06a	0.17±0.02a
	处理组 Treatment	0.329±0.014a	10.5±0.4a	2.75±0.02a	0.346±0.006a	3.72±0.06a	0.18±0.03a
4	对照组 Control	0.345±0.029b	10.4±0.3a	2.92±0.05b	0.419±0.006b	3.66±0.07a	0.17±0.03a
	处理组 Treatment	0.265±0.025a	11.7±0.2a	2.61±0.06a	0.403±0.012a	4.02±0.04a	0.26±0.03a
6	对照组 Control	0.289±0.005b	11.1±0.3b	2.65±0.07a	0.432±0.009b	4.10±0.04b	0.27±0.02a
	处理组 Treatment	0.172±0.008a	12.0±0.2a	2.51±0.03a	0.493±0.025a	4.04±0.08a	0.27±0.01a
8	对照组 Control	0.150±0.015b	11.9±0.3a	2.66±0.07b	0.556±0.004b	4.07±0.10a	0.37±0.02b
	处理组 Treatment	0.077±0.024a	13.1±0.2a	2.53±0.03a	0.366±0.006a	3.75±0.09a	0.29±0.02a

注:同列不同小写字母表示差异显著(P<0.05)。Note: Different small letters mean significant difference for data in the same column at 0.05 level.

## 3 讨论

软腐病是引起猕猴桃采后腐烂变质的重要真菌病害之一,目前我国多个猕猴桃产区均有发生,在国外如日本、新西兰和意大利等国也有发生<sup>[20-22]</sup>。Li 等<sup>[10]</sup>对来自中国 11 个猕猴桃主产区的猕猴桃软腐病病原菌进行分离鉴定,发现葡萄座腔菌和拟茎点霉菌是引起猕猴桃软腐病的主要致病菌。葡萄座腔菌不仅危害猕猴桃果实还能使叶片产生斑点,损伤枝条,在枝叶表面产生丰富的分生孢子,同

时也引起苹果和梨等果实腐烂<sup>[4]</sup>。而拟茎点霉菌属真菌是一类重要的植物病原菌,可引起寄主植物多种病害,如桃枝条溃疡病、大豆茎萎病、叶斑病和果腐等,同时也是导致龙眼、芒果、甜瓜和蓝莓等果实采后腐烂的主要致病菌<sup>[23]</sup>。本研究也发现葡萄座腔菌和拟茎点霉菌是引起猕猴桃软腐病的主要致病菌,在猕猴桃果实采后软腐病发生过程中起到重要作用,此结果与前人研究基本一致。值得注意的是,拟茎点霉菌在 PDA 平板上未观察到分生孢子,而李诚等<sup>[24]</sup>在显微观察拟茎点霉菌和葡萄座腔菌时

同样发现 2 种病原菌在常规培养基上不易产生孢子,需通过近紫外光照射等方法诱导产孢。此外,本研究发现灰葡萄孢菌、层出镰刀菌和链格孢菌也能引起猕猴桃采后软腐病。吴文能等<sup>[17]</sup>从“贵长”猕猴桃软腐病果中分离出链格孢菌,但检出率较低。陆训等<sup>[25]</sup>报道引起湖南省猕猴桃发生软腐病的主要致病菌是大豆拟茎点霉病菌。Zhou 等<sup>[4]</sup>从四川猕猴桃软腐果实中不仅分离出葡萄座腔菌,还分离出焦腐病菌和小新壳梭孢等病原真菌。以上结果表明引起猕猴桃软腐病发生的病原菌种类多,发病规律复杂,有必要对其发病规律进行更加深入系统的研究。

香芹酚作为牛至精油的主要成分,对青霉菌、曲霉菌、根霉菌等多种果蔬采后腐败真菌均有抑制作用<sup>[26-27]</sup>。Suwanamornlert 等<sup>[28]</sup>用香芹酚熏蒸和直接接触处理龙眼果实采后病原真菌,发现香芹酚对 4 种龙眼采后病原菌的菌丝生长抑制表现出显著的抑制作用,其最低抑菌浓度和最低杀菌浓度均仅在 40~80  $\mu\text{L/L}$ 。Zhang 等<sup>[29]</sup>报道 20~120  $\mu\text{L/L}$  香芹酚处理可以抑制灰葡萄孢菌菌丝生长,菌丝在 120  $\mu\text{L/L}$  时受到完全抑制,且抑制效果呈显著的剂量效应。本研究发现香芹酚熏蒸处理对引起猕猴桃软腐病的 8 种病原菌的菌丝生长均有显著的抑制作用,并且对猕猴桃软腐病的主要致病菌拟茎点霉菌和葡萄座腔菌的抑菌效果尤其显著,其  $\text{EC}_{50}$  值仅为 8.78  $\mu\text{g/L}$  和 12.15  $\mu\text{g/L}$ 。同时,香芹酚对模拟销售条件下猕猴桃果实采后软腐病具有良好的控制效果,经香芹酚处理后果实病害发生率仅为对照果实的 50.17%。Abdollahi 等<sup>[30]</sup>发现在采后喷洒以香芹酚为主要成分的夏味精油能降低无籽葡萄的病害发生率,减少质量损失,对风味口感没有不良影响;Peretto 等<sup>[31]</sup>报道含有香芹酚的可食性膜能有效降低草莓果实采后腐烂,并保持果实品质。此外,香芹酚显著降低甜樱桃<sup>[32]</sup>、柑橘<sup>[33]</sup>、番茄<sup>[34]</sup>等果实采后病害的发生。以上研究显示香芹酚在果实采后病害的控制方面表现出广阔的应用前景。本研究中香芹酚对 8 株致病真菌均表现出显著的抑制作用;同时,有效降低了模拟销售条件下猕猴桃果实软腐病的发病率,对猕猴桃采后软腐病具有良好的控制效果,可以改善猕猴桃果实品质,减少营养成分的损失,增强

果实的耐贮性,从而达到保持猕猴桃果实食用价值且延长货架期的效果。

## 参考文献 References

- [1] RICHARDSON D P, ANSELL J, DRUMMOND L N. The nutritional and health attributes of kiwifruit: a review[J]. *European journal of nutrition*, 2018, 57(8): 1-18.
- [2] MARI M, SPADONI A, CEREDI G. Alternative technologies to control postharvest diseases of kiwifruit[J]. *Stewart osthart review*, 2015, 11(4): 1-5.
- [3] 李黎, 陈美艳, 张鹏, 等. 猕猴桃软腐病的病原菌鉴定[J]. *植物保护学报*, 2016, 43(3): 527-528. LI L, CHEN M Y, ZHANG P, et al. Identification of the pathogen causing fruit soft rot on kiwifruit[J]. *Journal of plant protection*, 2016, 43(3): 527-528 (in Chinese).
- [4] ZHOU Y, GONG G S, CUI Y L. Identification of *Botryosphaeriaceae* species causing kiwifruit rot in Sichuan Province, China[J]. *Plant disease*, 2015, 99(5): 699-708.
- [5] 汤友军, 鲁晓翔. 植物精油稳定性的改善及其在食品中应用研究进展[J]. *食品工业科技*, 2020, 41(7): 353-357. TANG Y J, LU X X. Research advances on stability improvement of plant essential oil and its application in food[J]. *Science and technology of food industry*, 2020, 41(7): 353-357 (in Chinese with English abstract).
- [6] ISMAN M B. Plant essential oils for pest and disease management[J]. *Crop protection*, 2000, 19(8): 603-608.
- [7] MEMAR M Y, RAEI P, ALIZADEH N, et al. Carvacrol and thymol[J]. *Reviews in medical microbiology*, 2017, 28(2): 63-68.
- [8] CAMELE I, ALTIERI L, MARTINO L D, et al. *In vitro* control of post-harvest fruit rot fungi by some plant essential oil components[J]. *International journal of molecular sciences*, 2012, 13(2): 2290-2300.
- [9] KHORASANY S, AZIZI M H, BARZEGAR M, et al. A study on the chemical composition and antifungal activity of essential oil from *Thymus caramanicus*, *Thymus daenensis* and *Ziziphora clinopodioides* [J]. *Nutrition and food sciences research*, 2016, 3(2): 35-42.
- [10] LI L, PAN H, CHEN M, et al. Isolation and identification of pathogenic fungi causing postharvest fruit rot of kiwifruit (*Actinidia chinensis*) in China [J]. *Journal of phytopathology*, 2017, 165(11): 782-790.
- [11] EDWARDS K, JOHNSTONE C, THOMPSON C. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis [J]. *Nucleic acids research*, 1991, 19(6): 1349.
- [12] HE J L, WU D T, ZHANG Q, et al. Efficacy and mechanism of cinnamon essential oil on inhibition of *Colletotrichum acutatum* isolated from 'Hongyang' kiwifruit [J]. *Frontiers in microbiol-*

- ogy, 2018, 1288(9): 1-12.
- [13] CHAEMSANIT S, MATAN N, MATAN N. Effect of pepper-mint oil on the shelf-life of dragon fruit during storage[J]. Food control, 2018, 90: 172-179.
- [14] 朱仙慕, 陈丹, 马国萍, 等. 叶下珠薄层色谱鉴别及福林酚法测定总多酚含量研究[J]. 中国中医药科技, 2018, 25(4): 514-519. ZHU X M, CHEN D, MA G P, et al. Identification of thin layer chromatography of Xiazuzhu and determination of total polyphenol content by folinol method[J]. Chinese journal of traditional medical science and technology, 2018, 25(4): 514-519 (in Chinese with English abstract).
- [15] 陆蓓, 寿文虹, 赵建英. 柑橘黄酮中总黄酮及橙皮苷的含量测定[J]. 中华中医药学刊, 2008(1): 44-45. LU B, SHOU W H, ZHAO J Y. Determination of total flavonoids and hesperidin in citrus flavonoids[J]. Archives journal of traditional chinese medicine, 2008, 26(1): 44-45 (in Chinese with English abstract).
- [16] YAN J Y, XIE Y, ZHANG W, et al. Species of Botryosphaeriaceae involved in grapevine dieback in China [J]. Fungal diversity, 2013, 61(1): 221-236.
- [17] 吴文能, 张起, 雷霖卿, 等. “贵长”猕猴桃软腐病病原菌分离鉴定及抑菌药剂筛选[J]. 北方园艺, 2018(16): 47-54. WU W N, ZHANG Q, LEI Y Q, et al. Identification and pharmaceutical screening of kiwifruit soft rot disease on ‘Guichang’ gooseberry[J]. Northern horticulture, 2018(16): 47-54 (in Chinese with English abstract).
- [18] 任亚峰, 韦唯, 李冬雪, 等. 葡萄灰霉病病原菌鉴定及生物学特性[J]. 应用与环境生物学报, 2019, 25(5): 1139-1144. REN Y F, WEI W, LI D X, et al. Identification and biological characteristics of grape gray mold pathogen[J]. Chinese journal apply environment biology, 2019, 25(5): 1139-1144 (in Chinese with English abstract).
- [19] 李诚, 蒋军喜, 冷建华, 等. 奉新县猕猴桃果实腐烂病病原菌分离鉴定[J]. 江西农业大学学报, 2012, 34(2): 259-263. LI C, JIANG J X, LENG J H, et al. Isolation and identification of pathogenic fungi causing fruit rot of kiwifruit in Fengxin County[J]. Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis, 2012, 34(2): 259-263 (in Chinese with English abstract).
- [20] PENNYCOOK S R, SAMUELS G J. *Botryosphaeria* and *Fusicoccum* species associated with ripe fruit rot of *Actinidia deliciosa* (kiwifruit) in New Zealand[J]. Mycotaxon, 1985, 24: 445-458.
- [21] KOH Y J, JAELOGEOUN H, JUNG J S. Postharvest fruit rots of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) in Korea[J]. New Zealand journal of experimental agriculture, 2005, 33(3): 303-310.
- [22] LUONGO L, SANTORI A, RICCIONI L, et al. *Phomopsis* sp. associated with post-harvest fruit rot of kiwifruit in Italy[J]. Journal of plant pathology, 2011, 93(1): 205-209.
- [23] UDAYANGA D, LIU X, MCKENZIE E H C, et al. The genus *Phomopsis*: biology, applications, species concepts and names of common phytopathogens [J]. Fungal diversity, 2011, 50(1): 189-225.
- [24] 李诚, 蒋军喜, 冷建华, 等. 猕猴桃枝枯病病原菌鉴定[J]. 北方园艺, 2013(24): 130-133. LI C, JIANG J X, LENG J H, et al. Identification of the pathogen causing shoot blight of kiwifruit [J]. Northern horticulture, 2013(24): 130-133 (in Chinese with English abstract).
- [25] 陆训, 潘显婷, 庞立, 等. 猕猴桃采后腐烂病原的鉴定[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2017(2): 58-62. LU X, PAN X T, PANG L, et al. Identification of the pathogen associated with postharvest fruit rot of kiwifruit[J]. Journal of Hunan Agricultural University (natural sciences edition), 2017(2): 58-62 (in Chinese with English abstract).
- [26] WANG K, JIANG S, PU T, et al. Antifungal activity of phenolic monoterpenes and structure-related compounds against plant pathogenic fungi[J]. Natural product research, 2018, 33(10): 1-8.
- [27] PORTILLO-RUIZ M C, RAÚL A S, RAMOS S V, et al. Antifungal effect of mexican oregano (*Lippia berlandieri* Schauer) essential oil on a wheat flour-based medium[J]. Journal of food science, 2012, 77(8): 441-445.
- [28] SUWANAMORNLEERT P, SANGCHOTE S, CHINSIRIKUL W, et al. Antifungal activity of plant-derived compounds and their synergism against major postharvest pathogens of longan fruit, *in vitro* [J]. International journal of food microbiology, 2018, 271: 8-14.
- [29] ZHANG J, MA S, DU S, et al. Antifungal activity of thymol and carvacrol against postharvest pathogens *Botrytis cinerea* [J]. Journal of food science and technology, 2019, 59: 2611-2620.
- [30] ABDOLLAHI A, HASSANI A, GHOSTA Y, et al. Evaluation of essential oils for maintaining postharvest quality of Thompson seedless table grape[J]. Natural product research, 2012, 26(1): 77-83.
- [31] PERETTO G, DU W X, AVENA-BUSTILLOS R J, et al. Increasing strawberry shelf-life with carvacrol and methyl cinnamate antimicrobial vapors released from edible films [J]. Postharvest biology and technology, 2014, 89: 11-18.
- [32] TSAO R, ZHOU T. Interaction of monoterpenoids, methyl jasmonate, and  $Ca^{2+}$  in controlling postharvest brown rot of sweet cherry [J]. Hortscience: a publication of the american society for horticultural science, 2000, 35(7): 1304-1307.
- [33] BOUBAKER H, KARIM H, ELHAMDAOUI A, et al. Chemical characterization and antifungal activities of four *Thymus* species essential oils against postharvest fungal pathogens of citrus [J]. Industrial crops and products, 2016, 86: 95-101.

[34] BOUAYAD A S, DIB M E A, DJABOU N, et al. Essential oils as biocides for the control of fungal infections and devas-

tating pest of tomato[J]. *Chemistry & biodiversity*, 2017, 14 (7): 1-9.

## Identification of soft rot pathogens in postharvest kiwifruit and its control effect by carvacrol

ZUO Panpan, FU Su, PENG Litao, FAN Gang, YANG Shuzhen, LI Jie

*College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan, 430070, China*

**Abstract** The pathogenic fungi causing kiwifruit soft rots were isolated and identified by examining the morphological and microscopic characteristics, combined with the results of pathogenicity testing and rDNA-ITS (internal transcribed spacer) sequencing. The control effect of carvacrol on kiwifruit soft rot was studied. The main pathogens causing soft rot of kiwifruit after harvest are *Botryosphaeria dothidea* and *Phomopsis* sp., followed by *Botrytis cinerea*, *Fusarium proliferatum* and *Alternaria* sp.. Carvacrol had significant antifungal activity against the eight soft rot pathogens, especially for *B. dothidea*, with half effective concentration ( $EC_{50}$ ) of  $8.87 \mu\text{g/L}$ . Simultaneously, carvacrol effectively reduced the incidence of kiwifruit soft rot in a simulated sales environment. The incidence of treatment group was only 50.17% of the control fruit when placed for 8 days, and it had no significant effect on the quality of kiwifruit ( $P > 0.05$ ). Therefore, carvacrol has potential application value in controlling soft rot of kiwifruit after harvest.

**Keywords** kiwifruit; soft rot; pathogens identification; plant essential oil; carvacrol; green prevention and control

(责任编辑:张志钰)