

研究报告



余甘子采后软腐病菌的分离鉴定及其细胞壁水解酶活性

吴月 周志杰 覃小艳 徐金容 陈雪 张忆萱 陈安均 申光辉*

四川农业大学食品学院 四川 雅安 625014

摘要:【背景】药食同源的余甘子果实在采后贮藏过程中极易软腐变质,严重影响其品质和经济价值。【目的】明确引起余甘子果实软腐病的病原菌种类及其生长特性和产细胞壁水解酶活性,为余甘子采后软腐病的控制及延长其贮藏期奠定基础。【方法】采用组织块分离法从采后发病的余甘子果实分离病原菌,按照科赫法则确定分离菌株的致病性;采用形态学特征结合 rDNA-ITS 序列分析对病原菌进行鉴定,测定病原菌菌丝生长和产孢特性,检测产胞外细胞壁水解酶活性。【结果】从具有软腐症状的余甘子果实中分离得到 32 株真菌,其中菌株 DQ23 是余甘子采后软腐病的致病菌,通过形态特征结合 rDNA-ITS 序列将其鉴定为 *Penicillium choerospondiatis*。其菌丝在酵母膏葡萄糖琼脂培养基(YDA)上生长最快,在马铃薯蔗糖琼脂培养基(PSA)上产孢最多。该菌能有效利用多种碳、氮源,适宜产孢的碳源为蔗糖、葡萄糖,氮源为蛋白胨、牛肉膏、酵母膏。菌丝生长的最适温度和 pH 范围分别为 25 °C 和 3.0–5.0,产孢的最适温度和 pH 范围分别为 25 °C 和 4.0–7.0。光照均利于菌丝生长和产孢。该菌具有分解果胶、纤维素的能力,无分解蛋白质、鞣质的能力。【结论】*Penicillium choerospondiatis* 是余甘子果实软腐病的病原菌,研究结果为该病害的防控奠定了基础。

关键词: 余甘子, *Penicillium choerospondiatis*, 采后病害, 生物学特性, 细胞壁水解酶

Identification of the pathogen causing fruit rot of postharvest *Phyllanthus emblica* and its cell wall degrading enzyme activity

WU Yue ZHOU Zhi-Jie QIN Xiao-Yan XU Jin-Rong CHEN Xue ZHANG Yi-Xuan
CHEN An-Jun SHEN Guang-Hui*

College of Food Science, Sichuan Agricultural University, Ya'an, Sichuan 625014, China

Abstract: [Background] In the process of postharvest, *Phyllanthus emblica* both as diet and medicine is easy to be perishable, which can seriously decrease its quality and economic value. [Objective] We identified the pathogen causing fruit rot of postharvest *Phyllanthus emblica*, its biological characteristics and cell wall degrading enzyme activity analysis, in order to provide the basis for rot disease control and extension of the storage life of *Phyllanthus emblica* fruit. [Methods] The pathogen isolated from fruit rot of postharvest *Phyllanthus emblica* by tissue isolation method, followed by Koch's postulates pathogenicity test. The pathogen was identified based on morphological characteristics and rDNA-ITS sequence analysis. In addition, the pathogenic mycelia growth and spore characteristics were determined, the

Foundation item: National Key Research and Development Program of China (2017YFC0505106)

*Corresponding author: Tel: 86-835-2882281; E-mail: shenghuishen@163.com

Received: 28-03-2018; **Accepted:** 23-05-2018; **Published online:** 13-06-2018

基金项目: 国家重点研发计划(2017YFC0505106)

*通信作者: Tel: 0835-2882281; E-mail: shenghuishen@163.com

收稿日期: 2018-03-28; 接受日期: 2018-05-23; 网络首发日期: 2018-06-13

activity of extracellular cell wall degrading enzyme activity were also detected. **[Results]** Thirty-two fungi isolates were isolated from the fruit rot of *Phyllanthus emblica*. Strain DQ23 was the causal pathogen fungus of fruit rot of postharvest *Phyllanthus emblica*. The pathogen strain DQ23 was identified as *Penicillium choerospondiatis* via morphological characteristics and rDNA-ITS sequence analysis. YDA medium was the most appropriate for mycelium growth. PSA was the optimum medium for conidia production. The mycelium could utilize a variety of carbon and nitrogen sources. For conidia production, the optimum carbon sources were sucrose and glucose, and the optimum nitrogen source were tryptone, beef extract and yeast extract. The best mycelium growth was obtained at 25 °C and pH 3.0–5.0. The conidia production increased rapidly at 25 °C and pH 4.0–7.0. Continuous light was beneficial to mycelial growth and spore production. *Penicillium choerospondiatis* could decompose pectin and cellulose, but not protein and tannin. **[Conclusion]** *Penicillium choerospondiatis* strain DQ23 was the pathogenic fungi causing fruit rot of *Phyllanthus emblica*, and possessed higher pectinase and cellulase activity.

Keywords: *Phyllanthus emblica*, *Penicillium choerospondiatis*, Postharvest disease, Biological characteristics, Cell wall degrading enzyme

余甘子(*Phyllanthus emblica* L.)为大戟科叶下珠属落叶小乔木或灌木的果实,又名山油柑、油甘子、滇橄榄、余甘果等,广泛分布在广东、湖南、四川、福建和云南等省区的山地、丘陵和平原^[1]。果实营养丰富,富含维生素C、黄酮类化合物、多酚、鞣质^[2],既是营养价值高的天然食物,又具有多种药理活性,已被国家卫生部列入首批药食兼用名单^[3-4]。近年来,余甘子除药用外,已被开发成果汁、果酒、纳米乳液^[5]等,其栽培生产规模日益扩大,已发展为部分地区脱贫致富的重要特色产业。目前余甘子栽培生产技术较落后,管理较粗放,鲜果采后不耐贮藏,室温下易发生果实霉变腐烂等现象^[6],造成严重的经济损失,已成为贮藏和加工生产上亟待解决的问题。

目前,国内外对余甘子果实采后贮藏病害的研究报道较少。印度的Gupta等^[7]研究发现,余甘子贮藏期间易受到曲霉 *Aspergillus* spp. 和青霉 *Penicillium* spp. 真菌感染而降低其商品性。杨子祥等^[8]对云南地区的余甘子病虫害进行调查,主要发现了锈病、炭疽病、煤污病等危害果实生长的病害。郑毅等^[9]发现了余甘果贮藏过程中由链格孢菌 (*Alternaria*)引起的黑疔病。

作者在四川凉山产余甘子常温贮藏过程中发现,余甘子病果的腐烂症状与已报道的病害症状存

在较大差异,果实发病率高,腐烂速度快,组织软腐并呈现灰色霉变症状,贮藏危害性巨大。因此,明确该贮藏病害的病原菌及其生物学特性,对于余甘子贮藏安全控制具有重要意义。本研究通过对病原菌的分离及其致病性测定,采用形态学观察结合 rDNA-ITS 序列对病原菌进行鉴定,并对其生物学特性、细胞壁水解酶进行初步研究,以期余甘子果实采后贮藏安全防控提供依据。

1 材料与方 法

1.1 样品和培养基

余甘子鲜果于2017年10月采自四川凉山州,23–25 °C 贮藏,4–5 d 后开始腐败。

培养基:马铃薯葡萄糖(Potato dextrose agar, PDA)培养基^[10],马铃薯蔗糖(Potato sucrose agar, PSA)培养基^[10],查氏(Czapek agar, CA)培养基^[10],查氏酵母膏琼脂(Czapek yeast extract agar, CYA)培养基^[11],燕麦琼脂(Oatmeal agar, OA)培养基^[11],淀粉铵盐(Starch ammonium agar, SAA)培养基^[12],酵母膏葡萄糖琼脂(Yeast extract dextrose agar, YDA)培养基^[12],玉米粉琼脂(Corn meal agar, CMA)培养基^[12],马丁氏(Thayer martin agar, TMA)培养基^[11],25%的甘油硝酸盐琼脂(25% Glycerol nitrate agar, G25N)培养基^[11],产果胶酶培养基^[13],产纤维素酶培养基^[14],产鞣质酶培养基^[15],酪蛋

白琼脂培养基^[10]。

1.2 主要试剂和仪器

2×TSINGKE Master Mix 和 DNA 凝胶回收试剂盒, 成都擎科梓熙生物技术有限公司; DL2000 DNA marker, 宝生物(TaKaRa)工程(大连)有限公司。洁净工作台, 苏净集团苏州安泰空气技术有限公司; 立式压力蒸汽灭菌器, 上海博讯实业有限公司; 光学显微镜, 上海普赫生物科技有限公司; MyCycler™ Thermal Cycler PCR 仪和 GelDoc XR⁺凝胶成像分析仪, Bio-Rad 公司。

1.3 方法

1.3.1 病原菌分离纯化

挑选贮藏过程中具有典型软腐症状的余甘子果实作为供试病果, 参照方中达^[16]的方法并稍加改进, 病果表面用水清洗, 然后用 75%酒精浸泡 5 min, 再用 1% NaClO 溶液浸泡 10 min, 最后用无菌水清洗 3–5 次。将经表面消毒的发病果实, 沿着与病害相邻的病健交界处切取约 1 cm×1 cm 的组织块若干, 然后移至含有 0.1%乳酸的 PSA 平板上, 25 °C 培养 2–3 d 后, 用接种环挑取菌落边缘的菌丝接入 PSA 培养基上, 产孢后采用梯度稀释法纯化 3 次后转接于 PSA 斜面, 4 °C 生化培养箱保存备用。

1.3.2 病原菌的致病性测定

遵循柯赫法则, 并参照陈南泉等^[17]的方法, 对分离菌株进行致病性测定。采用损伤接种(针刺)法: 选取健康无病斑、大小一致的果实, 经 75%酒精表面消毒、无菌水冲洗 3 次并晾干, 用接种针在果实赤道部位均匀刺入深约 5 mm 三个孔。将待测菌株菌丝块接种于伤口处, 置于无菌塑封袋 25 °C 恒温贮藏, 逐日观察并记录果实发病情况, 每株菌接种 5 个果实, 重复 3 次。对回接后具有明显症状的病果再次分离、纯化, 观察再分离菌株与接种菌株的差异性。

1.3.3 病原菌的形态观察与初步鉴定

将纯化的致病菌采用 PSA 平板培养, 观察菌落形态, 采用插片法培养对其分生孢子梗形状、

大小等进行观察测量^[9]; 并采用美蓝染色法在光学显微镜下观察菌落产生分生孢子及分生孢子梗的形状、大小等性状^[18], 根据相关特征结合参考文献[11]对其进行种属初步鉴定。

1.3.4 病原菌 rDNA-ITS 序列扩增和鉴定

采用 CTAB 法提取菌株基因组 DNA, 用菌种鉴定通用引物 ITS-1 (5'-TCCGTAGGTGAACTGCG G-3')和 ITS-4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')进行 rDNA-ITS 序列扩增。PCR 反应体系: T5 Mix 25 μL; 上、下游引物(10 μmol/L)各 1 μL; 模板 DNA (100 μg/mL) 1 μL; ddH₂O 22 μL。PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 98 °C 10 s, 55 °C 15 s, 72 °C 10 s, 30 个循环; 72 °C 5 min; 4 °C。PCR 产物用 1%琼脂糖电泳检测。PCR 产物送往成都擎科梓熙生物技术有限公司进行测序。将获得的 rDNA-ITS 序列提交到 GenBank 数据库, 运用 BLAST 进行同源性比较, MEGA 5.10 软件构建系统发育树。

1.3.5 病原菌的生物学特性测定

(1) 培养基对菌丝生长、产孢量的影响: 将纯化的病原菌均匀涂布于 PSA 培养基上, 25 °C 培养 1–2 d, 用打孔器在生长趋势一致的菌落上打取直径 8 mm 的菌丝块, 分别移植于 PDA、PSA、CA、CYA、CMA、OA、YDA、G25N、SAA、TMA 等 10 种培养基平板中央^[19], 25 °C 条件下培养, 各处理 3 次平行, 7 d 后用十字交叉法测定菌落直径, 并取菌丝块溶于 10 mL 的 0.1% CMC-Na 溶液中, 血球计数法测定产孢量^[10]。

(2) 碳、氮源对菌丝生长、产孢量的影响: 以 PDA 作为基础培养基, 用蔗糖、果糖、乳糖、麦芽糖、木糖、可溶性淀粉、木薯淀粉替换该培养基中的基础碳源(葡萄糖), 制成 8 个不同的碳源配方; 在 PDA 的基础上, 分别加 0.2%的尿素、氯化铵、硫酸铵、硝酸钾、硝酸钠、酵母膏、牛肉膏、蛋白胨、甘氨酸, 制成 9 个不同的氮源平板^[20]。将(1)制备的菌丝块接于供试平板中央, 25 °C 条件下培养 7 d, 测定菌落直径和产孢量, 各处理 3 次平行。

(3) 温度对菌丝生长、产孢量的影响: 将菌丝

块移植到 PSA 平板中央, 分别置于 15、20、25、30、35 °C 恒温培养箱中培养 7 d, 测定菌落直径和产孢量, 各处理 3 次平行^[21]。

(4) pH 对菌丝生长、产孢量的影响: 用 1 mol/L HCl 或 NaOH 溶液将 PSA 培养基的 pH 分别调至 1.0–10.0, 将(1)制备的菌丝块移植到 PSA 平板中央, 25 °C 条件下培养 7 d, 测定菌落直径和产孢量, 各处理 3 次平行^[21]。

(5) 光照对菌丝生长、产孢量的影响: 将菌丝块移植到 PSA 平板中央, 分别连续光照、12 h 光照与黑暗交替、完全黑暗 3 种光照条件下培养, 光源为 4 W 普通日光灯, 距离 15 cm, 25 °C 培养 7 d, 测定菌落直径和产孢量, 各处理 3 次平行^[21]。

(6) 病原菌产细胞壁水解酶的测定: 挑取病原菌点接于产纤维素酶培养基、产果胶酶培养基、产鞣质酶培养基、酪蛋白琼脂培养基平板中央, 25 °C 条件下分别培养 12、6、7、10 d 后, 观察后三者的培养基上菌落周围是否有水解圈生成^[13,15]。将 1 mg/mL 刚果红溶液倒入产纤维素酶培养基中染色 10 min, 倒掉刚果红溶液, 再向平板中加入 1 mol/L NaCl 溶液浸泡 15 min, 观察平板上菌落周围有无水解圈^[22-23]。

1.4 数据统计分析

利用 Excel 2010 和 SPSS 19.0 软件进行统计分析, 并采用 Duncan 氏新复极差法对结果进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 余甘子果实采后病害的症状与病原菌致病性

余甘子常温贮藏期间发生了典型霉变软腐病害症状, 10 d 后发病率达 35.7%。初期果食表面上出现黄褐色病斑, 逐渐扩散直至整个果面并伴随果皮破裂, 呈现明显褐色水渍状, 中期病果表面裂隙处呈现白色绒状菌丝, 果实表面逐渐形成黄色点状霉变, 后期逐渐生成灰蓝色分生孢子层, 果实组织软化明显, 轻压凹陷(图 1F)。

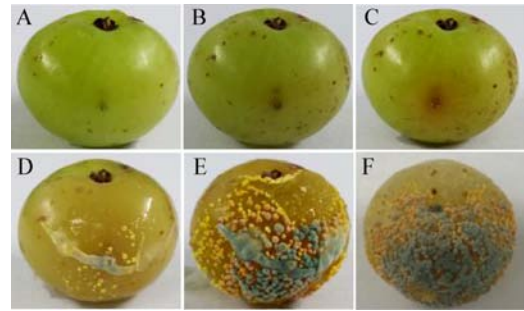


图 1 病原菌 DQ23 的致病性

Figure 1 Pathogenicity test of *Penicillium choerospondiatis* DQ23

注: A–E: 分别为接种 DQ23 果实 25 °C 贮藏的第 1–5 天发病症状; F: 果实贮藏第 7 天自然发病症状。

Note: A–E: Symptom of *Phyllanthus emblica* inoculated with *Penicillium choerospondiatis* DQ23, stored at 25 °C from 1th to 5th day; F: The natural symptoms of *Phyllanthus emblica* at the 7th postharvest day.

从典型发病病果组织共分离出 32 株丝状真菌, 初步形态观察发现所分离菌株主要为青霉(81.2%)、曲霉(9.3%)、镰刀菌(3.1%)、链格孢菌(6.2%), 按照科赫法则, 对其中 7 株形态差异明显的疑似病原真菌进行致病性测定, 结果表明贮藏 7 d 后, 接种菌株 DQ23 的余甘子鲜果发病明显, 接种其他菌株及对照组果实均未观察到明显病害。接种 DQ23 果实第 2 天后接种部位开始出现轻微的褐变(图 1B), 第 3 天浅褐色病斑明显扩大(图 1C), 第 4 天时果实表面开裂, 明显软烂, 轻压即出现凹陷, 同时果皮上出现少量黄色点状霉变症状(图 1D), 第 5 天时霉变面积扩大, 霉变层增厚, 接种位置附近产生明显的点状灰蓝色孢子层堆积, 并逐渐形成片状霉变(图 1E), 与自然发病第 7 天的余甘子果实症状相符(图 1F)。从接种病果再次分离、纯化获得菌株的菌落形态与从自然发病的余甘子果实分离、纯化得到的 DQ23 菌株相同, 因此 DQ23 菌株对机械损伤余甘子果实具有很强侵染能力, 是引起余甘子果实软腐症状的主要病原菌。

2.2 病原菌的形态学特征

DQ23 菌株在 PDA 培养基上生长 5 d 后, 菌落近圆形, 边缘不整齐, 质地绒状, 分生孢子面灰蓝色, 边缘浅黄色(图 2A), 菌落背面橙黄色(图 2B)。

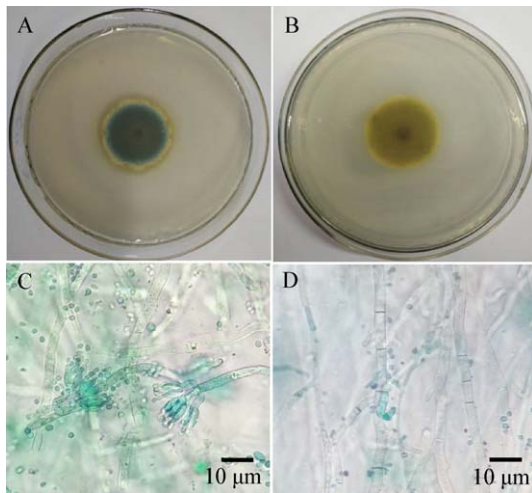


图 2 病原菌 DQ23 的形态特征

Figure 2 Symptoms of *Penicillium choerospondiatis* DQ23

注: A: 菌落正面(PDA 培养基); B: 菌落背面(PDA 培养基); C: 分生孢子、分生孢子梗形态; D: 菌丝形态.

Note: A: Colony morphology on the PDA plate at the positive side; B: Colony morphology on the PDA plate at the contrary side; C: The conidium and conidiophore; D: Hyphae form.

孢梗茎壁光滑, 帚状枝多为双轮生, 梗基 3-5 个, 瓶梗 3-5 个, 分生孢子呈不分支链状, 孢子球形至椭圆形(图 2C), 菌丝有隔膜(图 2D)。依据上述形态特征和《中国真菌志》第三十五卷^[11]描述, 将 DQ23 初步鉴定为青霉属(*Penicillium*)真菌。

2.3 病原菌的 rDNA-ITS 序列鉴定

测序结果显示, 菌株 DQ23 的 rDNA-ITS 片段长度为 581 bp (GenBank 登录号 MH236176), 通过 NCBI 上的 BLAST 分析, 与 *Penicillium choerospondiatis* HMAS 248813 (GenBank 登录号 KX885063)、*P. sanshaense* HMAS 248820 (GenBank 登录号 KX885070) 和 *P. herquei* CBS 336.48 (GenBank 登录号 JN617702) 的相似性均在 99% 以上。选取相似度较高不同种的模式菌株 ITS 序列, 用 MEGA 5.0 软件的邻接(Neighbor-Joining)法构建系统发育树(图 3)。结果显示, 菌株 DQ23 与 *Penicillium choerospondiatis* HMAS 248813 聚在同一分支。结合形态学特征和 ITS 序列分析, 将菌株 DQ23 鉴定为 *Penicillium choerospondiatis*。

2.4 病原菌的生物学特征

2.4.1 培养基对菌丝生长、产孢量的影响

由表 1 可以看出, DQ23 菌株在不同培养基上生长速率、产孢量存在着显著差异。DQ23 菌株在供试的 10 种培养基上均能生长, 其中在 YDA、CYA、PDA、PSA 培养基上生长速度较快, 7 d 时菌落平均直径分别为 9.00、8.42、7.68、6.99 cm, 在 CA、SAA、G25N 培养基上局限生长, 速度缓慢,

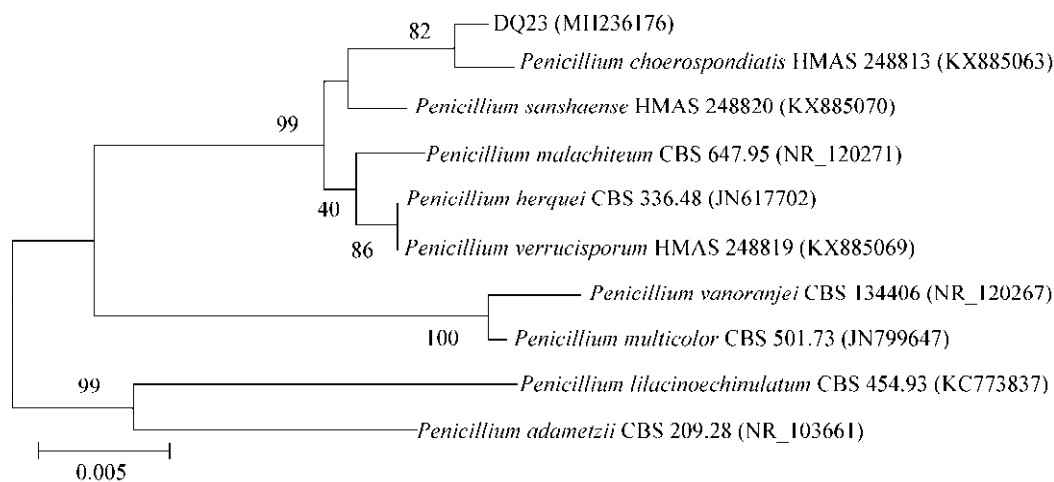


图 3 基于 rDNA-ITS 序列的病原菌 DQ23 系统发育树

Figure 3 Phylogenetic tree of *Penicillium choerospondiatis* DQ23 based on rDNA-ITS gene sequences

注: 分支处数值表示 Bootstrap 值; 括号内数字表示序列 GenBank 登录号; 标尺为进化距离.

Note: Numbers at branch nodes present bootstrap value; The GenBank accession number of aligned sequences are shown in the brackets; Bar: Nucleotide divergence.

表 1 培养基对菌丝生长、产孢量的影响

Table 1 Effect of medium on mycelium growth and conidia production

培养基 Medium	菌落直径 Colony diameter (cm)	产孢量 Conidia production ($\times 10^7$ 个/cm ²)
查氏培养基 CA	1.31±0.06g	0.21±0.37d
玉米粉琼脂培养基 CMA	5.38±0.31e	0.55±0.39d
马铃薯蔗糖琼脂培养基 PSA	6.99±0.42d	7.43±0.97a
马丁氏培养基 TMA	3.49±0.10f	2.02±0.49c
马铃薯葡萄糖琼脂培养基 PDA	7.68±0.38c	6.05±0.64b
淀粉铵盐培养基 SAA	1.38±0.29g	0.00±0.00d
5%的甘油硝酸盐琼脂培养基 G25N	1.60±0.20g	0.65±0.34d
查氏酵母膏琼脂培养基 CYA	8.42±0.11b	2.55±0.32c
酵母膏葡萄糖琼脂培养基 YDA	9.00±0.00a	2.76±0.48c
燕麦琼脂培养基 OA	5.16±0.22e	1.38±0.80d

注: 表中同列数据后不同小写字母表示在 $P<0.05$ 水平差异显著.

Note: Different lowercase letters in the same column indicate significant differences at $P<0.05$ level.

7 d 时菌落平均直径分别仅为 1.31、1.38、1.60 cm。DQ23 菌株在 PSA、PDA 培养基上产孢量最大, 平均产孢量分别为 7.43×10^7 、 6.05×10^7 个/cm², 在 SAS 琼脂培养基上不产生孢子, 在其他 7 种培养基上产孢量均较少。结果表明, PSA、PDA 有利于菌株 DQ23 菌丝生长和产孢。

2.4.2 碳、氮源对菌丝生长、产孢量的影响

由表 2、3 可见, 不同碳氮源对菌丝生长、产孢量的影响显著。碳源为麦芽糖、果糖、蔗糖、葡萄

糖时菌丝生长迅速, 菌落直径依次为 8.12、8.15、7.93、8.21 cm, 而木糖、乳糖、木薯淀粉、可溶性淀粉作为碳源时菌丝生长缓慢, 菌落直径明显小于其他碳源。乳糖、木薯淀粉、可溶性淀粉的产孢量也极少, 几乎不产孢, 最利于 DQ23 菌株生长的碳源为蔗糖、葡萄糖。与基础培养基 PDA 相比, 供试的 9 种氮源中除了尿素, 其余均有利于 DQ23 菌株生长、产孢, 且加入氮源的培养基背面产生数个同心圆, 颜色较深, 尿素明显抑制了菌丝生长。

表 2 碳源对菌丝生长、产孢量的影响

Table 2 Effect of carbon source on mycelium growth and conidia production

碳源 Carbon source	菌落直径 Colony diameter (cm)	产孢量 Conidia production ($\times 10^7$ 个/cm ²)
麦芽糖 Maltose	8.12±0.13a	4.48±0.48bc
木糖 Xylose	5.72±0.20c	4.29±0.38c
果糖 Fructose	8.15±0.09a	4.86±0.22b
乳糖 Lactose	5.08±0.16d	0.70±0.29d
可溶性淀粉 Soluble starch	4.91±0.07e	0.30±0.13d
木薯淀粉 Soluble starch	4.92±0.10e	0.28±0.44d
蔗糖 Sucrose	7.93±0.10b	6.71±0.26a
葡萄糖 Glucose	8.21±0.05a	6.92±0.30a

注: 表中同列数据后不同小写字母表示在 $P<0.05$ 水平差异显著.

Note: Different lowercase letters in the same column indicate significant differences at $P<0.05$ level.

表3 氮源对菌丝生长、产孢量的影响

Table 3 Effect of nitrogen source on mycelium growth and conidia production

氮源 Nitrogen source	菌落直径 Colony diameter (cm)	产孢量 Conidia production ($\times 10^7$ 个/cm ²)
硝酸钾 Potassium nitrate	8.20±0.07d	4.90±0.28d
蛋白胨 Tryptone	8.53±0.05b	6.45±0.35bc
酵母膏 Yeast extract	8.52±0.05b	6.33±0.07bc
硫酸铵 Ammonium sulfate	8.50±0.07b	6.52±0.46b
硝酸钠 Sodium nitrate	8.33±0.08c	6.11±0.45bc
牛肉膏 Beef extract	8.33±0.11c	6.69±0.45b
甘氨酸 Glycine	8.54±0.12b	5.84±0.42c
氯化铵 Ammonium chloride	8.69±0.07a	7.60±0.26a
尿素 Urea	0.00±0.00e	0.00±0.00e

注：表中同列数据后不同小写字母表示在 $P < 0.05$ 水平差异显著。

Note: Different lowercase letters in the same column indicate significant differences at $P < 0.05$ level.

2.4.3 温度对菌丝生长、产孢量的影响

菌株 DQ23 在 15–30 °C 内均能生长(表 4), 最适生长温度为 25 °C, 菌落平均直径为 7.10 cm, 与其余处理水平间存在显著差异。15–25 °C 范围内, 随着温度的升高, 菌落生长也增快; 之后, 随着温度升高, 菌落生长受到抑制; 35 °C 时停止生长。在 15–25 °C 时, 产孢量随着温度的升高而增加, 当温度超过 25 °C 后, 产孢量开始减少, 最后菌株死亡, 停止产孢, DQ23 菌株产孢的最适温度为 25 °C, 平均产孢量为 8.28×10^7 个/cm²。结果表明, 温度对菌落生长、产孢量的影响显著。

表4 温度对菌丝生长、产孢量的影响

Table 4 Effect of temperature on mycelium growth and conidia production

温度 Temperature (°C)	菌落直径 Colony diameter (cm)	产孢量 Conidia production ($\times 10^7$ 个/cm ²)
15	3.09±0.16d	3.18±0.32c
20	4.46±0.09c	6.37±0.96b
25	7.10±0.12a	8.28±0.64a
30	5.54±0.28b	7.11±0.80ab
35	0.00±0.00e	0.00±0.00d

注：表中同列数据后不同小写字母表示在 $P < 0.05$ 水平差异显著。

Note: Different lowercase letters in the same column indicate significant differences at $P < 0.05$ level.

2.4.4 pH 对菌丝生长、产孢量的影响

由表 5 可知, 培养基 pH 对菌落生长、产孢量的影响较大。pH 1.0–10.0 范围内, DQ23 菌株皆能生长; 在 pH 1.0–3.0 范围内, 随着 pH 值的升高, 菌丝生长加快; 超过 pH 3.0 时, 随着 pH 值的升高, 菌丝生长缓慢, 即 pH 3.0 最适于菌丝生长, 菌落平均直径为 7.51 cm, 与其他处理间差异显著。在 pH 1.0 时, 该菌不产生孢子, pH 2.0–4.0 范围内, 随着 pH 值的升高, 产孢量增加, pH 5.0–10.0 范围

表5 pH 对菌丝生长、产孢量的影响

Table 5 Effect of pH on mycelium growth and conidia production

pH	菌落直径 Colony diameter (cm)	产孢量 Conidia production ($\times 10^7$ 个/cm ²)
1.0	2.40±0.12h	0.00±0.00h
2.0	5.62±0.11d	3.61±0.49g
3.0	7.51±0.32a	7.64±0.32de
4.0	6.84±0.39b	10.61±1.29a
5.0	6.47±0.08c	9.87±0.84ab
6.0	5.80±0.13d	8.92±0.00bc
7.0	5.67±0.31d	8.39±0.67cd
8.0	5.24±0.17e	6.90±0.92ef
9.0	4.88±0.08f	5.84±0.37f
10.0	3.39±0.11g	2.65±0.73g

注：表中同列数据后不同小写字母表示在 $P < 0.05$ 水平差异显著。

Note: Different lowercase letters in the same column indicate significant differences at $P < 0.05$ level.

内,随着 pH 值的升高,产孢量减少,pH 4.0 最适于 DQ23 菌株产孢,平均产孢量为 10.61×10^7 个/cm²。结果表明,DQ23 菌株耐酸性强,在酸性环境中生长优于中性或碱性环境中生长。

2.4.5 光照对菌丝生长、产孢量的影响

由表 6 可知,DQ23 菌株在完全黑暗条件下的菌落平均直径为 5.40 cm 与 12 h 交替光照、连续光照条件下的菌落平均直径依次为 7.50 cm、7.83 cm 存在显著差异,表明光照对菌丝生长有一定的促进作用;DQ23 菌株在完全黑暗、12 h 交替光照、连续光照条件下的平均产孢量依次为 4.30×10^7 、 6.37×10^7 、 7.85×10^7 个/cm²,随着光照时间的延长,产孢量逐渐增加,表明光照有利于 DQ23 菌株产孢。

2.4.6 病原菌产细胞壁水解酶初步分析

由图 4A 可知,DQ23 菌落周围产生黄色水解圈,直径为 3.60 cm,表明该菌具有产果胶酶能力。由图 4B 可以看出,产纤维素酶培养基上 DQ23 菌

落周围产生水解圈,直径为 5.36 cm,表明该菌具有较强的产纤维素酶能力。而平板初筛培养基、酪蛋白琼脂培养基未产生水解圈,即该菌不能分解鞣质与蛋白质。

3 讨论与结论

余甘子作为重要的药食同源原料,采后贮藏腐烂率高,严重影响余甘子的贮藏安全和深加工产品的品质。余甘子贮藏保鲜已成为余甘子加工产业的重要瓶颈。目前国内外关于余甘子采后贮藏过程中的致病微生物种类及其侵染机理的研究报道较少。本研究通过组织分离法获得了 23 株真菌,通过刺伤接种按照科赫法则测定了其中形态特征差异明显的 7 株真菌的致病性。结果表明,其中一株青霉 DQ23 对余甘子果实具有很强的侵染能力,导致果实出现典型的褐变软腐症状,其他菌株未见明显的致病作用。根据 rDNA-ITS 序列分析发现,致病菌 DQ23 与中国科学院微生物研究所庄文颖先生团队于 2017 年发表的分离自南酸枣(*Choerospon diasaxillaris*)果实上的青霉属新种 *P. choerospondiatis*^[24]相似性最高,且聚在系统发育树同一分支,同时其显微形态特征与该种基本一致,因此将 DQ23 初步鉴定为 *P. choerospondiatis*。该致病菌导致的余甘子果实软腐症状与已报道余甘子锈病、炭疽病、煤污病^[8]及黑汀病^[9]的症状及致病能力具有明显的差异,主要表现为组织褐变软腐,果皮破裂,出现黄色点状霉变,后期繁殖大量分生孢子而形成灰蓝色霉变;同时在有伤条件下对余甘子果实的侵染速度快、致病能力强,贮藏 5 d 后整个果实组织受侵染软烂霉变。因此,本研究是国内外首次关于 *P. choerospondiatis* 引起余甘子果实软腐病的报道。

青霉属真菌是柑橘、苹果等水果采后贮藏期常见的致病菌^[25-26],对产品贮藏和食用安全性危害巨大。病原菌的生物学特性是进行病害控制的基础,青霉属真菌种类多,不同青霉具有生物学特性。本研究表明,致病菌 DQ23 在查氏培养基上局限生

表 6 光照对菌丝生长、产孢量的影响

Table 6 Effect of light condition on mycelium growth and conidia production

光照 Light condition (h/d)	菌落直径 Colony diameter (cm)	产孢量 Conidia production ($\times 10^7$ 个/cm ²)
0	5.40±0.43b	4.30±0.68b
12	7.50±0.18a	6.37±0.91ab
24	7.83±0.11a	7.85±0.49a

注:表中同列数据后不同小写字母表示在 $P < 0.05$ 水平差异显著。

Note: Different lowercase letters in the same column indicate significant differences at $P < 0.05$ level.

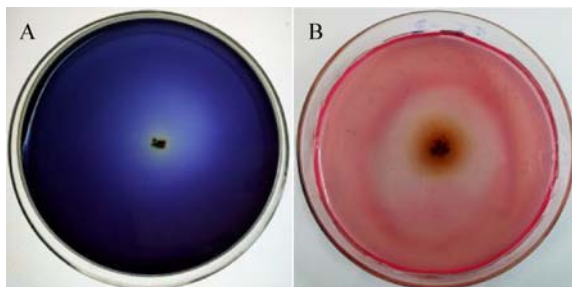


图 4 病原菌产果胶酶(A)和纤维素酶(B)能力
Figure 4 The pectinase (A) and cellulase (B) production capacity of *Penicillium choerospondiatis* DQ23

长, 与该种的模式菌株结果一致^[24], 尿素抑制其菌丝生长, 25 °C 最适合菌丝生长, 与常温贮藏发病腐烂率高的环境条件一致。此外, 该菌能够耐受较低的 pH, 属于耐酸菌, 最适生长 pH 3.0, 与余甘子果实有机酸含量高、酸性较强^[27] (pH 约 3.0) 的营养环境也高度一致。

细胞壁降解酶是很多植物病原真菌的重要致病因子^[28-29], 通过酶解果胶、纤维素等植物多糖成分来破坏分解寄主细胞壁和组织, 以提供病原菌自身营养并促进其对寄主组织的侵入和扩展, 同时导致植物果实组织软化等腐败现象。本研究通过平板显色法初步研究发现病原菌 DQ23 具有较强的果胶酶和纤维素酶活性, 因此推测病原菌分泌的两种细胞壁水解酶可能是其重要的胞外致病致腐因子。该致病菌分泌果胶酶和纤维素酶组成种类及其在不同贮藏条件下的活性变化规律有待进一步研究。

余甘子作为药食两用的水果而深受人们青睐, 但其贮藏过程中的真菌病害侵染致腐尚未引起足够的重视, 相关研究基础资料较为缺乏。我国余甘子贮藏条件简陋, 方法简单, 贮藏中腐败损失严重。本研究结果为余甘子贮藏安全控制提供了理论依据, 后续还需要进一步深入研究该病原菌侵染机理, 并寻找切实有效的防控措施, 以降低该病害导致的经济损失。

REFERENCES

- [1] Zhang FP. Nutritional value of *Phyllanthus emblica*[J]. Food and Nutrition in China, 2014(1): 25 (in Chinese)
张福平. 余甘子的营养价值[J]. 中国食物与营养, 2014(1): 25
- [2] Sarin B, Verma N, Martín JP. An overview of important ethnomedicinal herbs of *Phyllanthus* species: present status and future prospects[J]. Scientific World Journal, 2014: 839172
- [3] Liu YZ, Li HX, Xu LJ, et al. Modern research overview and application prospect analysis on *Phyllanthus emblica* both as diet and medicine[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2013, 44(12): 1700-1706 (in Chinese)
刘延泽, 李海霞, 许利嘉, 等. 药食兼用余甘子的现代研究概述及应用前景分析[J]. 中草药, 2013, 44(12): 1700-1706
- [4] Ngamkitidechakul C, Jaijoo K, Hansakul P, et al. Antitumour effects of *Phyllanthus emblica* L.: induction of cancer cell apoptosis and inhibition of *in vivo* tumour promotion and *in vitro* invasion of human cancer cells[J]. Phytotherapy Research, 2010, 24(9): 1405-1413
- [5] Chaittianan R, Sripanidkulchai B. Development of a nanoemulsion of *Phyllanthus emblica* L. branch extract[J]. Drug Development and Industrial Pharmacy, 2014, 40(12): 1597-1606
- [6] Zhang FP, Wang HM, Zheng DX, et al. Effects of storage temperature on sensory and nutritional quality of *Phyllanthus emblica* fruit during storage[J]. Journal of Southern Agriculture, 2014, 45(7): 1248-1252 (in Chinese)
张福平, 王慧敏, 郑道序, 等. 温度对余甘子采后贮藏期间感官及营养品质的影响[J]. 南方农业学报, 2014, 45(7): 1248-1252
- [7] Gupta VK, Mukherjee D. The influence of wax emulsion, morphactin and gibberellic acid on the storage behaviour of Indian gooseberry fruits[J]. Scientia Horticulturae, 1982, 16(2): 155-162
- [8] Yang ZX, Duan YT, Jin J, et al. A preliminary report on diseases and pests on *Phyllanthus emblica* in Yunnan[J]. Plant Protection, 2012, 38(6): 140-143 (in Chinese)
杨子祥, 段曰汤, 金杰, 等. 云南余甘子病虫害调查初报[J]. 植物保护, 2012, 38(6): 140-143
- [9] Zheng Y, Jiang SJ, Deng JM. Isolation and identification of pathogen causing black spot of *Phyllanthus emblica* L. fruit in post-harvest period[J]. Journal of Henan Agricultural Sciences, 2014, 43(3): 89-92 (in Chinese)
郑毅, 姜少娟, 邓建梅. 余甘果采后黑斑病病原的分离与鉴定[J]. 河南农业科学, 2014, 43(3): 89-92
- [10] Li PL, He ZF. Experiments Theories and Techniques in Food Microbiology[M]. 2nd ed. Beijing: China Agriculture Press, 2005: 32-34, 222-234 (in Chinese)
李平兰, 贺稚非. 食品微生物学实验原理与技术[M]. 2 版. 北京: 中国农业出版社, 2005: 32-34, 222-234
- [11] Kong HZ. Flora Fungorum Sinicorum, 35th Volume, *Penicillium* et Teleomorphi Cognati[M]. Beijing: Science Press, 2007: 31-35 (in Chinese)
孔华忠. 中国真菌志 第三十五卷 青霉菌属及其相关有性型属[M]. 北京: 科学出版社, 2007: 31-35
- [12] Cheng LJ, Xue QH, Lai HX. Laboratory Manual of Microbiology[M]. Xi'an: World Book Inc., 2000: 383-385 (in Chinese)
程丽娟, 薛泉宏, 来航线. 微生物学实验技术[M]. 西安: 世界图书出版公司, 2000: 383-385
- [13] Lan LJ, Zhou Q, Cai QM, et al. Screening and identification of a high-yield pectinase *Penicillium* strain[J]. Journal of Zhejiang Normal University (Natural Sciences), 2011, 34(4): 452-456 (in Chinese)
蓝丽精, 周琴, 蔡琪敏, 等. 一株高产果胶酶青霉菌株的筛选鉴定[J]. 浙江师范大学学报: 自然科学版, 2011, 34(4): 452-456
- [14] Li YB, Bao JL, Wan M, et al. Study on screening of high-yield cellulase strains in the fermented grains and its enzymatic properties[J]. Science and Technology of Food Industry, 2017, 38(24): 109-113, 119 (in Chinese)
李永博, 暴金磊, 万敏, 等. 酒醅中高产纤维素酶菌株的筛选

- 及其酶学性质[J]. 食品工业科技, 2017, 38(24): 109-113,119
- [15] Min FQ, Wang CZ, Ye JZ, et al. Screening of tannic acid degrading strain and optimization of its fermentation conditions[J]. Chemistry and Industry of Forest Products, 2014, 34(5): 84-90 (in Chinese)
闵凡芹, 王成章, 叶建中, 等. 没食子单宁降解菌株的筛选及发酵条件优化[J]. 林产化学与工业, 2014, 34(5): 84-90
- [16] Fang ZD. Research Method of Plant Disease[M]. 3rd ed. Beijing: China Agriculture Press, 1998: 122-124 (in Chinese)
方中达. 植物研究方法[M]. 3 版. 北京: 中国农业出版社, 1998: 122-124
- [17] Chen NQ, Chen YH, Lin HT, et al. Isolation and identification of the pathogen causing fruit rot in harvested Chinese olives[J]. Modern Food Science and Technology, 2016, 32(10): 138-142 (in Chinese)
陈南泉, 陈艺晖, 林河通, 等. 采后橄榄果实果腐病菌的分离与鉴定[J]. 现代食品科技, 2016, 32(10): 138-142
- [18] Wang XY. The several methods of observing microbial morphology[J]. Microbiology China, 1981, 8(4): 193-194 (in Chinese)
王秀云. 观察微生物形态的几种方法[J]. 微生物学通报, 1981, 8(4): 193-194
- [19] Lu NH, Xu RF, Wu LM, et al. The condition for sporulation of *Helminthosporium carposaprum*[J]. Microbiology China, 2005, 32(5): 77-81 (in Chinese)
陆宁海, 徐瑞富, 吴利民, 等. 长蠕孢菌产孢条件的研究[J]. 微生物学通报, 2005, 32(5): 77-81
- [20] Xu HJ, Tang SS, Zhou RJ, et al. Occurrence of sclerotinia rot of *Pulsatilla koreana* and biological characteristics of *Sclerotinia nivalis*[J]. Journal of Plant Protection, 2017, 44(2): 232-239 (in Chinese)
徐海娇, 唐珊珊, 周如军, 等. 白头翁菌核病发生危害调查及其病原菌生物学特性[J]. 植物保护学报, 2017, 44(2): 232-239
- [21] Li Z, Zeng GP, Zou X, et al. Biological characteristics of *Paecilomyces cicadae* LB strain[J]. Microbiology China, 2009, 36(11): 1670-1675 (in Chinese)
李忠, 曾桂萍, 邹晓, 等. 蝉拟青霉 LB 菌株的生物学特性[J]. 微生物学通报, 2009, 36(11): 1670-1675
- [22] Liu J, Li XZ, Gao PJ. Methods for determination of cellulase activity[J]. Industrial Microbiology, 1994, 24(4): 27-32 (in Chinese)
刘洁, 李宪臻, 高培基. 纤维素酶活力测定方法评述[J]. 工业微生物, 1994, 24(4): 27-32
- [23] Mu CL, Wu XS, Li SN, et al. Screening and identification of a cold-adapted cellulase-producing strains and characterization of cellulase[J]. Microbiology China, 2013, 40(7): 1193-1201 (in Chinese)
穆春雷, 武晓森, 李术娜, 等. 低温产纤维素酶菌株的筛选、鉴定及纤维素酶学性质[J]. 微生物学通报, 2013, 40(7): 1193-1201
- [24] Wang XC, Chen K, Zeng ZQ, et al. Phylogeny and morphological analyses of *Penicillium* section *Sclerotiora* (fungi) lead to the discovery of five new species[J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 8233
- [25] Azam M, Shahid AA, Majeed RA, et al. First report of *Penicillium biourgeianum* causing post-harvest fruit rot of apple in Pakistan[J]. Plant Disease, 2016, 100(8): 1778
- [26] Sonkar RK, Sarnaik DA, Dikshit SN, et al. Post-harvest management of citrus fruits: a review[J]. Journal of Food Science and Technology-Mysore, 2008, 45(3): 199-208
- [27] Chen P. The study on changes of polyphenols and carbohydrates contents of *Phyllanthus emblica* in browning[D]. Kunming: Master's Thesis of Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, 2017: 1-57 (in Chinese)
陈平. 余甘子褐变过程中多酚类与糖类化合物含量变化相关研究[D]. 昆明: 云南中医学院硕士学位论文, 2017: 1-57
- [28] Mäkelä MR, Donofrio N, De Vries RP. Plant biomass degradation by fungi[J]. Fungal Genetics and Biology, 2014, 72: 2-9
- [29] Zhao L, Zhang TY. Production and roles of the degrading enzymes produced by phytopathogen[J]. Microbiology China, 2002, 29(1): 89-93 (in Chinese)
赵蕾, 张天宇. 植物病原菌产生的降解酶及其作用[J]. 微生物学通报, 2002, 29(1): 89-93