

引起乙烯褪绿蜜橘果实腐烂的主要致病真菌 分离及鉴定

黎 阳 张欣怡 袁梓沭 邓丽莉* 姚世响 曾凯芳

(西南大学食品科学学院, 重庆 400715)

摘要: 为明确贮藏过程中乙烯褪绿蜜橘果实腐烂的主要致病真菌,以重庆市北碚产区无核蜜橘为研究材料,利用乙烯利对其果实进行褪绿处理,观察贮藏期间褪绿蜜橘果实的发病症状,确定病害种类,统计发病率;并从发病果实中分离主要致病真菌,采用形态学特征观察和ITS序列分子生物学分析对其进行鉴定。结果表明,乙烯褪绿加剧贮藏蜜橘果实病害的发生。从发病果实中共分离出5株主要致病真菌菌株,分别编号为A、B、C、D、E;结合形态学特征和5株致病真菌的ITS序列分析结果,A、B菌株均被鉴定为胶孢炭疽菌 *Colletotrichum gloeosporioides*,但这2株菌株具有不同的菌落形态及致病特性;C菌株被鉴定为焦腐病菌 *Lasiodiplodia theobromae*;D菌株被鉴定为交链格孢菌 *Alternaria alternata*;E菌株被鉴定为棘孢曲霉 *Aspergillus aculeatus*。A、B菌株引起的果实腐烂占乙烯褪绿蜜橘总腐烂果实的81.96%,是引起贮藏过程中乙烯褪绿蜜橘果实腐烂的主要致病真菌,其次为C菌株,D、E菌株为次要致病真菌。

关键词: 蜜橘; 乙烯褪绿; 致病真菌; rDNA-ITS序列分析

Isolation and identification of main pathogenic fungi causing the decay of ethylene-degreened satsuma mandarin fruit

Li Yang Zhang Xinyi Yuan Ziyi Deng Lili* Yao Shixiang Zeng Kaifang

(College of Food Science, Southwest University, Chongqing 400715, China)

Abstract: To identify the main postharvest pathogens of ethylene-degreened satsuma mandarin fruit during storage, satsuma mandarin fruits harvested in Beibei District of Chongqing City were degreened with ethephon, and then the diseases symptoms were investigated, and the disease types and the incidence rates of different diseases were determined. The main pathogenic fungi were isolated from disease-infected fruits, and the fungi were identified according to the morphology and rDNA-ITS sequences of the fungi. The results indicated that degreening treatment aggravated the occurrence of the postharvest pathogens in satsuma mandarin fruits. Five major pathogenic fungi were isolated from the infected mandarin fruit and numbered as A, B, C, D, E, respectively. The strains A and B were identified as *Colletotrichum gloeosporioides*, but they had different colony morphology and pathogenic characteristics; strains C, D and E were identified as *Lasiodiplodia theobromae*, *Alternaria alternata* and *Aspergillus aculeatus*, respectively. Strains A and B were the main postharvest fungi in ethephon-degreened satsuma mandarin fruits, and the disease caused by them accounted for 81.96% of the total disease, followed by strain C, and strains D and E were the minor fungi.

基金项目: 西南大学食品科学学院本科生科技创新基金项目(SPHY201603), 国家自然科学基金(31401540), 重庆市社会民生科技创新专项项目(cstc2015shmszx80004)

* 通信作者 (Author for correspondence), E-mail: denglili_361@163.com

收稿日期: 2017-08-13

Key words: satsuma mandarin; ethylene degreening; pathogenic fungus; rDNA-ITS sequence analysis

重庆市是我国柑橘主产区之一,柑橘品种丰富,其中蜜橘在重庆市柑橘产业中占有重要地位(唐晓华,2008)。早熟蜜橘的果皮和果肉不能同时达到成熟标准,果皮成熟时间要明显晚于果肉成熟时间(Sdiri et al., 2012a),表现为当蜜橘果肉的色泽和口感已经满足消费需求时,果皮仍为绿色,而果皮色泽是消费者衡量蜜橘果实品质的重要标准和决定性因素(Rodrigo et al., 2013; 尹保凤等, 2015)。针对这一问题,生产上采用乙烯对早熟蜜橘果实进行褪绿处理,使果肉和果皮均达到成熟标准(Poole & Gray, 2002)。

乙烯褪绿处理通过加速果皮类胡萝卜素的积累和叶绿素的降解(Sdiri, 2012b),促进蜜橘果皮褪绿、转色,使早熟柑橘果实色泽更接近于自然成熟果实,且对果实内部品质无影响(Porat et al., 1999; Tanaka & Tanaka, 2006; Mayuoni et al., 2011)。但乙烯褪绿处理加剧蜜橘果实失水、褐变和易受冷害(Cronje et al., 2005; Zhou et al., 2010; Sdiri et al., 2013),加速蜜橘果实果蒂脱落(Brown & Burns, 1998),增加了贮藏过程中蜜橘果皮塌陷等生理病害和侵染性病害的发生(Cronje et al., 2011)。其中,病害加剧是乙烯褪绿蜜橘过程中面临的主要问题。未进行褪绿处理的柑橘由指状青霉 *Penicillium digitatum* 引起的绿霉病以及意大利青霉 *P. italicum* 引起的青霉病最严重,其次为炭疽病和蒂腐病(鹿连明等, 2014)。乙烯褪绿处理后,柑橘果实自身抗病能力有所下降,导致果实病害发生情况更复杂(Sdiri et al., 2012c),其主要致病病原真菌往往与未褪绿处理的果实存在明显差异。此外,受栽培品种、地理环境、气候条件等内外源因素影响,不同地区柑橘果实褪绿处理后的主要致病真菌种类和致病能力也存在显著差异(Ismail & Zhang, 2004; Plaza et al., 2004)。如西班牙瓦伦西亚产区的柑橘在果皮绿色较少(较成熟)情况下进行乙烯褪绿后,青霉菌、绿霉菌有增加的趋势(MoscOSO-Ramírez & Palou, 2014);而蒂腐病则是美国佛罗里达柑橘产区的柑橘主要采后病害(Brown & Burns, 1998; Zhang, 2004),且褪绿过程中乙烯处理会明显增加该地区柑橘蒂腐病的发生。国内关于乙烯褪绿果实的转色机制以及果实褪绿后品质变化的研究较多(刘伟鑫等, 2013; 邓丽莉等, 2017),而关于引起乙烯褪绿后蜜橘果实腐烂的主要致病真菌尚无报道。关于柑橘果实病害的化学防控技术已很成熟,但关

于柑橘果实乙烯褪绿技术的研究较少,且技术体系不完善。重庆市作为柑橘主产区,蜜橘果实褪绿处理后主要病害的致病真菌种类和致病特性都尚不清楚,更无针对这些病害的有效控制措施,严重制约了乙烯褪绿技术在重庆市乃至全国的推广。ITS 序列分析能准确反映不同菌株在属间、种间的差异,弥补传统真菌形态学鉴定的不足(刘春来等, 2007)。近年来 ITS 序列分析在柑橘苗木黄化脉明病毒病和柑橘褪绿矮化病毒病(周彦等, 2017)、葡萄炭疽病(邓维萍等, 2013)和火龙果溃疡病(易润华等, 2013)等多种果实病害的致病病原菌鉴定方面得到了广泛应用。

本研究基于前期的褪绿处理适宜参数条件对重庆市蜜橘果实进行褪绿处理,统计贮藏过程中褪绿处理后蜜橘果实的发病率,确定主要致病真菌的种类,从发病果实中分离主要致病真菌,并利用传统真菌形态学鉴定方法和 ITS 序列分析方法对引起乙烯褪绿处理后蜜橘果实腐烂的主要致病真菌进行分离、鉴定,以期后续制定有针对性的病害控制措施提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料:分别于 2016 年 9 月和 10 月自重庆市北碚区歇马镇农户果园采集果肉成熟、果皮为绿色的温州蜜柑果实。果实采收后立即运回实验室,置于 5~8℃ 条件下预冷处理 24 h,选择大小均匀、色泽一致、无病虫害、无机械损伤等健康果实为试验材料。

培养基:马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基:马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、琼脂 20 g、蒸馏水 1 000 mL;马铃薯葡萄糖液体(potato-dextrose broth, PDB)培养基:马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、蒸馏水 1 000 mL。

试剂及仪器:TransStart® FastPfu Buffer、dNTP、TransStart® FastPfu DNA Polymerase, 宝生物工程(大连)有限公司;其它试剂均为国产分析纯。BX43 型生物显微镜,日本 Olympus 公司;1000™ 型梯度 PCR 仪、PowerPac™ Basic 型电泳仪,美国 Bio-Rad 公司;聚乙烯单果包装袋,长 150 mm、宽 150 mm、厚度为 0.015 mm,四川绿果林制袋有限公司。

1.2 方法

1.2.1 蜜橘果实发病情况调查

蜜橘果实自然发病情况调查:9 月份采收的蜜

橘果实,不做任何处理,单果包装后置于25℃室温下贮藏35 d;10月份采收的蜜橘果实,不做任何处理,单果包装后置于25℃室温下贮藏50 d,每个采收时间储藏360个果实,共储藏720个。贮藏结束后,记录2组蜜橘果实的发病症状,确定病害种类并统计其发病率。炭疽病发病症状:初期为淡褐色,以后变为褐色而腐烂;蒂腐病发病症状:自蒂部开始发病,以果蒂为中心出现水渍状、淡褐色病斑,病部果皮革质有柔韧感,边缘呈指状;青、绿霉病发病症状:果实发病部位出现绿色或青色粉状霉层;其它发病症状归入未知病害。以腐烂果实数量占总果实数量的百分比计算蜜橘果实发病率。

乙烯褪绿处理后蜜橘果实发病情况调查:用2% NaClO溶液浸泡蜜橘果实1 min,用自来水冲洗干净,自然晾干后用1 000 mg/kg乙烯利溶液浸泡处理1 min,以清水浸泡蜜橘果实为对照;果实自然晾干后,单果包装,置于20℃环境中贮藏,每组处理蜜橘果实360个,试验重复2次。蜜橘果实经褪绿处理后,25℃室温下贮藏18 d,贮藏结束后,记录乙烯褪绿处理蜜橘果实的发病症状,确定病害种类,统计发病率,方法同自然发病情况调查。

1.2.2 致病真菌分离纯化及形态学鉴定

乙烯褪绿处理后,收集发病蜜橘果实对其病原菌进行分离和鉴定。在乙烯褪绿处理的蜜橘果实中未发现青、绿霉病害的症状,因此,仅对具有炭疽病、蒂腐病和未知病害症状的乙烯褪绿蜜橘果实的致病真菌进行分离和鉴定。采用方中达(1998)方法,略作修改。选取已发病的褪绿蜜橘果实,用70%酒精对其表面消毒1 min,以无菌刀片在病健交界处均匀地取3块大小为5 mm×5 mm的小方块,无菌水冲洗小方块3次后置于灭菌并冷却的PDA平板上,置于25℃恒温、相对湿度95%的培养箱内培养3~7 d,待菌落在PDA培养基长出后,用灭菌接种针挑取菌落边缘的菌丝于灭菌并冷却的PDA平板上进行病原菌的初步分离纯化,重复3~5次后得到单菌落菌株,5 d后观察菌落形态并拍照。

挑取培养5 d的病原菌菌落边缘菌丝于400倍放大倍数的光学显微镜下观察其形态并拍照,挑取培养约14 d的孢子于200倍放大倍数的光学显微镜下观察孢子形态并拍照,观察3个视野。根据真菌鉴定手册(魏景超,1979),对纯化后的菌株进行初步鉴定。

1.2.3 褪绿蜜橘果实腐烂的致病真菌的致病性测定

将分离纯化后的菌株置于PDA平板中,于25℃

下培养14 d,用无菌水洗下孢子,采用血球计数板计数法将孢子悬液浓度调至 1×10^5 个/mL。选取大小均一、无病虫害、无机械伤的乙烯褪绿蜜橘果实,用无菌刀片在其表面划出1个2 mm×2 mm的十字伤口,将分离纯化得到的致病真菌菌丝及20 μL孢子悬浮液分别接种到2个果实的十字伤口上,每种致病真菌3次重复,单果包装后,于25℃下培养,观察果实发病症状,如果接种该致病真菌果实的发病症状与其自然贮藏果实的发病症状相同,则对该致病真菌进行分子生物学鉴定。

1.2.4 褪绿蜜橘果实腐烂的致病真菌分子生物学鉴定

致病真菌培养及菌丝获得:将活化的致病真菌接种到装入含有100 mL PDB液体培养基的三角瓶中,于25℃、180 r/min下振荡培养2~5 d后收取菌丝,用多层灭菌滤纸挤压将其充分吸干。

致病真菌DNA提取:参照易润华等(2003)方法并略作修改。取50 mg充分吸干的新鲜菌丝,液氮研磨成粉状后,加入2×CTAB提取缓冲液(0.7 mol/L NaCl、100 mmol/L Tris-HCl pH 8.0、20 mmol/L EDTA、10 g/L PVP-360、20 g/L CTAB、0.1% β-巯基乙醇)600 μL。充分研磨后移入2 mL的离心管中,65℃下保温30 min,加等量的氯仿/异戊醇混合液(体积比为24:1)充分摇匀,于4℃下以8 000 r/min离心5 min;移取上清液至新的2 mL离心管中,加10%体积的3 mol/L pH 6.0的NaAc溶液、2.5倍体积冷乙醇沉淀,于4℃下以10 000 r/min离心5 min,弃上清液,用70%酒精洗2~3次,晾干,20 μL TE缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl、1 mmol/L EDTA pH 8.0)充分溶解后在-20℃下保存备用。

致病真菌ITS序列分析:采用真菌通用引物ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')和ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')对菌株进行PCR扩增。25 μL PCR反应体系:ddH₂O 15.5 μL、5×TransStart® FastPfu Buffer 5 μL、2.5 mmol/L dNTP 2 μL、浓度100 μmol/L引物各0.5 μL、TransStart® FastPfu DNA Polymerase 0.5 μL、致病真菌DNA模板1 μL。PCR反应条件:95℃预变性3 min;95℃变性20 s,52℃退火20 s,72℃延伸1 min 20 s,共40个循环;72℃延伸5 min,4℃保存。PCR扩增产物委托生物工程(上海)股份有限公司进行DNA测序。

致病真菌基因序列比对与分析:用DNASTAR 7.1软件分别对DNA测序得到的致病真菌基因序列进行拼接,将拼接的基因序列上传至GenBank的核酸数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)中,使用

BLAST 功能进行同源性比对, 下载同源性较高的相似菌株的基因序列。用 ClustalX 2.1 软件将下载的相似菌株基因序列及致病真菌基因序列进行排列, 使用 MEGA 5.0 软件采用邻接法构建系统发育树, 采用自展法对构建的系统发育树进行检验, 重复 1 000 次。

1.3 数据分析

试验数据应用 SPSS 17.0 软件进行统计分析, 采用 *t* 检验法对数据进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 乙烯褪绿处理后蜜橘果实的发病情况

贮藏 35 d 和 50 d 后, 自然贮藏果实的总发病率为 33.38%, 而乙烯褪绿蜜橘果实的总发病率为 52.17%, 显著高于自然贮藏的发病率 ($P<0.05$), 表明乙烯褪绿加剧了果实病害的发生。从病害发生症状来看, 自然贮藏果实主要病害为炭疽病和蒂腐病, 发病率分别为 20.90% 和 7.29%, 青、绿霉病发病率为 4.77%; 乙烯褪绿处理蜜橘果实的主要病害为炭疽病和蒂腐病, 其发病率分别为 42.76% 和 7.70%, 炭疽病占总发病率的 81.96%, 乙烯褪绿处理显著增加了果实炭疽病的发病率 ($P<0.05$), 但乙烯褪绿蜜橘果实中未发现青、绿霉病害 (表 1)。

2.2 引起褪绿蜜橘果实腐烂致病真菌的形态学鉴定

从乙烯褪绿处理后发病的蜜橘果实中共分离出 5 株致病真菌, 分别编号为 A、B、C、D、E。

A 菌株在 PDA 培养基上生长速度较快, 7 d 即可铺满整个培养皿。菌落正面呈圆形, 气生菌丝发达, 致密, 呈绒状, 最初菌丝为白色, 逐渐变为灰色, 最终为黑褐色; 背面最初为不规则青、灰白色, 逐渐变为黑褐色 (图 1-A 和图 1-A1)。产分生孢子速度较慢,

分生孢子盘为深褐色, 刚毛少; 分生孢子为无色, 椭圆筒形 (图 2-A 和图 2-A1)。根据真菌鉴定手册, 初步鉴定为柑桔炭疽刺盘孢菌 *Colletotrichum gloeosporioides*。

B 菌株在 PDA 培养基上基质为橙红色, 边缘为白色, 菌落呈圆形, 生长速度较慢, 菌丝量少, 呈现为白色 (图 1-B 和图 1-B1)。菌丝形态及分生孢子形态同 A 菌株高度相似 (图 2-B 和图 2-B1)。根据真菌鉴定手册, 将其初步鉴定为炭疽菌属 *Colletotrichum*。

C 菌株在 PDA 培养基上生长迅速, 5 d 即可铺满整个培养皿, 菌落最初呈白色, 气生菌丝发达, 呈绒状, 茂密, 逐渐变为青灰色, 最终呈黑色, 在 PDA 培养基上产孢困难 (图 1-C 和图 1-C1)。分生孢子盘为灰白色, 在光学显微镜下, 菌丝为灰黑色, 孢子近卵形, 无色 (图 2-C 和图 2-C1)。根据形态学特征结合果实发病症状, 将其初步鉴定为焦腐病菌 *Lasiodiplodia theobromae*。

D 菌株在 PDA 培养基上生长较快, 7 d 即可铺满整个培养皿, 菌落呈椭圆形, 灰白色, 逐渐变为墨绿色, 气生菌丝较少, 培养皿底部有明显墨绿色轮纹 (图 1-D 和图 1-D1)。在光学显微镜下, 菌丝较细, 呈灰黑色, 孢子呈椭圆形, 具有 3~5 个横隔 (图 2-D 和图 2-D1)。根据真菌鉴定手册, 将其初步鉴定为链格孢菌 *Alternaria alternata*。

E 菌株在 PDA 培养基上生长十分迅速, 5 d 即可铺满整个培养皿, 菌落中央为黑色孢子, 周围有白色菌丝, 单个菌落直径小, 气生菌丝少, 培养皿底部呈白色 (图 1-E 和图 1-E1)。在光学显微镜下, 孢子呈球形, 黑色, 串状分布, 孢子囊梗为无色, 顶囊呈淡黄色 (图 2-E 和图 2-E1)。根据真菌鉴定手册, 将其初步鉴定为曲霉菌属 *Aspergillus*。

表 1 蜜橘果实自然贮藏及乙烯褪绿处理后的发病种类及发病率统计
Table 1 Disease types and decay rates of mandarin fruits treated with or without ethylene %

处理 Treatment	青、绿霉病 Blue and green mold	炭疽病 Anthracnose	蒂腐病 Stem-end rot	未知病害 Unknown disease	总发病率 Total decay rate
自然贮藏(清水对照处理) Without ethylene degreening treatment (water treatment)	4.77±0.14 a	20.90±1.68 b	7.29±0.38 a	0.42±0.04 b	33.38±1.93 b
乙烯褪绿处理 Ethylene degreening treatment	0.00±0.00 b	42.76±1.67 a	7.70±1.01 a	1.71±0.16 a	52.17±2.81 a

表中数据为平均数±标准差。同列不同小写字母表示经 *t* 检验法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。Data are mean±SD. Different lowercase letters in the same column indicate significant difference at $P<0.05$ level by *t* test.

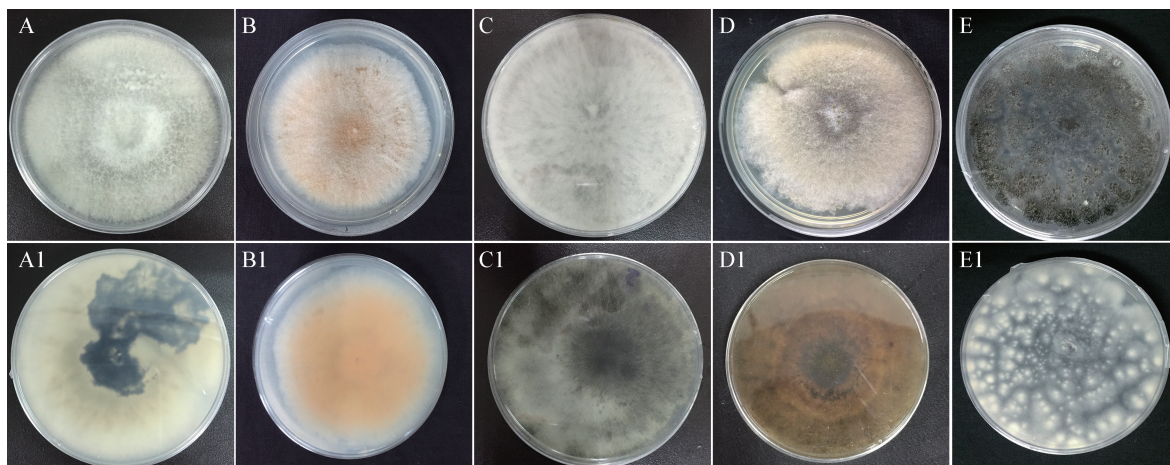


图1 引起乙烯褪绿蜜橘果实腐烂的5株致病真菌的菌落形态特征

Fig. 1 Colony morphological characteristics of five pathogenic fungal strains causing the decay of ethylene-degreased mandarin fruits

A~E: 分别为A~E菌株菌落正面形态特征; A1~E1: 分别为A~E菌株菌落背面形态特征。A~E: Colony morphological characteristics at the front side of strains A, B, C, D, E, respectively; A1~E1: colony morphological characteristics at the back side of strains A, B, C, D and E, respectively.

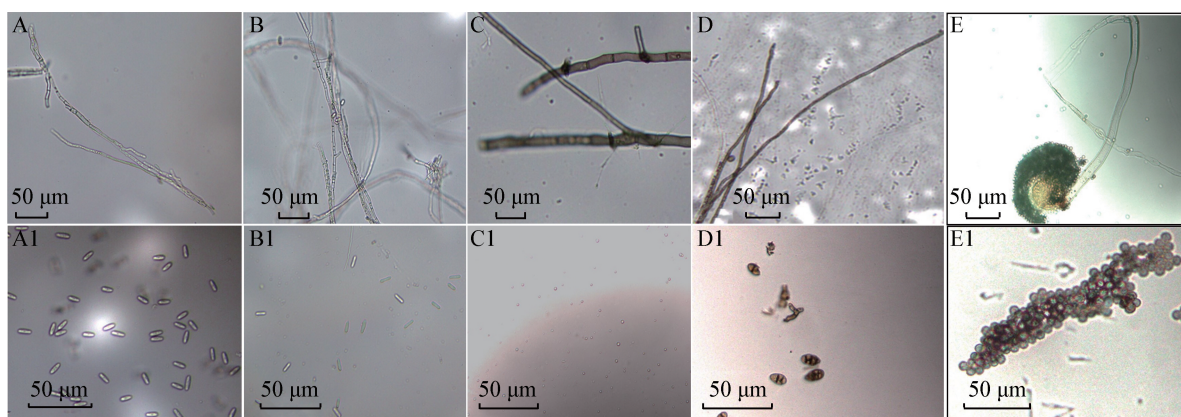


图2 引起乙烯褪绿蜜橘果实腐烂的5株致病真菌的菌丝及孢子形态特征

Fig. 2 Morphological characteristics of mycelia and spores of five pathogenic fungal strains causing the decay of ethylene-degreased mandarin fruit

A~E: 分别为A~E菌株的菌丝形态特征; A1~E1: 分别为A~E菌株的孢子形态特征。A~E: Morphological characteristics of mycelia of strains A, B, C, D and E, respectively; A1~E1: morphological characteristics of the spores of strains A, B, C, D and E, respectively.

2.3 引起褪绿蜜橘果实腐烂致病真菌的致病性

分别接种引起乙烯褪绿蜜橘果实腐烂的致病真菌A~E菌株后,蜜橘果实发病(图3-A1~E1),且与自然状态下果实发病症状相同(图3-A~E),因此确定这5株菌株均为引起褪绿后蜜橘果实腐烂的致病真菌。5株致病真菌中,A菌株和B菌株主要侵染褪绿蜜橘果实果蒂部位,A菌株主要侵染果皮部位,不侵染果肉部位,且不易产孢(图3-A和图3-A1);B菌株同时侵染果皮及果肉部位,发病过程易见粉红色孢子(图3-B和3-B1);C菌株侵染褪绿

蜜橘果实后发病迅速,首先侵染果蒂部位,继而呈指状向赤道部位扩散(图3-C和3-C1);D菌株侵染褪绿蜜橘果实速度较缓慢,但侵染后扩散速度快,表面覆盖致病真菌的黑色孢子,周围有黄色晕圈(图3-D和3-D1);E菌株侵染褪绿蜜橘果实后发病迅速,向周围扩散速度快,能引起果皮变软,塌陷,继而引起整果腐烂(图3-E和3-E1)。

2.4 引起褪绿蜜橘腐烂致病真菌的分子生物学鉴定

引起乙烯褪绿蜜橘果实腐烂的致病真菌A、B、C、D和E菌株的rDNA扩增片段分别长544、548、

514、543 和 537 bp。A、B 菌株均与已知的胶孢炭疽菌(登录号 JN887346.1)18S rDNA 的相似度达 99%, 自展值高达 100, 与形态学初步鉴定结果一致, 因此将其鉴定为胶孢炭疽菌 *C. gloeosporioides*; C 菌株与已知的焦腐病菌(登录号 KU377483.1)18S rDNA 的相似度高达 100%, 自展值高达 100, 与形态学初步鉴定结果一致, 将其鉴定为焦腐病菌 *L. theobromae*; D 菌株与已知的交链格孢菌(登录号 KF380824.1)

18S rDNA 的相似度高达 100%, 自展值高达 100, 与形态学初步鉴定结果一致, 将其鉴定为交链格孢菌 *A. alternata*; E 菌株与已知的棘孢曲霉菌(登录号 KR296866.1)及日本曲霉菌(登录号 AJ876880.1)18S rDNA 的相似度均达 99%, 自展值均高达 100, 而其形态学特征与棘孢曲霉形态学特征更相似, 将其鉴定为棘孢曲霉菌 *A. aculeatus*(图 4)。

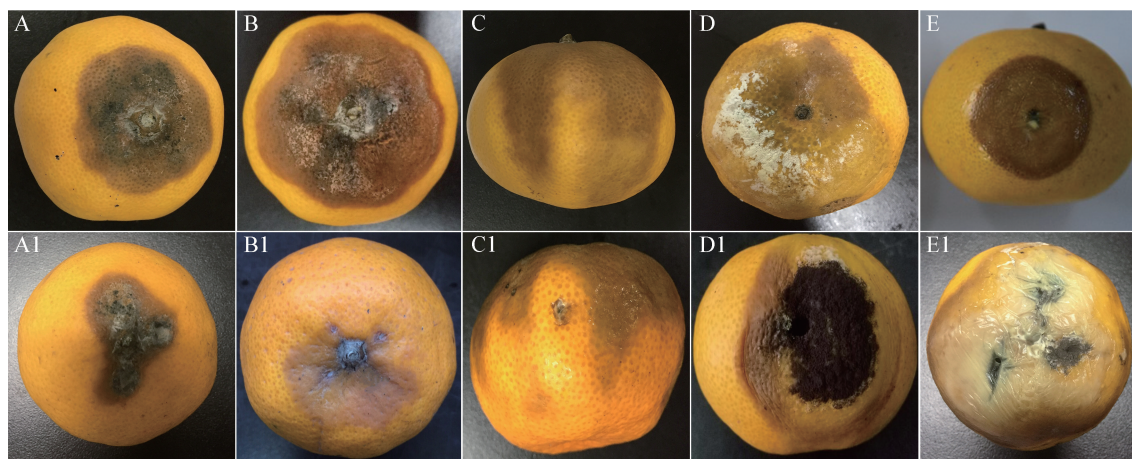


图 3 引起乙烯褪绿蜜橘果实腐烂的 5 株致病真菌的发病症状(A~E)及果实回接症状(A1~E1)

Fig. 3 Disease symptoms of five pathogenic fungal strains causing the decay of ethylene-degreenned mandarin fruits (A-E) and the disease symptoms of relative artificial infection tests (A1-E1)

A~E: 分别为 A~E 菌株所致病害的自然发病症状; A1~E1: 分别为回接乙烯褪绿蜜橘致病真菌 A~E 菌株后的果实发病症状。A~E: Disease symptoms of strains A, B, C, D and E in ethylene-degreenned mandarin fruits, respectively; A1-E1: disease symptoms of strains A, B, C, D and E after artificial infection test, respectively.

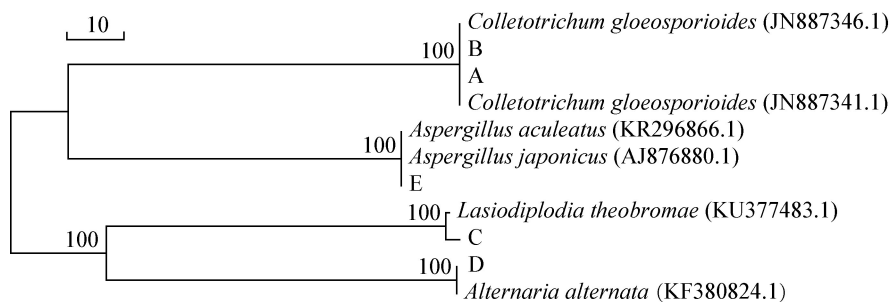


图 4 基于 18S rDNA 序列构建引起乙烯褪绿蜜橘果实腐烂的 5 株致病真菌菌株与其它高度同源真菌的系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree of five pathogenic fungal strains causing the decay of ethylene-degreenned mandarin fruit and their highly homologous species based on 18S rDNA-ITS sequences

A~B: 胶孢炭疽菌菌株; C: 焦腐病菌菌株; D: 交链格孢菌菌株; E: 棘孢曲霉菌菌株。A~B: Strains of *Colletotrichum gloeosporioides*; C: strain of *Lasiodiplodia theobromae*; D: strain of *Alternaria alternata*; E: strain of *Aspergillus aculeatus*.

3 讨论

蜜橘个小、皮薄、表面积相对较大、采收季节温度较高、果实生理代谢旺盛,果实采后易因青、绿霉病(鹿连明等,2014)、炭疽病(何凯等,2013)、蒂腐病、黑腐病(李红叶等,2015)等病害而发生腐烂。本

研究结果显示,自然贮藏果实总发病率为 33.38%,主要病害为炭疽病、蒂腐病和青、绿霉病,而乙烯褪绿蜜橘果实的总发病率为 52.17%,明显高于自然贮藏的发病率,主要病害为发生在果蒂部位的炭疽病和蒂腐病。这可能是由于乙烯褪绿处理增加了脱落相关酶的活性,离层内细胞大量降解使真菌的渗透

率增加(Brown & Lee, 1993),从而增加了蜜橘果实发病率。

本研究对引起重庆市乙烯褪绿蜜橘果实腐烂的主要致病真菌进行了分离和鉴定,从受试果实中共分离出5株致病真菌,包括2株胶孢炭疽菌、1株焦腐病菌、1株交链格孢菌以及1株棘孢曲霉菌。2株胶孢炭疽菌具有不同的菌落形态及致病特性,A菌株致病过程中不易产孢,主要侵染乙烯褪绿蜜橘果皮,B菌株致病过程易产粉红色的孢子,可同时侵染乙烯褪绿蜜橘果皮和果肉,这可能与胶孢炭疽菌的多样性有关(曾大兴等,2003)。Brown(1975)研究表明,Robinson蜜橘易感染炭疽病,特别是乙烯褪绿处理后,但仅以侵染果皮的炭疽菌为主,而本研究结果发现引起重庆市蜜橘果实褪绿后腐烂的胶孢炭疽菌既有仅侵染果肉的胶孢炭疽菌,也有同时侵染蜜橘果皮和果肉的软腐型胶孢炭疽菌,且以同时侵染果皮和果肉的软腐型胶孢炭疽菌为主,这可能与蜜橘品种以及地区气候差异有关(Moscoso-Ramírez & Palou, 2014)。焦腐病菌引起的蒂腐病是美国佛罗里达柑橘产区乙烯褪绿处理后的主要病害(Brown & Burns, 1998),而本研究结果表明胶孢炭疽菌是引起重庆市蜜橘果实褪绿后腐烂的主要致病真菌,其引起的果实腐烂发病率占乙烯褪绿蜜橘果实腐烂总发病率的81.96%。李红叶等(2015)指出交链格孢菌引起的柑橘链格孢褐斑病在全国发病面积较低,属于次要的柑橘采后病害。棘孢曲霉菌能分泌半纤维素酶(张闯, 2014),这可能是棘孢曲霉菌能迅速引起蜜橘果实果皮塌陷,变软,继而腐败的原因。此外,在受试蜜橘果实中未发现青、绿霉病发病果实,这是因为褪绿处理引起胶孢炭疽病菌对青、绿霉菌的抵抗,并且增加蜜橘果实对胶孢炭疽病菌的敏感性(Brown, 1973)。

我国乙烯褪绿技术目前仍处于研究阶段,本研究明确了胶孢炭疽菌引起的炭疽病和焦腐病菌引起的蒂腐病是重庆市乙烯褪绿蜜橘果实贮藏过程中的主要病害,但我国其它地区,其它品种的柑橘乙烯褪绿后主要致病真菌尚不清楚,仍需进一步深入研究。

参 考 文 献 (References)

- Brown GE. 1973. Development of green mold in degreened oranges. *Phytopathology*, 63(9): 1104-1107
- Brown GE. 1975. Anthracnose, a serious decay of degreened 'Robinson' tangerines. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, 88: 308-311
- Brown GE, Burns JK. 1998. Enhanced activity of abscission enzymes predisposes oranges to invasion by *Diplodia natalensis*, during ethylene degreening. *Postharvest Biology and Technology*, 14(2): 217-227
- Brown GE, Lee HS. 1993. Interactions of ethylene with citrus stem-end rot caused by *Diplodia natalensis*. *Phytopathology*, 83(11): 1204-1208
- Cronje PJR, Barry GH, Huysamer M. 2011. Postharvest rind breakdown of 'Nules Clementine' mandarin is influenced by ethylene application, storage temperature and storage duration. *Postharvest Biology and Technology*, 60(3): 192-201
- Cronje PJR, Crouch EM, Huysamer M. 2005. Postharvest calyx retention of citrus fruit. *Acta Horticulturae*, 682: 369-376
- Deng LL, Yuan ZY, Yin BF, Ren SY, Li SP, Yao SX, Zeng KF. 2017. Effect of LED light treatment on coloration of ethphon-degreened mandarin fruit. *Food & Machinery*, 33(3): 127-133 (in Chinese) [邓丽莉, 袁梓沂, 尹保凤, 任书颖, 李四平, 姚世响, 曾凯芳. 2017. LED光照处理对乙烯褪绿蜜橘果实着色影响. *食品与机械*, 33(3): 127-133]
- Deng WP, Yang M, Du F, Yang JZ, Zhu SS. 2013. Identification of the pathogen causing grape anthracnose in Yunnan and its pathogenicity. *Journal of Plant Protection*, 40(1): 61-67 (in Chinese) [邓维萍, 杨敏, 杜飞, 杨积忠, 朱书生. 2013. 云南葡萄产区葡萄炭疽病原鉴定及致病力分析. *植物保护学报*, 40(1): 61-67]
- Fang ZD. 1998. *Research methods of plant pathology* (3rd edition). Beijing: China Agriculture Press (in Chinese) [方中达. 1998. *植物病理学方法* (第3版). 北京: 中国农业出版社]
- He K, Li ZL, Yang SY, Li XR. 2013. Biological characteristics of citrus *Colletotrichum gloeosporioides* and inhibitory effect of boron on the fungus. *Journal of Plant Protection*, 40(6): 571-572 (in Chinese) [何凯, 李振轮, 杨水英, 李晓蕊. 2013. 柑橘炭疽菌的生物学特性及硼对其抑制作用. *植物保护学报*, 40(6): 571-572]
- Ismail M, Zhang JX. 2004. Post-harvest citrus diseases and their control. *Outlooks on Pest Management*, 15(1): 29-35
- Li HY, Mei XF, Fu YS, Huang F, Chen ZL, Yang XP, Wang YG, Huang HH. 2015. Alternaria brown spot of citrus: the risk and management strategy. *Journal of Fruit Science*, 32(5): 969-976 (in Chinese) [李红叶, 梅秀凤, 符雨诗, 黄峰, 陈再廖, 杨小平, 王一光, 黄海华. 2015. 柑橘链格孢褐斑病的发生危害风险和治理对策. *果树学报*, 32(5): 969-976]
- Liu CL, Wen JZ, Yang MX, Li YG. 2007. Application of rDNA-ITS in molecular test of phytopathogenic fungi. *Journal of Northeast Agricultural University*, 38(1): 101-106 (in Chinese) [刘春来, 文景芝, 杨明秀, 李永刚. 2007. rDNA-ITS在植物病原真菌分子检测中的应用. *东北农业大学学报*, 38(1): 101-106]
- Liu WX, Miao HX, Jin ZQ, Liu JH, Jia CH, Sun PG, Xu BY. 2013. Effects of ethylene and 1-MCP on pigment content and degreening of banana during ripening. *Journal of Fruit Science*, 30(6): 1051-1055 (in Chinese) [刘伟鑫, 苗红霞, 金志强, 刘菊华, 贾彩红, 孙佩光, 徐碧玉. 2013. 乙烯和1-MCP处理对香蕉采后果皮色素含量及褪绿变黄的调控. *果树学报*, 30(6): 1051-1055]

- Lu LM, Du DC, Cheng BP, Hu XR, Chen GQ. 2014. Isolation and identification of marine actinomyces A3202 and its control efficacy against postharvest citrus diseases. *Journal of Plant Protection*, 41(3): 327–334 (in Chinese) [鹿连明, 杜丹超, 程保平, 胡秀荣, 陈国庆. 2014. 海洋放线菌 A3202 的分离鉴定及其对柑橘采后病害的防效. *植物保护学报*, 41(3): 327–334]
- Mayuoni L, Tietel Z, Patil BS, Porat R. 2011. Does ethylene degreening affect internal quality of citrus fruit? *Postharvest Biology and Technology*, 62(1): 50–58
- Moscoso-Ramírez PA, Palou L. 2014. Effect of ethylene degreening on the development of postharvest penicillium molds and fruit quality of early season citrus fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 91: 1–8
- Plaza P, Sanbruno A, Usall J, Lamarca N, Torres R, Pons J, Viñas I. 2004. Integration of curing treatments with degreening to control the main postharvest diseases of clementine mandarins. *Postharvest Biology and Technology*, 34(1): 29–37
- Poole ND, Gray K. 2002. Quality in citrus fruit: to degreen or not degreen? *British Food Journal*, 104(7): 492–505
- Porat R, Weiss B, Cohen L, Daus A, Goren R, Droby S. 1999. Effects of ethylene and 1-methylcyclopropene on the postharvest qualities of ‘Shamouti’ oranges. *Postharvest Biology and Technology*, 15(2): 155–163
- Rodrigo MJ, Alquézar B, Alós E, Lado J, Zacarías L. 2013. Biochemical bases and molecular regulation of pigmentation in the peel of citrus fruit. *Scientia Horticulturae*, 163: 46–62
- Sdiri S, Navarro P, Benabda J, Monterde A, Salvador A. 2012b. Antioxidant activity and vitamin C are not affected by degreening treatment of clementine mandarins. *Acta Horticulturae*, 934: 893–900
- Sdiri S, Navarro P, Monterde A, Benabda J, Salvador A. 2012a. Effect of postharvest degreening followed by a cold-quarantine treatment on vitamin C, phenolic compounds and antioxidant activity of early-season citrus fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 65(3): 13–21
- Sdiri S, Navarro P, Monterde A, Benabda J, Salvador A. 2012c. New degreening treatments to improve the quality of citrus fruit combining different periods with and without ethylene exposure. *Postharvest Biology and Technology*, 63(1): 25–32
- Sdiri S, Navarro P, Salvador A. 2013. Postharvest application of auxins to control calyx senescence in clementines submitted to degreening treatment. *Postharvest Biology and Technology*, 75: 68–74
- Tanaka A, Tanaka R. 2006. Chlorophyll metabolism. *Current Opinion in Plant Biology*, 9(3): 248–255
- Tang XH. 2008. Development strategy of Chongqing citrus industry based on “Diamond Model”. Master Thesis. Chongqing: Southwest University (in Chinese) [唐晓华. 2008. 基于“钻石模型”的重庆柑橘产业发展研究. 硕士学位论文. 重庆: 西南大学]
- Wei JC. 1979. *Fungal identification manual*. Shanghai: Shanghai Scientific & Technical Publishers (in Chinese) [魏景超. 1979. 真菌鉴定手册. 上海: 上海科学技术出版社]
- Yi RH, Gan LJ, Yan DH, Wu ZJ, Tong YT, Wu FF. 2013. Identification and biological characteristics of *Neoscytalidium dimidiatum* causing pitaya canker. *Journal of Plant Protection*, 40(2): 102–108 (in Chinese) [易润华, 甘罗军, 晏冬华, 吴泽菁, 童依婷, 吴凤发. 2013. 火龙果溃疡病原菌鉴定及生物学特性. *植物保护学报*, 40(2): 102–108]
- Yi RH, Zhu XR, Zhou EX. 2003. Simplified CTAB method to extract DNA of filamentous fungi. *Journal of Zhanjiang Ocean University*, 23(6): 72–73 (in Chinese) [易润华, 朱西儒, 周而勋. 2003. 简化 CTAB 法快速微量提取丝状真菌 DNA. *湛江海洋大学学报*, 23(6): 72–73]
- Yin BF, Zeng KF, Zhang ZQ, Deng LL. 2015. Advances in ethylene degreening treatment of citrus fruits. *Food Science*, 36(3): 245–249 (in Chinese) [尹保凤, 曾凯芳, 张昭其, 邓丽莉. 2015. 柑橘果实乙烯褪绿技术研究进展. *食品科学*, 36(3): 245–249]
- Zeng DX, Qi PK, Jiang ZD. 2003. Analysis of intraspecific variation in the species *Colletotrichum gloeosporioides*. *Mycosystema*, 22(1): 50–55 (in Chinese) [曾大兴, 戚佩坤, 姜子德. 2003. 胶孢炭疽菌的种内遗传多样性研究. *菌物系统*, 22(1): 50–55]
- Zhang C. 2014. Screening of *Aspergillus aculeatus* ZC-1005 based on citrus mesocarp degradation and basic research for application. Master Thesis. Changsha: Central South University (in Chinese) [张闯. 2014. 降解柑橘囊衣 *Aspergillus aculeatus* ZC-1005 的筛选及其应用基础研究. 硕士学位论文. 长沙: 中南大学]
- Zhang JX. 2004. Effect of ethylene on natural resistance of citrus fruit to stem-end rot caused by *Diplodia natalensis* and its relation to harvest control of this decay. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, 117: 364–367
- Zhou JY, Sun CD, Zhang LL, Dai X, Xu CJ, Chen KS. 2010. Preferential accumulation of orange-colored carotenoids in Ponkan (*Citrus reticulata*) fruit peel following postharvest application of ethylene or ethephon. *Scientia Horticulturae*, 126(2): 229–235
- Zhou Y, Chen HM, Wang XF, Tang J, Jin X, Zhou CY. 2017. Development and application of a duplex RT-PCR protocol for detection of two new citrus viruses in China. *Journal of Plant Protection*, 44(4): 699–700 (in Chinese) [周彦, 陈洪明, 王雪峰, 唐杰, 金鑫, 周常勇. 2017. 两种柑橘新病毒双重 RT-PCR 检测体系的建立及应用. *植物保护学报*, 44(4): 699–700]

(责任编辑:张俊芳)