

杨桃病原真菌分离鉴定及代谢产物研究

徐 湘, 林子怡, 卫 蔚, 林 洁

Isolation and Identification of Pathogenic Fungi of Carambola Fruit and Study on Their Metabolites

XU Xiang, LIN Ziyi, WEI Wei, and LIN Jie

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023060147>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

川秋葵1号采后菌核病病原菌鉴定及其生物学特性研究

Research on pathogen identification and biological characteristics of sclerotinia from Sichuan okra

食品工业科技. 2017(12): 186-190 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2017.12.034>

甜樱桃采后腐烂病原菌的分离与鉴定

Isolation and Identification of Postharvest Pathogens of Sweet Cherry

食品工业科技. 2019, 40(2): 160-164 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2019.02.028>

野生牛肝菌内生真菌分离鉴定及其生物学特性

Isolation, Identification and Biological Characteristics of Endophytic Fungi from Wild Boletus

食品工业科技. 2021, 42(21): 118-124 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021010061>

阿克苏红富士苹果采后腐烂病原真菌的分离与鉴定

Isolation and identification of main pathogenic fungus from post-harvest Akesu Fuji apple fruits

食品工业科技. 2017(02): 205-209 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2017.02.031>

娃娃菜 (*Brassica campestris*) 软腐病病原菌的分离与鉴定

Isolation and Identification of Pathogenic Bacteria Causing Soft Rot of *Brassica campestris*

食品工业科技. 2021, 42(18): 106-111 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020120021>

采后番木瓜果实炭疽病病原菌分离鉴定及其拮抗菌的筛选

Isolation and Identification of Anthracnose Pathogen in Postharvest Papaya Fruits and Screening of the Antagonistic Bacteria

食品工业科技. 2020, 41(6): 111-118,130 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.06.019>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

徐湘, 林子怡, 卫蔚, 等. 杨桃病原真菌分离鉴定及代谢产物研究 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(11): 125–132. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023060147

XU Xiang, LIN Ziyi, WEI Wei, et al. Isolation and Identification of Pathogenic Fungi of Carambola Fruit and Study on Their Metabolites[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(11): 125–132. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023060147

· 生物工程 ·

杨桃病原真菌分离鉴定及代谢产物研究

徐 湘, 林子怡, 卫 蔚, 林 洁*

(江苏第二师范学院生命科学与化学化工学院, 江苏省生物功能分子重点实验室, 江苏南京 210013)

摘 要: 为了解杨桃病原真菌的种类、生物学特性和代谢产物类型, 本研究通过组织分离法对杨桃果实发病部位进行病原真菌分离, 通过形态学结合基于 ITS 序列分析的分子鉴定方法对真菌进行鉴定, 并对其生物学特性进行探究, 使用液相色谱分离纯化菌株代谢产物, 利用核磁共振谱确定代谢产物结构。结果表明: 4 株病原真菌分别是木贼镰刀菌 (*Fusarium equiseti*)、新拟盘多毛孢属 (*Neopestalotiopsis* sp.)、裂褶菌 (*Schizophyllum commune*) 和枝状枝孢菌 (*Cladosporium cladosporioides*)。这 4 株菌均可导致杨桃果实发病。进一步从木贼镰刀菌 *Fusarium equiseti* 发酵产物中分离得到 4 种化合物, 分别为交链孢酚、1,4,7-三羟基-3,9-二甲氧基-6H-苯并 [c] 色烯-6-酮、红粉苔酸和 7-羟基-4-甲基-1 (3H)-异苯并呋喃酮。生物学特性的研究结果表明, 4 株病原真菌的最适生长温度在 25~28 °C, 在 pH4~10 的范围内均能生长。

关键词: 杨桃, 病原真菌, 分离纯化, 种属鉴定, 致病性, 生物学特性

中图分类号: TS255.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2024)11-0125-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023060147



本文网刊:

Isolation and Identification of Pathogenic Fungi of Carambola Fruit and Study on Their Metabolites

XU Xiang, LIN Ziyi, WEI Wei, LIN Jie*

(College of Life Science and Chemistry, Jiangsu Second Normal University, Jiangsu Key Laboratory for Biofunctional Molecules, Nanjing 210013, China)

Abstract: In order to understand the types, biological characteristics, and metabolites types of pathogenic fungi in carambola, the typical diseased parts of carambola fruit were collected for fungal isolation by tissue isolation methods. The fungi were identified by morphological and molecular identification methods based on ITS sequencing analysis. The biological characteristics of pathogenic fungi were explored, and metabolites were isolated and purified using liquid chromatography. Their structures were established on the basis of ¹H NMR and ¹³C NMR. The results were as follows: The four strains were identified as *Fusarium equiseti*, *Neopestalotiopsis* sp., *Schizophyllum commune* and *Cladosporium cladosporioides*. All four strains could cause disease in carambola fruit. The fermentation products of *Fusarium equiseti* were chemically investigated, leading to the discovery of four compounds, 3,7,9-trihydroxy-1-methyl-6H-dibenzo[b,d]pyran-6-on, 1,4,7-trihydroxy-3,9-dimethoxy-6H-benzo[c]chromen-6-one, lecanoric acid and 7-hydroxy-4-methyl-1(3H)-isobenzofuranone. The results of biological characteristics indicated that the optimal growth temperature for the four pathogenic fungi was 25~28 °C, and they could all grow within the pH range of 4~10.

Key words: carambola; pathogenic fungi; separation and purification; species identification; pathogenicity; biological characteristics

收稿日期: 2023-06-15

基金项目: 国家自然科学基金 (31700009); 江苏省 333 工程; 江苏第二师范学院 (JSSNUJXGG2021YB15); 江苏省教育科学规划课题 (C/2022/01/09)。

作者简介: 徐湘 (1999-), 女, 本科, 研究方向: 微生物学, E-mail: 1395141340@qq.com。

* 通信作者: 林洁 (1984-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 微生物学, E-mail: linjie@jssnu.edu.cn。

杨桃(*Averrhoa carambola* L.) 在我国的种植历史已经超过 2000 年, 种植区域主要位于南部地区, 在广东种植最多^[1]。但是, 其果皮较薄, 极易在采摘和贮运过程中受到微生物的侵染, 导致腐烂加剧^[2-3]。引起水果采后病害的病原菌主要为真菌, 而其中常见病原真菌包括青霉属(*Penicillium* spp.)、灰葡萄属(*Botrytis cinerea*)、交链孢霉属(*Alternaria* spp.)、曲霉属曲霉(*Aspergillus* spp.) 和毛霉属(*Mucor* spp.)^[4]。研究还发现番茄采后病原真菌有致病疫霉菌(*Phytophthora infestans*) 和粉红聚端孢霉菌(*Trichothecium roseum*)^[5], 青皮核桃采后病原真菌包括隐秘刺盘孢(*Colletotrichum aenigma*)、暹罗炭疽菌(*Colletotrichum siamense*)、葡萄座腔菌(*Botryosphaeria dothidea*) 和藤仓镰刀菌(*Fusarium fujikuroi*)^[6], 桃果实采后病原菌主要为果生链核盘菌(*Monilinia fructicola*)^[7], 脐橙采后致病真菌有芽枝状枝孢(*Cladosporium cladosporioides*)^[8]。

而杨桃病害的研究多集中在田间发病症状, 已确定的杨桃病害有尾孢菌属(*Cercospora averrhoa*), 多主棒孢霉(*Corynespora cassiicola*), 拟茎点属(*Phomopsis* spp.), 盘长孢菌(*Gloeosporium* sp.), 叶点霉属(*Phyllosticta* sp.) 引起的叶斑病^[9-10]、由鲑色伏革菌(*Corticium salmonicolor*) 引起的粉霉病、由链格孢菌(*Alternaria alternata*) 引起的黑斑病, 由茎点菌属(*Phoma* sp.) 引起的黑点病, 由芽枝状枝孢(*Cladosporium cladosporioides*) 引起的黑霉病, 由细盾壳属(*Leptothyrium* sp.) 引起的霉烟病, 由多主枝孢霉(*Cladosporium herbarum*) 引起的果腐病, 由华丽腐霉菌(*Pythium* sp.) 引起的衰退病, 由尖孢镰孢菌(*Fusarium oxysporum*) 引起的枯萎病, 由假尾孢属(*Pseudocercospora* sp.) 引起的细菌性赤斑病^[11-13]。目前研究多集中在杨桃种植和采收过程, 而对采收后引起杨桃腐烂的病原菌报道较少, 仅少数研究者从采后杨桃中分离出西蒙氏炭疽菌(*Colletotrichum simmondsii*)、胶孢炭疽菌(*Colletotrichum gloeosporioides*) 和暹罗炭疽菌(*Colletotrichum siamense*)^[10,14-15]。因此, 本研究选取采后杨桃为研究材料, 通过组织分离、致病性验证、病原真菌的形态学结合分子生物学方法, 鉴定杨桃贮藏期病原真菌的种类, 系统地研究病原菌的生物学特性, 对病原菌发酵物进行化学研究, 为进一步研究杨桃病害的发生规律和综合防治措施的制定提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

健康杨桃(*Averrhoa carambola* L.) 果实 品种为“香蜜”, 于 2022 年 10 月购买自福建省漳州市云霄县下河乡杨桃种植基地; 50×TAE 电泳缓冲液、Loading buffer、ddH₂O 北京索莱宝生物科技有限公司; Lysis Buffer、DNA Marker(DL-2000)、Taq 酶 美谷生物科技有限公司; 琼脂糖 西格玛奥德里

奇(上海)贸易有限公司; 引物 ITS4 及 ITS5 南京金斯瑞生物科技有限公司; 核酸染料 生工生物工程(上海)股份有限公司; 乳酸石碳酸棉蓝染液(生物染色液试剂) 南京森贝伽生物科技有限公司。

BSA24S 分析天平 赛多利斯(上海)贸易有限公司; GZX-9240 MBE 电热鼓风干燥箱、SW-CJ-2FD 双人超净工作台、YXQ-LS-70A 全自动数显式压力蒸汽灭菌器 上海博迅公司; SHP-300 智能生化培养箱 常州普天仪器公司; BW2000 数码显微镜 南京江南永新光学有限公司; 2720 普通 PCR 仪 赛默飞生物有限公司; Agilent 1200 高效液相色谱仪(配有 Agilent ZorbaxSB-C₁₈ 色谱柱) 安捷伦科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 病原菌分离纯化 室温存放新鲜健康的杨桃至发病, 然后在病健交界处切取 5 mm×5 mm 的组织块用清水冲洗后, 将其置于体积分数 75% 的酒精溶液的培养皿中消毒 45 s, 再用无菌水冲洗 3 次后, 用质量分数 2% 次氯酸钠溶液浸泡 30 s, 继续用无菌水冲洗 3 次。灭菌过的滤纸片吸干水分。随后, 将处理好的材料放置在含抗生素的 PDA 培养基上倒置培养, 以最后一次漂洗液作为对照。在恒温培养箱培养 3~5 d(28 ℃), 待长出菌落后, 沿菌落边缘挑取少量菌丝在新的 PDA 培养基中分离培养, 重复以上步骤直至长出单一菌落^[16]。挑取已纯化的单菌落接种至斜面培养基, 于 4 ℃ 冰箱保存备用^[17]。

1.2.2 致病性鉴定 用体积分数 75% 的乙醇消毒健康、完整的杨桃表面; 配制质量分数 0.85% 生理盐水并灭菌, 灭菌的解剖针蘸取生理盐水并刺伤已消毒的杨桃, 作为对照; 用灭菌的解剖针挑取培养所得的菌株分别刺伤已消毒的实验杨桃, 每株菌设置三组平行实验; 用无菌自封袋装好并于 28 ℃ 恒温培养, 观察杨桃果实发病情况。从发病杨桃病害部位再次进行病原菌分离, 与接种物进行一致性比对, 完成科赫氏法则验证^[18]。

1.2.3 病原菌的形态学观察 在干净的载玻片中央滴加 1 滴乳酸石碳酸棉蓝染液, 用解剖针挑取少量菌丝于染液上, 分散菌丝, 轻轻盖上玻片, 吸去多余的染液, 置于显微镜下观察菌丝的形态、颜色等特征^[19]。

1.2.4 病原菌的分子生物学鉴定

1.2.4.1 ITS 区序列扩增和测序 作为 PCR 扩增模板的杨桃病原真菌的基因组 DNA 的提取采用 CTAB 法^[20]。采用真菌 ITS 序列的通用引物 ITS4(TCCTC CGCTTATTGATATGC) 和 ITS5(GGAAGTAAAA GTCGTAACAAGG) 对样品进行扩增。50 μL PCR 反应体系含 2×Master Mix 25 μL, 10 μmol/L 引物各 1 μL 和 DNA 模板 1 μL, 其余用经灭菌的双蒸水补足。PCR 扩增条件: 94 ℃ 预变性 3 min, 94 ℃ 变性 30 s, 55 ℃ 复性 30 s, 72 ℃ 延伸 45 s, 共 30 个循环,

72 ℃ 保温 5 min。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测后送南京思普金生物科技有限公司进行测序。

1.2.4.2 系统发育树构建 在 NCBI 数据库中进行 BLAST 序列相似性搜索, 下载相似性高的菌株的序列, 使用软件 MEGA 11.0.13 进行多序列对比, 聚类分析, 采用邻位相连算法(Neighbor-Joining), 通过自举分析(bootstrap)进行置信度检测, 自展次数为 1000, 构建系统发育树。

1.2.5 生物学特性分析

1.2.5.1 温度对病原菌菌落生长的影响 将分离纯化所得的 4 株真菌分别接种在 PDA 培养基的中心, 分别置于 4、10、15、20、25、28 和 30 ℃ 的恒温培养箱中, 黑暗条件下培养。5 d 后采用十字交叉法测量菌落直径并拍照记录菌落形态^[21]。

1.2.5.2 环境 pH 对病原菌菌落生长的影响 利用 HCl 和 NaOH 调节 PDA 培养基 pH 梯度为 4、5、6、7、8、9、10。将分离纯化得到的 4 株菌依次接种在 PDA 培养基的中央, 黑暗条件 25 ℃ 下培养。5 d 后采用十字交叉法测量菌落直径并拍照记录菌落形态^[22]。

1.2.6 杨桃病原菌发酵产物制备 配制液体种子培养基: 取 4.0 g 葡萄糖, 10.0 g 麦芽提取物, 4.0 g 酵母提取物, 溶于 1000 mL 蒸馏水中, 调节 pH 至 6.5; 配制大米固体培养基: 称取 80.0 g 大米于 500 mL 锥形瓶中, 倒入 120 mL 蒸馏水。从长满菌落的培养基表面切取 4 块 1 cm² 的小块, 将其放入含 50 mL 种子培养基的 250 mL 三角瓶中, 置于摇床培养(25 ℃, 转速为 180 r/min)3~5 d^[23]。将种子培养物转移至大米培养基中(每瓶转移 10 mL 液体种子培养液), 25 ℃ 下静置发酵 40 d。在固体培养基中倒入乙酸乙酯溶液, 浸泡 5 d, 过滤留溶液, 重复 4~5 次(至乙酸乙酯溶液无色), 合并滤液, 浓缩得浸膏并称重。

1.2.7 杨桃病原菌 A-Yt-1 代谢化合物的提取与分离

杨桃病原菌 A-Yt-1 的发酵浸膏重 3.78 g。减压硅胶柱用 GF₂₅₄ 装柱, 将发酵浸膏用 200~300 目硅胶拌样, 经石油醚/乙酸乙酯体系减压洗脱。洗脱液经 TLC 薄层层析和 HPLC 分析合并, 共得到 8 个馏分 FrA1~FrA8。馏分 FrA4(石油醚/乙酸乙酯=60:40, 102 mg)经过半制备液相色谱进一步分离, 分离柱选用 Agilent ZorbaxSB-C₁₈(5 μm, 9.4 mm×250 mm), 洗脱梯度为 20% 甲醇水等度洗脱 5 min, 30%~100% 甲醇水梯度洗脱 30 min, 流速 2 mL/min, 纯化得到

化合物 1(2.2 mg, t_R 17.10 min)、2(3.5 mg, t_R 18.30 min) 和 3(2.5 mg, t_R 21.10 min)。馏分 FrA3(石油醚/乙酸乙酯=40:60, 80 mg)经上述半制备液相色谱柱分离, 洗脱梯度为 20% 甲醇水等度洗脱 5 min, 30%~100% 甲醇水梯度洗脱 30 min, 流速 2 mL/min, 纯化得到化合物 4(4.5 mg, t_R 9.26 min)。

1.2.8 杨桃病原菌 A-Yt-1 代谢化合物的鉴定 通过高分辨质谱得到化合物的分子量信息, 进一步推测分子式。通过核磁共振谱得到化合物的¹H 谱和¹³C 谱信息, 进一步确定分子式。通过核磁共振谱图的解析, 结合文献分析, 最终确定化合物的结构。

1.3 数据处理

全部数据采用 Excel 2010 计算平均值和标准误差, 使用 Origin 2021 软件作图, 统计学差异分析采用 SPSS 19.0 软件进行 Duncan's multiple range test 显著性分析($P < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 病原菌的分离纯化

从发生腐烂的杨桃果实中分离、纯化, 最终得到 4 种菌落, 标记为 A-Yt-1、A-Yt-2、A-Yt-3、A-Yt-4(图 1), 在 PDA 培养基 25 ℃ 培养 5 d 后观察菌落形态、微观结构特征。显微镜观察结果表明, A-Yt-1 菌丝有隔分枝, 菌丝色浅, 少量菌丝较为粗壮, 分生孢子两端较尖, 细长如梭形, 有 2 个隔膜, 有球形厚垣孢子(图 2A)。A-Yt-2 菌丝有隔, 未见明显分枝, 菌丝无色, 分生孢子呈纺锤形, 5 个细胞, 中间 3 个细胞呈褐色且较为膨大, 前后两端的细胞为无色透明的圆锥形, 细胞间隔处的颜色较深, 顶端细胞具 2 根附属丝, 透明无色(图 2B)。A-Yt-3 菌丝有隔分枝, 菌丝

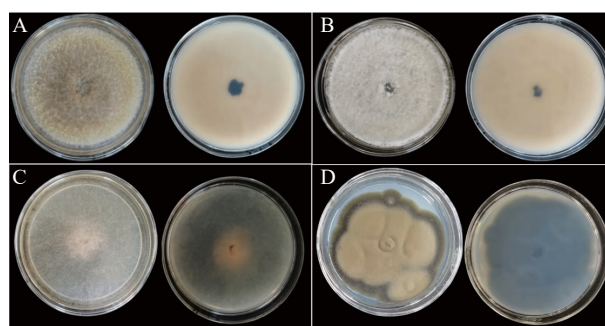


图 1 从患病组织中分离的 4 株菌的菌落形态

Fig.1 Colony morphology of 4 strains isolated from diseased tissue

注: A: A-Yt-1; B: A-Yt-2; C: A-Yt-3; D: A-Yt-4; 图 2 同。

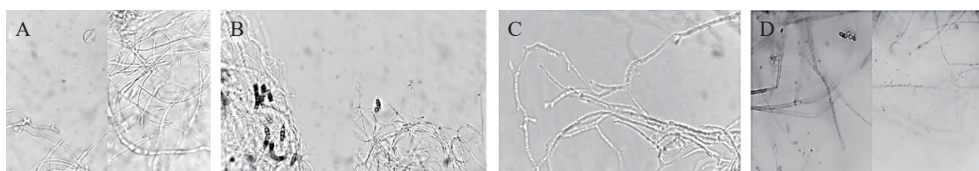


图 2 4 株菌的菌丝形态结构

Fig.2 Morphological structure of mycelium of 4 strains

较为透明,菌丝顶端分枝如树梢状,上面有球形的或者棍状的凸起,卵圆形的分生孢子附着在棍状的小凸起上(图2C)。A-Yt-4菌丝有隔且分散,菌丝暗色或无色,分生孢子梗细长,顶端具有分枝,无色、卵圆形的分生孢子成簇着生于菌丝上,聚集的分生孢子与菌丝之间有小柄相连(图2D)。

2.2 致病性鉴定

用解剖针分别挑取2.1中分离得到的4种菌株接种于杨桃上,杨桃均表现出一定程度的病害症状(图3B~3E),而对照组并未有病害(图3A)。接种A-Yt-1、A-Yt-2菌株的杨桃接种部位出现灰白色霉状物,周围出现红褐色病斑;接种A-Yt-3菌株的杨桃接种部位呈红褐色,果皮变软并有液体渗出,杨桃表面长出白色绒毛状菌丝;接种A-Yt-4菌株的杨桃接种部位呈黑色,病斑表面有墨绿色霉状物。从接种后发病的杨桃果实病害部位再次进行病原菌分离,分离物与接种物进行一致性比对,完成科赫氏法则验证。确认A-Yt-1、A-Yt-2、A-Yt-3和A-Yt-4为杨桃病原菌。

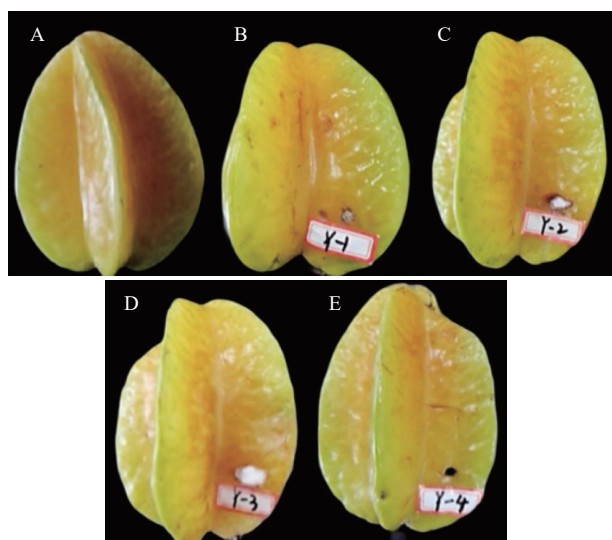


图3 4株菌的致病检测

Fig.3 Pathogenic determination of 4 strains

注: A: 空白对照; B: A-Yt-1; C: A-Yt-2; D: A-Yt-3; E: A-Yt-4。

2.3 病原菌分子生物学鉴定

PCR扩增得到的片段长度为500~750 bp(图4),符合测序要求。构建系统发育树(图5),根据病原菌株与已知菌株的亲缘关系确定其分类地位为: A-Yt-1属于镰刀菌属(*Fusarium* sp.)分支, A-Yt-2位于新拟盘多毛孢属(*Neopestalotiopsis* sp.)分支, A-Yt-3位于裂褶菌(*Schizophyllum commune*)分支, A-Yt-4位于枝孢属(*Cladosporium* sp.)分支。结合形态学鉴定和ITS序列特征,故最终将杨桃病原真菌鉴定为木贼镰刀菌(*Fusarium equiseti*)、新拟盘多毛孢属(*Neopestalotiopsis* sp.)、裂褶菌(*Schizophyllum commune*)和枝状枝孢菌(*Cladosporium cladosporioides*)。

2.4 生物学特性研究

2.4.1 温度对4株菌菌落生长的影响 温度是影响



图4 PCR扩增产物的琼脂糖凝胶电泳图

Fig.4 Agarose gel electropherogram of PCR amplicon products

病原真菌生长的重要环境因素之一。随着温度的增加,各菌株菌落直径呈现先增加后减小的趋势。在25℃时,木贼镰刀菌(*F. equiseti*)、裂褶菌(*S. commune*)和枝状枝孢菌(*C. cladosporioides*)生长速率最快,菌落直径分别达到65.83、28.03和44.87 mm,显著高于同组其余温度下的病原菌($P<0.05$,图6);而新拟盘多毛孢属(*Neopestalotiopsis* sp.)在28℃时生长速率最快,菌落直径达到46.23 mm。在4℃时,4株菌的菌落直径都在5.73 mm之内,菌丝生长迟缓甚至停止。新拟盘多毛孢属和裂褶菌在10~30℃内均可生长,其余2株真菌在4~30℃均可生长。4株病原真菌的最适生长温度在25~28℃之间。

2.4.2 环境pH对4株菌菌落生长的影响 黑暗条件25℃下培养,5 d后测量菌落直径,结果如图7所示,木贼镰刀菌(*F. equiseti*)在pH8时生长最快,菌落直径为72.53 mm,显著高于其他pH下的生长速率($P<0.05$);新拟盘多毛孢属(*Neopestalotiopsis* sp.)和裂褶菌(*S. commune*)的菌落直径均在pH6时达到最大,分别为41.80 mm和39.77 mm;枝状枝孢菌(*C. cladosporioides*)则在pH7时生长最快,菌落直径为36.17 mm。4株菌的生长速度在pH4时均受到较大抑制,除了木贼镰刀菌(*F. equiseti*)菌落直径为33.43 mm外,其余菌落直径都在10 mm之内。当pH10时,木贼镰刀菌(*F. equiseti*)和枝状枝孢菌(*C. cladosporioides*)的菌落直径为53.63 mm和28.83 mm,说明这2株菌可以耐受偏碱性条件。以上结果表明,木贼镰刀菌的最适pH为8~9,枝状枝孢菌的最适pH为7~8,其余2株真菌的最适pH为6~7,4株病原真菌在pH4~10内均能生长(图7)。

2.5 病原菌A-Yt-1次级代谢产物结构鉴定

从杨桃病原菌A-Yt-1木贼镰刀菌(*F. equiseti*)中分离得到4种次级代谢产物(图8)。根据高分辨

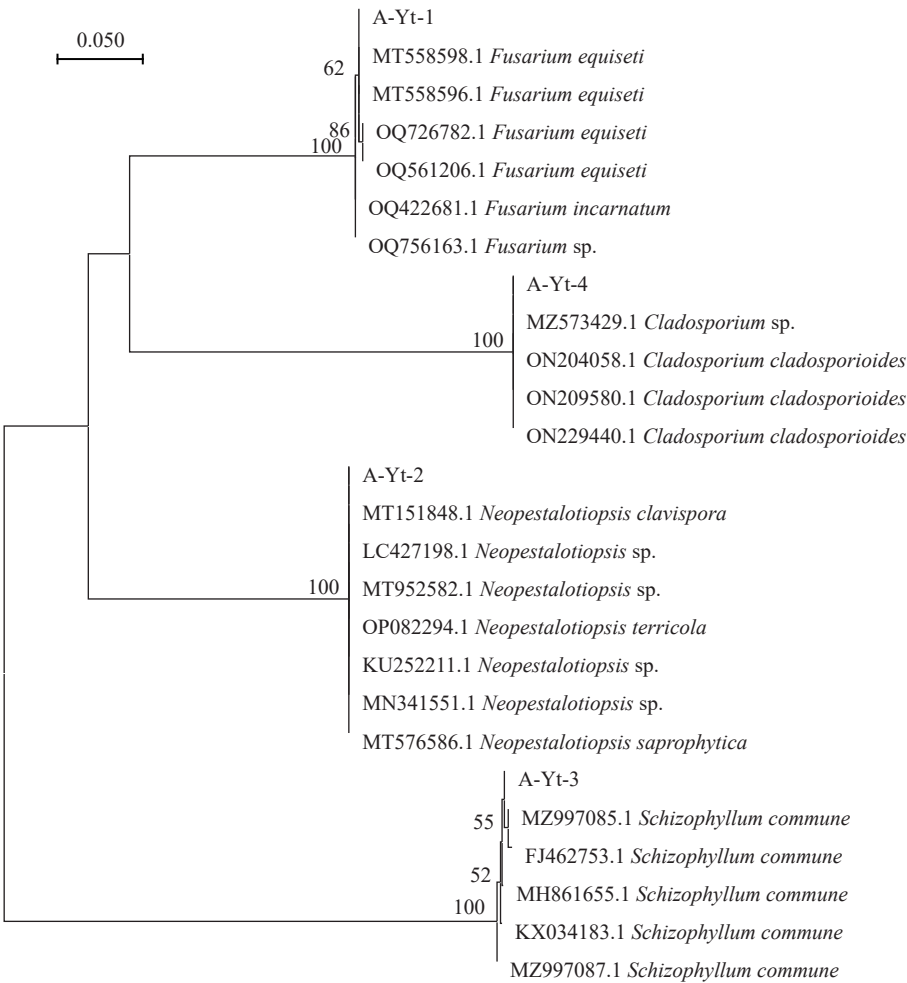


图 5 基于 ITS 序列的 4 个菌株系统发育树

Fig.5 Phylogenetic tree of 4 strains based on ITS region sequence

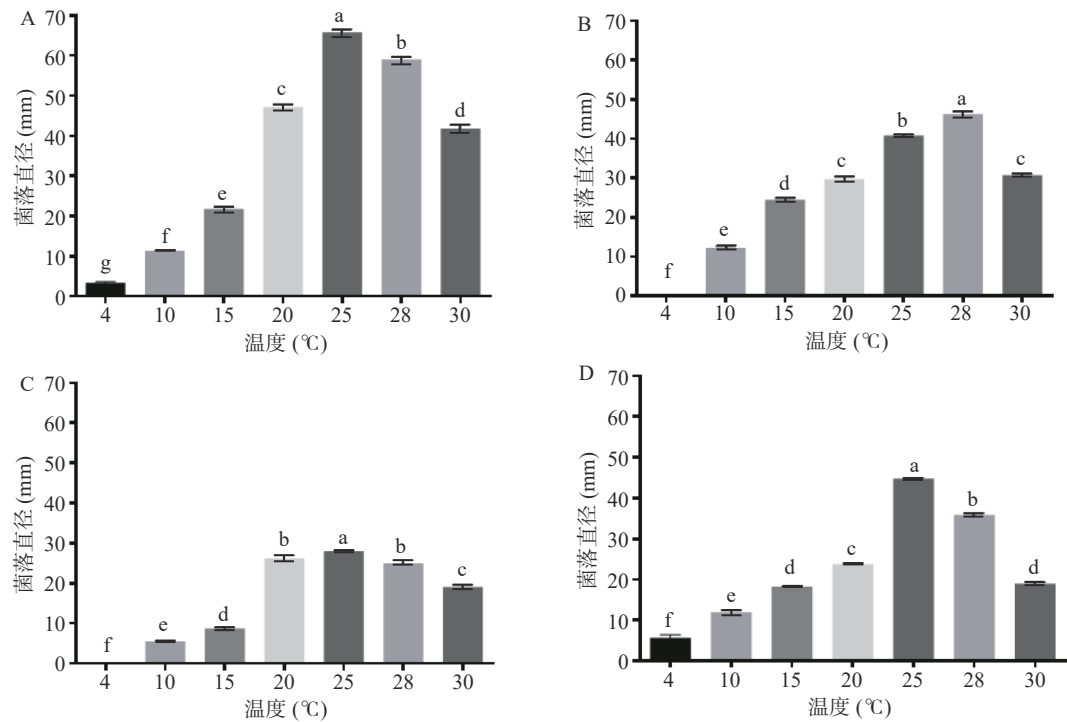


图 6 不同温度对 4 株病原真菌菌落生长的影响

Fig.6 Effects of different temperature on the colony growth of 4 pathogenic fungi

注: A.木贼镰刀菌 (*F. equiseti*); B.新拟盘多毛孢属 (*Neopestalotiopsis* sp.); C.裂褶菌 (*S. commune*); D.枝状枝孢菌 (*C. cladosporioides*); 误差线代表标准误; 不同字母表示差异显著($P<0.05$); 图 7 同。

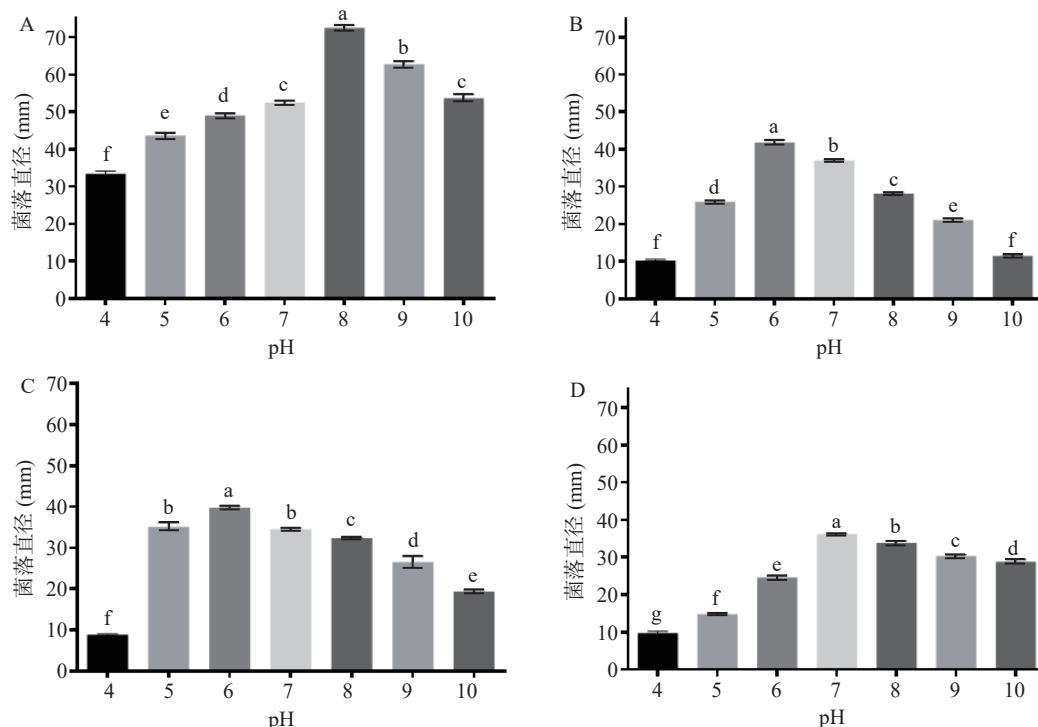
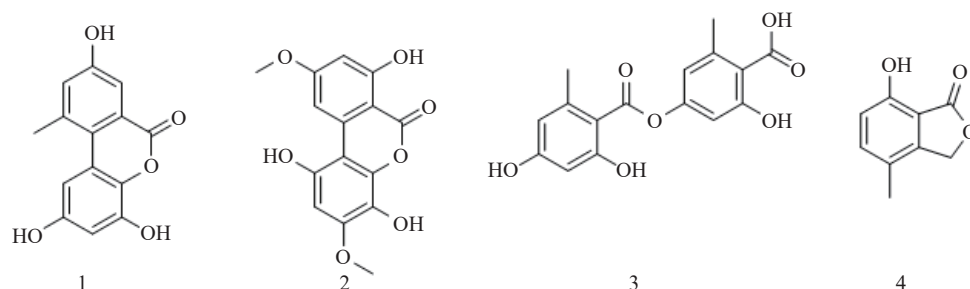


图7 不同 pH 对 4 株病原真菌菌落生长的影响

Fig.7 Effects of different pH on the colony growth of 4 pathogenic fungi

图8 木贼镰刀菌(*F. equiseti*)发酵液中分离得到 4 种次级代谢产物结构Fig.8 Structures of four secondary metabolites isolated from the fermentation broth of *F. equiseti*

质谱, 化合物 1 的分子式为 $C_{14}H_{10}O_5$, 核磁数据显示: 1H NMR(500 MHz, methanol- d_4) δ_H 7.28(d, $J=2.1$ Hz, 1H), 6.68(d, $J=2.7$ Hz, 1H), 6.59(d, $J=2.6$ Hz, 1H), 6.34(d, $J=2.0$ Hz, 1H), 2.76(s, 3H)。 ^{13}C NMR(150 MHz, methanol- d_4) δ_C 167.0, 166.9, 166.1, 159.8, 154.2, 140.0, 139.8, 118.3, 110.9, 105.5, 102.7, 101.9, 99.0, 25.8。参考文献数据^[24], 鉴定该化合物为交链孢酚(3,7,9-trihydroxy-1-methyl-6H-dibenzo[b,d]pyran-6-one); 根据高分辨质谱, 化合物 2 的分子式为 $C_{15}H_{12}O_7$, 核磁数据显示: 1H NMR(500 MHz, methanol- d_4) δ_H 8.10(d, $J=2.5$ Hz, 1H), 6.50(s, 1H), 6.46(d, $J=2.5$ Hz, 1H), 3.91(s, 3H), 3.90(s, 3H)。 ^{13}C NMR(125 MHz, methanol- d_4) δ_C 168.3, 167.2, 165.3, 150.9, 146.5, 145.9, 138.7, 131.9, 105.0, 102.0, 100.2, 99.4, 92.8, 56.7, 56.1。参考文献数据^[25], 鉴定该化合物为 1,4,7-三羟基-3,9-二甲氧基-6H-苯并[c]色烯-6-酮(1,4,7-trihydroxy-3,9-dimethoxy-6H-benzo[c]chromen-6-one); 根据高分辨质谱, 化合物 3 的分子式为 $C_{16}H_{14}O_7$, 核磁数据显示: 1H NMR(500 MHz,

DMSO- d_6) δ_H 10.48(s, 1H), 10.02(s, 1H), 6.59(s, 2H), 6.21(s, 2H), 2.35(s, 3H), 2.33(s, 3H)。 ^{13}C NMR(125 MHz, DMSO- d_6) δ_C 170.7, 167.2, 161.2, 160.2, 158.8, 152.3, 140.4, 139.6, 116.6, 114.8, 109.9, 108.26, 107.45, 100.5, 21.4, 21.0。参考文献数据^[26], 鉴定该化合物为红粉苔酸(lecanoric acid); 根据高分辨质谱, 化合物 4 的分子式为 $C_9H_8O_3$, 核磁数据显示: 1H NMR(500 MHz, $CDCl_3$) δ_H 7.65(1H, s), 7.38(1H, d, $J=7.0$ Hz), 6.78(1H, d, $J=7.0$ Hz), 5.21(2H, s), 2.30(3H, s); ^{13}C NMR(125 MHz, $CDCl_3$) δ_C 172.9, 154.5, 144.0, 138.0, 124.8, 112.8, 110.4, 70.4, 14.5。参考文献数据^[27], 鉴定该化合物为 7-羟基-4-甲基-1(3H)-异苯并呋喃酮(7-hydroxy-4-methyl-1(3H)-isobenzofuranone)。化合物 1~4 均在木贼镰刀菌(*F. equiseti*)中首次发现。

3 讨论与结论

本研究从杨桃果实典型发病组织中分离纯化得到 4 株菌, 通过形态学结合分子生物学鉴定为木贼镰刀菌(*F. equiseti*)、新拟盘多毛孢属(*Neopestalot-*

tiopsis sp.)、裂褶菌(*S. commune*)和枝状枝孢菌(*C. cladosporioides*)。将 4 株菌分别回接至健康的实验材料,均能相应地导致杨桃腐烂,确认其为杨桃病原真菌。通过对 4 种真菌生物学特性的研究发现,新拟盘多毛孢属和裂褶菌在 10~30 ℃ 内均可生长,其余 2 株真菌在 4~30 ℃ 均可生长。4 株病原真菌的最适生长温度在 25~28 ℃ 左右。在 4 ℃ 时,4 株菌的菌丝生长迟缓甚至停止。在 pH 方面,木贼镰刀菌的最适 pH 为 8~9,枝状枝孢菌的最适 pH 为 7~8,其余 2 株真菌的最适 pH 为 6~7,4 株病原真菌在 pH4~10 内均能生长。从木贼镰刀菌的发酵物中得到了 4 种化合物,分别为交链孢酚(1)、1,4,7-三羟基-3,9-二甲氧基-6H-苯并[c]色烯-6-酮(2)、红粉苔酸(3)和 7-羟基-4-甲基-1(3H)-异苯并呋喃酮(4)。化合物 1~4 均为首次从木贼镰刀菌中分离得出。交链孢酚曾被报道从三线镰刀菌(*F. tricinctum*)中分离得出,具有致突变性和致癌性^[28-29],所以对植物病原菌带来的真菌毒素污染一定要引起重视。

© The Author(s) 2024. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

参考文献

- [1] 刘全儒. 阳桃属[M]//中国植物志,第 43 卷第 1 分册. 北京: 科学出版社, 1998: 4-6. [LIU Q R. *Averrhoa* L.[M]//Florae Republicae Popularis Sinicae, Tomus 43(1). Beijing: Science Press, 1998: 4-6.]
- [2] RAMADAN N S, EL-SAYED N H, EL-TOUMY S A, et al. Anti-obesity evaluation of *Averrhoa carambola* L. leaves and assessment of its polyphenols as potential α -glucosidase inhibitors[J]. *Molecules*, 2022, 27(16): 5159.
- [3] 刘佳贺, 郭文场, 李悦. 杨桃的栽培管理与贮藏(2)[J]. *特种经济动植物*, 2017, 20(2): 51-54. [LIU J H, GUO W C, LI Y. Cultivation management and storage of carambola(2)[J]. *Journal of Special Economic Animals and Plants*, 2017, 20(2): 51-54.]
- [4] 蔺楠, 杜静婷, 施俊凤, 等. 水果采后致病菌及拮抗酵母防治机制研究进展[J]. *果树资源学报*, 2023, 4(4): 73-79. [LIN N, DU J T, SHI J F, et al. Research progress in control mechanism of postharvest fruit pathogenic bacteria and antagonistic yeast[J]. *Journal of Fruit Resources*, 2023, 4(4): 73-79.]
- [5] 蔡锦玲, 蓝波妙, 陈品品, 等. 番茄采后病菌鉴定及肉桂精油的抑菌分析[J]. *亚热带植物科学*, 2021, 50(2): 140-146. [CAI J L, LAN B M, CHEN P P, et al. Identification of post-harvest pathogens of tomato and bacteriostasis of cinnamon essential oil on them[J]. *Subtropical Plant Science*, 2021, 50(2): 140-146.]
- [6] 席飞, 汤静, 吕凤霞, 等. 青皮核桃采后病害生防菌贝莱斯芽胞杆菌 XRD006 全基因组分析及防治效果研究[J]. *微生物学报*, 2024, 64(1): 303-322. [XI F, TANG J, LÜ F X, et al. *Bacillus velezensis* XRD006: Genomic characteristics and biocontrol effects on diseases of postharvest green walnuts[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2024, 64(1): 303-322.]
- [7] 李志昊, 林斯茵, 高颖, 等. 挥发性有机化合物对桃果实采后褐腐病控制及感官品质的影响[J]. *浙江大学学报(农业与生命科学版)*, 2024, 50(1): 75-85. [LI Z H, LIN S Y, GAO Y, et al. Effects of volatile organic compounds on postharvest brown rot control and sensory quality in peach fruit[J]. *Journal of Zhejiang University (Agriculture and Life Sciences)*, 2024, 50(1): 75-85.]
- [8] 熊大维, 顾斌涛, 刘兰, 等. 赣南脐橙致腐菌的分离鉴定及其对 2-苯乙醇敏感性分析[J]. *安徽农业科学*, 2020, 48(7): 186-189, 201. [XIONG D W, GU B T, LIU L, et al. Isolation and identification of citrus pathogens from navel orange in southern Jiangxi Province and sensitivity analysis to 2-phenyl ethanol alcohol[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2020, 48(7): 186-189, 201.]
- [9] 何新华. 杨桃病虫害及其防治[J]. *福建果树*, 1995, 3: 41-42. [HE X H. Diseases and pests of carambola and their prevention and control[J]. *Southeast Horticulture*, 1995, 3: 41-42.]
- [10] 刘韬, 肖荣凤, 刘波, 等. 台湾引进甜杨桃的两种真菌病原鉴定[J]. *福建农业学报*, 2011, 26(3): 409-414. [LIU T, XIAO R F, LIU B, et al. Identification of two fungal pathogens in sweet carambola from Taiwan[J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2011, 26(3): 409-414.]
- [11] MANDA H, VYAS K, PANDYA A, et al. A complete review on: *Averrhoa carambola*[J]. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 2012, 1(1): 17-33.
- [12] PLOETZ R C. Influence of temperature on *Pythium splendens*—induced root disease on carambola, *Averrhoa carambola*[J]. *Mycopathologia*, 2004, 157(2): 225-231.
- [13] 徐雪荣, 臧小平, 雷新涛. 杨桃病虫害及其防治[J]. *中国南方果树*, 2002, 31(4): 34-37. [XU X R, ZANG X P, LEI X T. Diseases and pests of carambola and their prevention and control[J]. *South China Fruits*, 2002, 31(4): 34-37.]
- [14] SHIVAS R G, TAN Y P. A taxonomic re-assessment of *Colletotrichum acutatum*, introducing *C. fiorinae* comb. et stat. nov. and *C. simmondsii* sp. nov.[J]. *Fungal Diversity*, 2009, 39: 111-122.
- [15] 杨友联, 刘永翔, 刘作易. 水果采后炭疽病病原鉴定[J]. *西南农业学报*, 2014, 27(3): 1114-1123. [YANG Y L, LIU Y X, LIU Z Y. *Colletotrichum* species responsible for anthracnose disease of postharvest fruits[J]. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2014, 27(3): 1114-1123.]
- [16] 梁忠厚, 李静纳. 湖南多花黄精根腐病病原菌的分离与鉴定[J]. *南方农业学报*, 2021, 52(7): 1923-1930. [LIANG Z H, LI J N. Isolation and identification of the pathogenic fungi of *Polygonatum cyrtoneura* Hua root rot in Hunan Province[J]. *Journal of Southern Agriculture*, 2021, 52(7): 1923-1930.]
- [17] SHAO Y, WANG X Y, QIU X, et al. Isolation and purification of a new *Bacillus subtilis* strain from deer dung with anti-microbial and anti-cancer activities[J]. *Current Medical Science*, 2021, 41: 832-840.
- [18] 毕秋艳, 党志红, 朱伟旗, 等. 河北省大豆主要病原真菌鉴定及防治药剂筛选[J]. *中国农业科学*, 2021, 54(1): 71-85. [BI Q Y, DANG Z H, ZHU W Q, et al. Identification of major pathogenic fungi of soybean in Hebei Province and screening of control fungicides[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2021, 54(1): 71-85.]
- [19] 李佩琪, 江山, 戴群, 等. 猕猴桃和青菜病原真菌的分离、鉴定及生物学特性[J]. *食品工业科技*, 2022, 43(19): 146-153. [LI P Q, JIANG S, DAI Q, et al. Isolation, identification and biological characteristics of pathogenic fungi from kiwifruit and pakchoi[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2022, 43(19): 146-153.]
- [20] YAO Y J, PEGLER D N, CHASE M W. Application of ITS (NrDNA) sequences in the phylogenetic study of *Tyromyces* S. I.

- [J]. *Mycological Research*, 1999, 41(2): 219–229.
- [21] 苏畅, 窦晓, 叶新, 等. 基于 ITS4/5 rRNA 区序列对不同时期大曲中霉菌的分离与鉴定[J]. *现代食品科技*, 2018, 34(3): 54–58, 211. [SU C, DOU X, YE X, et al. Isolation and identification of mold from Daqu in different periods based on the ITS4/5 rRNA region sequence[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2018, 34(3): 54–58, 211.]
- [22] 王飞, 杨瑾, 李雪梦, 等. 丹参茎基腐病病原鉴定及防治药剂筛选[J]. *植物病理学报*, 2022, 52(6): 950–958. [WANG F, YANG J, LI X M, et al. Identification of basal stem rot causal pathogen in *Salvia miltiorrhiza* and evaluation of fungicides on the inhibition of mycelial growth in laboratory[J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2022, 52(6): 950–958.]
- [23] LING L, HAO G, CHEN X, et al. Brasilamides A-D: Sesquiterpenoids from the plant endophytic fungus *Paraconiothyrium brasiliense*[J]. *European Journal of Organic Chemistry*, 2010, 17: 3302–3306.
- [24] ALY A H, EDRADA-EBEL R, INDRIANI I D, et al. Cytotoxic metabolites from the fungal endophyte *Alternaria* sp. and their subsequent detection in its host plant *Polygonum senegalense*[J]. *Journal of Natural Products*, 2008, 71(6): 972–980.
- [25] TANAHASHI T, TAKENAKA Y, NAGAKURA N, et al. 6H-dibenzo[b,d]pyran-6-one derivatives from the cultured lichen mycobionts of *Graphis* spp. and their biosynthetic origin[J]. *Phytochemistry*, 2003, 62(1): 71–75.
- [26] THIAGO I L, BARROS C, ROBERTA G C, et al. Radical-scavenging activity of orsellinates[J]. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 2008, 56(11): 1551–1554.
- [27] KO S, TOSHIKATSU O, FUMIHITO S, et al. Three metabolites produced by *Valsa* sp.[J]. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1984, 48(12): 3151–3152.
- [28] 何隽, 马锦涛, 马蕊, 等. 猕猴桃内生真菌 *Fusarium tricinctum* 化学成分研究[J]. *中南民族大学学报(自然科学版)*, 2023, 42(1): 52–57. [HE J, MA J T, MA R, et al. The chemical constituents from kiwi-associated fungus *Fusarium tricinctum*[J]. *Journal of South-Central Minzu University (Natural Science Edition)*, 2023, 42(1): 52–57.]
- [29] 程树品, 李晓蒙, 王小丹, 等. 交链孢霉毒素的危害评估[J]. *毒理学杂志*, 2020, 34(3): 220–227. [CHENG S P, LI X M, WANG X D, et al. Current status of hazard assessment of *Alternaria* toxins[J]. *Journal of Toxicological Sciences*, 2020, 34(3): 220–227.]