

李晓莺,朱丽珍,张曦燕,等. 枸杞鲜果采后主要病原菌分离鉴定及不同品种枸杞抗病性鉴定评价[J]. 江苏农业科学,2022,50(16):92-105.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2022.16.015

枸杞鲜果采后主要病原菌分离鉴定 及不同品种枸杞抗病性评价

李晓莺¹, 朱丽珍², 张曦燕¹, 闫亚美¹, 刘兰英¹, 米佳¹, 禄璐¹, 何军¹

(1. 宁夏农林科学院枸杞科学研究所, 宁夏银川 750002; 2. 宁夏大学农学院, 宁夏银川 750021)

摘要:枸杞是我国宝贵的“药食同源”型植物资源,我国药典收录的唯一药用枸杞植物。枸杞鲜果属于多汁小浆果,皮薄肉厚,水分含量高,采摘后容易被病原菌侵染,难以贮藏保鲜。为明确侵染不同品种枸杞鲜果的病原菌种类,采用形态学、分子生物学等 2 种方法开展枸杞鲜果采后主要病原菌的分离鉴定研究,经鉴定和致病性确定链格孢属(*Alternaria*)、葡萄孢属(*Stemphylium*)、毛霉属(*Mucor*)、曲霉属(*Aspergillus*)是枸杞鲜果的主要致病病原真菌,杆菌和沙门菌的近似属为枸杞鲜果腐烂病害的潜在生防菌,同时发现,宁杞 7 号在枸杞主栽品种中具备明显的抗病优势。以上结果可为枸杞鲜果采后腐烂病害拮抗菌的筛选和生物防治提供理论基础,也为今后枸杞及制品安全流通提供了技术保障。

关键词:枸杞鲜果;病原菌;抗病性;形态鉴定;分子生物学鉴定;生防菌;枸杞品种

中图分类号: S435.671 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2022)16-0092-14

枸杞(*Lycium barbarum* L.)是茄科枸杞属多年生落叶小灌木,广泛分布于我国西北干旱和半干旱地区,作为一种传统药物已被广泛使用了数千年^[1]。枸杞作为宁夏最具地方特色的优势产业^[2],在促进农业效益、农民增收致富中起着决定性作用^[3]。枸杞果实中含有丰富的活性物质,主要包括枸杞多糖、维生素、类黄酮、多酚等物质^[4],是理想的药食资源,在增强免疫力、防衰老、抗氧化、降血糖血脂等方面具有显著功效^[5-6]。目前,枸杞浆果干制是其主要加工方式,但制干过程中会导致大量活性成分的流失^[7]。枸杞鲜果的各种营养成分含量均比干果的高,营养价值优于干果^[8],导致近年来能够使活性成分得以最大程度保留的鲜果枸杞需求日益增大^[9]。

枸杞鲜食不仅能更加充分地发挥其清除自由基、促进代谢的功效,而且也可以降低氨基酸、类胡

萝卜素等功能性成分的流失^[10]。但是由于枸杞鲜果皮薄肉嫩,水分含量高,采后容易受致病病原真菌的侵染^[11],常温条件下果实放置 2~4 d 就会变色、变味,腐烂指数逐步上升。放置 8~10 d,果实腐烂指数迅速增加,甚至完全失去食用价值^[12-13]。但是,目前鲜果市场主要面对的难题是采后加工、运输和贮藏期间造成的腐烂而导致的重大经济损失^[14]。据相关研究表明,在发达国家鲜果采摘后损失率一般在 25% 以上,发展中国家则在 50% 以上^[15]。而造成果实采后腐烂的最主要致腐菌为病原真菌^[16-18],主要包括青霉属、链格孢属、曲霉属和木霉属等^[11]。因此,如何控制枸杞采后腐烂已成为解决鲜果枸杞产业发展的关键问题之一。

目前对导致鲜食枸杞腐烂现象的研究较少,通过研究发现,果实病害与其枸杞品种自身的抗性相关,现在枸杞的栽培品种品系很多,还是以宁杞系列枸杞为主^[19]。李捷研究发现,在接种致病力强菌尖孢镰孢菌后,抗病能力依次表现为 *L. exsertum* (枸杞属美洲野生种) > *L. brevipes* (枸杞属美洲野生种) > 宁夏枸杞 = 中国枸杞 > 黑果枸杞 > 宁杞 2 号 > 宁杞 1 号 > 宁杞 5 号。研究者通过室内和田间的炭疽病抗病性鉴定发现,宁杞 1 号和截萼枸杞是相对较抗病的品种^[20],进而说明不同枸杞品种的抗病性存在差异^[21]。此外,大量研究表明,鲜

收稿日期:2021-08-31

基金项目:宁夏自然科学基金(编号:2020AAC03287);宁夏农林科学院“十四五”农业高质量发展和生态保护科技创新示范课题(编号:NGSB-2021-2-037)。

作者简介:李晓莺(1979—),女,宁夏银川人,副研究员,研究方向为枸杞保鲜及深加工。E-mail:649808864@qq.com。

通信作者:何军,硕士,副研究员,研究方向为枸杞耕作与栽培。E-mail:706451180@qq.com。

果自身携带的生物源能诱导抗性因子的产生,这类常应用于果实采后病害生物防治的微生物因子主要包括细菌、酵母菌、类酵母菌和木霉等^[22]。张小彦等在健康枸杞植株根际土壤样品中筛选出对枸杞根腐病菌具有抑制效果的菌株,其中最高抑菌率可达到 52%,该研究结果可为有效利用微生物拮抗作用防治枸杞根腐病提供理论依据^[23]。

本研究通过分离、鉴定枸杞鲜果在贮藏保鲜过程中产生的病原菌种类,为延长枸杞鲜果的贮藏期提供科学依据;同时,通过回接的方式对不同主栽枸杞品种的抗病性展开研究,为筛选适合鲜食枸杞的品种提供理论依据;进一步在研究过程中筛选拮抗菌,对延长鲜果枸杞产业链,增加农民收入,促进枸杞产业的发展具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试果实为头茬枸杞鲜果,采自宁夏农林科学院园林场,品种为宁杞 1 号、宁杞 5 号、宁杞 7 号。挑选大小、色泽较均一,表面无明显病虫害和机械损伤且带果柄的果实放入 4℃ 冷藏保鲜备用。

1.2 仪器与设备

试验仪器主要有超净工作台(SW-GJ-2FD 型,上海坤权生物科技有限公司)、高压灭菌锅(YXQ-LS-100S II 型,上海博迅实业有限公司)、智能人工气候培养箱(ZRX-258E 型,杭州钱江仪器设备有限公司)、荧光显微镜及 DIC 微分干涉仪[BX51 型,奥林巴斯(中国)投资有限公司]、植物图像分析仪(LA-S 杭州万深探测科技有限公司)、超纯水机(AXLK-181 型,北京思普特科技有限公司)。

1.3 试验时间与地点

1.3.1 试验时间与地点 试验于 2021 年 6 月在宁夏农林科学院枸杞科学所枸杞贮藏保鲜加工实验室进行。

1.4 试验方法

1.4.1 培养基的选择 采用马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA 培养基)培养枸杞的病害组织。称取 6.0 g 马铃薯粉,20.0 g 葡萄糖,20.0 g 琼脂粉,加入 1 000 mL 蒸馏水中,调节 pH 值为 5.4~5.8;115℃ 高压灭菌 20 min,倒入培养皿中,备用。

1.4.2 病原菌分离与纯化 选取在冰箱保鲜 7 d 后呈明显发病症状的枸杞鲜果,先用 75% 乙醇溶液表面消毒后,移入超净台,用无菌镊子去除表层菌

丝,挑取 4~6 块直径约 2 mm 的内部腐烂组织,分别用无菌水漂洗后转移至同一 PDA 培养基上并均匀分布,26℃ 条件下培养 1 d。待菌株长出菌丝,立即转接到新的 PDA 平板上,继续重复此操作 3 次,直至获得菌株的纯培养。观察分离培养基平板上菌落的形态,包括形状、色泽、大小、菌丝特征。将单菌落的病原菌制片后,用复红染色后在 10、20、40 倍目镜及 100 倍油镜下观察菌丝形态、孢子形状,记录观察结果并拍照。

1.4.3 病原菌基因组精细图测序分析 提取高质量基因组 DNA,利用 Nanodrop、Qubit 和 0.35% 琼脂糖凝胶电泳进行纯度、浓度和完整性质检;BluePippin 全自动核酸回收系统回收大片段 DNA;文库构建(SQK-LSK109 连接试剂盒):包括 DNA 损伤修复和末端修复,磁珠纯化;接头连接,磁珠纯化;Qubit 文库定量;上机测序 4 个步骤。测序结果在国家生物技术信息中心(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>)的数据库中比对,将病原菌鉴定到种,明确其分类地位。

1.4.4 不同枸杞品种对病原菌的抗病性研究 分别挑选宁杞 1 号、宁杞 5 号、宁杞 7 号的优级鲜果,用 2% 次氯酸钠溶液浸泡 2 min 后用灭菌蒸馏水冲洗,转入超净台内晾干,用无菌移液枪枪头分别刺伤果实。再用移液枪吸取无菌水在 5 种菌株上吸打后,分别接种到宁杞 1 号、宁杞 5 号、宁杞 7 号的伤口处。将接种后的果实置于培养皿中保湿培养。每个处理 5 个果实,重复 3 次,定期观察接种处是否有致病性及病害症状表现。用 LA-S 植物图像分析仪进行果实病斑损害的分析,并对损害面积进行统计。

2 结果与分析

2.1 枸杞鲜果采后病害的发病症状

常温条件下,采收 1~2 d 后果表就可观察到菌丝,冷藏保存条件下 5~7 d 可观察到。通过对不同果实发病症状的观察,可将果实主要发病症状分为 4 类,4 类病斑的果实发病症状见图 1、表 1。对不同枸杞品种果实发病情况进行了调查,结果见表 1。

2.2 枸杞鲜果采后主要病原菌的分离与鉴定

根据发病症状,选择不同症状特点的病斑进行病原菌的分离和鉴定,共分离到 4 株真菌菌株和 1 株细菌菌株,其中不同真菌菌株的菌落和孢子形态描述见图 2、图 3、表 2。本研究对这 5 类菌株的形态学初步鉴定结果见表 2。



图1 枸杞果实发病症状

表 1 枸杞果实发病症状及不同品种发病情况调查

病斑种类	果实发病症状	发病情况		
		宁杞 1 号	宁杞 5 号	宁杞 7 号
I 类病斑	中间白色, 外围青绿色或黑色, 略凸, 有白色晕环	有	有	有
II 类病斑	果实轻度腐烂, 内凹, 出现白色菌丝	有	有	有
III 类病斑	病斑为灰色或黑色菌斑, 由内而外, 病斑果肉质较软	有	有	无
IV 类病斑	果实表面生少量灰白色霉层, 可向果柄扩展, 并生有厚厚的灰色霉层, 呈水腐状	有	有	无

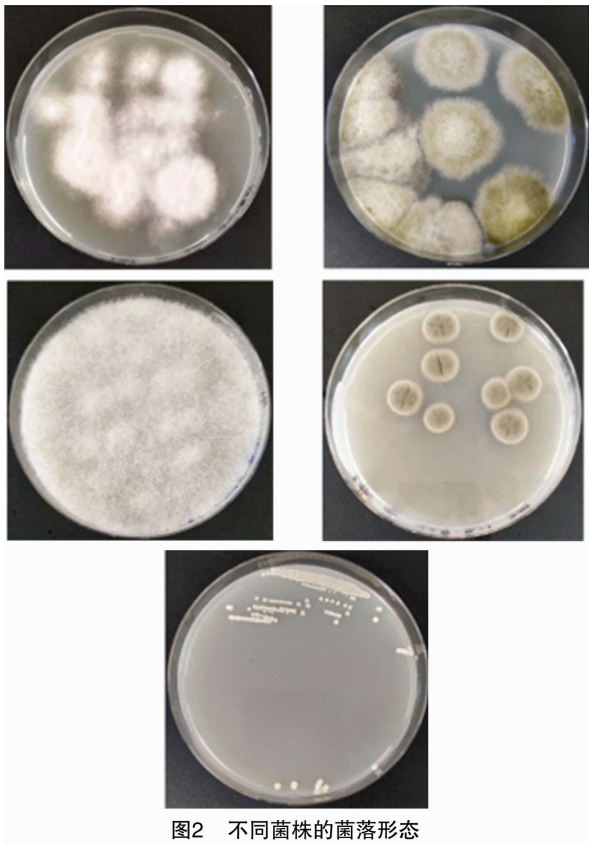


图2 不同菌株的菌落形态

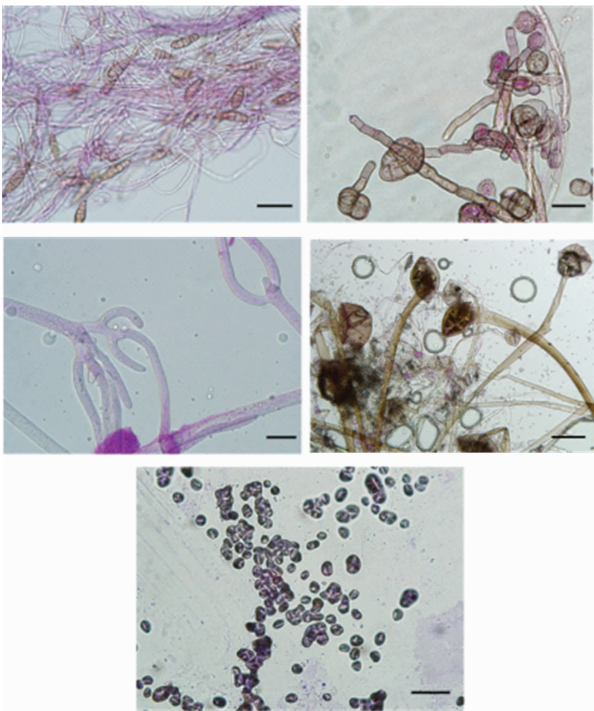


图3 不同菌株的孢子形态

2.3 病原菌的分子生物学鉴定

2.3.1 基因组测序分析 根据上述试验和分析, 由

于IV类病斑具有明显的结构特征, 霉菌上研究较多 (未送样), V类病斑有拮抗微生物潜力, 因此选择 4 类研究相对较少的菌株进行送样测序, 分别是 I 类、II 类、III 类、V 类菌株, 将 4 类菌株送到北京百迈

克生物科技有限公司进行病原菌基因组精细图测序分析。使用 NECAT 软件进行组装,最后采用 Pilon 软件利用二代数据进一步对组装基因组进行

纠错,得到最终准确度更高的基因组。4 类菌送样编号分别为 RO1、RO2、RO3、RO4。最后统计结果如表 3 所示。

表 2 枸杞不同菌株的菌落和孢子形态描述

病斑种类	菌落结构及形态特征	镜检分生孢子描述	形态学初步鉴定
I 类	菌落初期到后期一直为白色,白色晕环,不规则圆形,短绒毛	分生孢子呈深褐色,梭型,在分生孢子梗上呈链状分布,无隔	半知菌亚门丝孢纲链格孢属
II 类	短绒毛状浅绿色规则圆形菌落,菌落生长缓慢,由内而外颜色逐渐变浅	菌丝有隔,分生孢子椭圆形或圆形,分生孢子梗呈念珠状分布,有隔	半知菌亚门丝孢目葡萄霉属
III 类	菌落初期为白色,均匀分布,菌丝长而密,后期整体变黑色	病原菌分生孢子梗无隔膜,顶端分枝呈扫帚状,不对称或对称	半知菌亚门丝孢纲毛霉属
IV 类	菌落直径 1~2 cm 或更小,菌落灰色,种间有明显形状,密集的短绒毛,外观干燥	分生孢子梗顶端膨大成为顶囊,一般呈球形	半知菌亚门丝孢纲曲霉属
V 类	菌落形态与细菌相似,但较大较厚,表面湿润乳黄色、半透明状	孢子为圆形颗粒	细菌纲

表 3 基因组组装结果统计

样本	片段重叠群长度 (bp)	片段重叠群数量	连续片段 N50 (bp)	连续片段 N90 (bp)	GC 含量 (%)	未重叠序列数量
RO1	34 246 721	12	2 977 357	2 399 557	51	0
RO2	34 912 982	11	3 313 433	2 547 308	51	0
RO3	55 603 465	72	2 701 884	644 558	36	0
RO4	4 007 293	2	3 900 433	3 900 433	45	0

由于物种间重复序列的保守性相对较低,针对特定的物种进行重复序列的预测时需要构建特定的重复序列数据库。因此,借助 LTR_FINDER v 1.05、MITE – Hunter、RepeatScout v1.0.5、PILER – DF v2.4 等软件,基于结构预测和从头预测的原理构建该真菌基因组的重复序列数据库,用 PASTEC classifier 对数据库进行分类,再与 Repbase 的数据库合并作为最终的重复序列数据库,最后利用 RepeatMasker v4.0.6 软件基于构建好的重复序列数据库对该真菌进行重复序列的预测,得到 472 549 bp 的重复序列,重复序列比例为 1.38% (表 4)。

通过重复序列预测统计编码蛋白基因的数量、平均长度,以及内含子、外显子的数量和平均长度进一步确定基因组组分。确定 I 类、II 类、III 类菌为真菌菌株,V 类菌为细菌菌株。其中 3 类真菌菌株的基因基本信息见表 5。4 个菌株经基因组测序后,获得 4 个菌株的 Contig 重叠区,经重叠分析就可以得到完整的染色体基因组序列。

2.3.2 病原菌的分子鉴定 进一步从 GenBank 数据库中

表 4 重复序列预测结果统计

类型	编号	长度 (bp)	百分率 (%)
ClassI	309	198 001	0.58
ClassI/LINE	21	6 048	0.02
ClassI/LTR	1	59	0
ClassI/LTR/Copia	9	582	0
ClassI/LTR/Gypsy	199	176 050	0.51
ClassI/PLE/LARD	29	8 652	0.03
ClassI/SINE	43	2 521	0.01
ClassI/TRIM	3	721	0
ClassI/Unknown	4	3 403	0.01
ClassII	239	150 933	0.44
ClassII/Helitron	36	15 928	0.05
ClassII/MITE	30	3 226	0.01
ClassII/TIR	170	131 686	0.38
ClassII/Unknown	3	152	0
PotentialHostGene	16	3 860	0.01
SSR	108	28 724	0.08
Unknown	460	93 612	0.27
总体	672	472 549	1.38

列,与供试菌株构建系统发育树。

表 5 基因基本信息统计

样本	RO1	RO2	RO3
GeneNum	13 640	13 726	13 022
Genelen	20 953 369	21 061 907	20 072 148
AveGenlen	1 536.17	1 534.45	1 541.40
ExonLen	19 006 305	19 112 559	16 583 430
AveExonLen	536.16	535.92	290.05
ExonNum	35 449	35 663	57 175
AveExonNum	2.60	2.60	4.39
CDSLen	19 006 305	19 112 559	16 583 430
AveCDSlen	536.16	535.92	290.05
CDSNum	35 449	35 663	57 175
AveCDSNum	2.60	2.60	4.39
IntronLen	1 947 064	1 949 348	3 488 718
AveIntronLen	89.28	88.86	79.01
IntronNum	21 809	21 937	44 153
AveIntronnum	1.60	1.60	3.39

将 I 类菌基因序列测序结果 Contig00003 在 NCBI 上通过 BLAST 比对,与同源性相近的 20 个登录号序列建立系统发育树,与链格孢霉属的

Alternaria sorghi 和 *Alternaria helianthiinficiens* 对应登录号分别为 NR 160246.1 和 NR 077213.1 同源性较高,位于系统发育树的同一分支,聚为一类(图 4、表 6)。鉴定结果与形态学鉴定结果一致,结合形态鉴定结果,最终确定 I 类病原菌为链格孢霉属,具体种名还有待进一步明确。

将 II 类菌基因序列测序结果 Contig00005a 和 Contig00005b 在 NCBI 上通过 BLAST 比对,与同源性相近的 20 个登录号序列建立系统发育树,与葡萄柄霉属的 *Stemphylium carpobroti* 对应登录号为 NR 171994.1 同源性较高,位于系统发育树的同一分支,聚为一类(表 7、图 5)。鉴定结果与形态学鉴定结果一致,结合形态鉴定结果,最终确定 II 类病原菌为葡萄柄霉属,具体种名还有待进一步明确。

将 III 类菌基因序列测序结果 Contig00034a、Contig00034b、Contig00034c、Contig00034d、Contig00028a、Contig00028b、Contig00028c 在 NCBI 上通过 BLAST 比对,与同源性相近的 20 个登录号序列建立系统发育树,与卷毛霉属的 *Circinella nodulosa* 和毛霉属的

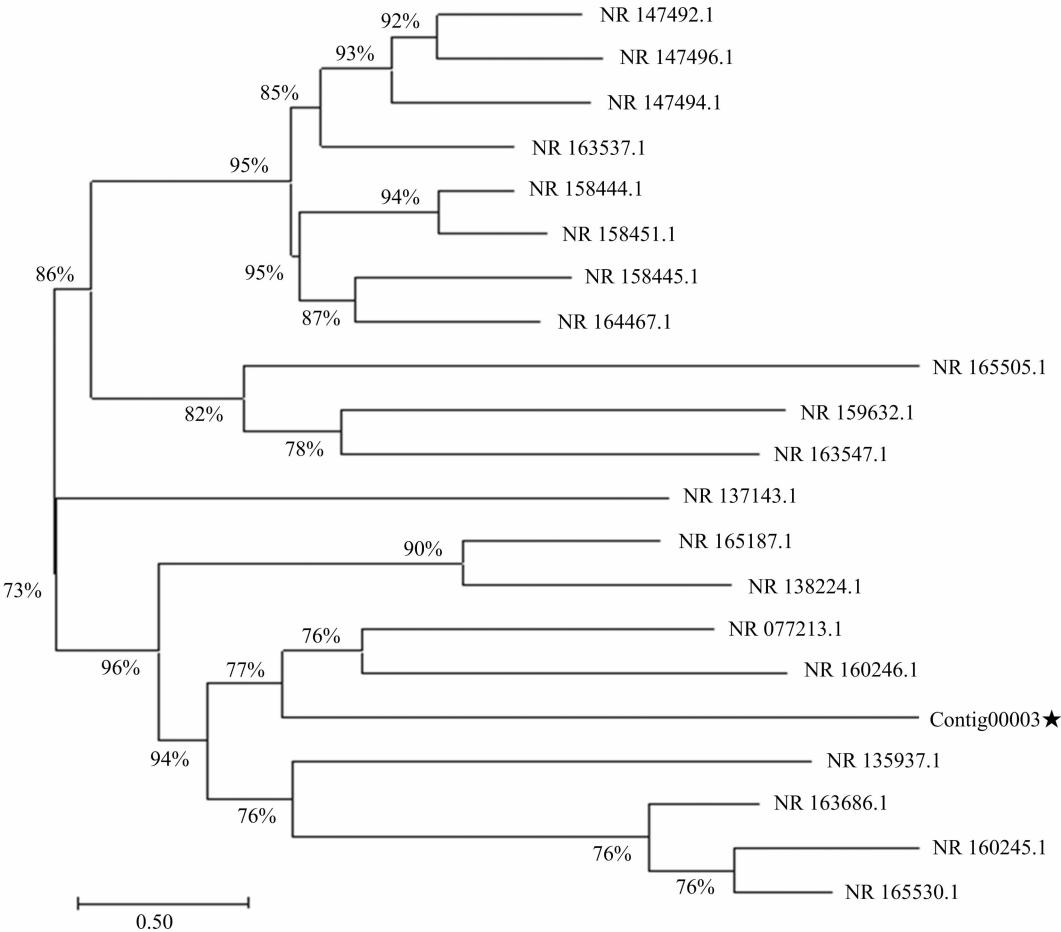


图4 菌株 RO1 基于 rDNA-ITS 序列构建的系统发育树

表 6 RO1 菌株及其近缘种比对结果与描述

描述	学名	最大分数	总分	查询范围	E 值	识别	基因片段长度 (bp)	登录号
<i>Alternaria thalictrigena</i> CBS 121712 ITS region;from TYPE material	<i>Alternaria thalictrigena</i>	1 055	1 055	0.95	0	94.71	722	NR_135937.1
<i>Cumularia kusanoi</i> CBS 137.29 ITS region;from TYPE material	单弯孢菌(<i>Cumularia kusanoi</i>)	809	809	0.95	0	88.01	753	NR_165187.1
<i>Bipolaris maydis</i> CBS 136.29 ITS region;from TYPE material	玉蜀黍平脐蠕孢菌(<i>Bipolaris maydis</i>)	780	780	0.92	0	88.06	677	NR_138224.1
<i>Bipolaris subramanianii</i> BRIP 16226 ITS region;from TYPE material	<i>Bipolaris subramanianii</i>	741	741	0.90	0	87.76	723	NR_147496.1
<i>Cumularia colbranii</i> BRIP 13066 ITS region;from TYPE material	<i>Cumularia colbranii</i>	739	739	0.90	0	87.41	713	NR_158445.1
<i>Cumularia boeremae</i> IMI 164633 ITS region;from TYPE material	<i>Cumularia boeremae</i>	737	737	0.90	0	87.43	711	NR_158451.1
<i>Cumularia coatesiae</i> BRIP 24261 ITS region;from TYPE material	<i>Cumularia coatesiae</i>	736	736	0.90	0	87.30	715	NR_158444.1
<i>Bipolaris axonopicola</i> BRIP 11740 ITS region;from TYPE material	<i>Bipolaris axonopicola</i>	732	732	0.90	0	87.54	693	NR_147492.1
<i>Bipolaris shoemakeri</i> BRIP 15929 ITS region;from TYPE material	中国平脐蠕孢属(<i>Bipolaris Shoemakeri</i>)	728	728	0.90	0	87.31	700	NR_147494.1
<i>Exserohilum turcicum</i> CBS 690.71 ITS region;from TYPE material	玉米大斑病菌(<i>Exserohilum turcicum</i>)	732	732	0.88	0	87.81	640	NR_163537.1
<i>Pyrenophora variabilis</i> ITS region;from TYPE material	<i>Pyrenophora variabilis</i>	732	732	0.88	0	87.60	653	NR_164467.1
<i>Alternaria lolii</i> CBS 115266 ITS region;from TYPE material	<i>Alternaria lolii</i>	909	909	0.86	0	93.40	614	NR_159632.1
<i>Alternaria obclavata</i> CBS 124120 ITS region;from TYPE material	<i>Alternaria obclavata</i>	769	769	0.86	0	89.06	646	NR_165505.1
<i>Alternaria sorghi</i> CBS 127502 ITS region;from TYPE material	<i>Alternaria sorghi</i>	946	946	0.81	0	96.08	580	NR_160246.1
<i>Stemphylium botryosum</i> CBS 714.68 ITS region;from TYPE material	匍柄霉(<i>Stemphylium botryosum</i>)	743	743	0.81	0	89.92	587	NR_163547.1
<i>Alternaria alstroemeriae</i> CBS 118809 ITS region;from TYPE material	<i>Alternaria alstroemeriae</i>	1 046	1 046	0.80	0	99.82	569	NR_163686.1
<i>Alternaria zantedeschiae</i> CBS 127501 ITS region;from TYPE material	<i>Alternaria zantedeschiae</i>	913	913	0.80	0	95.65	569	NR_160245.1
<i>Alternaria helianthifaciens</i> CBS 208.86 ITS region;from TYPE material	<i>Alternaria helianthifaciens</i>	905	905	0.80	0	95.30	569	NR_077213.1
<i>Alternaria leucanthemi</i> CBS 421.65 ITS region;from TYPE material	<i>Alternaria leucanthemi</i>	872	872	0.80	0	94.27	572	NR_165530.1
<i>Alternaria destruens</i> ATCC 204363 ITS region;from TYPE material	<i>Alternaria destruens</i>	1 020	1 020	0.77	0	100.00	552	NR_137143.1

表 7 RO2 菌株及其近缘种比对结果与描述

描述	学名	最大分数	总分	查询范围	E 值	识别	基因片段长度 (bp)	登录号
<i>Alternaria thalictrigena</i> CBS 121712 ITS region; from TYPE material	<i>Alternaria thalictrigena</i>	1 055	1 055	0.95	0	94.71	722	NR_135937.1
<i>Curvularia kusanoi</i> CBS 137.29 ITS region; from TYPE material	<i>Curvularia kusanoi</i>	809	809	0.95	0	88.01	753	NR_165187.1
<i>Bipolaris maydis</i> CBS 136.29 ITS region; from TYPE material	<i>Bipolaris maydis</i>	780	780	0.92	0	88.06	677	NR_138224.1
<i>Bipolaris subramanianii</i> BRIP 16226 ITS region; from TYPE material	<i>Bipolaris subramanianii</i>	741	741	0.90	0	87.76	723	NR_147496.1
<i>Curvularia colbranii</i> BRIP 13066 ITS region; from TYPE material	<i>Curvularia colbranii</i>	739	739	0.90	0	87.41	713	NR_158445.1
<i>Curvularia boeremae</i> IMI 164633 ITS region; from TYPE material	<i>Curvularia boeremae</i>	737	737	0.90	0	87.43	711	NR_158451.1
<i>Curvularia coatesiae</i> BRIP 24261 ITS region; from TYPE material	<i>Curvularia coatesiae</i>	736	736	0.90	0	87.30	715	NR_158444.1
<i>Bipolaris axonopicola</i> BRIP 11740 ITS region; from TYPE material	<i>Bipolaris axonopicola</i>	732	732	0.90	0	87.54	693	NR_147492.1
<i>Bipolaris shoemakeri</i> BRIP 15929 ITS region; from TYPE material	<i>Bipolaris shoemakeri</i>	728	728	0.90	0	87.31	700	NR_147494.1
<i>Exserohilum turcicum</i> CBS 690.71 ITS region; from TYPE material	<i>Exserohilum turcicum</i>	732	732	0.88	0	87.81	640	NR_163537.1
<i>Pyrenophora variabilis</i> ITS region; from TYPE material	<i>Pyrenophora variabilis</i>	732	732	0.88	0	87.60	653	NR_164467.1
<i>Alternaria lolii</i> CBS 115266 ITS region; from TYPE material	<i>Alternaria lolii</i>	909	909	0.86	0	93.40	614	NR_159632.1
<i>Alternaria obclavata</i> CBS 124120 ITS region; from TYPE material	<i>Alternaria obclavata</i>	769	769	0.86	0	89.06	646	NR_165505.1
<i>Alternaria sorghi</i> CBS 127502 ITS region; from TYPE material	<i>Alternaria sorghi</i>	946	946	0.81	0	96.08	580	NR_160246.1
<i>Stemphylium botryosum</i> CBS 714.68 ITS region; from TYPE material	<i>Stemphylium botryosum</i>	743	743	0.81	0	89.92	587	NR_163547.1
<i>Alternaria alstroemeriae</i> CBS 118809 ITS region; from TYPE material	<i>Alternaria alstroemeriae</i>	1 046	1 046	0.80	0	99.82	569	NR_163686.1
<i>Alternaria zantedeschiae</i> CBS 127501 ITS region; from TYPE material	<i>Alternaria zantedeschiae</i>	913	913	0.80	0	95.65	569	NR_160245.1
<i>Alternaria helianthiificiens</i> CBS 208.86 ITS region; from TYPE material	<i>Alternaria helianthiificiens</i>	905	905	0.80	0	95.30	569	NR_077213.1
<i>Alternaria leucanthemi</i> CBS 421.65 ITS region; from TYPE material	<i>Alternaria leucanthemi</i>	872	872	0.80	0	94.27	572	NR_165530.1
<i>Stemphylium carpobroti</i> CBS 146789 ITS region; from TYPE material	<i>Stemphylium carpobroti</i>	734	734	0.80	0	89.97	579	NR_171994.1

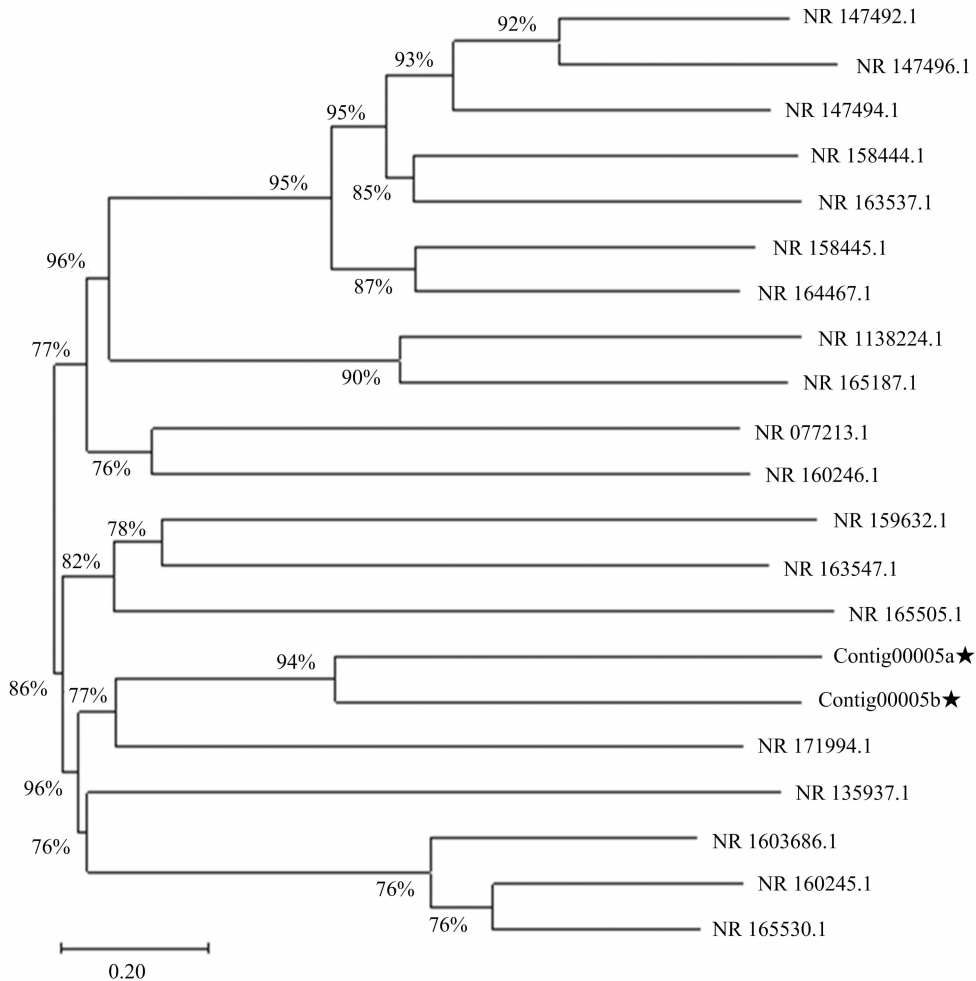


图5 菌株 RO2 基于 rDNA-ITS 序列构建的系统发育树

Mucor rudolphii、*Mucor lilianae* 对应登录号分别为 NR 154803.1、NR 152977.1、NR 152978.1 同源性较高,位于系统发育树的同一分支,聚为一类(表 8、图 6)。鉴定结果与形态学鉴定结果一致,结合形态鉴定结果,最终确定Ⅲ类病原菌为毛霉属,具体种名还有待进一步明确。

将 V 类菌基因序列测序结果 Contig00001a、Contig00002a、Contig00001b、Contig00001c、Contig00001d、Contig00001e、Contig00001f、Contig00001g 和 Contig00002b 在 NCBI 上通过 BLAST 比对,与同源性相近的 20 个登录号序列建立系统发育树,与杆菌的 *Cronobacter turicensis* z3032 和 *Escherichia fergusonii* ATCC 35469 对应登录号分别为 NR 102802.1 和 NR 074888.1,以及沙门菌的 NR 074902.1 同源性较高,位于系统发育树的同一分支,聚为一类(表 9、图 7)。鉴定结果与形态学鉴定结果一致,结合形态鉴定结果,最终确定 V 类病原

菌为杆菌和沙门菌属的近缘菌,具体种名还有待进一步明确。

2.4 病原菌致病性测定及不同枸杞品种鲜果对病害响应

将分离纯化的菌种回接到健康枸杞上,Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ等 4 类病原菌均有发病,且表现出和腐烂枸杞病害相一致的典型症状;V 类菌无发病症状。从接种发病的枸杞上再进行分离纯化培养,性状与原来的微生物相同,得到与原来一样的接种菌,依照科赫氏法则(Koch's Rule),可知分离的Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ这 4 种病原菌是该品种枸杞采后病害的主要致病菌,V 类菌为非致病菌(表 10)。

用 LA-S 植物图像分析仪进行果实病斑损害的分析,并对损害面积进行统计,统计结果见表 11。

通过对相同回接方式,相同回接时间后不同枸杞受损面积进行分析发现,宁杞 7 号具有明显的抗病害潜力(图 8、表 11)。其中,Ⅰ类病斑抗性,宁杞

表 8 RO3 菌株及其近缘种比对结果与描述

描述	学名	最大分数	总分	查询范围 (%)	E 值	识别	基因片段长度 (bp)	登录号
<i>Rhizopus oryzae</i> CBS 112.07 ITS region; from TYPE material	米根霉 (<i>Rhizopus oryzae</i>)	1 110	1 110	79	0	99.67	610	NR_103595.1
<i>Mucor rudolphii</i> WU 35869 ITS region; from TYPE material	<i>Mucor rudolphii</i>	246	525	46	3.00×10^{-65}	90.53	741	NR_152977.1
<i>Mucor lilianae</i> K M 196153 ITS region; from TYPE material	<i>Mucor lilianae</i>	244	524	46	1.00×10^{-64}	90.10	740	NR_152978.1
<i>Circinella nodulosa</i> CGMCC 3.14102 ITS region; from TYPE material	<i>Circinella nodulosa</i>	185	402	42	6.00×10^{-47}	84.90	784	NR_154803.1
<i>Rhizopus caespitosus</i> CBS 427.87 ITS region; from TYPE material	<i>Rhizopus caespitosus</i>	350	350	40	2.00×10^{-96}	87.27	576	NR_137056.1
<i>Rhizopus homothallicus</i> CBS 336.62 ITS region; from TYPE material	<i>Rhizopus homothallicus</i>	333	333	40	2.00×10^{-91}	85.89	588	NR_103616.1
<i>Rhizopus schipperae</i> CBS 138.95 ITS region; from TYPE material	<i>Rhizopus schipperae</i>	281	431	37	8.00×10^{-76}	92.08	538	NR_077174.1
<i>Cokeromyces recurvatus</i> CBS 158.50 ITS region; from TYPE material	屈弯科克霉 (<i>Cokeromyces recurvatus</i>)	222	368	37	5.00×10^{-58}	87.89	675	NR_077172.1
<i>Mucor ellipsoideus</i> ATCC MYA-4767 ITS region; from TYPE material	<i>Mucor ellipsoideus</i>	248	424	34	8.00×10^{-66}	94.44	616	NR_111683.1
<i>Mucor circinelloides</i> CBS 195.68 ITS region; from TYPE material	卷枝毛霉 (<i>Mucor circinelloides</i>)	239	391	34	5.00×10^{-63}	91.86	639	NR_126116.1
<i>Umbelopsis dimorpha</i> CBS 110039 ITS region; from TYPE material	<i>Umbelopsis dimorpha</i>	180	264	34	3.00×10^{-45}	83.94	598	NR_111664.1
<i>Mucor orantomantidis</i> CNUFC MID1-1 ITS region; from TYPE material	<i>Mucor orantomantidis</i>	219	295	32	6.00×10^{-57}	87.50	583	NR_164587.1
<i>Umbelopsis gibberispora</i> CBS 109328 ITS region; from TYPE material	<i>Umbelopsis gibberispora</i>	195	290	32	1.00×10^{-49}	85.71	620	NR_103656.1
<i>Umbelopsis angularis</i> CBS 603.68 ITS region; from TYPE material	<i>Umbelopsis angularis</i>	189	284	32	5.00×10^{-48}	84.97	624	NR_137072.1
<i>Phycomyces blakesleeanus</i> var. <i>piloboloides</i> CBS 112.20 ITS region; from TYPE material	<i>Phycomyces blakesleeanus</i> var. <i>piloboloides</i>	191	284	31	1.00×10^{-48}	85.05	678	NR_138380.1
<i>Umbelopsis swartii</i> CBS 868.85 ITS region; from TYPE material	<i>Umbelopsis swartii</i>	189	268	31	5.00×10^{-48}	85.26	615	NR_103654.1
<i>Circinella chinensis</i> CBS 140.28 ITS region; from TYPE material	<i>Circinella chinensis</i>	185	258	31	6.00×10^{-47}	84.90	647	NR_156243.1
<i>Absidia idahoensis</i> CBS 103.91 ITS region; from TYPE material	<i>Absidia idahoensis</i>	185	258	31	6.00×10^{-47}	84.90	680	NR_164083.1
<i>Mucor lusitanicus</i> CBS 108.17 ITS region; from TYPE material	<i>Mucor lusitanicus</i>	239	325	30	5.00×10^{-63}	91.86	614	NR_126127.1
<i>Mucor hiemalis</i> f. <i>hiemalis</i> CBS 201.65 ITS region; from TYPE material	<i>Mucor hiemalis</i> f. <i>hiemalis</i>	237	332	30	2.00×10^{-62}	93.21	626	NR_152948.1

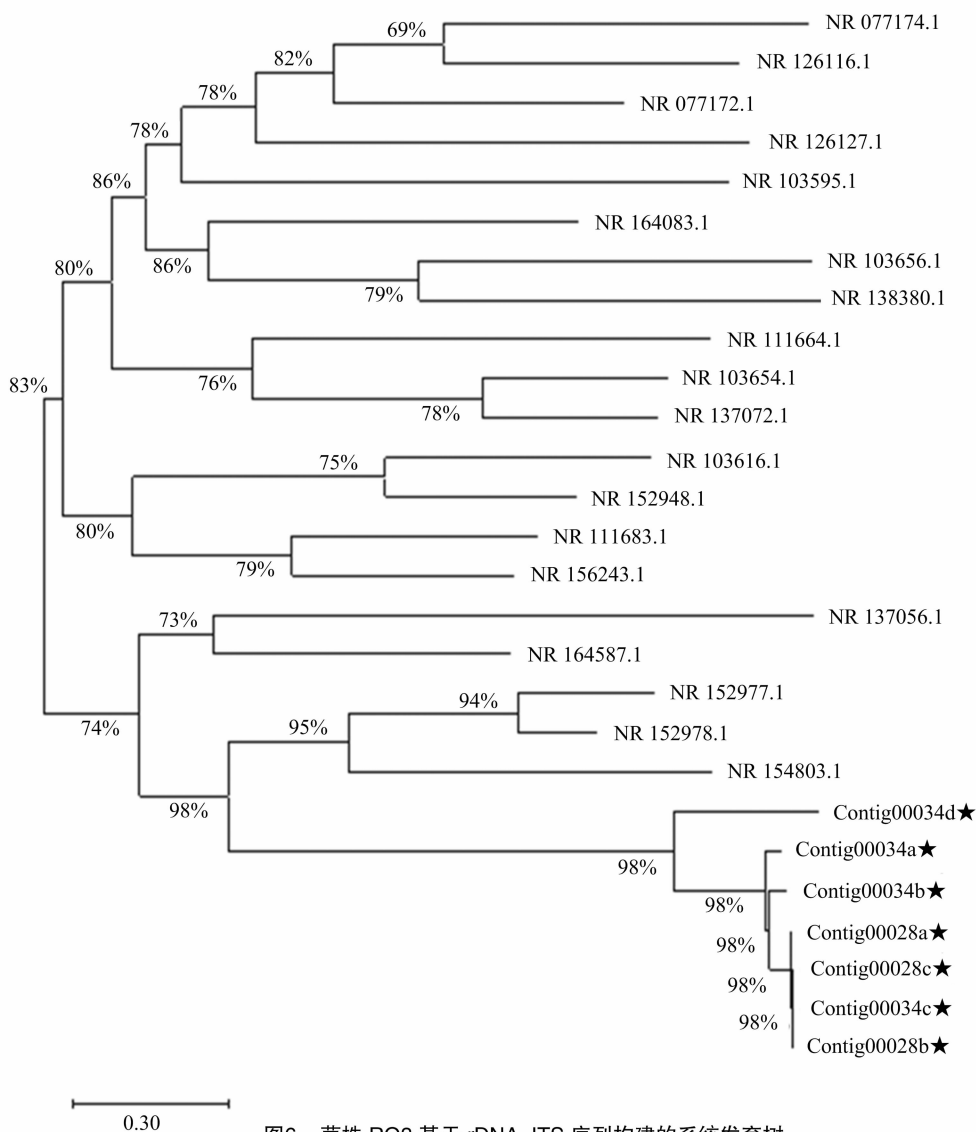


图6 菌株 RO3 基于 rDNA-ITS 序列构建的系统发育树

7 号>宁杞 1 号>宁杞 5 号;Ⅱ类病斑抗性,宁杞 7 号>宁杞 5 号>宁杞 1 号;Ⅲ类病斑抗性,宁杞 7 号>宁杞 5 号>宁杞 1 号;Ⅳ类病斑抗性,宁杞 7 号>宁杞 1 号>宁杞 5 号。V 类菌株在任何枸杞上均无发病症状。

通过对不同枸杞品种鲜果上病原菌的分离对比,除了发现宁杞 7 号具有明显的抗病害潜力外,还发现 V 类菌株在 3 个枸杞品种中无病害症状,但在果实分离病害时发现,宁杞 7 号的所有病害均伴随 V 类病斑(图 9)。因此,考虑该菌株是否具有拮抗病害微生物的能力,可为病害拮抗菌的筛选和生物防治提供基础;另外,考虑宁杞 7 号是否含有影响该类菌株的营养物质,导致该类菌株的富集,最终影响宁杞 7 号抵抗病害的能力。

3 结论与讨论

枸杞采后腐烂是鲜果主要病害之一,其中病原真菌是果实采后腐烂的主要致腐菌^[24],病原真菌主要包括链格孢属、匍柄霉属、毛霉属、曲霉属、芽枝霉属、镰孢属、青霉属、根霉属等^[25]。本研究利用组织分离法从发病的果实病斑处分离得到了 5 株菌株,通过形态学、分子测序和菌株回接试验确定 4 株为真菌菌株和 1 株为细菌菌株。

I 类病斑对应的链格孢属真菌作为果实采后常见的潜伏侵染病原菌,是半知菌暗色丝孢菌中重要的一类^[26],主要通过产生毒素和代谢物等致病因子诱发果实腐烂等病害的发生^[27]。本研究发现,链格孢属真菌在自然发病条件下至少有 2 个种

表 9 RO4 菌株及其近缘种比对结果与描述

描述	学 名	最大分数	总分	查询范围 (%)	E 值	识别	基因片段长度 (bp)	登录号
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> strain LT2 16S ribosomal RNA, partial sequence	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium	2 278	2 278	99	0	93.46	1 544	NR_074910.1
<i>Salmonella bongori</i> strain NCTC 12419 16S ribosomal RNA, complete sequence	波哥沙门菌 (<i>Salmonella bongori</i>)	2 255	2 255	99	0	93.10	1 542	NR_074888.1
<i>Enterobacter cloacae</i> strain ATCC 13047 16S ribosomal RNA, complete sequence	肠杆菌 (<i>Enterobacter cloacae</i>)	2 239	2 239	99	0	92.93	1 543	NR_102794.2
<i>Klebsiella pneumoniae</i> strain DSM 30104 16S ribosomal RNA, partial sequence	克雷伯氏菌 (<i>Klebsiella pneumoniae</i>)	2 237	2 237	99	0	92.91	1 534	NR_036794.1
<i>Klebsiella pneumoniae</i> strain DSM 30104 16S ribosomal RNA, partial sequence	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2 233	2 233	99	0	92.96	1 530	NR_117686.1
<i>Enterobacter cloacae</i> strain DSM 30054 16S ribosomal RNA, partial sequence	<i>Enterobacter cloacae</i>	2 233	2 233	99	0	92.95	1 529	NR_117679.1
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium strain ATCC 13311 16S ribosomal RNA, partial sequence	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium	2 231	2 231	99	0	92.71	1 539	NR_119108.1
<i>Klebsiella pneumoniae</i> strain DSM 30104 16S ribosomal RNA, partial sequence	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2 228	2 228	99	0	92.89	1 530	NR_117684.1
<i>Klebsiella pneumoniae</i> strain DSM 30104 16S ribosomal RNA, partial sequence	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2 228	2 228	99	0	92.89	1 530	NR_117683.1
<i>Kosakonia radicincitans</i> DSM 16656 16S ribosomal RNA, partial sequence	<i>Kosakonia radicincitans</i> DSM 1 6656	2 222	2 222	99	0	92.82	1 530	NR_117704.1
<i>Klebsiella pneumoniae</i> strain DSM 30104 16S ribosomal RNA, partial sequence	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2 222	2 222	99	0	92.83	1 530	NR_117685.1
<i>Leclercia adecarboxylata</i> strain CIP 82.92 16S ribosomal RNA, partial sequence	非脱羧勒克菌 (<i>Leclercia adecarboxylata</i>)	2 206	2 206	99	0	92.68	1 527	NR_104933.1
<i>Yokenella regensburgei</i> strain CIP 105435 16S ribosomal RNA, partial sequence	雷根斯堡约克氏菌 (<i>Yokenella regensburgei</i>)	2 200	2 200	99	0	92.62	1 527	NR_104934.1
<i>Escherichia fergusonii</i> ATCC 35469 16S ribosomal RNA, complete sequence	<i>Escherichia fergusonii</i> ATCC 35469	2 189	2 189	99	0	92.35	1 542	NR_074902.1
<i>Cedecea lapagei</i> strain DSM 4587 16S ribosomal RNA, partial sequence	拉氏西地西菌 (<i>Cedecea lapagei</i>)	2 183	2 183	99	0	92.38	1 531	NR_126319.1
<i>Kosakonia quasiscachari</i> strain WCHEs120001 16S ribosomal RNA, partial sequence	<i>Kosakonia quasiscachari</i>	2 182	2 182	99	0	92.27	1 536	NR_169476.1
<i>Klebsiella aerogenes</i> KCTC 2190 16S ribosomal RNA, complete sequence	产气克雷伯氏菌 (<i>Klebsiella aerogenes</i>) KCTC 2190	2 176	2 176	99	0	92.21	1 540	NR_102493.2
<i>Erwinia tasmaniensis</i> Et1/99 16S ribosomal RNA, partial sequence	塔斯曼尼亚欧文氏菌 (<i>Erwinia tasmaniensis</i>) Et1/99	2 176	2 176	99	0	92.20	1 539	NR_074869.1
<i>Cronobacter turicensis</i> z3032 16S ribosomal RNA, complete sequence	<i>Cronobacter turicensis</i> z3032	2 174	2 174	99	0	92.12	1 543	NR_102802.1
<i>Cedecea lapagei</i> strain DSM 4587 16S ribosomal RNA, partial sequence	<i>Cedecea lapagei</i>	2 174	2 174	99	0	92.26	1 532	NR_126317.1

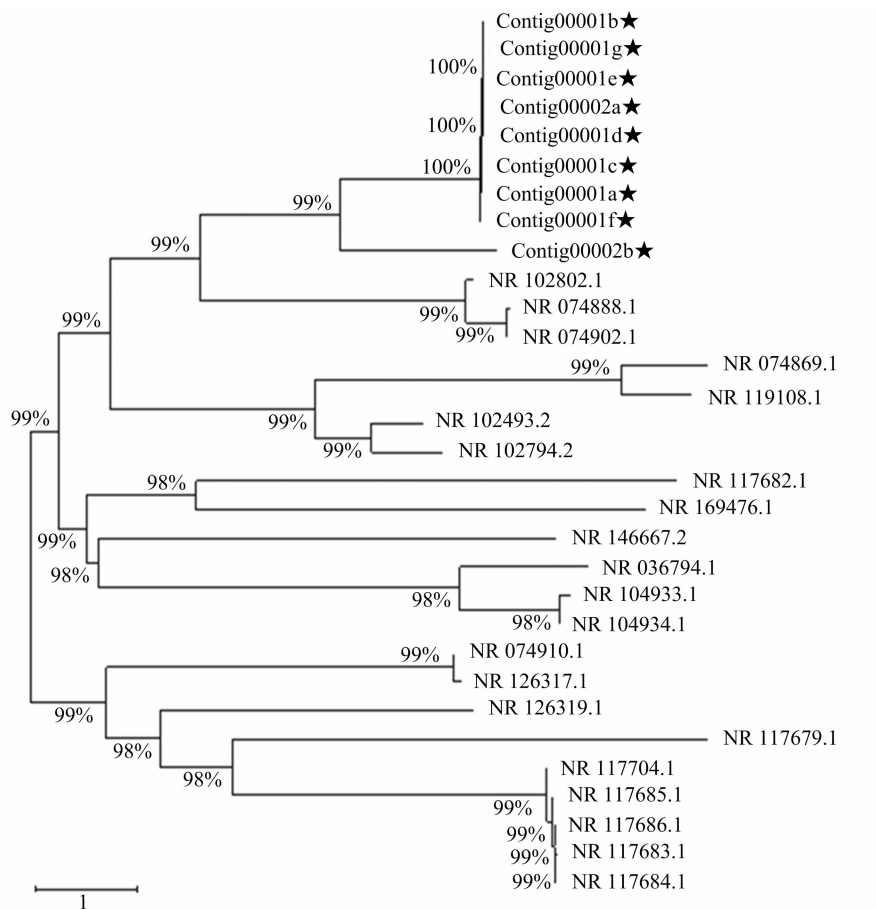


图7 菌株 RO4 基于 rDNA-ITS 序列构建的系统发育树

表 10 不同真菌菌株回接枸杞后发病情况统计

病斑种类	发病情况		
	宁杞 1 号	宁杞 5 号	宁杞 7 号
I 类	有	有	有
II 类	有	有	有
III 类	有	有	有
IV 类	有	有	无
V 类	无	无	无

Alternaria sorghi 和 *Alternaria helianthiinficiens* 能引起枸杞鲜果的采后腐烂,与王晓等的研究结果^[28]相符。II 类病斑对应的匍柄霉属,是链格孢属的近似属,亦作为一种独立的真菌类群广泛分布于植物组织中^[29],是浆果类采摘后腐烂的主要病原菌^[25]。III 类菌经形态学和分子生物学鉴定为毛霉菌,多在高温、高湿度以及通风不良的条件下快速孳生,加速鲜果腐烂进程。目前在鲜果上的研究较少,但根据枸杞鲜果采后病原菌的发病情况观察,该类菌在鲜果采后腐烂进程中发挥重要作用。IV 类病原菌

在枸杞及其他浆果植物上研究较多,真菌形态具有明显特征,曲霉属黑曲霉菌,亦是枸杞果实腐烂部位的主要分离菌株。黑曲霉能导致水分较高的食物、果蔬等发生霉腐变质,且有可能产生致癌性的黄曲霉毒素,对人体危害性大^[30-31]。此外,真菌还会产生次级代谢产物及其他真菌毒素,对人类和农场牲畜都具有高度毒性^[32]。随着人们生活水平和食品安全意识的提高,果蔬微生物安全控制越发受到重视,枸杞无论是鲜食还是加工干制都需要严格控制微生物生长,通过分离鉴定出鲜枸杞的主要致病微生物,为采取有效措施抑制微生物生长提供了理论依据,也为今后枸杞及制品安全流通提供了技术保障。

笔者进一步对枸杞三大主要栽培种进行了抗病性鉴定,发现宁杞 7 号具有明显抗四大真菌病害的优势。尽管对宁杞 7 号抗病性研究较少,但本研究也进一步验证了李捷的研究,即不同枸杞品种的抗病性存在差异^[21]。此外,在果实分离病害时发现,具有明显抗病优势的宁杞 7 号在健康果和病害

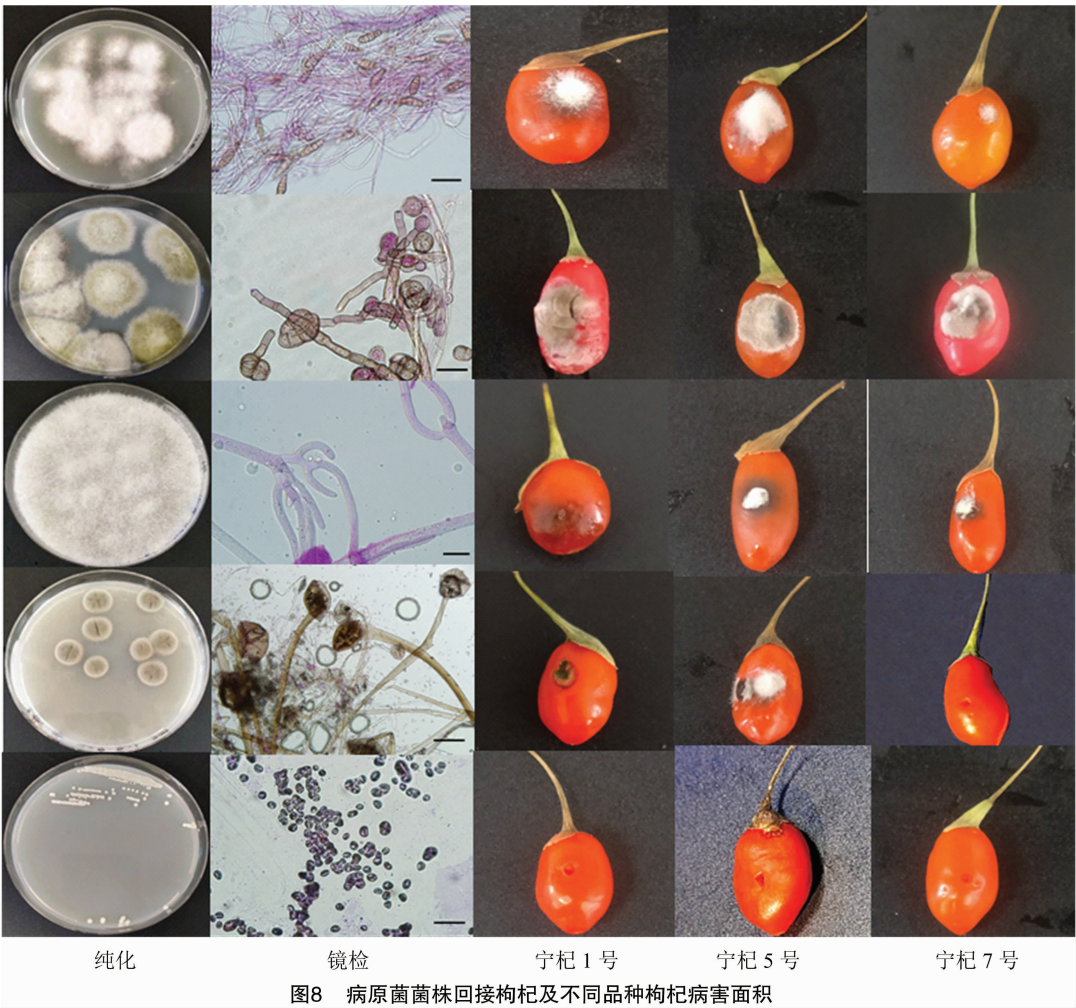


图8 病原菌菌株回接枸杞及不同品种枸杞病害面积

表 11 不同真菌菌株回接枸杞后发病面积统计

病斑种类	发病面积(mm ²)		
	宁杞 1 号	宁杞 5 号	宁杞 7 号
I 类	62.09 ± 3.08b	73.96 ± 8.71a	4.84 ± 0.43c
II 类	97.42 ± 7.62a	66.10 ± 5.37b	49.14 ± 4.01c
III 类	65.93 ± 6.01a	23.91 ± 1.08b	9.73 ± 0.78c
IV 类	9.42 ± 1.04b	74.30 ± 7.96a	0c
V 类	0.00 ± 0.00a	0.00 ± 0.00a	0.00 ± 0.00a

注:同行数据后不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

果实上均分离出 V 类菌株,且回接该菌株后在任一枸杞品种上均无发病症状。之前也有关于杆菌类作为生防菌株的相关报道,Obagwu 等首次报道了分离自柑橘果实表面的枯草芽孢杆菌可有效地抑制柑橘青绿霉病^[33]。冯玉衡筛选出 2 株沙福芽孢杆菌能够抑制马铃薯黑痣病和枯萎病的发生^[34],徐同伟等筛选出一株芽孢杆菌用于抑制烟草黑胫病^[35]。何文琪等从莲雾上分离得到一株对莲雾软腐病病



图9 宁杞 7 号病原菌培养及伴生菌

原菌具有明显拮抗效果的芽孢杆菌菌株,可以作为抑制莲雾软腐病的潜在生防菌^[36]。因此,考虑 V 类菌株亦具有拮抗病害微生物的能力,可以作为抑制枸杞鲜果腐烂病害的潜在生防菌,可为今后枸杞鲜果采后腐烂病害拮抗菌的筛选和生物防治提供

基础。

参考文献:

- [1] Amagase H, Farnsworth N R. A review of botanical characteristics, phytochemistry, clinical relevance in efficacy and safety of *Lycium barbarum* fruit (Goji) [J]. Food Research International, 2011, 44 (7): 1702 – 1717.
- [2] Chen J H. Play advantage innovation development to promote ningxia *Lycium barbarum* industry high – quality development [J]. Ningxia Forestry, 2018 (4): 4 – 6.
- [3] 温淑萍, 王琛, 张治华. 宁夏枸杞产业发展及全产业链技术创新趋势分析[J]. 农业展望, 2018, 14 (3): 53 – 58, 64.
- [4] Sun H Y, Liu Y S, Gai Y Z, et al. De novo sequencing and analysis of the cranberry fruit transcriptome to identify putative genes involved in flavonoid biosynthesis, transport and regulation [J]. BMC Genomics, 2015, 16 (1): 652.
- [5] Zheng J, Ding C X, Wang L S, et al. Anthocyanins composition and antioxidant activity of wild *Lycium ruthenicum* Murr. from Qinghai – Tibet Plateau [J]. Food Chemistry, 2011, 126 (3): 859 – 865.
- [6] Wang C C, Chang S C, Inbaraj B S, et al. Isolation of carotenoids, flavonoids and polysaccharides from *Lycium barbarum* L. and evaluation of antioxidant activity [J]. Food Chemistry, 2010, 120 (1): 184 – 192.
- [7] Zhang S, Zhang S F, Tian Y Y, et al. Development and utilization model of fresh fruit *Lycium barbarum* [J]. Chinese Horticultural Abstruses, 2016, 32 (4): 221 – 222.
- [8] 李晓莺, 何军, 曹有龙. 枸杞鲜果销售面临的难题及解决办法[J]. 北方园艺, 2010 (23): 175 – 176.
- [9] 赵荣祥, 范小静, 郝佳, 等. 18 种植物源物质对枸杞鲜果的保鲜活性[J]. 西北农业学报, 2014, 23 (9): 147 – 151.
- [10] 王瑞庆, 魏雯雯, 徐新明, 等. CF 保鲜剂对鲜食枸杞贮藏品质的影响[J]. 北方园艺, 2012 (10): 169 – 171.
- [11] 兰璞, 高芙蓉, 陈存坤, 等. 枸杞采后病害及主要病原真菌的分离与鉴定[J]. 中国果菜, 2014, 34 (12): 9 – 12.
- [12] 冯美, 张宁, 张宏宝, 等. 枸杞采后细胞壁组分及其降解酶活性的变化[J]. 干旱地区农业研究, 2011, 29 (5): 111 – 114.
- [13] Li X Y, He J, Ge Y P, et al. Study on the preservation of fresh Chinese wolfberry fruit at room temperature by chitosan coating [J]. Agricultural Science & Technology, 2009, 10 (3): 120 – 122.
- [14] Camele I, Altieri L, de Martino L, et al. In vitro control of post – harvest fruit rot fungi by some plant essential oil components [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2012, 13 (2): 2290 – 2300.
- [15] Nunes C A. Biological control of postharvest diseases of fruit [J]. European Journal of Plant Pathology, 2012, 133 (1): 181 – 196.
- [16] Korsten L. Advances in control of postharvest diseases in tropical fresh produce [J]. International Journal of Postharvest Technology and Innovation, 2006, 1 (1): 48.
- [17] Barkai – Goland R. Postharvest diseases of fruit and vegetables: development and control [M]. Amsterdam: Elsevier, 2001: 45 – 46.
- [18] 范青. 果实采后病害生物防治及其机理研究 [D]. 北京: 中国科学院植物研究所, 2001: 13 – 14.
- [19] 尚洁, 思彬彬. 宁夏枸杞主要栽培品种的 DNA 多态性分析 [J]. 安徽农业科学, 2010, 38 (6): 2801 – 2802.
- [20] 李云翔, 石志刚, 张丽蓉, 等. 6 个枸杞品种对炭疽病抗性研究 [J]. 林业实用技术, 2007 (8): 29 – 31.
- [21] 李捷. 甘肃省枸杞根腐病病原及生理生化抗病机理研究 [D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2015: 79 – 83.
- [22] 李静, 于建娜, 张利莉. 果品采后病害及生物防治研究进展 [J]. 中国生物防治, 2007, 23 (增刊 1): 97 – 102.
- [23] 张小彦, 何静, 侯彩霞, 等. 枸杞根腐病菌拮抗菌株的筛选与鉴定 [J]. 浙江农业学报, 2020, 32 (5): 858 – 865.
- [24] Korsten L. Advances in control of postharvest diseases in tropical fresh produce [J]. International Journal of Postharvest Technology and Innovation, 2006, 1 (1): 48.
- [25] Barkai – Golan R. Postharvest Diseases of Fruits and Vegetables [M]. Amsterdam: Elsevier, 2001: 33 – 53.
- [26] 闫璐, 高贵田, 哈益明, 等. 谷物中链格孢毒素的研究进展 [J]. 核农学报, 2017, 31 (2): 334 – 341.
- [27] 康子腾, 姜黎明, 罗义勇, 等. 植物病原链格孢属真菌的致病机制研究进展 [J]. 生命科学, 2013, 25 (9): 908 – 914.
- [28] 王晓, 徐小迪, 陈勇, 等. 宁夏枸杞鲜果采后病原菌的分离、鉴定及水杨酸的抑病效果研究 [J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9 (22): 5837 – 5842.
- [29] 冯中红, 孙广宇. 链格孢属及相关属分类研究新进展 [J]. 菌物研究, 2020, 18 (4): 294 – 303.
- [30] 梁志宏, 黄昆仑, 何云龙, 等. 黑曲霉及其食品安全领域的赭曲霉毒素问题 [J]. 食品科技, 2008, 33 (10): 191 – 194.
- [31] 孙统政, 王娜, 田俊, 等. 黄曲霉毒素 B₁ 检测与脱毒方法最新研究进展 [J]. 江苏农业学报, 2021, 37 (3): 789 – 799.
- [32] 王刘庆, 王瑶, 王多, 等. 坚果和干果中黄曲霉毒素的污染、检测与控制 [J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9 (22): 5791 – 5798.
- [33] Obagwu J, Korsten L. Integrated control of citrus green and blue molds using *Bacillus subtilis* in combination with sodium bicarbonate or hot water [J]. Postharvest Biology and Technology, 2003, 28 (1): 187 – 194.
- [34] 冯玉衡. 马铃薯黑痣病和枯萎病病菌拮抗菌株的筛选与鉴定 [D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2018.
- [35] 徐同伟, 周建云, 祖庆学, 等. 两株烟草黑胫病拮抗菌的筛选、鉴定和促生防病潜力评价 [J]. 中国烟草科学, 2017, 38 (3): 44 – 50.
- [36] 何文琪, 王雅君, 尤文静, 等. 采后莲雾果实软腐病病原菌的分离鉴定和拮抗菌的筛选及防治机理 [J]. 食品工业科技, 2020, 41 (7): 102 – 108.