

doi:10.11937/bfyy.20170861

蓝莓果实潜伏侵染病原真菌的分离与鉴定

秦士维, 夏秀英, 安利佳

(大连理工大学 生命科学与技术学院, 辽宁 大连 116024)

摘要:以辽宁省蓝莓鲜果为试材,采用组织分离法分离潜伏侵染果实的病原真菌,通过形态学和分子生物学方法,对病原菌进行分类鉴定,研究了真菌的潜伏侵染状况,为指导蓝莓果实病害防治提供参考依据。结果表明:辽宁省蓝莓果实普遍存在真菌潜伏侵染现象,不同品种带菌率存在差异,‘M7’带菌率较高,“布里吉塔”“爱国者”“奥尼尔”和“南好”带菌率较低。从8个蓝莓品种中共分离鉴定出9种潜伏病原真菌,分别为互隔交链孢霉(*Alternaria alternata*)、细极链格孢菌(*Alternaria tenuissima*)、芽枝霉属(*Cladosporium* sp.)、灰葡萄孢菌(*Botrytis cinerea*)、黑曲霉(*Aspergillus niger*)、嗜松青霉(*Penicillium pinophilum*)、茎点霉属(*Phoma* sp.)、毛壳属(*Chaetomium* sp.)和镰刀菌属(*Fusarium* sp.)。其中,互隔交链孢霉(*Alternaria alternata*)可在多个品种中分离,为蓝莓果实主要潜伏侵染病原真菌。另外,从蓝莓果实中分离到一株葡萄有孢汉逊酵母(*Hanseniaspora uvarum*),该酵母对互隔交链孢霉具有良好的抑制作用。

关键词:蓝莓;潜伏侵染;病原真菌;分离;鉴定

中图分类号:S 436.639 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)18-0041-08

蓝莓(*Vaccinium* spp.)属杜鹃花科越橘属小浆果类果树^[1],又名越橘,蓝莓果实风味独特,富含花青素、抗坏血酸、酚类、鞣质等成分^[2],具有抗

衰老和抗氧化损伤^[3]、预防泌尿系统感染和癌症等医疗保健功效^[4]。近年来,蓝莓在世界范围内的栽培面积不断扩大,截至2015年,我国蓝莓栽培面积达31 210 hm²,总产量达43 244 t^[5]。作为新兴果品,蓝莓鲜果消费量持续增加,售价也较高,具有广阔的市场前景和巨大的经济效益。蓝莓果实皮薄肉软,含水量高,且存在明显的果蒂痕,极易发生微生物侵染,引起果实腐烂及品质变

第一作者简介:秦士维(1991-),男,硕士研究生,研究方向为植物真菌病害。E-mail:860758110@qq.com

责任作者:夏秀英(1972-),女,博士,副教授,研究方向为植物生理与分子生物学。E-mail:xx47@dlut.edu.cn

收稿日期:2017-04-11

controlled neither spray water or spray fertilizer production rate was the highest, reached to 13.7%, which could increase 44.5 kg per 667 m². During the later ripe, the spray fertilizer treatment of sucrose synthase and sucrose phosphate synthase were higher than CK, with the biogas slurry spraying volume fraction increasing, sucrose content increased; sucrose content and the activity of sucrose synthase and sucrose phosphate synthase were extremely significant positive correlated, the correlation coefficient was 0.648, 0.530 ($P < 0.01$), on the basis of that, the synthesis of sucrose in the process of mature of ‘Fuji’ apples might be mainly regulated by sucrose synthase and sucrose phosphate synthase. And spraying biogas slurry on the leaf could increase its activity in the late mature, thus improved the sucrose content in apple fruit.

Keywords: biogas slurry; apple; yield; quality; invertase activity

化^[6],不仅限制了鲜果贮运和货架期,也造成了巨大的经济损失,还存在一定的食品安全隐患,因此采后病害已成为蓝莓鲜果产业发展的瓶颈。

微生物侵染是造成果实贮藏期腐败变质的最主要原因^[7],而引起采后病害的病原菌有些在果实发育期间侵入,但由于寄主或环境条件的限制,暂时停止生长活动,寄主也不表现症状,待果实采收后,有利于病原菌活动的条件出现,潜伏的病菌开始生长和扩展,使果实发病腐烂^[8]。目前,在果树和农作物上已发现 16 种病原菌存在潜伏侵染^[9]。已报道的蓝莓采后真菌病害主要有链核盘菌属(*Monilinia*)、拟茎点霉(*Phomopsis*)、灰葡萄孢菌(*Botrytis cinerea*)、链格孢属(*Alternaria* sp.)、炭疽菌(*Colletotrichum acutatum*)等^[10-14]。其中,链核盘菌属、链格孢属和拟茎点霉属在许多果实上存在潜伏侵染^[15-17],但在蓝莓果实中是否存在潜伏侵染尚不清楚。

辽宁省蓝莓种植面积、产量及品质均居全国前列,其鲜果销售占产量的 90%。由于不同种植区,不同蓝莓品种,病害种类也不完全相同^[18],目前尚鲜有对辽宁省蓝莓果实潜伏侵染病害种类及危害程度的调查研究。因此,开展辽宁省蓝莓果实的潜伏侵染病害研究,对指导蓝莓果实病害防治,延长蓝莓货架期,减少经济损失具有重要意义。该研究以辽宁省大连市及丹东市采集的新鲜蓝莓为试验材料,进行果实潜伏病原真菌的分离、纯化、鉴定,明确病菌种类,了解其侵染状况,以期对蓝莓采后病害有效防治提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试蓝莓果实采自大连蓝源农业科技开发有限公司位于大连市城子坦和丹东的蓝莓种植园,品种为“蓝丰”“布里吉塔”“爱国者”“南好”“M4”“北陆”“M7”及“奥尼尔”。采集成熟度基本一致、无病虫害、无机械损伤的果实为试验材料。

菌株、培养基和试剂:葡萄有孢汉逊酵母(*Hanseniaspora uvarum*)为大连理工大学生物工程研究室分离并保存。马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)、酵母浸出粉胨葡萄糖培养基(YPD)、真菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒均购自生工生

物工程(上海)股份有限公司;PCR 扩增试剂(2× Easy Tap Super Mix)购自北京全式金生物技术有限公司;PCR 扩增引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

试验仪器:冷冻离心机(Sorvall Legend Micro 17R,美国 Thermo Fisher Scientific 公司);PCR 仪(TP600,宝生物(大连)有限公司);电泳仪(DYY-BC 型,北京六一仪器厂);凝胶成像系统(G:BOX-F3,英国 Syngene 公司);超净工作台(CA-1390,上海上净设备有限公司);电热恒温培养箱(DHP-9082,上海一恒有限公司);高压灭菌锅(ES-315,日本 Tomy 公司);倒置荧光显微镜(LX-71,日本 Olympus 公司);水浴锅(DK-98-II,天津泰斯特仪器有限公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 病原菌的分离纯化

将蓝莓果实用自来水冲洗干净,自然晾干,于超净工作台用灭菌刀片将果实切成 2~4 块,把组织块移入 70% 的酒精中浸泡 30 s,取出后用灭菌滤纸吸干酒精,再移入 1% 的次氯酸钠溶液浸泡 1 min,取出用无菌水清洗 3 次,灭菌滤纸吸干组织块,植入 PDA 培养基中,使果肉部分接触培养基,28℃ 恒温培养 3~7 d。检查带菌组织块数量,计算带菌率^[19]。带菌率(%)=带菌组织块数/总分离组织块数×100。待培养基上长出菌落后,用接种环挑取菌落边缘的菌丝,平板划线法反复分离、纯化,直至菌落的生长状态和形态特征表现一致,纯化的菌落于 4℃ 保存。

1.2.2 分离菌株的致病性确定

用纯化后的菌株制作浓度为 1×10^5 cfu·mL⁻¹ 的孢子液^[20]。无菌条件下,用移液枪枪头在蓝莓果蒂处打孔,将上述各分离菌的孢子液接种到果蒂打孔处,每种孢子液一次接种 6 颗蓝莓,接种后移入灭菌平板中封口膜封口,26℃ 恒温培养 3~5 d,重复 3 次。观察、记录蓝莓接种后的发病速度和状态,判断菌株对蓝莓的致病能力。根据柯赫法则比较发病蓝莓上分离的菌株与所接种菌株的菌落形态是否一致,若一致则确定为蓝莓的潜伏侵染病原真菌。

1.2.3 分离菌株的形态学鉴定

纯化后的病原菌培养 5~10 d 后,观察菌株

的菌落形态。挑取每种菌株少量孢子或菌丝,显微镜下观察各菌株分生孢子及孢子梗的形状,孢子纵横隔膜数目等,参照《真菌鉴定手册》^[21]和《真菌病害诊断》^[22],初步鉴定病原菌的种属。

1.2.4 分离菌株的分子生物学鉴定

取适量菌体,液氮研磨至细粉,用真菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒提取 DNA, -20℃ 保存待用。用扩增真菌核糖体 DNA 转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS) 的通用引物^[23](ITS1: 5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3'和 ITS4: 5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3')进行扩增。PCR 反应体系(50 μL): 模板 DNA 2 μL, 上、下游引物各 2 μL, 超纯水 19 μL, 2×Easy Tap Super Mix 25 μL。PCR 扩增程序: 94℃ 预变性 3 min; 94℃ 变性 30 s, 55℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 循环 30 次; 72℃ 终延伸 10 min。取 5 μL 扩增产物, 电泳检测目的条带。其余产物送生工生物工程(上海)股份有限公司测序, 所得序列在 NCBI 数据库中进行 BLAST 同源性检索, 采用 MEGA 5.1 软件对同源序列与目的序列进行比对, 构建系统进化树, 分析亲缘关系。

1.2.5 葡萄有孢汉逊酵母对互隔交链孢霉的抑制试验

改进 TOLAINI 等^[24]的方法, 制备浓度为 1.0×10^6 、 1.0×10^7 、 1.0×10^8 cfu · mL⁻¹ 的酵母悬浮液, 分别吸取 200 μL, 均匀涂布于 PDA 培养

基上, 涂布等量无菌水作为对照, 放置 2 h。用直径 6 mm 的打孔器从培养 8 d 的病原菌互隔交链孢霉(*Alternaria alternata*) 上打孔获得菌饼, 将菌饼置于上述涂有不同浓度酵母悬浮液的 PDA 平板中央。28℃ 恒温培养 3 d 后, 测量病原菌菌落直径, 每处理重复 3 次, 按下式计算抑菌率。抑菌率(%) = (对照平板病原菌直径 - 处理平板病原菌直径) / (对照平板病原菌直径 - 接种时病原菌菌饼直径) × 100。

1.3 数据分析

采用 Origin 7.5 软件对数据进行显著性分析, $P < 0.05$ 作为差异显著性判断标准。

2 结果与分析

2.1 蓝莓果实带菌情况检测

由图 1 可知, 8 个品种蓝莓果实中均存在真菌的潜伏侵染现象, 但不同品种带菌率存在差异, 其中‘M7’最高, 达到 54.33%, 与其它品种差异显著; 其次为“蓝丰”和“北陆”, 分别为 40.33% 和 35.17%, 2 个品种间差异不显著, 与其它品种差异显著; ‘M4’、“爱国者”“布里吉塔”“奥尼尔”和“南好”带菌率较低, 分别为 29.67%、27.17%、26.25%、25.33% 和 25.17%, 5 个品种间差异不显著。表明‘M7’“蓝丰”和“北陆”较易受到真菌的潜伏侵染, 应注意提前防治。

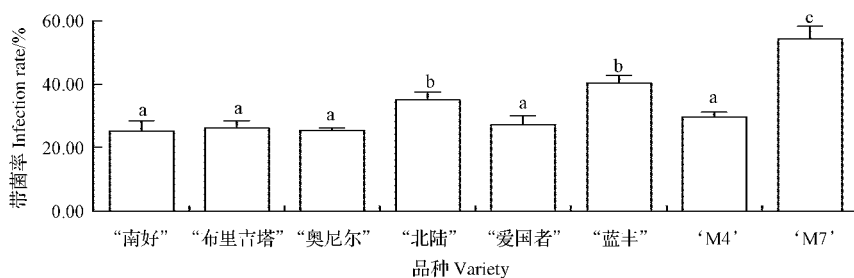


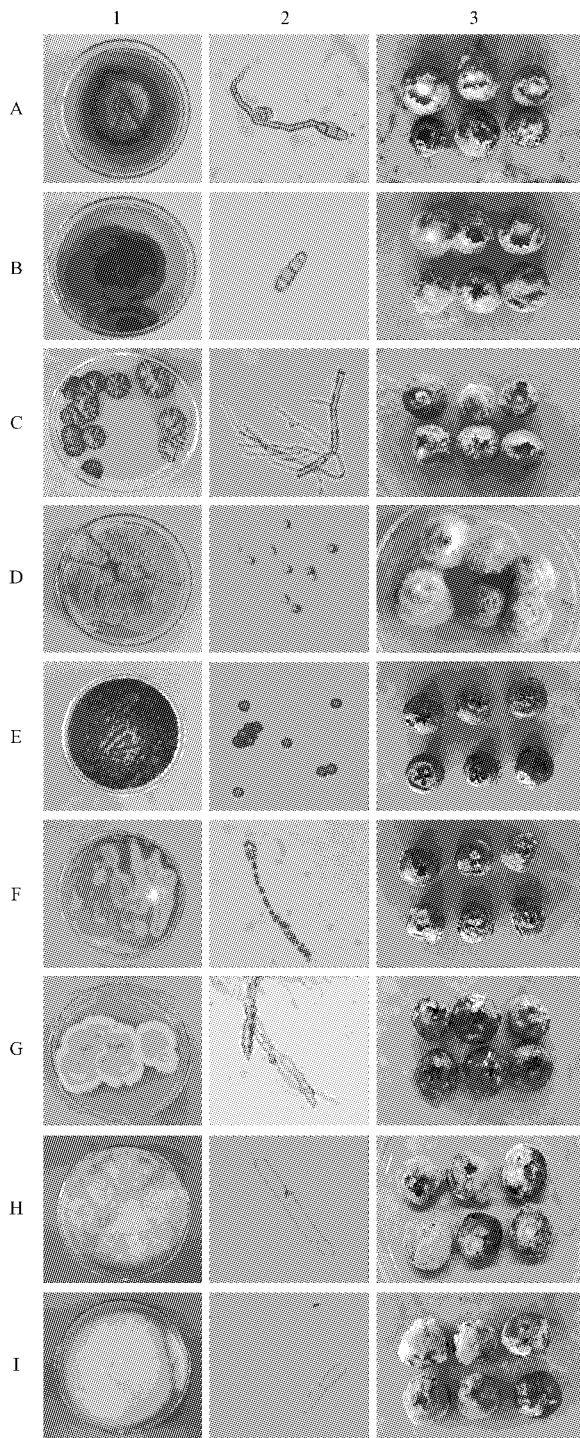
图 1 不同品种蓝莓果实带菌率比较

Fig. 1 Comparison of rate of latent infection fungi in different blueberry cultivars

2.2 蓝莓果实真菌分离纯化与致病性

从 8 个品种蓝莓果实中共分离纯化出 10 株形态差别比较明显的真菌(菌株 A~J), 其中 9 株(菌株 A~I)对蓝莓果实具有致病性, 接种后导致蓝莓果实霉变或干瘪皱缩(图 2)。菌株接种果实

3 d 后的发病率达到 100%, 判定这 9 种真菌为蓝莓潜伏侵染病原真菌。在‘M4’‘M7’“爱国者”“蓝丰”“北陆”“南好”和“布里吉塔”7 个品种中均能分离到菌株 A。可见, 该菌为蓝莓果实主要潜伏侵染病原真菌。



注: A~I. 分离菌株; 1. 分离菌株菌落形态; 2. 分离菌株显微形态; 3. 分离真菌接到蓝莓果实后的发病情况。

Note: A—I. Nine isolated fungi strains; 1—3. The colonial morphology, micro-morphology and the pathogenicity, respectively.

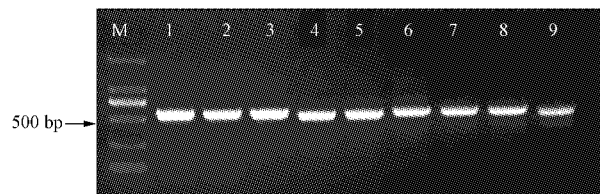
图2 分离真菌的菌落形态、显微形态及致病性测定

Fig. 2 Colonial morphology, micro-morphology and its pathogenicity of nine isolated fungi strains

2.3 病原真菌的鉴定

观察记录 9 株病原真菌在培养基上的菌落形态、色泽、菌丝特征, 取分生孢子或少量菌丝制成玻片, 观察记录各菌株的显微形态(图 2), 根据《真菌鉴定手册》和相关文献^[25-29]对病原菌进行形态学初步鉴定, 结果如表 1 所示。

以 9 种病原真菌 DNA 为模板, 扩增 ITS 区序列, 各菌株均获得约 500 bp 的单一片段(图 3)。测序后, 将所得序列在 NCBI 数据库中进行核酸序列比对, 得到与目标序列同源性和覆盖率较高的相似序列, 用软件 MEGA 5.1 以 Neighbor-Joining 分析法进行系统发育进化树的构建, 结果见图 4。



注: M. Marker DL 2 000; 1~9. 菌株 A~I。

Note: M. Marker DL 2 000; 1—9. Fungi strains A—I.

图3 分离菌株 ITS 区扩增产物

Fig. 3 ITS amplification products of isolated stains

菌株 A 的 ITS 序列与 KF644350.1 (NCBI 登录号) 菌株序列同源性达到 100%, 系统进化树分析结果显示, 菌株 A 与互隔交链孢霉 (*Alternaria alternata*) 同源性最近, 且菌株 A 形态特征与互隔交链孢霉基本一致, 因此确定菌株 A 为互隔交链孢霉。菌株 B 与 AB369458.1 的序列同源性达到 100%, 系统进化分析显示其与细极链格孢菌 (*Alternaria tenuissima*) 亲缘关系最近, 且菌株形态特征与细极链格孢菌基本一致, 因此确定菌株为细极链格孢菌。菌株 A 与菌株 B 以 100% 的置信度聚在一支上, 都属于链格孢属。菌株 C 与 KU527799.1 序列同源性达到 99%, 与芽枝霉属 (*Cladosporium* sp.) 在进化树上位于同一分支, 结合形态学鉴定结果, 确定菌株 C 为芽枝霉属。菌株 D 与 KR055050.1 的序列同源性达到 99%, 与灰葡萄孢菌 (*Botrytis cinerea*) 位于同一分支, 结合形态学特征, 确定菌株 D 为灰葡萄孢菌。菌株 E 与 GU951769.1 序列相似性为 99%,

结合形态学鉴定结果,确定其为黑曲霉(*Aspergillus niger*)。菌株 F 与 AF176660.1 序列相似性为 99%,与嗜松青霉(*Penicillium pinophilum*)在进化树上属同一分支,结合形态学特征,判断为嗜松青霉。菌株 G 与 JX401978.1 序列同源性达到 99%,为茎点霉属(*Phoma* sp.)。

菌株 H 与 KT224780.1 序列同源性达到 99%,结合形态学特征,判断属于毛壳属(*Chatetomium* sp.)。菌株 I 与 KU950736.1 同源性达到 99%,结合形态学特征,判断为镰刀菌属(*Fusarium* sp.)。

表 1 分离菌株形态特征

Table 1 Morphology of nine isolated pathogenic fungi

菌株 Fungi strains	菌株形态 Colonial morphology	孢子特征 Spore morphology	鉴定结果 Identification results
A	菌落棉絮状,初期无色,后期为灰色至青褐色,背面颜色逐渐加深至暗褐色	分生孢子短链生,倒棍棒形、卵形,横隔膜 1~5 个	互隔交链孢霉 (<i>Alternaria alternata</i>)
B	菌落初期为浅褐色或绿色,后期至深褐色,背面有不明显的同心轮纹	分生孢子单生或链生,横隔膜 2~3 个	细极链格孢菌 (<i>Alternaria tenuissima</i>)
C	菌落圆形,橄榄绿色,中央略突起,辐射状纵脊,外端环形隆起,边缘平坦,基质菌丝黑色	孢子卵形、椭圆形,孢子梗直立偶有分支,丛生,5 根以上	芽枝霉属 (<i>Cladosporium</i> sp.)
D	菌落灰白色绒毛状,后期变成深灰色,孢子生成后颜色加深,后期呈淡褐色或黑色,菌落背面初期浅灰色,后期褐色	分生孢子卵圆形单胞,无色或淡褐色	灰葡萄孢菌 (<i>Botrytis cinerea</i>)
E	菌落黑色粉状,菌落会扩展到整个培养基,菌落背面浅黄色	分生孢子球形,褐色	黑曲霉 (<i>Aspergillus niger</i>)
F	菌株茸毛状,大量孢子在黄色至橙红色菌丝体上作暗绿色,背面紫红色,有明显的褶皱	分生孢子椭圆形、球形,串珠状排列	青霉属 (<i>Penicillium</i> sp.)
G	菌株棉絮状,菌丝初期白色后转为灰褐色,有明显环痕,菌落背面初期浅褐色后期深褐色	分生孢子梗粗大,在基部和顶端分枝,分生孢子纺锤形,无色	茎点霉属 (<i>Phoma</i> sp.)
H	菌落浅褐色,有灰白色或橄榄褐色气生菌丝,菌落边缘常呈不整齐的波裂状,子囊棍棒状内有子囊孢子	孢子柠檬形,两侧扁,两端各具一细尖	毛壳属 (<i>Chatetomium</i> sp.)
I	菌落绒状或棉絮状,菌丝生长迅速,初期为白色后淡粉色,背外层白色,内层暗红色	孢子微弯或弯曲显著,镰刀形,无色,具隔膜	镰刀菌属 (<i>Fusarium</i> sp.)

2.4 葡萄有孢汉逊酵母对互隔交链孢霉的抑制效果

经鉴定,该研究从蓝莓果实中分离出的菌株 K 为葡萄有孢汉逊酵母(*Hanseniaspora uvarum*)。葡萄有孢汉逊酵母多被用作生防菌,对灰葡萄孢菌^[30]、辣椒炭疽菌^[31]等多种病原菌具有抑制作用。该研究检测了该酵母对蓝莓主要潜伏病原真菌互

隔交链孢霉(*Alternaria alternata*)的抑制效果,如表 2 所示,该株葡萄有孢汉逊酵母对互隔交链孢霉具有一定的抑制作用,且 1.0×10^8 cfu · mL⁻¹的酵母悬浮液对链孢霉的抑制效果最明显,抑制率为 86.04%,酵母悬液浓度降低,抑制率也随之降低。因此,可考虑将该酵母用于蓝莓采后病害的生物防治。

表 2 不同浓度酵母悬液对互隔交链孢霉的抑制效果

Table 2 Effects of different concentrations of yeast suspensions on *Alternaria alternata*

酵母菌悬液浓度 Yeast suspensions concentration/(cfu · mL ⁻¹)	抑制率 Inhibition rate/%
1.0×10^8	86.04±2.05b
1.0×10^7	79.92±1.27b
1.0×10^6	66.05±2.00a

注:不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

Note: Different lowercase letters indicate significant difference at 0.05 level.

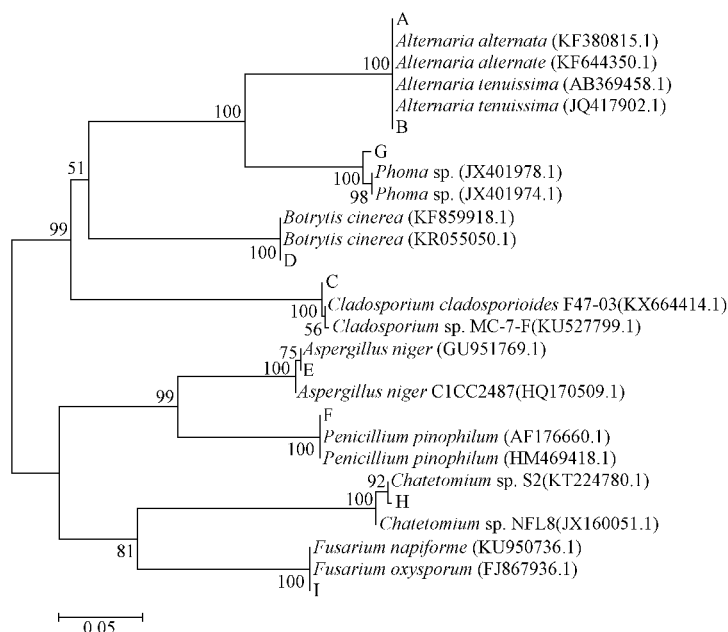


图4 以 ITS-rDNA 基因序列为分子标记的真菌菌株系统进化分析

Fig. 4 Phylogenetic analysis of fungi based on ITS-rDNA sequence

3 讨论

潜伏侵染是病原菌侵入到寄主组织后不会立即发病,而要等到寄主或环境条件适宜才表现症状的一种侵染现象。病原的潜伏侵染已被认识许多年,迄今在果树和农作物等 21 种寄主上已发现 16 种病原存在潜伏侵染^[32]。该研究对辽宁省蓝莓果实进行了潜伏侵染真菌的分离及鉴定研究,结果表明,辽宁省蓝莓普遍存在真菌的潜伏侵染现象,且不同品种带菌率存在差异,‘M7’带菌率较高,“布里吉塔”“爱国者”“奥尼尔”和“南好”带菌率较低,这可能与不同品种的抗病性有关。该研究结果对蓝莓抗病育种具有重要的指导作用。

该研究从 8 个品种中共鉴定出 9 种潜伏病原真菌,分别是互隔交链孢霉(*Alternaria alternata*)、细极链格孢菌(*Alternaria tenuissima*)、芽枝霉属(*Cladosporium* sp.)、灰葡萄孢菌(*Botrytis cinerea*)、黑曲霉(*Aspergillus niger*)、嗜松青霉(*Penicillium pinophilum*)、茎点霉属(*Phoma* sp.)、毛壳属(*Chatetomium* sp.)、镰刀菌属(*Fusarium* sp.)。链格孢属和拟茎点霉属在许多果实上存在潜伏侵染,曲霉、镰刀菌属在芒果、香蕉中也具有潜伏侵染特性^[33-34]。该研究分离出

潜伏侵染的毛壳属真菌,回接蓝莓后,初期会产生白色绒毛状的菌丝体,后期迅速在果实表皮形成一层白色或灰白色的绒毛状菌丝体。品种、栽培条件及操作环境不同,所分离的病原真菌的种类可能也不同。若增加采样数量和采样地点,分离到的潜伏侵染真菌种类可能还会进一步增加。另外,由于表面灭菌方法的影响,可能存在分离到的真菌并不是潜伏侵染病原的可能性。张居念等^[35]通过对龙眼果实不同发育时期进行潜伏病菌的组织分离,确定了拟茎点霉在花期即可侵染,而可可毛色二孢主要在龙眼果实膨大期侵染。PARIKKA 等^[36]通过 PCR 反应成功地检测到潜伏侵染草莓的炭疽菌。今后可在果实不同发育时期采集样品,或者采用组织切片法、血清学方法及酶联免疫、分子生物学等方法对潜伏侵染的病原进行检测,明确潜伏侵染病菌的来源、路径,为病害防治提供参考依据。

链格孢菌和灰葡萄孢菌是蓝莓采后常见的病原真菌,郭晓月等^[37]从澄江地区蓝莓果实中分离出了链格孢属,梁晨等^[38]、戴启东等^[39]分别在蓝莓果实中分离出链格孢菌和灰葡萄孢菌。该研究也在多个品种蓝莓果实中分离到链格孢菌(菌株 A、菌株 B)和灰葡萄孢菌(菌株 D)。可见,这 2 种

病菌发病普遍,危害严重,实际生产中应重点防治。蓝莓在盛花期最易受到灰葡萄孢菌的感染^[40],分析果实中分离的灰葡萄孢菌可能是在花期感染后潜伏于果实中的,因此在蓝莓花期有针对性地对灰葡萄孢菌进行防治,可能对蓝莓采后病害的发生具有一定的效果。

该研究从蓝莓果实中分离出一株葡萄有孢汉逊酵母(*Hanseniaspora uvarum*),研究发现,该酵母对互隔交链孢霉在平板上的抑制率可达86.04%,且抑制率随酵母悬液浓度的降低而降低。秦晓杰等^[41]研究发现,采前3 d喷施葡萄有孢汉逊酵母悬浮液可以提高草莓果实超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、多酚氧化酶(PPO)的活性,提高果实抗性,延长贮藏寿命。因此可以尝试在蓝莓花期或果实发育期,采用葡萄有孢汉逊酵母进行采前防治,以期减少采后果实发病情况,延长果实货架期。

参考文献

- [1] HÄKKINEN S H, KÄRENLAMPI S O, MARINA H, et al. Content of the flavones quercetin, myricetin, and kaempferol in 25 edible berries[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1999, 47: 2274-2279.
- [2] WILLIAMS C M, MOHSEN M A, VAUZOUR D, et al. Blueberry-induced changes in spatial working memory correlate with changes in hippocampal CREB phosphorylation and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels[J]. Free Radical Biology and Medicine, 2008, 45(3): 295-305.
- [3] DEL B C, MARTINI D, VENDRAMI S, et al. Improvement of lymphocyte resistance against H₂O₂-induced DNA damage in Sprague-Dawley rats after eight weeks of a wild blueberry (*Vaccinium angustifolium*)-enriched diet[J]. Mutation Research Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 2010, 703(2): 158-162.
- [4] NETO C C. Cranberry and blueberry: Evidence for protective effects against cancer and vascular diseases[J]. Molecular Nutrition and Food Research, 2007, 51(6): 652-664.
- [5] 李亚东,孙海悦,陈丽. 我国蓝莓产业发展报告[J]. 中国果树, 2016(5): 1-10.
- [6] PRITTS M P, HANCOCK J F. High bush blueberry production guide[M]. New York: Northeast Regional Agricultural Engineering Service, 1992: 4-7.
- [7] JANISIEWICZ W, CONWAY W S. Combining biological control with physical and chemical treatments to control fruit decay after harvest[J]. Stewart Postharvest Review, 2010, 6(1): 1-16.
- [8] 李传道,周仲铭,鞠国柱. 森林病理学通论[M]. 北京: 中国林业出版社, 1985: 123-125.
- [9] REDLIN S C, CARRIS L M. Endophytic fungi in grasses and woody plants: systematics, ecology, and evolution[M]. MN: American Phytopathological Society, 1996: 3-31.
- [10] GOSCH C. Mummy berry disease (*Monilinia vaccinii-corymbosi*) on highbush blueberries in Europe[J]. International Society for Horticultural Science, 2006, 715: 469-472.
- [11] FARR D F. Morphological and molecular characterization of *Phomopsis vaccinii* and additional isolates of *Phomopsis* from blueberry and cranberry in the eastern United States[J]. Mycologia, 2002, 94(3): 494-504.
- [12] KWON J H, CHOI O. First report of *Botrytis cinerea* as a postharvest pathogen of blueberry in Korea[J]. Mycobiology, 2011, 39(1): 52-53.
- [13] MARIANA V G, PATRIARCA A, TERMINIELLO L, et al. Toxigenic *Alternaria* species from Argentinean blueberries[J]. International Journal of Food Microbiology, 2012, 154(3): 187-191.
- [14] JAMES J P, MARK K E, ALLAN W S, et al. Anthracnose fruit rot resistance in blueberry cultivars[J]. Plant Disease, 2005, 89(1): 33-38.
- [15] THOMAS T. Influence of relative virulence and latent infections on the development of *Monilinia* to Greek peach orchards[J]. Crop Protection, 2017, 94: 159-165.
- [16] PEARSON R C, HALL D H. Factors affecting the occurrence and severity of blackmold of ripe tomato fruit caused by *Alternaria alternata*[J]. Phytopathology, 1975, 65: 1352-1359.
- [17] WILLIAMSON P M, SIVASITHAMPARAM K, COWLING W A. Formation of subcuticular coralloid hyphae by *Phomopsis leptostromiformis* upon latent infection of narrow-leaved lupins[J]. Plant Disease, 1991, 75: 1023-1026.
- [18] 周笑犁,王瑞,雷霖卿,等. 蓝莓采后病原真菌分离及其生物学鉴定[J]. 食品科技, 2015, 40(9): 283-293.
- [19] 胡美姣,高兆银,李敏. 杜果果实潜伏侵染真菌种类研究[J]. 果树学报, 2012, 29(1): 105-110.
- [20] 宋聪,黄亚丽,谢晨星. 河北省冬枣黑斑病原菌的分离鉴定及生物防治初探[J]. 微生物学杂志, 2016, 36(5): 85-89.
- [21] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979: 501-547.
- [22] 陆家云. 真菌病害诊断[M]. 2版. 北京: 中国农业出版社, 1997.
- [23] NOVICKI T J, LAKE K, BUI L. Genetic diversity among clinical isolates of *Acremonium strictum* determined during an investigation of a fatal mycosis[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2003, 41(6): 2623-2628.
- [24] TOLAINI V, ZJALIC S, REVERBERI M. *Lentinula edodes* enhances the biocontrol activity of *Cryptococcus laurentii* against *Penicillium expansum* contamination and patulin production in apple fruits international[J]. Journal of Food Microbiology, 2010,

138;243-249.

[25] ZHU X Q, XIAO C L. Phylogenetic, morphological, and pathogenic characterization of *Alternaria* species associated with fruit rot of blueberry in California[J]. *Etiology*, 2015, 105(12): 1555-1567.

[26] 雷桂林, 刘云龙, 刘雪峰. 雪松针叶枯斑病原鉴定及其生物学特性研究[J]. *林业科学研究*, 2003, 24(5): 69-72.

[27] SANZANI S M, SCHENA L, CICCIO V D, et al. Early detection of *Botrytis cinerea* latent infections as a tool to improve postharvest quality of table grapes[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2012, 68(6): 64-71.

[28] 许晴晴. 香芹酚对蓝莓采后病害抑制和贮藏品质的影响研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2014.

[29] VON A J A. The Ascomycete genus *Chaetomium* [M]. Berlin: Cramer J, 1986: 1-162.

[30] QIN X J, XIAO H M, XUE C H, et al. Biocontrol of gray mold in grapes with the yeast *Hanseniaspora uvarum* alone and in combination with salicylic acid or sodium bicarbonate[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2015, 100: 160-167.

[31] BASHA H, RAMANUJAM B. Growth promotion effect of *Pichia guilliermondii* in chilli and biocontrol potential of *Hanseniaspora uvarum* against *Colletotrichum capsici* causing fruit rot[J]. *Biocontrol Science and Technology*, 2015, 25(2): 185-206.

[32] 刘艳, 叶建仁. 植物病害潜伏感染研究进展[J]. *南京林业大*

学学报, 2000, 24(5): 69-72.

[33] 刘秀娟, 李继勇, 杨业铜. 海南岛芒果果实真菌潜伏感染的研究[J]. *植物病理学报*, 1986, 16(1): 47-51.

[34] 胡美姣, 张令宏, 杨凤珍. 香蕉果实潜伏感染真菌研究[J]. *中国果实*, 2004(5): 6-8.

[35] 张居念, 林河通, 谢联辉. 龙眼果实潜伏性病原真菌的初步研究[J]. *热带作物学报*, 2006, 7(4): 78-82.

[36] PARIKKA P, LEMMETTY A. Tracing latent infection of *Colletotrichum acutatum* on strawberry by PCR [J]. *European Journal of Plant Pathology*, 2004, 110: 393-398.

[37] 郭晓月, 丁雅迪, 邓佳. 蓝莓贮藏期病原真菌的分离与鉴定[J]. *北方园艺*, 2015(24): 104-108.

[38] 梁晨, 刘翠, 赵洪海. 蓝莓贮藏期病原菌的鉴定及病菌的温度效应[C]//彭友良, 王宗华. 中国植物病理学会第九届全国会员代表大会暨 2010 年学术年会. 厦门: 中国植物病理学会, 2010: 108-113.

[39] 戴启东, 李广旭, 杨华. 蓝莓采后病害的病原鉴定及发生规律的研究[J]. *果树学报*, 2016(10): 1299-1306.

[40] RIVERA S A, ZOFFOLI J P, LATORRE B A. Infection risk and critical period for the postharvest control of gray mold (*Botrytis cinerea*) on blueberry in Chile[J]. *Plant Disease*, 2013, 97(8): 1069-1074.

[41] 秦晓杰, 高梦, 蒋晓玲, 等. 采前喷施拮抗酵母菌对草莓采后贮藏性能的影响[J]. *南京农业大学学报*, 2015, 38(1): 152-160.

Isolation and Identification of Latent Pathogenic Fungi in Blueberry Fruits

QIN Shiwei, XIA Xiuying, AN Lijia

(School of life Science and Biotechnology, Dalian University of Technology, Dalian, Liaoning 116024)

Abstract: The occurrence of latent infection of pathogenic fungi in blueberry fruits from Liaoning Province was researched. The fresh blueberry fruits were used as materials, using the tissue isolation method, latent pathogenic fungal were isolated. Morphology and molecular biology were used to identify the fungal species in order to provide a theoretical basis for blueberry decay control. The results showed that the latent infection of fungi was commonly found in the healthy blueberry fruits, and there existed significant difference in the latent infection rates among different cultivars. The rate of latent infection in ‘M7’ was the highest as compared to other cultivars such as ‘Brigitta’ ‘Patriot’ ‘O’Neal’ and ‘Southgood’. Nine pathogenic strains (*Alternaria alternata*, *Alternaria tenuissima*, *Cladosporium* sp., *Botrytis cinerea*, *Aspergillus niger*, *Penicillium pinophilum*, *Phoma* sp., *Chaetomium* sp., *Fusarium* sp.) which could cause blueberry decay were identified. In addition, *Alternaria alternata* was the main latent infection fungi in blueberry fruits whereas *Chaetomium* sp., a new pathogen of blueberry was reported for the first time. *Hanseniaspora uvarum* showed a strong antagonistic effect on *Alternaria alternata*.

Keywords: blueberry; latent infection; pathogenic fungi; isolation; identification