

水蜜桃主要病原真菌分离鉴定及肉桂精油对其抑制作用

虞铭霞, 韦莹莹, 黄铮铮, 陈义, 姜舒, 许凤, 王鸿飞, 邵兴锋

Isolation and Identification of the Main Fungal Pathogens of Peach Fruit and the Antifungal Effect of Cinnamon Essential Oil on These Pathogens

YU Mingxia, WEI Yingying, HUANG Zhengzheng, CHEN Yi, JIANG Shu, XU Feng, WANG Hongfei, and SHAO Xingfeng

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023080163>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

低温减压贮藏对“川中岛”水蜜桃保鲜效果的影响

The preservation effects of low temperature and hypobaric storage on “Chuan Zhongdao” peach

食品工业科技. 2018, 39(7): 267-270 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2018.07.048>

植物精油在果蔬采后病害控制中的研究进展

Research progress in postharvest disease control of essential oils of plant origin on fruits and vegetables

食品工业科技. 2017(02): 370-373 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2017.02.063>

甜瓜粉霉病病原菌鉴定及三种药物对病原菌的体外抑制作用

Identification of Fungal Pathogen Causing Pink Rot of Muskmelons and Inhibitory Effects of Three Chemicals on the Fungal Pathogen *in Vitro*

食品工业科技. 2019, 40(13): 78-83 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2019.13.013>

晚熟桃采后褐腐病致病菌的分离鉴定及拮抗菌对其防治效果的研究

Isolation and identification of pathogen caused postharvest brown rot of late-ripening peach and bio-control effects of antagonistic bacteria

食品工业科技. 2018, 39(2): 102-107 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2018.02.020>

物理方法对病原真菌及其产毒的防控作用研究进展

Progress on prevention and control of physical methods on pathogenic fungi and its toxins

食品工业科技. 2017(22): 346-352 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2017.22.067>

肉桂精油蒸气对黄曲霉生长及其毒素B₁合成的影响

Effect of cinnamon essential oil in the vapor phase on the growth and aflatoxin B₁ production of *Aspergillus flavus*

食品工业科技. 2018, 39(9): 119-123 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2018.09.021>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

虞铭霞, 韦莹莹, 黄铮铮, 等. 水蜜桃主要病原真菌分离鉴定及肉桂精油对其抑制作用 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(13): 124–131.
doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023080163

YU Mingxia, WEI Yingying, HUANG Zhengzheng, et al. Isolation and Identification of the Main Fungal Pathogens of Peach Fruit and the Antifungal Effect of Cinnamon Essential Oil on These Pathogens[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(13): 124–131. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023080163

· 生物工程 ·

水蜜桃主要病原真菌分离鉴定及肉桂精油对其抑制作用

虞铭霞, 韦莹莹*, 黄铮铮, 陈 义, 姜 舒, 许 凤, 王鸿飞, 邵兴锋

(农产品质量安全危害因子与风险防控国家重点实验室, 宁波大学食品科学与工程学院,
浙江宁波 315800)

摘 要: 本文分别在 2020 年、2021 年连续两年采集浙江省水蜜桃产区内的腐烂水蜜桃, 从果实病灶组织中分离、纯化病原真菌, 通过形态特征、分子生物学 (rDNA-ITS 序列分析) 鉴定法以及致病性检测确定病原真菌的种类, 并采用体外和体内试验探究肉桂精油对病原真菌的抑制效果。结果表明, 从两年采集的腐烂桃果实中分离纯化出两株具有较强致病性的真菌, 经鉴定为美澳型核果类链核盘菌 (*Monilinia fructicola*) 和匍枝根霉 (*Rhizopus stolonifer*), 分别导致桃果实的褐腐病和软腐病。肉桂精油对 *M. fructicola* 和 *R. stolonifer* 的生长均有一定的抑制作用, 最小抑菌浓度分别为 0.4 和 0.8 mL/L, *M. fructicola* 对肉桂精油更加敏感; 肉桂精油熏蒸处理水蜜桃可以降低这两种病原菌造成的病害发生率和病斑直径, 表明肉桂精油能有效地控制这两种病原真菌导致的水蜜桃果实病害。

关键词: 水蜜桃, 病原真菌, 肉桂精油, 抑菌, 病害防控

中图分类号: TS255.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2024)13-0124-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023080163

本文网刊:



Isolation and Identification of the Main Fungal Pathogens of Peach Fruit and the Antifungal Effect of Cinnamon Essential Oil on These Pathogens

YU Mingxia, WEI Yingying*, HUANG Zhengzheng, CHEN Yi, JIANG Shu, XU Feng,
WANG Hongfei, SHAO Xingfeng

(State Key Laboratory for Managing Biotic and Chemical Threats to the Quality and Safety of Agro-products, College of Food Science and Engineering, Ningbo University, Ningbo 315800, China)

Abstract: In 2020 and 2021, peach fruit with natural disease and decay were collected from orchards in Zhejiang Province. Then the fungal pathogens were isolated from the diseased spots and identified by morphological characteristics, molecular biological identification (rDNA-ITS sequence analysis) and pathogenicity detection. The antifungal effect of cinnamon essential oil on the fungal pathogens *in vitro* and *in vivo* were also investigated. The results showed that two fungal pathogens with strong pathogenicity were isolated, and identified as *Monilinia fructicola* and *Rhizopus stolonifer*, which caused brown rot and soft rot, respectively. Cinnamon essential oil inhibited the growth of *M. fructicola* and *R. stolonifer*, and the minimum inhibitory concentrations were 0.4 and 0.8 mL/L, respectively. *M. fructicola* was more sensitive to cinnamon essential oil. Cinnamon essential oil fumigation could reduce the disease incidence and lesion diameter of brown rot and soft rot of peach fruit caused by these two fungal pathogens. Therefore, cinnamon essential oil could be used as a natural fungicide to control fungal diseases of peach fruit.

Key words: peach; fungal pathogen; cinnamon essential oil; antifungal; disease control

收稿日期: 2023-08-16

基金项目: 宁波市公益性科技计划项目 (2022S143); 宁波大学大学生科技创新计划项目 (2023SRIP3615)。

作者简介: 虞铭霞 (1997-), 女, 硕士, 研究方向: 果蔬贮藏与保鲜, E-mail: 1372863676@qq.com。

* 通信作者: 韦莹莹 (1989-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 果蔬贮藏与保鲜, E-mail: weiyinying@nbu.edu.cn。

浙江省是我国桃栽培的最适宜地区之一,尤其是宁波奉化水蜜桃驰名海内外。水蜜桃果实味甜多汁,富含多种营养物质。但由于水蜜桃果实皮薄、果肉组织柔软极易遭受病原真菌的侵染导致腐烂^[1-2]。已报道的桃果实真菌性病害主要有褐腐病、软腐病和灰霉病等,主要致病菌分别是链核盘菌(*Monilinia* spp.)、匍枝根霉菌(*Rhizopus stolonifer*)和灰霉葡萄孢菌(*Bortrytis cinerea*)。这些病原菌不仅在田间造成危害,导致采收时产生大量的烂果;而且果实上潜伏的病原菌还会在采后贮运期间导致果实腐烂^[3-4]。化学杀菌剂虽然在防治果蔬病害上是一种有效方法,但是存在高残留、极易造成环境污染、同时还容易使环境中的微生物产生耐药性等问题,因而寻找替代化学杀菌剂的方法尤为重要^[5]。

肉桂精油是从肉桂树的干叶和枝梗中蒸馏提取的一种植物精油,具有抑菌、抗氧化等多种生物活性,且使用安全环保,已应用于医药、食品以及化妆品等领域^[6]。研究表明肉桂精油对尖孢炭疽菌(*Colletorichum acutatum*)、葡萄座腔菌(*Botryosphaeria parva*)、灰葡萄孢霉(*B. cinerea*)、黑曲霉(*Aspergillus niger*)等具有较强的抗真菌活性^[7-8]。近年来亦有不少研究报道了肉桂精油及其活性成分在果蔬采后病害上的应用,发现其能够有效减少柑橘青霉病、番茄灰霉病和芒果炭疽病以及蒂腐病等病害的发生^[8-10],且肉桂精油在防控果蔬采后病害显示出良好的应用前景和发展潜力。然而,其对于水蜜桃致病真菌的抑制作用及防控水蜜桃病害的效果鲜有报道。

因此,本研究对浙江省水蜜桃产区采集的烂果进行病原真菌的分离鉴定,并结合科赫法则确定主要的致病真菌,进一步通过体外、体内试验探究了肉桂精油对水蜜桃主要致病真菌的抑制效果,为该产区内水蜜桃真菌病害的精准防控和绿色防腐保鲜提供理论依据和技术基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

病原真菌的分离果实 分别于 2020 和 2021 年在浙江省水蜜桃产区(宁波市奉化区周边)的果园采摘自然发病腐烂的水蜜桃果实,品种为‘湖景蜜露’,病原真菌致病性测定和肉桂精油在果实体内的抑菌研究用水蜜桃为同品种的、商业成熟度采收的水蜜桃果实;无水乙醇、 β -巯基乙醇、吐温-80 国药集团化学试剂有限公司,均为分析纯;硫酸链霉素 北京索莱宝科技有限公司;Ezup 柱式真菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒 上海生工生物有限公司;肉桂精油 上海甬川生物科技有限公司。

SW-CJ-2FD 洁净工作台 苏州安泰空气技术有限公司;CX23LED RFS1C 生物显微镜 奥林巴斯(广州)工业有限公司;LDZX-50KBS 立式高压蒸汽灭菌器 上海申安医疗器械厂;SG-5406T 数显恒温磁力搅拌器 上海硕光科技有限公司;HWM-358 恒

温恒湿培养箱 宁波江南仪器厂;H1850R 高速台式冷冻离心机 湖南湘仪实验室仪器开发有限公司;WG-9140A 电热恒温鼓风干燥箱 上海精宏实验设备有限公司;HH-4 数显恒温水浴锅 常州国华电器有限公司;6331PCR 仪 德国艾本德有限公司;STAR-VF-10 综合型超纯水机 上海砾鼎水处理设备有限公司;LE2002E 梅特勒-托利多天平 梅特勒-托利多国际贸易(上海)有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 水蜜桃果实病原真菌的分离和纯化 水蜜桃果实病原真菌的分离参考徐祥林等^[11]的方法略作修改。从病果腐烂处取适量果皮,放置于含硫酸链霉素(200 $\mu\text{g/mL}$)的马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基上。25 $^{\circ}\text{C}$ 培养 3~4 d 后,从菌落边缘挑取适量菌丝转移至新的 PDA 培养基上进一步纯化培养,纯化 2~3 次并经镜检无杂菌后即可确定是纯菌落。将纯化后的菌落接种到 PDA 斜面培养基中,培养数天后置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 存放备用。

1.2.2 病原真菌的致病性检测 参考解淑慧等^[12]的方法略作修改。将病原真菌在 25 $^{\circ}\text{C}$ 恒温下培养 7 d,加入无菌水后用灭菌接种环刮取分生孢子,再用无菌绢网过滤得到孢子悬浮液,最后用血球计数的方法将其配成浓度为每毫升 1×10^5 个孢子悬浮液。水蜜桃果实表面采用 75% 乙醇进行消毒,风干后在赤道处用消毒的铁钉均匀刺伤两个伤口(3 mm $\times$ 3 mm),每个伤口接种 10 μL 的真菌孢子悬浮液(1×10^5 孢子/mL),随后将桃果实置于 20 $^{\circ}\text{C}$ 恒温恒湿箱中贮藏 5 d,记录发病率和病斑直径,利用十字交叉法测量病斑直径,以伤口病斑直径大于 3 mm 记为发病。每种菌株接种 5 个桃果实,实验重复 3 次。若再次于发病处分离纯化出与首次分离相同的真菌,则为病原真菌。

1.2.3 分离的病原真菌鉴定

1.2.3.1 形态学鉴定 参考张方博^[13]的方法,将纯化后的病原真菌接种于 PDA 培养基上 25 $^{\circ}\text{C}$ 培养 5 d,用无菌接种环挑适量菌丝体,置于放有少许水的载玻片上,盖上盖玻片后在显微镜下观察菌丝及孢子形态和结构特征,并拍照记录。

1.2.3.2 分子生物学鉴定 根据刘瑞玲等^[14]的方法略作修改。刮取适量活化后的病原真菌,将其置于无菌离心管中,根据试剂盒步骤提取 DNA。真菌 ITS 区扩增通用引物采用 ITS-1(5'-TCCGTAGGTGAAC CTGCGG-3')和 ITS-4 (5'-TCCTCCGCTTATTGAT ATGC-3'),扩增程序:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s,57 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 60 s,共 35 个循环;最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。PCR 产物经过琼脂糖凝胶电泳检测后送往公司进行测序,测序结果在 NCBI 中进行 BLAST 分析并下载相关基因序列,用 MEGA X 采用 NJ 法构建系统发育树。

1.2.4 肉桂精油对两种病原真菌的抑制效果 采用

平板接触试验^[15]研究肉桂精油对两种病原真菌的体外抑制效果。将肉桂精油添加到冷却至 60 ℃、含有 1% 吐温-80 的 PDA 中,使其终浓度分别达到 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7 和 0.8 mL/L。混合充分后倒入培养皿中,待培养基凝固后向每个培养皿中心接种一个病原真菌菌饼,置于 25 ℃ 培养,每天观测菌丝直径(mm)。每个处理重复 3 次,不含精油的作为对照组(CK),根据以下公式计算菌丝生长抑制率:

$$\text{菌丝生长抑制率(\%)} = \frac{\text{对照组菌丝的直径} - \text{处理组菌丝的直径}}{\text{对照组菌丝的直径} - \text{病原真菌菌饼的直径}} \times 100$$

1.2.5 应用试验 参考 Alves 等^[16]的方法略作改动。将水蜜桃按照 1.2.2 的方法刺伤接种后,将接种病原真菌的水蜜桃置于可密闭的塑料保鲜盒中,肉桂精油熏蒸浓度根据 1.2.4 体外实验的结果,结合两种致病真菌的最小抑菌浓度,选择精油的熏蒸浓度为 0.4 和 0.8 mL/L,对照组不作任何处理。所有果实置于 20 ℃ 的恒温恒湿箱中密封贮藏,24 h 后将肉桂精油取出,每天测定发病率和病斑直径。每种病原真菌的每个处理设置 3 组重复,每个重复 5 个果实。

1.3 数据处理

使用 Microcal Excel(Microsoft Office, 2019)软件进行数据计算。使用 SPSS(Version 26, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)软件中单因素方差分析对试验数据进行差异性分析, $P < 0.05$ 说明具有显著差异。采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行作图。相关数据数值均以平均值±标准误差表示。

2 结果与分析

2.1 桃果实中真菌的分离和纯化

如图 1 所示,2020 年采集的腐烂桃果实样品中分离纯化出 12 种不同形态的真菌,分别标记为菌株 A~L(图 1a),其中菌株 A 菌落呈灰褐色,有同心车轮纹;菌株 B 菌落粉白色,棉絮状;菌株 C 菌落呈现深

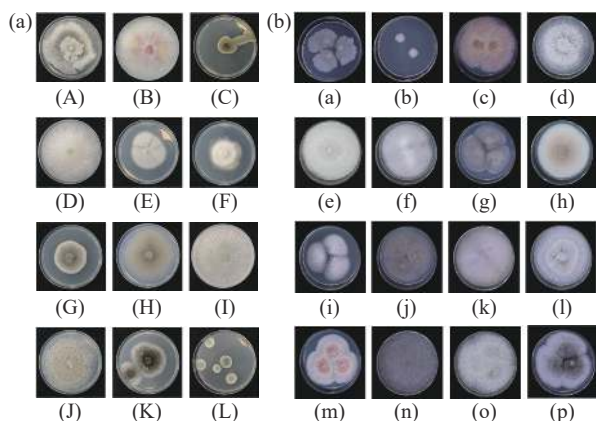


图 1 水蜜桃中真菌菌株的分离与纯化

Fig.1 Isolation and purification of fungal strains from peach fruit

注:(a)为 2020 年从自然腐烂的水蜜桃中分离出的 12 株真菌(A~L);(b)为 2021 年从自然腐烂的水蜜桃中分离出的 16 株真菌(a~p)。

绿色,粉状;菌株 D 菌落为白色,绒毛状;菌株 E 菌落白色,较平整光滑;菌株 F 菌落白色,絮状,车轮状;菌株 G 菌落灰褐色,絮状;菌株 H 菌落灰褐色,絮状;菌株 I 菌落白绿色,棉絮状;菌株 J 菌落灰褐色,车轮状;菌株 K 菌落黑褐色,毡状;菌株 L 菌落暗绿色,毡状。2021 年采集的样品中分离纯化出 16 种不同形态的真菌,分别标记为菌株 a~p(图 1b),其中菌株 a 菌落乳白色,边缘不规整;菌株 b 菌落白色,奶油状;菌株 c 菌落粉红色,絮状;菌株 d 菌落灰褐色,有同心车轮纹;菌株 e 菌落白色;菌株 f 菌落白色,蓬松凸起;菌株 g 菌落浅褐色,光滑;菌株 h 菌落粉白色,绒状;菌株 i 菌落白粉色,絮状;菌株 j 菌落灰褐色,絮状;菌株 k 菌落白灰色,绒毛状;菌株 l 菌落灰褐色,车轮状;菌株 m 菌落黄棕色,绒状;菌株 n 菌落黑褐色,棉絮状;菌株 o 菌落灰褐色,絮状;菌株 p 菌落白灰色,絮状。

2.2 分离菌株的致病性评价

2020 年采集的病桃样品中,共分离得到 12 株真菌,其中 11 株真菌在反接桃果实 5 d 后都没有发生明显的病害,而菌株 J 在接种 2 d 后开始发病。同时发病处逐渐形成水渍状腐烂病斑,腐烂速度较快,3 d 后果实的发病率和病斑直径分别为 100% 和 26.7 mm,在第 5 d 时病斑直径达到 68.6 mm。观察发现随着病斑直径的扩大,腐烂表面会覆盖一层灰褐色的圆形霉状物(图 2b),并伴有腐臭气味;2021 年分离得到 16 株真菌中,有 15 株在反接回桃果实后均未发生明显病害,而菌株 n 在接种 2 d 后就出现水渍状微凹陷病斑。在第 3 d 时病斑几乎覆盖整个果实表面,发病率和病斑直径分别为 96.7% 和 58.4 mm。果实发病非常迅速,腐烂表面有大量灰白色气生菌丝,腐烂部位有组织液渗出并伴有腐臭气味(图 2d)。如图 2 所示,病原真菌菌株 J 和 n 接种至桃果实的病害情况与初始情况基本一致,并且从回接病斑处再次分离得到了相同的病原真菌,因此确定这两株真菌为水蜜桃腐烂的主要病原真菌。

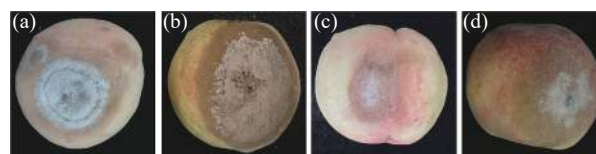


图 2 水蜜桃果实主要病原真菌 J 和 n 的病害特征

Fig.2 Disease characteristics of main fungal pathogen J and n in peach fruit

注:(a)为菌株 J 引起的水蜜桃果实上的初始病斑;(b)为菌株 J 反接至桃果实 5 d 后的症状;(c)为菌株 n 引起的水蜜桃果实上的初始病斑;(d)为菌株 n 反接至桃果实 3 d 后的症状。

2.3 水蜜桃腐烂的病原真菌鉴定

2.3.1 致病真菌形态特征 菌株 J 在 PDA 培养基中培养 4~5 d 就能长满整个 90 mm 的培养皿,其菌落产孢丰富,菌落形态呈现均匀的灰褐色车轮状,边缘整齐(图 1a)。显微镜观察显示,其菌丝有数个隔膜,

分生孢子单孢, 椭圆形或柠檬形, 串珠状生于分生孢子梗顶端, 分子孢子梗较短, 二分枝或不分枝(图 3a、3b)。结合《真菌鉴定手册》^[17] 和王准等^[18] 的鉴定方法, 菌株 J 根据形态学特征为美澳型核果类链核盘菌(*Monilinia fructicola*)。菌株 n 在 PDA 上快速生长, 培养 1~2 d 就能长满培养皿, 菌落初期呈白色棉絮状, 随后颜色加深至黑褐色或灰褐色。气生匍匐菌丝

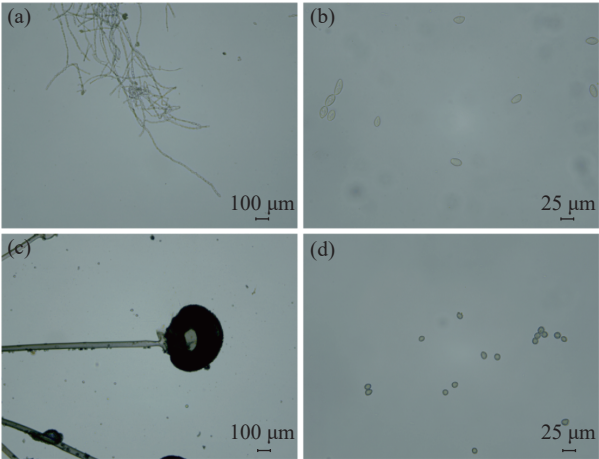


图 3 水蜜桃上分离的主要病原真菌的形态特征

Fig.3 Morphological characteristics of main fungal pathogens isolated from peach fruit

注: (a) 菌株 J 的菌丝体和孢子梗(100×); (b) 菌株 J 的分生孢子(400×); (c) 菌株 n 的孢子囊(100×); (d) 菌株 n 的孢囊孢子(400×)。

生长在培养基表面, 并伴有大量黑色孢子生成(图 1b), 菌丝无隔膜, 具有假根, 其顶端膨大生出黑褐色的球形或者椭圆形孢子囊, 内生有孢囊孢子, 形状多为卵圆形(图 3c、3d)。结合病原真菌的菌落特征和《真菌鉴定手册》^[16], 菌株 n 为匍枝根霉菌(*Rhizopus stolonifer*)。

2.3.2 水蜜桃上分离的主要病原真菌分子生物学分析 如表 1 所示, 2020 年从腐烂桃果实样品中分离出的 12 株真菌包含间座壳属(*Diaporthe* spp.)、镰刀菌属(*Fusarium* spp.)、枝孢属(*Cladosporium* spp.)、毛霉属(*Mucor* spp.)、地霉属(*Geotrichum* spp.)、拟盘多毛孢属(*Pestalotiopsis* spp.)、链格孢属(*Alternaria* spp.)、木霉属(*Trichoderma* spp.)、链核盘菌属(*Monilinia* spp.)、曲霉属(*Aspergillus* spp.)和青霉属(*Penicillium* spp.)。2021 年分离得到的 16 株真菌包括毕赤酵母属(*Pichia* spp.)、有孢汉逊酵母属(*Hanseniaspora* spp.)、镰刀菌属(*Fusarium* spp.)、间座壳属(*Diaporthe* spp.)、地霉属(*Geotrichum* spp.)、附球菌属(*Epicoccum* spp.)、毛霉属(*Mucor* spp.)、丽赤壳属(*Calonectria* spp.)、根霉属(*Rhizopus* spp.)和葡萄座腔菌属(*Botryosphaeria* spp.)。在两年的腐烂病桃上分离到相同的真菌包括 *G. candidum* 和 *M. irregularis*, 而分离到的一些真菌, 例如 *F. asiaticum* 和 *F. fragilis* 为同属不同种真菌, *C. cladosporioides* 和 *B. dothidea* 为不同属真菌。

表 1 水蜜桃病原真菌的分子生物学鉴定结果

Table 1 Molecular biological identification results of major fungal pathogens isolated from peach fruit

年份	菌株编号	序列号	长度(bp)	一致性	拉丁学名
2020	A	OM538421.1	521	99.62	<i>Diaporthe fusicola</i>
	B	KY466861.1	480	100	<i>Fusarium asiaticum</i>
	C	MT635286.1	520	100	<i>Cladosporium cladosporioides</i>
	D	OL981331.1	560	99.82	<i>Mucor irregularis</i>
	E	MN394447.1	323	100	<i>Geotrichum candidum</i>
	F	KP050563.1	535	100	<i>Pestalotiopsis adusta</i>
	G	OP163735.1	524	99.81	<i>Alternaria destruens</i>
	H	MN872499.1	567	99.65	<i>Mucor racemosus</i>
	I	ON927129.1	589	100	<i>Trichoderma harzianum</i>
	J	MK566185.1	505	100	<i>Monilinia fructicola</i>
	K	MT597436.1	566	100	<i>Aspergillus niger</i>
	L	NR_169981.1	525	99.81	<i>Penicillium estinogenum</i>
2021	a	LC431629.2	416	98.32	<i>Pichia bruneiensis</i>
	b	AB469379.1	635	99.84	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
	c	MK934343.1	507	100	<i>Fusarium tricinctum</i>
	d	MK335747.1	526	99.81	<i>Diaporthe eres</i>
	e	KY433560.1	517	99.81	<i>Diaporthe hongkongensis</i>
	f	MT603294.1	493	100	<i>Fusarium fujikuroi</i>
	g	MT353978.1	306	99.35	<i>Geotrichum candidum</i>
	h	MF061768.1	485	99.79	<i>Epicoccum sorghinum</i>
	i	MW016557.1	498	99.60	<i>Fusarium stilboides</i>
	j	KP216929.1	556	99.82	<i>Mucor fragilis</i>
	k	MH102381.1	553	99.82	<i>Mucor irregularis</i>
	l	ON024647.1	515	99.81	<i>Diaporthe amygdali</i>
	m	KJ512152.1	493	100	<i>Calonectria hongkongensis</i>
	n	DQ641317.1	872	98.97	<i>Rhizopus stolonifer</i>
	o	KP050623.1	549	99.27	<i>Diaporthe arecae</i>
	p	MN634015.1	518	100	<i>Botryosphaeria dothidea</i>

两株病原真菌 J 和 n 的系统发育树如图 4 所示, 菌株 J 与 *Monilinia fructicola* 聚在同一分支, 将其鉴定为美澳型核果类链核盘菌 (*Monilinia fructicola*); 菌株 n 与 *Rhizopus stolonifer* 聚为同一分支,

将菌株鉴定为匍枝根霉菌 (*Rhizopus stolonifer*)。

2.4 肉桂精油对两株主要病原真菌的抑制作用

2.4.1 体外抑制效果 从图 5 可知, 肉桂精油对两种病原真菌的体外抑制效果均呈现浓度依赖性, 即随

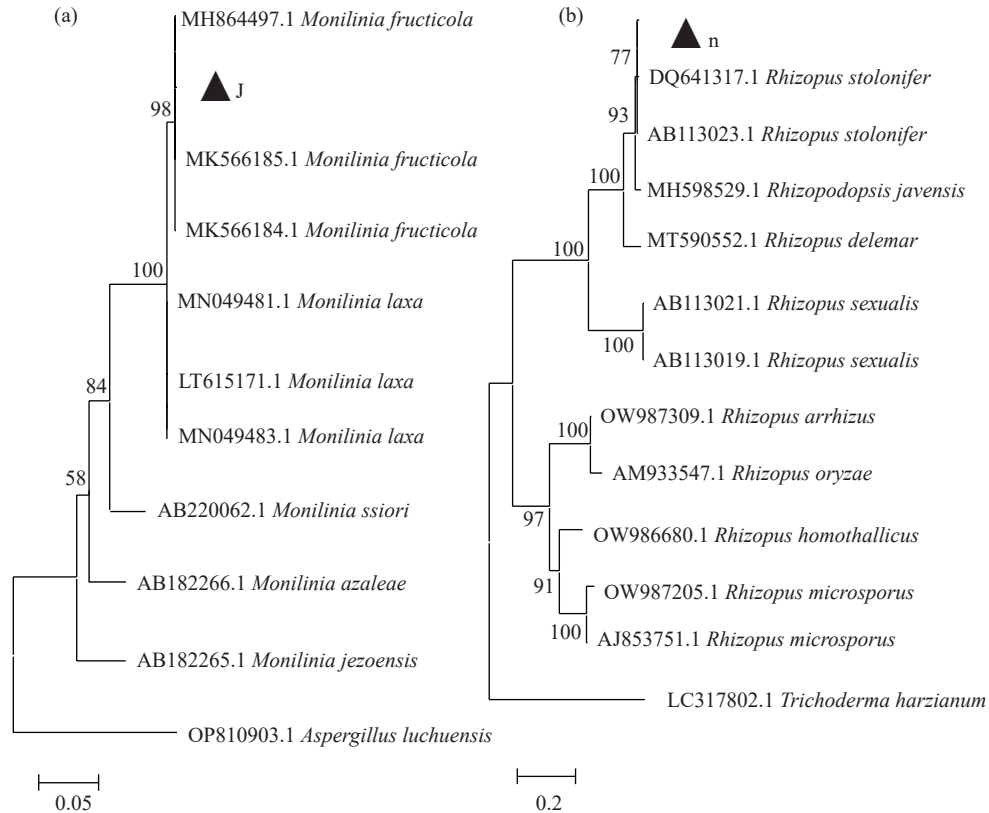


图 4 基于 ITS 基因序列的桃果实病原真菌 J(a)和 n(b)的系统发育树

Fig.4 Phylogenetic tree of peach fruit fungal pathogen J (a) and n (b) based on ITS gene sequences

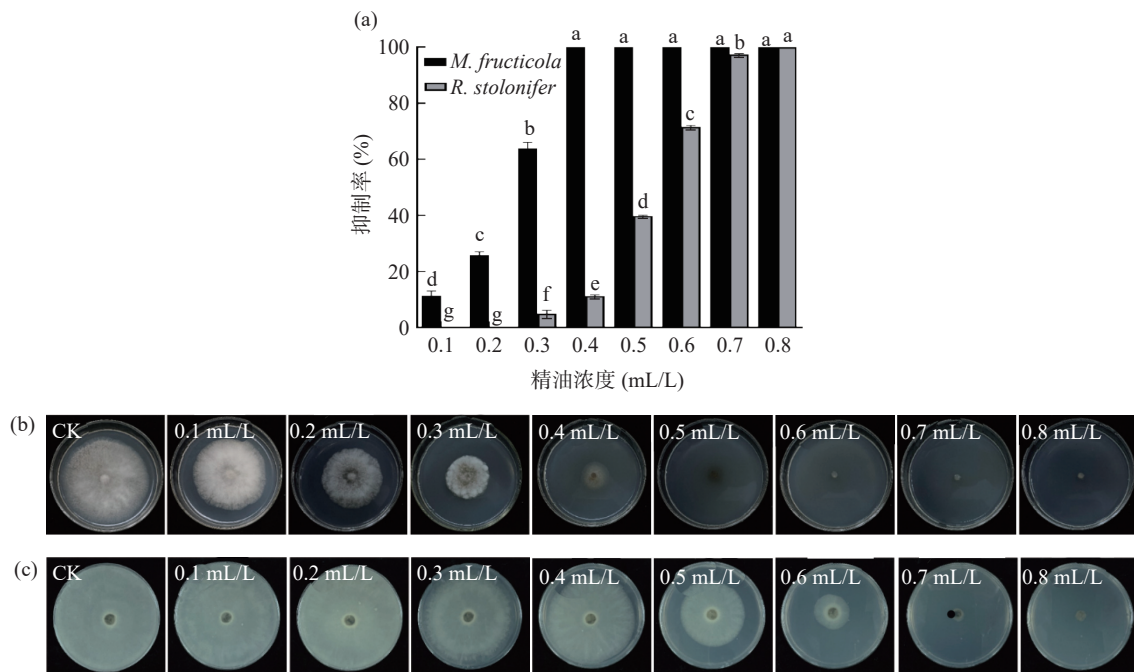


图 5 不同浓度的肉桂精油对两种病原真菌菌丝生长的影响

Fig.5 Effects of different concentrations of cinnamon essential oil on mycelial growth of two fungal pathogens

注: (a)抑制率(培养 2 d), 图中不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$); (b) *M. fructicola* 菌丝生长情况 (5 d); (c) *R. stolonifer* 菌丝生长情况 (2 d)。

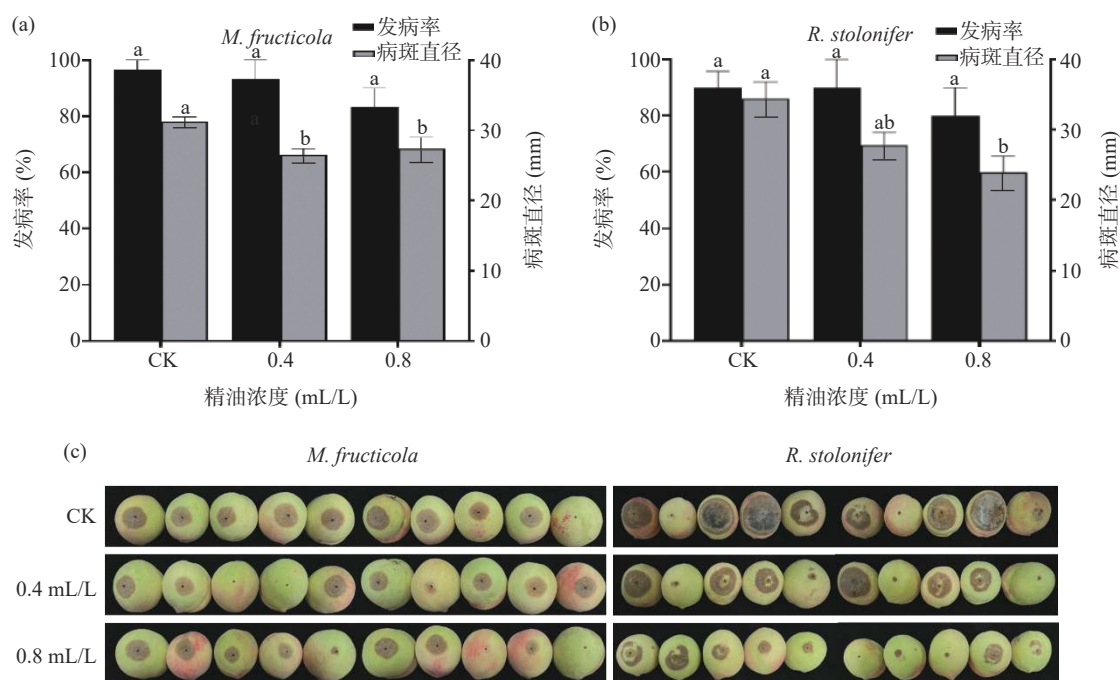


图 6 肉桂精油熏蒸处理对水蜜桃接种 *M. fructicola*(a)、*R. stolonifer*(b)病害的影响及接种后的桃果实贮藏 3 d 时出现的病害情况(c)

Fig.6 Effects of cinnamon essential oil fumigation treatment on *M. fructicola* (a), *R. stolonifer* (b) and disease symptoms in inoculated peach fruit at 3 d of storage (c)

注: 图中不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

随着肉桂精油浓度的升高, 菌丝生长的抑制率显著上升($P<0.05$)。在 25 °C 培养 2 d 时, 肉桂精油对 *M. fructicola* 和 *R. stolonifer* 的菌丝生长抑制率达到 100% 的最低浓度分别为 0.4 和 0.8 mL/L。

2.4.2 应用效果 肉桂精油熏蒸处理对水蜜桃采后接种两种病害的影响如图 6 所示。贮藏第 3 d 时, 接种两种病害的处理组果实的发病率总体小于对照组, 但无显著性差异, 且肉桂精油熏蒸处理均降低了两种病害病斑直径的扩展。其中, 接种 *M. fructicola* 的对照组水蜜桃果实病斑直径为 31.3 mm, 0.4 和 0.8 mL/L 肉桂精油熏蒸处理均显著抑制了病斑直径的扩展($P<0.05$), 较对照组分别下降了 15.2% 和 12.4%; 接种 *R. stolonifer* 后的水蜜桃经过 0.8 mL/L 肉桂精油熏蒸处理, 病斑直径显著减小($P<0.05$), 较对照组下降了 30.6%。上述结果表明肉桂精油能够有效延缓果实接种 *M. fructicola* 和 *R. stolonifer* 后病害的发展。

3 讨论和结论

浙江产区的水蜜桃成熟和采收期主要集中在 7~8 月份, 高温高湿环境使得致病真菌极易滋生繁殖, 导致果园中产生大量的腐烂病桃。此外, 由于水蜜桃皮薄肉软, 贮运过程中很容易造成机械损伤, 使得潜伏在果实上的致病真菌更易侵染果实, 导致腐烂^[2,19]。本研究分别从 2020 年和 2021 年采集的腐烂的水蜜桃果实中分离出 12 和 16 株真菌, 并通过致病性检测发现其中接种病原真菌菌株 J 的水蜜桃腐烂表面会覆盖一层灰褐色的圆形状霉状物和接种菌株 n 的水蜜桃发病迅速且腐烂表面有大量灰白色

气生菌丝, 它们的病害情况均与初始情况基本一致, 同时, 通过致病真菌形态特征和病原真菌分子生物学分析确定了两株病原真菌 J 和 n 对应的 *Monilinia fructicola* 和 *Rhizopus stolonifer* 均为水蜜桃病害主要致病菌。目前国内外也有关于 *M. fructicola* 和 *R. stolonifer* 侵染引起的桃果实病害报道^[20-21]。王友升等^[22]在桃、李病果上分离出的 5 株真菌均为 *M. fructicola*, 同时 Ozkilinc 等^[23]和纪兆林等^[24]也从桃果实褐腐病病果中鉴定出该种真菌, 说明 *M. fructicola* 是导致桃果实产生褐腐病的重要致病真菌。Fischer 等^[25]在种植的'Regis'病桃上分离纯化出的真菌中就包括 *Rhizopus stolonifer*。田一鸣等^[26]报道桃果实被 *R. stolonifer* 侵染后, 初期在果实表面上形成水渍状圆形的褐色病斑, 进而迅速蔓延至整个果实, 这跟本文的研究发现一致。因此, 本研究明确了浙江省水蜜桃产区中主要的致病真菌为 *Monilinia fructicola* 和 *Rhizopus stolonifer*, 为防控水蜜桃病害和腐烂明确了靶标病原真菌, 为病害的精准防控奠定了基础。

植物精油是一类提取自植物不同器官的具有芳香气味且容易挥发的油状液体类物质, 主要成分有萜烯类、醛酮类、酚类、醇类等^[27]。相较于化学杀菌剂使用上的弊端, 植物精油来源广泛、使用安全、绿色高效, 含有的多种组分使其具有广谱抑菌, 且不易产生抗性等优势^[28]。肉桂精油是其中一种具有较强抑菌作用的植物精油, 可以应用于果蔬的防腐保鲜^[6]。本研究通过体外平板试验发现肉桂精油对分离出的两种致病真菌 *M. fructicola* 和 *R. stolonifer* 均有较

强的抑制作用。结果表明培养 2 d 时,肉桂精油对 *M. fructicola* 和 *R. stolonifer* 的菌丝生长抑制率达到 100% 的最低浓度分别为 0.4 和 0.8 mL/L。同样,郭小磊^[29] 研究发现肉桂精油对草莓致病真菌 *R. stolonifer* 的生长有较强的抑制作用。但有研究指出肉桂精油抑制 *M. fructicola* 菌丝生长的效果不佳,但却可以显著抑制 *M. fructicola* 孢子的萌发^[30],这可能是由于肉桂精油的使用量和精油中的组分不同导致。本研究应用试验中,发现精油熏蒸处理组水蜜桃果实的发病率总体低于对照组,病斑直径显著小于对照组($P<0.05$)。其中,0.4 mL/L 肉桂精油熏蒸处理就可以显著抑制 *M. fructicola* 病斑直径的扩展($P<0.05$),而 *R. stolonifer* 病斑直径在 0.8 mL/L 肉桂精油熏蒸处理下才显著降低($P<0.05$)。同时本研究发发现肉桂精油熏蒸处理可以抑制桃果实接种两种致病菌后病害的发展,但抑制效果不如体外试验,这与杜小琴^[31] 的研究结果相似,可能是由于精油在熏蒸过程中较容易挥发散失,导致实际作用于果实的精油浓度降低。未来可以对肉桂精油抑制 *M. fructicola* 和 *R. stolonifer* 的作用机理展开进一步的研究,由于精油易挥发的特点可将精油负载或者包埋至其他材料中,以增强精油的稳定性和应用效果。

综上,本研究表明 *M. fructicola* 和 *R. stolonifer* 是从浙江产区水蜜桃果实上分离鉴定的 2 种主要致病真菌,分别导致桃果实褐腐病和软腐病,肉桂精油能有效抑制这两种真菌的生长,可以防控二者导致的水蜜桃果实病害。本研究结果可为肉桂精油在水蜜桃防腐保鲜中的应用提供一定的参考依据和理论基础。

© 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] ALAMRI S A M, HASHEM M, ALQAHTANI M S A, et al. Formulation of mint and thyme essential oils with arabic gum and tween to enhance their efficiency in the control of postharvest rots of peach fruit[J]. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 2020, 42(3): 330–343.
- [2] 陶春柳,刘影,李建龙.我国水蜜桃保鲜与贮藏冷链物流建设现状、问题及其展望[J]. *江苏农业科学*, 2019, 47(23): 62–67. [TAO C L, LIU Y, LI J L. Development status, problems and prospects of cold chain logistics for preservation and storage of china's peach[J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2019, 47(23): 62–67.]
- [3] 肖烟云,张婷婷,林丽莎,等.中国桃果实采后生理和病害研究进展[J]. *包装与食品机械*, 2014, 32(3): 45–51. [XIAO Y Y, ZHANG T T, LIN L S, et al. Advances in the studies on post-harvest physiology and post-harvest disease of Chinese peach fruit[J]. *Packaging and Food Machinery*, 2014, 32(3): 45–51.]
- [4] KARABULUT O A, COHEN L, WIESS B, et al. Control brown rot and blue mold of peach by short hot water brushing and yeast antagonists[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2002, 24(2): 103–111.
- [5] DING P, LEE Y. Use of essential oils for prolonging postharvest life of fresh fruits and vegetables[J]. *International Food Research Journal*, 2019, 26(2): 363–366.
- [6] YANG K, LIU A P, HU A X, et al. Preparation and characterization of cinnamon essential oil nanocapsules and comparison of volatile components and antibacterial ability of cinnamon essential oil before and after encapsulation[J]. *Food Control*, 2021, 17: 664–673.
- [7] 何靖柳,刘继,杜小琴,等.植物精油对‘红阳’猕猴桃低温贮藏保鲜效果的影响[J]. *食品工业科技*, 2015, 36(9): 320–326. [HE J L, LIU J, DU X Q, et al. Preservation of ‘Red Sun’ kiwifruit fumigated with plant essential oil during cold storage[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2015, 36(9): 320–326.]
- [8] TZORTZAKIS N G. Impact of cinnamon oil-enrichment on microbial spoilage of fresh produce[J]. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2009, 10(1): 97–102.
- [9] 苏子寒,高兆银,胡美姣,等.16种植物源活性成分对2种芒果采后病害的防治[J]. *热带生物学报*, 2019, 10(1): 28–33. [SU Z H, GAO Z Y, HU M J, et al. Effects of plant-based active ingredients on postharvest diseases of mango fruit[J]. *Journal of Tropical Biology*, 2019, 10(1): 28–33.]
- [10] RADI M, AHMADI H, AMIRI S. Effect of cinnamon essential oil-loaded nanostructured lipid carriers (NLC) against *Penicillium citrinum* and *Penicillium expansum* involved in tangerine decay[J]. *Food and Bioprocess Technology*, 2022, 15(2): 306–318.
- [11] 徐祥林,骆海玉,颜小捷,等.罗汉果内生真菌多样性研究[J]. *广西植物*, 2020, 40(5): 618–627. [XU X L, LUO H Y, YAN X J, et al. Diversity of endophytic fungi isolated from *Siraitia grosvenorii*[J]. *Guihaia*, 2020, 40(5): 618–627.]
- [12] 解淑慧,邵兴锋,王可,等.柑橘采后腐烂主要致病菌的分离鉴定及丁香精油对其抑制作用研究[J]. *果树学报*, 2013, 30(1): 134–139,181. [XIE S H, SHAO X F, WANG K, et al. Isolation and identification of dominant pathogen of citrus fruit and the anti-fungal effect of clove essential oil on these fungi[J]. *Journal of Fruit Science*, 2013, 30(1): 134–139,181.]
- [13] 张方博.草莓根腐病原菌的分离鉴定及拮抗菌株的筛选[D].呼和浩特:内蒙古农业大学,2019. [ZHANG F B. Isolation and identification of pathogens of strawberry root rot and screening of antagonistic strains[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2019.]
- [14] 刘瑞玲,郇海燕,陈杭君,等.红肉火龙果采后病原菌分离鉴定与植物精油抑菌研究[J]. *农业机械学报*, 2018, 49(8): 338–345. [LIU R L, GAO H Y, CHEN H J, et al. Isolation, identification and inhibition of pathogens from red pitaya fruit during storage[J]. *Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery*, 2018, 49(8): 338–345.]
- [15] XU Y Y, WEI J Y, WEI Y Y, et al. Tea tree oil controls brown rot in peaches by damaging the cell membrane of *Monilinia fructicola*[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2021, 175: 111474.
- [16] ALVES J A V, STEFFENS C A, DA SILVA J C, et al. Quality of ‘San Andreas’ strawberries and control of gray mold with essential melaleuca oil[J]. *Journal of Food Processing and Preservation*, 2022, 46(1): e16130.
- [17] 魏景超.真菌鉴定手册[M].上海:上海科学技术出版社,1979. [WEI J C. Fungal identification manual[M]. Shanghai: Shanghai Scientific & Technical Publishers, 1979.]

- [18] 王准,李文君,魏春艳,等.从进境桃中分离美澳型核果褐腐病菌的检疫鉴定[J].中国口岸科学技术,2021,3(6):4-9. [WANG Z, LI W J, WEI C Y, et al. Isolation and identification of *Monilinia fructicola* (Winter) honey from imported peach[J]. China Port Science and Technology, 2021, 3(6): 4-9.]
- [19] 杜小龙,李建龙,刘影,等.水蜜桃采后防腐、保鲜与贮藏研究进展[J].食品安全质量检测学报,2017,8(9):3295-3303. [DU X L, LI J L, LIU Y, et al. Research progress of antisepsis, preservation and storage of postharvest juicy peach[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2017, 8(9): 3295-3303.]
- [20] 朱小琼,段维军,胡勤郡,等.核果和仁果褐腐病原菌研究进展[J].菌物学报,2022,41(3):331-348. [ZHU X Q, DUAN W J, HU M J, et al. Research progress on brown rot pathogens of stone and pome fruit[J]. Mycosystema, 2022, 41(3): 331-348.]
- [21] 王晓钊,黄明明,王玉宁,等.1-辛烯-3-醇防治采后桃果实软腐病的作用[J].微生物学报,2022,62(12):4878-4893. [WANG X Z, HUANG M M, WANG Y N, et al. Effect of 1-octen-3-ol on soft rot of postharvest peach fruit[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2022, 62(12): 4878-4893.]
- [22] 王友升,张燕,陈玉娟.5株桃、李果实采后褐腐病菌鉴定、rDNA ITS序列与碳源代谢指纹图谱分析[J].食品科学,2012,33(16):246-250. [WANG Y S, ZHANG Y, CHEN Y J. Identification, rDNA ITS analysis and carbon metabolic fingerprinting of five *Monilinia fructicola* strains isolated from postharvest peach and plum fruits[J]. Food Science, 2012, 33(16): 246-250.]
- [23] OZKILINC H, YILDIZ G, SILAN E, et al. Species diversity, mating type assays and aggressiveness patterns of *Monilinia* pathogens causing brown rot of peach fruit in Turkey[J]. European Journal of Plant Pathology, 2020, 1(1): 799-814.
- [24] 纪兆林,谈彬,朱薇,等.我国不同产区桃褐腐病原鉴定与分析[J].微生物学通报,2019,46(4):869-878. [JI Z L, TAN B, ZHU W, et al. Identification and analysis of the peach brown rot pathogens from different peach-growing areas in China[J]. Microbiology China, 2019, 46(4): 869-878.]
- [25] FISCHER I H, DE ARRUDA M C, DE ALMEIDA A M, et al. Postharvest diseases and physicochemical characteristics of 'Régis' peach produced in Presidente Prudente-SP[J]. Semina: Ciências Agrárias (Londrina), 2010, 31(3): 627-632.
- [26] 田一鸣,张旭,陆祥柳,等.桃、李采后主要侵染性病害及其防控方法[J].中国果菜,2022,42(6):13-19. [TIAN Y M, ZHANG X, LU X L, et al. Main infectious diseases of peach and plum after harvest and their control methons[J]. China Fruit & Vegetable, 2022, 42(6): 13-19.]
- [27] JUGREET B S, SUROOWAN S, RENGASAMY R K, et al. Chemistry, bioactivities, mode of action and industrial applications of essential oils[J]. Trends in Food Science & Technology, 2020, 101: 89-105.
- [28] DIMA C, DIMA S. Essential oils in foods: Extraction, stabilization, and toxicity[J]. Current Opinion in Food Science, 2015, 5: 29-35.
- [29] 郭小磊.草莓采后腐败菌的致病规律及抑菌研究[D].石家庄:河北科技大学,2016. [GUO X L. Study on the pathogenic mechanism & control of spoilage fungi on postharvest strawberry [D]. Shaijiazhuang: Hebei University of Science & Technology, 2016.]
- [30] 邱夕兰.植物精油对桃果果生链核盘菌的抑制机理及抑菌效果研究[D].乌鲁木齐:新疆大学,2021. [QIU X L. Inhibitory mechanism and effect of plant essential oil on *Monilinia fructicola* [D]. Urumqi: Xinjiang University, 2021.]
- [31] 杜小琴.植物精油对甜樱桃采后病原真菌的抑制作用及其贮藏效果研究[D].成都:四川农业大学,2016. [DU X Q. Inhibition of postharvest pathogens by essential oils and their effect on storage quality of sweet cherry [D]. Chengdu: Sichuan Agricultura University, 2016.]