

张曦晨,李萌,杨书珍,等.板栗采后优势致病真菌的分离、鉴定及植物精油对其控制效果[J].华中农业大学学报,2022,41(2):151-160.
DOI:10.13300/j.cnki.hnlkxb.2022.02.018

板栗采后优势致病真菌的分离、鉴定及植物精油对其控制效果

张曦晨¹,李萌¹,杨书珍¹,彭丽桃¹,冯柏如²,杨菁菁²

1. 华中农业大学食品科学技术学院,武汉 430070; 2. 广州粒上皇食品有限公司,广州 510600

摘要 为明确板栗采后优势致病真菌种类及植物精油对其控制效果,采用组织分离法对引起板栗采后腐败的病原真菌进行分离纯化,通过显微观察和双基因系统发育分析对优势致病真菌作进一步的形态学和分子生物学鉴定,并在此基础上分析紫苏醛、肉桂醛、柠檬醛、叶醛、丁香酚、芳樟醇、橙花醇、麝香草酚、香芹酚、香茅醇植等10种植物精油单组分对板栗采后优势病原真菌的控制效果。结果显示,板栗采后优势致病真菌包括镰孢属、新壳梭孢属、地霉属和毛霉属在内的多种真菌,其中菌株BL-8和BL-18经双基因系统发育分析鉴定为亚洲镰孢菌(*Fusarium asiaticum*)和小新壳梭孢菌(*Neofusicoccum parvum*)。10种植物精油单组分对板栗采后优势致病真菌菌株BL-8和BL-18均有一定程度的抑制作用,其中,香芹酚对板栗采后优势病原真菌的抑制作用最为显著,对菌株BL-8和菌株BL-18的 EC_{90} 值分别为24.431和11.768 $\mu\text{L/L}$ 。体外病原菌生长抑制试验和自然贮藏试验结果发现,香芹酚显著抑制了2种优势致病真菌的生长,香芹酚熏蒸处理有效控制了由菌株BL-8和BL-18侵染所引起的板栗采后病害的发生。因此,香芹酚作为熏蒸剂,在板栗采后真菌病害的控制方面具有潜在的应用价值。

关键词 板栗; 采后病害; 优势致病真菌; 分离鉴定; 植物精油; 抑菌作用

中图分类号 TS255.3 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2022)02-0151-10

板栗(*Castanea mollissima* Blume)是壳斗科栗属坚果类植物,在我国大部分地区均有栽培,是我国重要的经济树种,其种植面积和产量均居世界首位^[1]。板栗果实甘甜味美,营养丰富,素有“干果之王”的美誉^[2]。但与其他坚果相比,板栗的淀粉含量和水分含量较高,采后呼吸作用旺盛,对贮藏环境的温湿度很敏感,在采后贮藏过程中常因管理不当遭受病原菌的侵染而腐烂变质^[3]。据统计,我国每年因贮藏不当而造成的板栗果实腐烂变质导致的损失占总产量的20%~30%,而在南方的一些板栗产区,由于采收期高温、高湿的环境,严重时板栗腐烂率可达50%,给板栗产业带来了极大的损失^[4]。

板栗的采后病害通常是由于多种病原菌的共同侵染所致,发病症状多且杂,目前尚未有统一的系统分类。根据病斑的表观颜色不同,板栗采后病害可分为黑腐、褐腐和红腐;根据病果的湿润程度不同,可分为干腐和湿腐;根据病原菌的侵染途径不同,可

分为外腐和内腐^[5]。此外,板栗采后病原真菌的种类和数量受其产地和品种的影响大^[6],给板栗采后病害的防治带来了极大的困难^[7]。因此,明确板栗采后优势致病真菌,进一步针对性地控制板栗采后病害,对于有效减少板栗采后损失具有重要意义。

植物精油是一种植物源次生代谢产物^[8],通常具有优异的抑菌活性,不仅对沙门氏菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌等细菌具有显著的抑制效果^[9],同时对青霉菌、根霉菌和链格孢菌等病原真菌引起的果实采后病害也表现出良好的控制作用^[10]。据统计,在目前已经发现的3 000多种植物精油中,约有1 340种具有较强的抑菌活性,是开发新型果蔬采后天然抑菌剂的优势资源^[11]。然而,由于大多数植物精油的成分复杂,极易受植物的种类、品种、生长部位和产地的影响,致使其生物活性稳定性差,给植物精油在食品防腐保鲜领域的应用带来一定的困难^[12]。因此,近年来人们对植物精油单组分的抗菌活性进行

收稿日期: 2021-09-23

基金项目:国家重点研发计划项目(2019YFD1002300)

张曦晨,E-mail:280784472@qq.com

通信作者: 杨书珍,E-mail:yszhen@mail.hzau.edu.cn.

了广泛研究,并发现了一些具有强烈抗菌活性的植物精油单组分,如柠檬醛^[13]、香叶醇^[14]、丁香酚^[15]和肉桂醛^[15]等对采后果蔬具有良好的抑菌防腐效果。目前有关植物精油单组分控制板栗采后病害的研究相对较少。因此,本研究从不同来源的发病板栗中分离并鉴定板栗采后优势致病真菌,并分析植物精油单组分对优势致病真菌的抑制活性,在此基础上研究了活性精油单组分香芹酚对板栗采后病害的控制作用,旨在为进一步研发适合板栗采后防腐保鲜的天然防腐保鲜剂提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

试验所用板栗采自湖北省黄冈市罗田县凤山镇栗子塆工业园区,品种包括“大红袍”“羊毛栗”和“红光油栗”;试验中所有真菌的培养均使用马铃薯琼脂葡萄糖(potato dextrose agar, PDA)培养基;PCR扩增试剂盒购自天一辉远生物科技有限公司;紫苏醛(90%)、肉桂醛(98%)、柠檬醛(97%)、叶醛(98%)、丁香酚(99%)、芳樟醇(98%)、橙花醇(97%)均购自上海阿拉丁生化科技有限公司;麝香草酚(99%)、香芹酚(99%)、香茅醇(95%)均购自上海麦克林生化科技有限公司;试验中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 病原菌的分离与纯化

板栗致病菌的分离与纯化采用组织分离法^[16]进行,具体的操作步骤:将常温贮藏2周后的板栗病果用刀片剥去外壳,分别从果壳和果仁的病健交界处挑取组织,将组织小块在75%乙醇中浸泡消毒10 s,经无菌水清洗3次后,接种至PDA培养基,26℃恒温培养24 h后,挑取生长在菌落边缘的幼嫩菌丝体转接至新的培养基上,在同等条件下继续培养,重复之前的分离操作3~5次,直至获得纯菌落,根据其菌落与菌丝的形态特征进行初步归类和编号,并保存菌种。

1.3 致病性测定

采用菌饼接种法^[17]对病原菌的致病性进行测定。将病原真菌接种于PDA培养基上,26℃下培养4 d后,于菌落边缘取菌饼(直径8 mm)待用。板栗经过清水浮选,剔除浮起的病虫害果后,选择大小均一,表面无机械损伤的罗田板栗,用0.4%的NaClO溶液进行表面消毒后,采用造伤接种法,用刀片在果实腰部割开一个方形小孔,露出内种皮,将菌饼反贴

至造伤部位。每种病原菌分别接种15颗板栗,以反贴无菌PDA培养基至造伤部位的板栗作对照,于室温下放置7 d后剥去外壳,观察果仁的发病情况。按照公式(1)和公式(2)分别统计致病率和病情指数,并在病斑处再次分离病原菌,获得菌株应与原接种菌株一致。板栗病害病情分级标准^[18]:0级,果实不感病,未出现病斑;1级,有病斑但不扩散;2级,0 mm<病斑直径≤5 mm;3级,5 mm<病斑直径≤10 mm;4级,病斑直径>10 mm。

$$\text{发病率} = \frac{\text{发病的接种果实数}}{\text{总接种果实数}} \times 100\% \quad (1)$$

$$\text{病情指数} = \frac{\sum(\text{病情级别} \times \text{相应病情级别接种果实数})}{\text{最高病情级别} \times \text{总接种果实数}} \times 100 \quad (2)$$

1.4 病原菌鉴定

1) 形态学鉴定。将通过致病性实验所得到的优势致病真菌于26℃下培养3 d,根据其菌落形态、色泽、生长速度和气生菌丝的疏密程度,以及观察光学显微镜下的菌丝形态、菌丝隔膜及孢子形态等特征,对病原菌进行初步的形态学鉴定。

2) 分子生物学鉴定。采用CATB法^[19]提取菌株基因组DNA,使用EF22T/EF3和T22-R/T1-F、EF1-986R/EF1-728F和ITS1/ITS4两组引物(表1)^[20-23]分别对病原菌菌株进行PCR扩增(15 μL 2×PCR Mix, 1 μL DNA, 1 μL 10 mmol/L Forward primer与1 μL 10 mmol/L Reverse primer, 12 μL ddH₂O), 95℃预变性5 min, 95℃变性30 s, 58℃退火30 s, 72℃延伸30 s,共35次循环。72℃修复延伸5 min。PCR产物用1%琼脂糖凝胶进行电泳检测(20 min, 120 V)后,由天一辉远生物科技(武汉)有限公司进行测序,将获得的序列与从NCBI中下载的菌株序列进行比对,经人工校正后使用软件MEGA 7.0,采用邻接法构建系统发育树。

1.5 植物精油单组分的抑菌活性评价

参考Ambrico等^[24]的滤纸片扩散法并稍作修改。将病原真菌在PDA培养基上于26℃培养3 d后,于菌落边缘处取菌饼,反贴于PDA培养基的中央。将不同体积的植物精油单组分滴加至直径为20 mm、已灭菌的圆形滤纸片上,迅速密封培养皿,26℃恒温培养3 d,每隔24 h测定1次菌落直径,并按照公式(3)计算菌丝生长抑制率,以滴加等量蒸馏水的平板作对照。以精油单组分的浓度为横坐标,以菌丝生长抑制率为纵坐标,制作毒力回归方程并计算相应的EC₅₀和EC₉₀。

表 1 用于分子鉴定的基因位点与引物序列

Table 1 Gene locus and primer sequences used to molecular identification

基因位点 Gene locus	引物名称 Primer names	引物序列(5'-3') Primer sequences(5'-3')	参考文献 References
<i>EF-1α</i> (BL-8)	EF3	GTAAGGAGGASAAGACTCACC	[20]
	EF22T	AGGAACCCTTACCGAGCTC	
<i>β-tubulin</i> (BL-8)	T1-F	AACATGCGTGAGATTGTAAGT	[21]
	T22-R	TCTGGATGTTGTTGGAATCC	
<i>EF-1α</i> (BL-18)	EF1-728F	CATCGAGAAGTTCGAGAAGG	[22]
	EF1-986R	TACTTGAAGGAACCCTTACC	
<i>ITS</i> (BL-18)	ITS1	CTTGGTCATTTTAGAGGAAGTAA	[23]
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	

菌丝生长抑制率 =

$$\frac{\text{对照组菌落直径} - \text{处理组菌落直径}}{\text{对照组菌落直径}} \times 100\% \quad (3)$$

1.6 香芹酚对病原菌菌落生长和菌丝生物量的影响

菌落生长的测定采用生长速率法^[25]进行。将病原菌菌丝转接至 PDA 培养基上于 26 ℃ 培养 3 d 后，于菌落边缘处取菌饼，反贴于 PDA 培养基的中央。将不同体积的香芹酚(使其最终体积分数分别达到 0、5、10、15、20、25、30 μL/L)滴加至直径为 20 mm、已灭菌的圆形滤纸片上，迅速将其粘贴至培养皿内盖中心位置，迅速用封口膜将培养皿紧密封口；每个处理设置 3 个重复，26 ℃ 恒温培养 5 d，定期观察菌落形态，并用十字交叉法测量菌落直径。

菌丝生物量的测定采用文献^[25]的方法进行。将病原菌菌丝转接至 PDB 培养基中 26 ℃、120 r/min 恒温振荡培养 24 h，无菌过滤收集菌丝，称取 1.0 g 的幼嫩湿重菌丝接种于 100 mL 的 PDB 培养基中，加入一定体积的香芹酚，使其最终体积分数分别达到 12.5、25、50、100、200 μL/L。每个处理设置 3 个重复，26 ℃、120 r/min 振荡培养 48 h，菌丝过滤后用蒸馏水冲洗 2 次，冷冻干燥 60 h，记录菌丝干质量。

1.7 香芹酚熏蒸处理对板栗采后病害的控制效果

将板栗进行清水浮选，挑除已腐烂和发芽的果实后，再挑选外壳色泽一致，大小均一且无机械损伤的果实待用。病原菌的接种方法与本文“1.3”方法一致。香芹酚处理采用熏蒸法，将已接种病原菌的板栗置于带盖保鲜盒内，滴加一定量的香芹酚于滤纸片上，贴于保鲜盒内侧，使盒内香芹酚体积分数为 80 μL/L，以加入等量蒸馏水熏蒸空白对照，以上每组处理设置 3 个重复，每个重复 3 颗果实，密闭熏蒸 16 h，熏蒸结束后打开盒盖通风 30 min，用扎孔保鲜膜封口，室温下放置 7 d 后，按照与本文“1.3”的方法测定板栗的发病率与病情指数。

2 结果与分析

2.1 板栗采后病害病原菌的分离纯化结果

从 150 颗不同来源的板栗腐烂果实中分离获得共 464 株病原菌，根据菌落在 PDA 培养基上的生长形态大致分为 23 类，经过初步的致病性测定，获得了 5 株具有较强的致病性的病原真菌，编号依次为 BL-3、BL-8、BL-18、BL-20 和 BL-22，在分离纯化过程中分别检出 36、30、39、49 和 33 株。

2.2 板栗采后病害优势病原菌的致病性

根据柯赫氏法则，将前期筛选得到的 5 株病原菌菌株回接至健康的板栗果实上，室温放置 7 d 后将板栗外壳剥去，观察到部分板栗种仁表面产生了明显的黑灰色病斑，少数种仁表面还有白色或粉红色的菌苔覆盖，而对照组果实则没有发病。对病果发病组织中的病原菌再次分离纯化培养，其生长特性与菌落、菌丝形态等均与原菌株一致。由表 2 可知，BL-8 和 BL-18 的致病率和病情指数均为最高，致病率分别为 100% 和 93.33%，病情指数分别为 68.33 和 63.33，说明其致病性最强，而 BL-20 的致病性最弱，其致病率和病情指数均为最低。

表 2 板栗采后病原真菌的致病性

Table 2 Pathogenicity assay of isolated fungal strains on chestnut

菌株编号 Strain number	分离率/% Isolated rate	致病率/% Disease rate	病情指数 Disease index
BL-3	7.76	73.33	30.00
BL-8	6.47	100.00	68.33
BL-18	8.41	93.33	63.33
BL-20	10.56	13.33	3.33
BL-22	7.11	60.00	15.00

2.3 板栗采后病害优势病原菌的显微形态特征

根据菌落特征、菌丝形态和孢子形态等对菌株BL-3、BL-8、BL-18、BL-20、BL-22进行初步的形态学鉴定,其菌落特征与显微结构如图1所示。

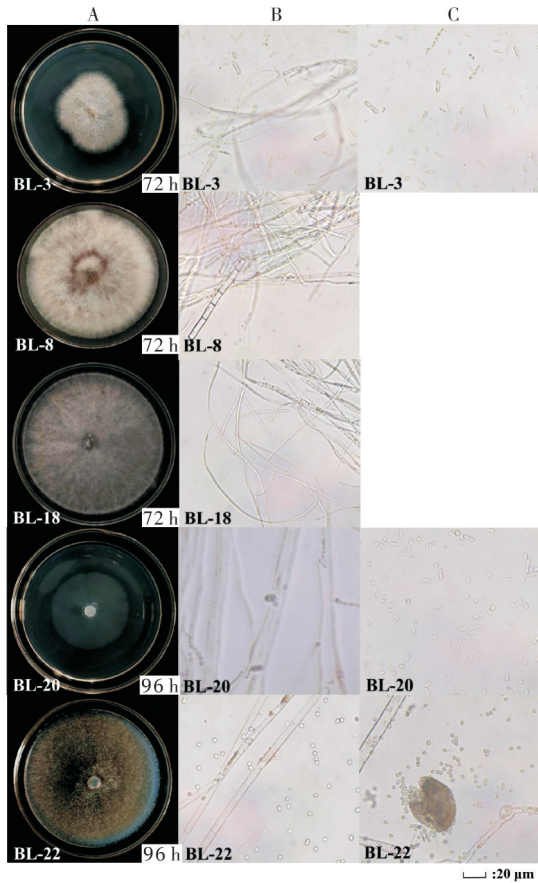


图1 5种优势病原菌的菌落形态(A)、菌丝形态(B)与孢子形态(C)观察

Fig.1 Colony morphology(A), mycelial morphology(B) and spore characteristics(C) of five pathogenic fungal strains

BL-3: 菌落呈边缘整齐的圆形,初为白色,培养2~3 d后逐渐转为淡粉色,最后渐变为淡黄色,气生菌丝呈白色棉絮状,生长速度中等。菌丝有分支与隔膜,宽度约为 $3.20\sim 5.30\ \mu\text{m}$,在PDA培养基上可产生大量小型分生孢子,有单细胞和多细胞2种,呈椭圆或长条形,长 $5.10\sim 18.75\ \mu\text{m}$,宽 $1.89\sim 2.50\ \mu\text{m}$,依据上述特征并结合菌种鉴定手册初步鉴定为镰孢菌属(*Fusarium* sp.)。

BL-8: 菌落呈边缘整齐的圆形,初为白色,培养2~3 d后逐渐转为浅粉色,最后呈玫红色,气生菌丝旺盛,呈白色绒毛状,生长速度较快。菌丝有分支与隔膜,宽度约为 $6.46\sim 7.85\ \mu\text{m}$ 。由于在PDA培养基上未观察到分生孢子,依据上述特征

并结合文献[26]认为其与镰孢菌属(*Fusarium* sp.)的形态特征相似,需要进一步通过分子生物学鉴定明确其种类。

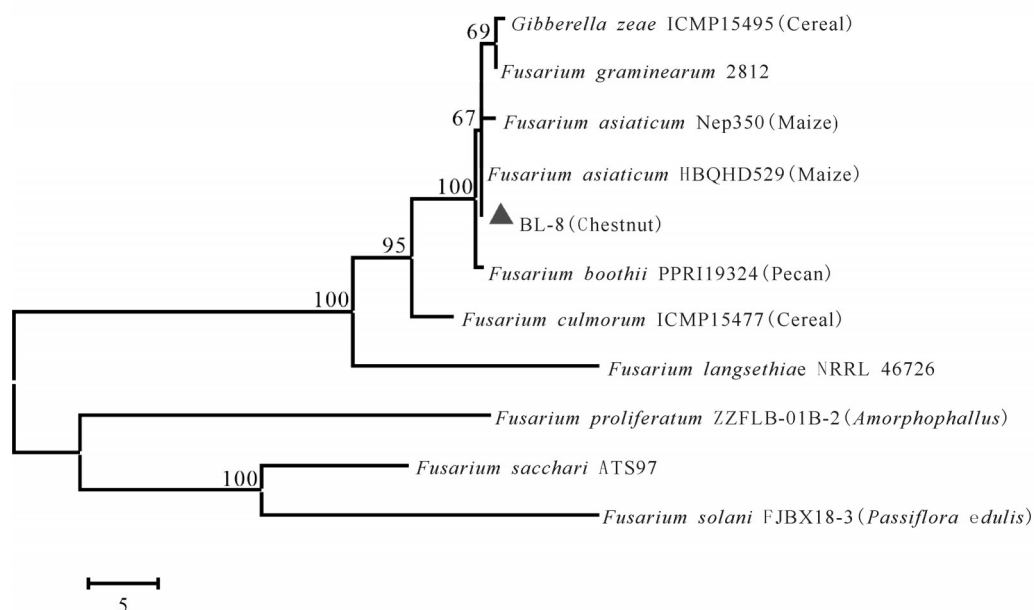
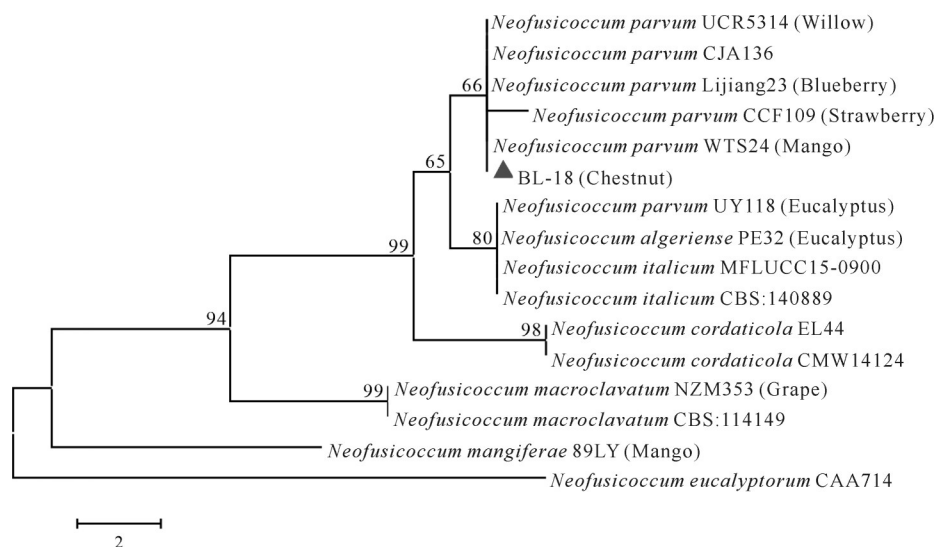
BL-18: 菌落边缘不整齐,初为白色,培养2~3 d后逐渐转为灰绿色,最后颜色加深至灰黑色,气生菌丝旺盛,呈白色棉絮状,生长速度较快。菌丝多为无隔膜菌丝,菌丝宽度约为 $2.46\sim 4.72\ \mu\text{m}$ 。由于在PDA培养基上未观察到分生孢子,依据上述形态特征并结合文献[27],认为其与新壳梭孢属(*Neofusicoccum* sp.)的形态特征相似,需要进一步通过分子生物学鉴定明确其种类。

BL-20: 菌落呈边缘整齐的圆形,匍匐生长,始终为浅白色,无气生菌丝,生长速度缓慢。营养菌丝有少量分支与隔膜,宽度约为 $7.10\sim 9.50\ \mu\text{m}$,在PDA培养基上观察到呈长串状生长的分生孢子,以菌丝节孢的方式产孢,单个的分生孢子呈方形、长筒型或圆形,长 $3.92\sim 6.65\ \mu\text{m}$,宽 $2.46\sim 3.60\ \mu\text{m}$,依据上述特征并结合菌种鉴定手册初步鉴定为地霉属(*Geotrichum* sp.)。

BL-22: 菌落初始为灰白色,培养约3 d后,逐渐转变为黑褐色,表面密生小颗粒孢子团,气生菌丝不发达,生长速度中等。菌丝有分支与隔膜,宽度约为 $6.35\sim 9.24\ \mu\text{m}$,可观察到球形孢子囊,内含大量圆形或椭圆形的孢囊孢子,孢子长 $0.90\sim 1.57\ \mu\text{m}$,宽 $1.10\sim 1.24\ \mu\text{m}$ 。依据上述形态特征,结合菌种鉴定手册初步鉴定为毛霉属(*Mucor* sp.)。

2.4 板栗采后病害优势病原菌的分子生物学鉴定

对菌株BL-8的*EF-1 α* 和 *β -tubulin*片段、BL-18的*EF-1 α* 和*ITS*片段进行扩增,菌株BL-8分别获得676 bp和1 260 bp的片段,菌株BL-18分别获得282 bp和577 bp的片段。在NCBI数据库中进行同源性比对,下载同源性较高的菌株序列,与菌株BL-8和BL-18的相应序列构建双基因联合系统发育树。系统进化分析发现菌株BL-8与分离自玉米的*F. asiaticum*聚为同一分支(图2),其*EF-1 α* 和 *β -tubulin*核苷酸序列与*F. asiaticum*菌株HBQHD529的匹配度分别达到了99.85%和99.84%。菌株BL-18与分离自芒果、草莓、蓝莓和柳树的*N. parvum*聚为同一分支(图3),其*EF-1 α* 和*ITS*核苷酸序列与*N. parvum*菌株WTS24的匹配度分别达到了98.89%和100%。因此,菌株BL-8鉴定为*Fusarium asiaticum*,菌株BL-18鉴定为*Neofusicoccum parvum*。

图2 基于菌株BL-8的 *EF-1α* 和 *β-tubulin* 基因序列构建的NJ系统发育树Fig.2 Phylogenetic tree constructed through NJ method based on combined *EF-1α* and *β-tubulin* gene sequences图3 基于菌株BL-18的 *EF-1α* 和 *ITS* 基因序列构建的NJ系统发育树Fig.3 Phylogenetic tree constructed through NJ method based on combined *EF-1α* and *ITS* gene sequences

2.5 植物精油单组分对板栗优势致腐菌的抑制作用

采用菌饼法测定了香芹酚、丁香酚、麝香草酚、紫苏醛、肉桂醛、叶醛、柠檬醛、芳樟醇、香茅醇和橙花醇等10种常见的植物精油单组分对板栗采后优势致腐菌的抑制作用,结果如表3所示,大多数精油单组分对菌株BL-8和BL-18表现出了一定的抑菌活性。香芹酚、丁香酚、麝香草酚、紫苏醛、肉桂醛、叶醛、柠檬醛以及芳樟醇均对菌株BL-8表现出显著的抑制作用,其 EC_{50} 值和 EC_{90} 值均低于100 $\mu\text{L/L}$ 。其中,香芹酚的抑菌效果最强,对菌株BL-8的 EC_{50} 和

EC_{90} 分别为5.696和24.431 $\mu\text{L/L}$ 。而香芹酚、麝香草酚、紫苏醛、叶醛等精油单组分对菌株BL-18表现出明显的抑制效果,其 EC_{50} 值和 EC_{90} 值均低于100 $\mu\text{L/L}$,同样是香芹酚拥有最强的抑菌活性,其 EC_{50} 和 EC_{90} 分别仅达到2.561和11.768 $\mu\text{L/L}$ 。

2.6 香芹酚对板栗优势致腐菌菌丝生长的影响

进一步采用菌饼法和菌丝干重法分析香芹酚对板栗采后优势致腐菌菌株BL-8和BL-18生长的影响,结果如图4、图5所示。由图4A、B可知,经香芹酚处理的菌株BL-8的菌落直径显著低于对照菌的菌落直径;香芹酚对菌株BL-8的菌落生长表现出显著

表 3 10种植物精油单组分对板栗优势致腐菌 BL-8和 BL-18抑制作用

植物精油单组分 Essential oil components	BL-8		BL-18	
	EC ₅₀	EC ₉₀	EC ₅₀	EC ₉₀
香芹酚 Carvacrol	5.696	24.431	2.561	11.768
丁香酚 Eugenol	17.670	54.685	688.465	1 227.040
麝香草酚 Thymol	7.920	36.660	5.102	15.174
紫苏醛 Perillaldehyde	7.606	25.225	7.020	23.401
肉桂醛 Cinnamaldehyde	13.479	57.879	62.000	129.589
反式-2-己烯醛 Trans-2-Hexen-1-al	22.622	48.053	20.625	32.251
柠檬醛 Citral	17.027	57.137	126.227	154.897
芳樟醇 Linalool	23.955	92.974	83.225	116.434
香茅醇 β-Citronellol	682.096	1 193.017	693.259	1 213.280
橙花醇 Nerol	550.088	993.411	559.457	1 006.885

的抑制作用,且这种抑制作用呈明显的浓度效应,当香芹酚的体积分数为 30 μL/L 时,菌株 BL-8 的菌落生长被完全抑制。香芹酚处理对菌株 BL-18 菌落生长的抑制作用规律与菌株 BL-8 相似,当香芹酚的体积分数达到 25 μL/L 时,菌株 BL-18 的菌落生长被完

全抑制。由图 5 可以看出,经香芹酚处理的菌株 BL-8 和 BL-18,其菌丝干质量显著下降,并且随着香芹酚体积分数的增高,菌丝干质量呈逐渐下降的趋势。可见,香芹酚对板栗采后优势致腐菌菌株 BL-8 和 BL-18 的生长表现出显著的抑制作用。

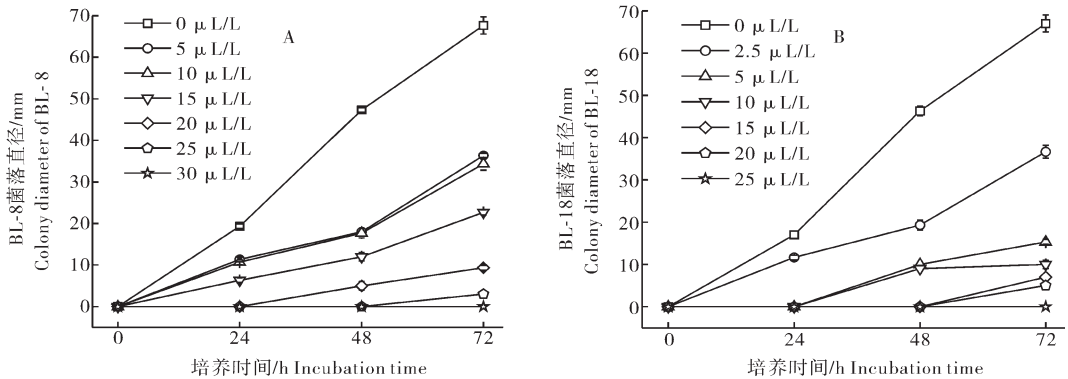


图 4 香芹酚处理后菌株 BL-8(A)和 BL-18(B)的菌落生长情况
Fig.4 Inhibition of carvacrol on colony growth of strain BL-8 (A) and BL-18(B)

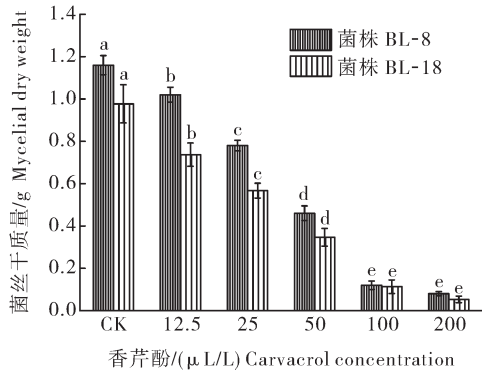


图 5 香芹酚处理下菌株 BL-8和 BL-18菌丝的干质量
Fig.5 Inhibition of carvacrol on mycelial biomass of strain BL-8 and BL-18

2.7 香芹酚熏蒸对板栗采后病害的控制效果

香芹酚对板栗采后病害的防治效果如图 6 所示。接种菌株 BL-8 和 BL-18 的对照组果实感病症状明显(图 6A、C),病情指数分别为 94.45 和 100(图 6B、D)。而经过香芹酚熏蒸处理的板栗果实,发病症状和病情指数显著低于对照组果实(图 6A);并且在 0~80 μL/L 的体积分数范围内,随着香芹酚浓度的上升,板栗果实的病情指数显著降低,当香芹酚的浓度达 80 μL/L 时,接种菌株 BL-8 和 BL-18 的板栗果实的病情指数分别骤降至 19.45 和 36.11,采后病害抑制率分别达到了 79.4% 和 63.89%。可见,香芹酚熏蒸处理对板栗果实采后病害具有明显的防治效果。

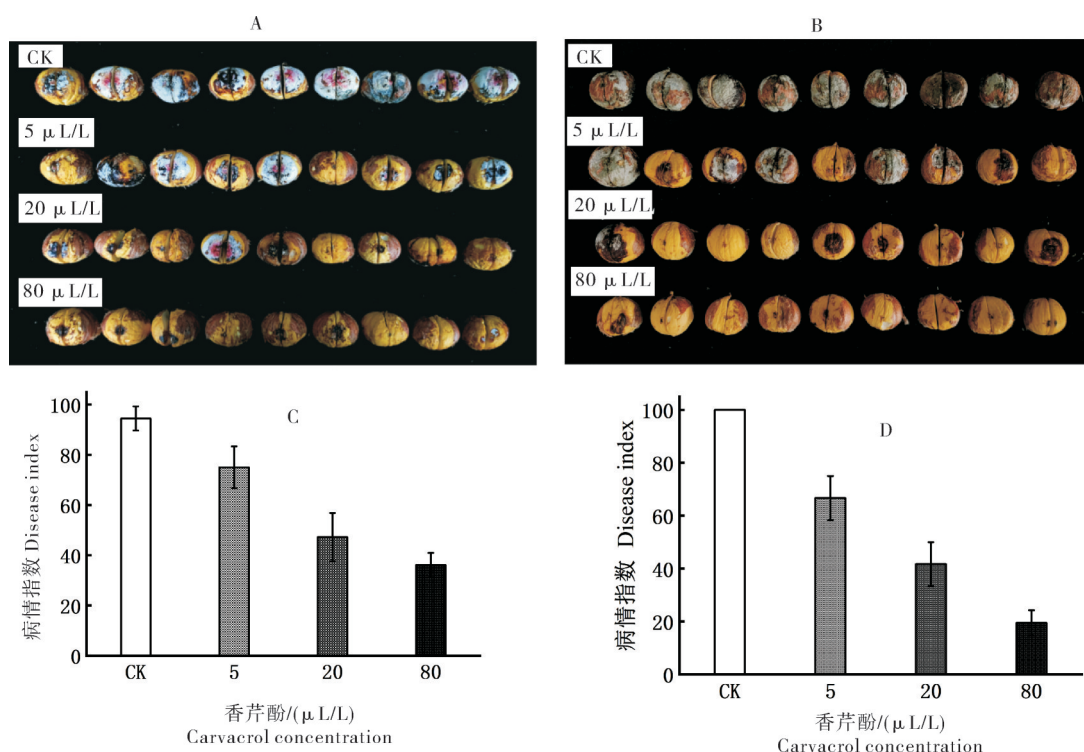


图6 接种菌株BL-8(A、C)和BL-18(B、D)的板栗感病情况和病情指数

Fig.6 Infective symptoms and disease index of postharvest chestnut inoculated by strain BL-8(A,C) and BL-18(B,D)

3 讨论

由病原真菌侵染引起的板栗病害是造成板栗采后腐烂的重要原因之一,我国板栗种植产区的分布十分广泛,病原菌的种类及其侵染特性都存在着较大的地域差异性。王海霞等^[5]对来自北京市产区的板栗进行了病原菌的分离鉴定,其研究表明镰孢菌属和壳梭孢属的致病菌具有潜伏侵染的致病特性。梁丽松等^[28]从湖北、湖南、安徽的等8个主要板栗产区的6个产区板栗中都分离出了镰孢菌属的病原菌,分布地域十分广泛。菌株BL-18则是林木和果树中的常见病原菌,可直接侵染果实导致采后柑橘、柠檬、苹果和芒果的腐烂,也可在果树的枝干和根中潜伏,造成枝干枯萎、树根死亡^[28-29]。本研究发现菌株BL-8和菌株BL-18在板栗采后病害的发病过程中起重要作用,是2种主要的致病菌,此结果与前人研究基本一致^[30]。在病原菌鉴定过程中,菌株BL-8和菌株BL-18均未在PDA培养基上观察到分生孢子,这与单柳颖^[31]和袁志林等^[32]的研究发现一致,这2种霉菌在营养丰富的PDA培养基中均无法产生有性或无性繁殖结构,需要在绿豆汤培养基等特殊培养基中培养,并通过近紫外线照射诱导产孢。此外,本研究还在板栗病果中分离出了毛霉属(*Mucor* sp.)和

地霉属(*Geotrichum* sp.),但其致病性并不强。吴小芹等^[33]从江苏“九家种”板栗病果中分离出了镰刀属、壳梭孢属和毛霉属,其中毛霉属的分离率最高。李琳玲等^[34]认为束丝菌属和曲霉属是湖北罗田板栗病害的重要致病菌。结合以往的研究来看,从同一批的发病板栗中可以分离出多种病原菌,而同一种病原菌也可以从不同产地、不同病症的板栗中分离到。Turchetti等^[35]认为,从同一批板栗中分离出的多种真菌并不都在板栗腐烂过程中起主要作用,由于菌种之间存在竞争关系,直接导致板栗病害的可能只有少数几种优势菌。因此,鉴于板栗复杂的发病规律,既需要全面系统地研究明确各种病原菌的种类与分布,也需要深入精确地研究病原菌的侵染机制与防控措施。

在果蔬采后防腐保鲜的领域,香芹酚也展现出了良好的发展前景。前人研究发现,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。Wu等^[36]报道了百里香精油对由链格孢菌引起的圣女果采后病害有良好的体外抑菌活性和病害控制效果,而百里香精油中的主要活性成分正是香芹酚。候辉宇等^[37]发现香芹酚对链格孢菌和尖孢镰孢菌的MIC值均低于

500 mg/L。此外,添加了香芹酚的可食性涂膜能有效减轻草莓的腐烂症状,延长草莓的货架期^[38]。本研究通过测定香芹酚、丁香酚、麝香草酚、紫苏醛、肉桂醛、叶醛、柠檬醛、芳樟醇、香茅醇和橙花醇等10种植物精油单组分对板栗采后病害病原真菌的抑制作用,发现香芹酚对板栗优势致腐菌的抑制效果最为显著,将香芹酚以熏蒸的方式处理板栗,能有效控制板栗病害的发生。综上所述,结合本研究的结果,作为一种天然植物源抑菌剂,香芹酚对板栗优势致腐菌所表现出的显著抑制作用,以及对板栗采后病害的良好控制效果,使其在板栗采后真菌性病害的防治工作中具备了潜在的应用价值。

参考文献 References

- [1] 韩元顺,许林云,周杰.中国板栗产业与市场发展现状及趋势[J].中国果树,2021(4):83-88.HAN Y S, XU L Y, ZHOU J. The development status and trend of Chinese chestnut industry and market[J].China fruits,2021(4):83-88(in Chinese).
- [2] 张瑞菊,孙强,张洪坤.板栗的营养、生产现状及前景展望[J].山东商业职业技术学院学报,2014,14(4):106-107.ZHANG R J, SUN Q, ZHANG H K, The nutrition, production status quo and prospect of Chinese chestnut[J].Journal of Shandong Business Vocational and Technical College,2014,14(4):106-107(in Chinese with English abstract).
- [3] 王贵禧,梁丽松,宗亦臣.贮藏板栗休眠与萌芽的温度调控[J].林业科学,1999(3):31-35.WANG G X, LIANG L S, ZONG Y C, Temperature regulation of dormancy and germination of storage chestnut[J].Scientia silvae sinicae,1999(3):31-35(in Chinese with English abstract).
- [4] 汪永文,张良富,王力,等.板栗贮藏保鲜问题及解决措施[J].经济林研究,2009,27(3):108-114.WANG Y W, ZHANG L F, WANG L, et al. Chestnut storage and preservation problems and solutions[J].Nonwood forest research,2009,27(3):108-114(in Chinese with English abstract).
- [5] 王海霞,刘正坪,朱晓清,等.板栗贮藏期致病病原真菌种类鉴定及其侵染特性[J].北京农学院学报,2006,21(4):33-36.WANG H X, LIU Z P, ZHU X Q, et al. Pathogens caused Chinese chestnut seed rot during storage and their infection process[J].Journal of Beijing Agricultural College,2006,21(4):33-36(in Chinese with English abstract).
- [6] RODRIGUES P, VENÂNCIO A, LIMA N. Mycobiota and mycotoxins of almonds and chestnuts with special reference to aflatoxins[J].Food research international,2012,48(1):76-90.
- [7] ROBERTO M, RON P H, SIRINNAPA S, et al. Nondestructive detection of insect infested chestnuts based on NIR spectroscopy[J].Postharvest biology and technology,2014,87(1):88-94.
- [8] HAMZA O, NAIMA B, AICHA H, et al. Chemical composition and biological activity of *Mentha citrata* Ehrh., essential oils growing in southern Algeria[J].Journal of food science and technology,2019,56(12):5346-5353.
- [9] LAYAL K, RAYANE C, TAREQ M O, et al. Antimicrobial effect of thymol and carvacrol added to a vinegar-based marinade for controlling spoilage of marinated beef (Shawarma) stored in air or vacuum packaging[J/OL].International journal of food microbiology,2020,332:108769[2021-09-23].https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108769.
- [10] ABBASZADEH S, SHARIFZADEH A, SHOKRI H, et al. Antifungal efficacy of thymol, carvacrol, eugenol and menthol as alternative agents to control the growth of food-relevant fungi[J].Journal de mycologie médicale,2014,24(2):51-56.
- [11] 贾睿,蔡丹,刘景圣,等.天然植物源抑菌活性成分研究进展[J].食品工业,2020,41(10):283-287.JIA R, CAI D, LIU J S, et al. Progress in the active components of natural plant sources[J].The food industry,2020,41(10):283-287(in Chinese with English abstract).
- [12] 卢钲,龚吉军.植物精油对采后农产品抑菌作用的研究进展[J].保鲜与加工,2021,21(7):136-141.LU K, GONG J J, Research progress of antimicrobial property of plant essential oils on postharvested agricultural products[J].Storage and process,2021,21(7):136-141(in Chinese with English abstract).
- [13] CAMELE I, ALTIERI L, De MARTINO L, 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.
- [14] 汤曦,邵烨林,周文文.精油成分香叶醇和柠檬醛对储粮霉菌的抑制及防控机制[C]//中国食品科学技术学会第十五届年会.中国食品科学技术学会第十五届年会论文摘要集.青岛:中国食品科学技术学会,2018:1.TANG X, SHAO Y L, ZHOU W W. Inhibition and control mechanism of essential oil components: aromatic foliol and citaldehyde [C]//The 15th annual meeting of Chinese Society of Food Science and Technology. Summary set of papers in the 15th annual meeting of Chinese Society of Food Science and Technology. Qingdao: Chinese Society of Food Science and Technology,2018:1(in Chinese with English abstract).
- [15] YANG R P, MIAO J Y, SHEN Y T, et al. Antifungal effect of cinnamaldehyde, eugenol and carvacrol nanoemulsion against *Penicillium digitatum* and application in postharvest preservation of citrus fruit[J].LWT-Food science and technology,2021,141:110924-110936.
- [16] 华娟,李琳玲,程华,等.罗田栗实致腐真菌的分离鉴定及拮抗菌筛选[J].中国农学通报,2013,29(25):102-107.HUA J, LI L L, CHENG H, et al. Isolation, identification and screening of antagonistic bacteria of the pathogenic fungi in Chinese from Luotian County[J].Chinese agricultural science bulletin,2013,29(25):102-107(in Chinese with English abstract).
- [17] 王俊凤.板栗果腐烂病原菌鉴定及室内药剂筛选[D].秦皇岛:河北科技师范学院,2020.WANG J F. Identification of the pathogenic fungus of chestnut rot disease and indoor screening of fungicides[D].Qinhuangdao: Hebei Normal University of Science and Technology,2020(in Chinese with English abstract).
- [18] 覃丽萍,苏琴,汪茜,等.广西芒果炭疽病菌致病力差异测定[J].中国植保导刊,2016,36(4):5-8.QIN L P, SU Q,

- WANG Q, et al. Determination on pathogenicity differences of mango anthracnose pathogens [J]. China plant protection, 2016, 36(4): 5-8 (in Chinese with English abstract).
- [19] 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): 1349-1349.
- [20] O'DONNELL K, SUTTON D A, RINALDI M G, et al. Novel multilocus sequence typing scheme reveals high genetic diversity of human pathogenic members of the *Fusarium incarnatum*; *F. equiseti* and *F. chlamydosporum* species complexes within the United States [J]. Journal of clinical microbiology, 2009, 47(12): 3851-3861.
- [21] O'DONNELL K, KISTLER H C, CIGELNIK E, et al. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies [J]. PNAS, 1998, 95(5): 2044-2049.
- [22] SLIPPERS B, CROUS P W, DENMAN S, et al. Combined multiple gene genealogies and phenotypic characters differentiate several species previously identified as *Botryosphaeria dothidea* [J]. Mycologia, 2004, 96(1): 83-101.
- [23] JACOBS K A, REHNER S A. Comparison of cultural and morphological characters and ITS sequences in anamorphs of *Botryosphaeria* and related taxa [J]. Mycologia, 1998, 90(4): 601-610.
- [24] AMBRICO A, TRUPO M, MARTINO M, et al. Essential oil of *Calamintha nepeta* (L.) Savi subsp. *nepeta* is a potential control agent for some postharvest fruit diseases [J]. Organic agriculture, 2019, 10(1): 35-48.
- [25] DIKBAS N, KOTAN R, DADASOGLU F, et al. Control of *Aspergillus flavus* with essential oil and methanol extract of *Satureja hortensis* [J]. International journal of food microbiology, 2008, 124(2): 179-182.
- [26] 秦子惠. 玉米穗腐病致病镰孢特征及玉米—小麦致病镰孢关系研究 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2014. QIN Z H. Characteristics of *Fusarium* species causing maize ear rot and relationship of pathogenic *Fusarium* spp. between maize and wheat [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2014 (in Chinese with English abstract).
- [27] 雷建姣, 汤前, 曲正, 等. 柑橘果实壳梭孢腐烂病的鉴定 [J]. 植物病理学报, 2018, 48(5): 582-586. LEI J J, TANG Q, Q Z, et al. Identification of *Neofusicoccum parvum* causing rot on citrus fruit [J]. Acta phytopathologica sinica, 2018, 48(5): 582-586 (in Chinese with English abstract).
- [28] 梁丽松, 王贵禧. 不同产区板栗病原菌的种类及其致病力研究 [J]. 林业科学研究, 2003(3): 284-288. LIANG L S, WANG G X. Studies on the varieties and pathogenic ability of the pathogenic fungi of Chinese chestnut seed in different production areas of China [J]. Forest research, 2003(3): 284-288 (in Chinese with English abstract).
- [29] 雷建姣. 柑橘采后病害的鉴定 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2019. LEI J J. Identification of postharvest diseases of *Citrus* [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2019 (in Chinese with English abstract).
- [30] 傅本重, 王立华, 李国元, 等. 板栗实腐病菌 rDNA-ITS 的 RFLP 和测序分析 [J]. 经济林研究, 2014, 32(2): 9-13. FU B Z, WANG L H, LI G Y, et al. RFLP and sequence analysis of rDNA-ITS in *Castanea mollissima* seed rot pathogens [J]. Nonwood forest research, 2014, 32(2): 9-13 (in Chinese with English abstract).
- [31] 单柳颖. 引起玉米茎腐病的镰孢菌的分离鉴定与多样性分析 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2018. SHAN L Y. Identification and diversity analysis of *Fusarium* spp. causing maize stem rot disease [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2018 (in Chinese with English abstract).
- [32] 袁志林, 陈益存, 汪阳东. 一种新发生的油桐叶枯病原真菌 [J]. 菌物学报, 2011, 30(4): 658-662. YUAN Z L, CHEN Y C, WANG Y D, et al. A new leaf blight pathogen of *Vernicia fordii* [J]. Mycosystema, 2011, 30(4): 658-662 (in Chinese with English abstract).
- [33] 吴小芹, 林树燕, 熊春红, 等. 贮藏方式对板栗品质及其微生物种类数量消长的影响 [J]. 南京林业大学学报 (自然科学版), 2001, 25(3): 47-51. WU X Q, LIN S Y, XIONG C H, et al. Effects of different treatments on the quality and the microorganisms' kinds and quantities of chestnuts in storage [J]. Journal of Nanjing Forestry University (natural sciences edition), 2001, 25(3): 47-51 (in Chinese with English abstract).
- [34] 李琳玲, 李政, 华娟, 等. 罗田板栗储存后期致腐真菌的分离鉴定及致病性研究 [J]. 湖北农业科学, 2013, 52(10): 2305-2308. LI L L, LI Z, HUA J, et al. Isolation and identification of the pathogenic fungi in rotted chestnut from luotian county in later storage period and research on the pathogenicity [J]. Hubei agricultural sciences, 2013, 52(10): 2305-2308 (in Chinese with English abstract).
- [35] TURCHETTI T. Some aspects of the main fungus diseases of chestnut [J]. Informare agrario, 1986, 2: 51-53.
- [36] WU F, JIAPING C, XIAODONG Z, et al. Thyme oil to control *Alternaria alternata* *in vitro* and *in vivo* as fumigant and contact treatments [J]. Food control, 2010, 22(1): 78-81.
- [37] 侯辉宇, 李敏, 李爽, 等. 牛至精油及其主要成分香芹酚和百里酚对 16 种植物病原真菌的抑制活性 [J]. 植物保护学报, 2020, 47(6): 1362-1369. HOU H Y, LI M, LI S, et al. Inhibitory activities of *Origanum vulgare* essential oil, and its main components carvacrol and thymol against 16 plant pathogenic fungi [J]. Journal of plant protection, 2020, 47(6): 1362-1369 (in Chinese with English abstract).
- [38] GRETA P, WEN-XIAN D, ROBERTO J A, 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.

Isolation and identification of predominant pathogenic fungi in postharvest chestnut and control effects of plant essential oils on them

ZHANG Xichen¹, LI Meng¹, YANG Shuzhen¹, PENG Litao¹, FENG Boru², YANG Jingjing²

1.College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2.Guangzhou Mini King Food Co., Ltd., Guangzhou 510600, China

Abstract The pathogenic fungi causing the rot disease of postharvest chestnut were isolated and purified by tissue separation method to clarify the predominant pathogenic fungi of postharvest chestnut and the control effect of plant essential oil on them. Further morphological and molecular biological identification of the predominant pathogenic fungi was carried out by microscopic observation and double-gene phylogenetic analysis. On this basis, the control effect of a single component of 10 plant essential oils including perillaldehyde, cinnamaldehyde, citral, folic aldehyde, eugenol, linalool, nerol, thymol, carvacrol, and citronellol on the predominant pathogenic fungi in chestnut postharvest was analyzed. The results showed that the predominant rot-causing fungi of postharvest chestnut included *Fusarium* sp., *Neofusicoccum* sp., *Geotrichum* sp. and *Mucor* sp., among which strains BL-8 and BL-18 were identified as *Fusarium asiaticum* and *Neofusicoccum parvum* by double-gene phylogenetic analysis. The single component of 10 plant essential oils had a certain degree of inhibitory effect on the predominant rot-causing fungus strain BL-8 and BL-18 of postharvest chestnut. Among them, carvacrol had the most obvious antifungal activity against the predominant pathogenic fungi of postharvest chestnut, with its EC_{90} value on the strain BL-8 and BL-18 of 24.431 $\mu\text{L/L}$ and 11.768 $\mu\text{L/L}$, respectively. It was further found that carvacrol significantly inhibited the growth of the two predominant pathogenic fungi through *in vitro* pathogen growth inhibition test and natural storage test. Carvacrol fumigation treatment effectively controlled the occurrence of disease in postharvest chestnut caused by the infection of strain BL-8 and BL-18. Therefore, carvacrol as a fumigant has potential application value in controlling fungal diseases of postharvest chestnut.

Keywords chestnut; postharvest diseases; predominant pathogenic fungi; isolation and identification; plant essential oil; antifungal effect

(责任编辑:边书京)