

## 精氨酸对引起采后蓝莓腐烂的链格孢靶标菌的抑制效果研究

王佳琦<sup>a,b</sup>, 杨雪<sup>a,b</sup>, 赵汝楠<sup>a,b</sup>, 朱恂飞<sup>a,b</sup>, 刘闯<sup>b</sup>, 张爽<sup>b</sup>, 严雪瑞<sup>a,b\*</sup>  
(沈阳农业大学 a.食品学院 b.设施园艺教育部重点实验室, 沈阳 110866)

**摘要:** **目的** 旨在筛选引起蓝莓采后腐烂的链格孢靶标菌株, 并比较 L-精氨酸和山梨酸钾对其抑制效果, 为蓝莓采后链格孢腐烂病的防控提供前期基础。 **方法** 通过组织分离法结合单孢分离法进行致腐菌的分离, 采用 ITS 序列分析进行属水平鉴定, 采用 ATP 序列分析结合形态学观察进行种水平鉴定, 采用平板抑菌法比较 L-精氨酸和山梨酸钾的抑菌效果。 **结果** 本研究分离获得的链格孢菌均有致病性, 分别属于 3 个不同种群, 分别为细极链格孢 (*Alternaria tenuissima*)、互隔交链孢 (*A. alternata*) 和云南铁杉链格孢 (*A. dumosa*)。以菌株 B20190623E3 (*A. tenuissima* 代表菌株)、菌株 B20190623B1 (*A. alternata* 代表菌株)、菌株 B20190623C1 (*A. dumosa* 代表菌株) 为靶标菌, 发现 L-精氨酸对供试 3 株靶标菌的 EC<sub>50</sub> 值均低于山梨酸钾。 **结论** 供试链格孢菌株均有致病性, 其中引起蓝莓采后腐烂的优势链格孢种群为细极链格孢。云南铁杉链格孢为引起蓝莓果实腐烂的新纪录种。筛选获得了 3 株链格孢代表靶标菌。L-精氨酸对引起蓝莓采后腐烂的链格孢菌具有较好的抑制效果。

**关键词:** 蓝莓; 链格孢种群; 致病性; L-精氨酸; 抑菌效果

中图分类号: S608 文献标志码: A 文章编号: 1001-3563(2024)03-0091-08

DOI: 10.19554/j.cnki.1001-3563.2024.03.011

### Effect of L-arginine on the *Alternaria* Targets Causing Postharvest Blueberry Rot

WANG Jiaqi<sup>a,b</sup>, YANG Xue<sup>a,b</sup>, ZHAO Runan<sup>a,b</sup>, ZHU Xunfei<sup>a,b</sup>, LIU Chuang<sup>b</sup>,  
ZHANG Shuang<sup>b</sup>, YAN Xuerui<sup>a,b\*</sup>

(a. College of Food Science, b. Key Laboratory of Protected Horticulture,  
Ministry of Education, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China)

**ABSTRACT:** The work aims to screen out the *Alternaria* targets causing postharvest blueberries rot and compare the inhibition effects of L-arginine and potassium sorbate on those *Alternaria* targets, so as to provide a preliminary basis for the prevention and control of postharvest blueberries rot caused by *Alternaria* targets. Tissue separation and single spore separation were used to isolate the *Alternaria* targets. ITS and ATP sequence analysis were adopted for the genus level identification and the species level identification, respectively. Plate inhibition method was used to compare the inhibition effects of L-arginine and potassium sorbate. All *Alternaria* isolates had pathogenicity and were distinguished to 3 *Alternaria* species, including *A. tenuissima*, *A. alternata* and *A. dumosa*. B20190623E3, B20190623B1 and B20190623C1 were selected out as targets for different *Alternaria* species. L-arginine had better inhibition effects than

收稿日期: 2023-11-10

基金项目: 国家重点研发计划 (2022YFD1600500); 辽宁省兴辽英才计划资助项目 (XLYC2002053); 辽宁省重点研发项目 (2019JH2/10200009)

\*通信作者

potassium sorbate on *Alternaria* targets. All the tested *Alternaria* targets are pathogenic, and *A. tenuissima* is the dominant causing postharvest rot of blueberry. *A. dumosa* is a new record species causing blueberry rot. Three representative targets of *Alternaria* are screened. L-arginine has a good inhibition effect on *Alternaria* causing postharvest rot of blueberry.

**KEY WORDS:** blueberry; *Alternaria* species; pathogenicity; L-arginine; inhibition effect

蓝莓, 杜鹃花科 (Ericaceae) 越橘属 (*Vaccinium*) 植物, 口感酸甜, 富含花青素等活性成分, 抗氧化活性强<sup>[1]</sup>, 具有较高的营养价值和经济价值<sup>[2]</sup>。蓝莓果实多成熟于高温多雨的季节<sup>[3]</sup>, 但是蓝莓果实鲜嫩多汁、果皮较薄, 采后不耐贮藏<sup>[4]</sup>, 且易受到病原菌侵染造成果实腐烂, 这些因素制约了蓝莓产业的健康发展<sup>[5-7]</sup>。

链格孢属真菌是常见真菌, 广泛分布于世界各地<sup>[8]</sup>。由链格孢属真菌引起的采后腐烂是蓝莓生产中面临的重要问题之一<sup>[9-10]</sup>。因此在蓝莓的贮运及包装研究中, 链格孢属真菌是重要的靶标菌之一。病原菌不同种群对防治效果影响较大, 因此本研究从种群鉴定入手, 筛选具有代表性的靶标菌株, 为后续相关研究提供基础。

目前仅用 ITS (Internal Transcribed Spacer) 序列分析无法将链格孢属真菌鉴定到种水平。相关研究表明 OPA2-1 基因分析可以对链格孢属小孢子类群部分种进行区分, 但该基因无法区分 *Alternaria tenuissima* 和 *A. alternata*<sup>[11]</sup>。张荣等<sup>[12-13]</sup>利用 Histone-3 基因对 *A. tenuissima* 和 *A. alternata* 进行了研究, 结果表明部分 *A. alternata* 的菌株被错误地划分到 *A. tenuissima*, 这表明 Histone-3 基因无法准确区分 *A. tenuissima* 和 *A. alternata*。质膜三磷酸腺苷酶 (The Plasma Membrane, ATPase) 序列片段具有较高的变异性, ATPase 序列能够以较高的支持率将链格孢属小孢子类群中 *A. tenuissima*、*A. arborescens*、*A. alternata*、*A. dumosa*、*A. frumenti*、*A. infectoria*、*A. kordkuyana*、*A. limoniasperae*、*A. rosae* 等种进行区分<sup>[14-18]</sup>。这一研究结果对后续进行链格孢属小孢子种类群的鉴定提供了技术支撑。

L-精氨酸作为一种可食用的氨基酸, 可允许添加至婴幼儿奶粉当中, 安全性高<sup>[19]</sup>, 前期研究发现用 L-精氨酸处理蓝莓果实, 可显著提高贮藏期蓝莓品质<sup>[5]</sup>。山梨酸钾是食品常用的防腐剂之一, 具有安全性高、无毒性的优点<sup>[20]</sup>。

本研究从病原菌分离、致病性测定及种水平鉴定进行研究, 全面筛选引起蓝莓采后腐烂的链格孢靶标菌株, 为后续抑菌剂效果评价提供更具有代表性的靶标菌株。在此基础上, 本研究比较了 L-精氨酸和山梨酸钾对链格孢靶标菌株的抑菌效果, 为后续开发蓝莓采后抑菌保鲜剂提供研究基础。

## 1 实验

### 1.1 材料与试剂

病样来源: 蓝莓果实主要采自沈阳、丹东、葫芦岛等产区, 品种主要为蓝丰和北陆, 待其自然发病后对病果进行病原菌分离。

供试培养基: 马铃薯葡萄糖琼脂培养基 (PDA)、减量马铃薯胡萝卜培养基 (PCA), 培养基配方参考刘闯<sup>[10]</sup>的研究。

供试药剂: L-精氨酸 (国药集团化学试剂有限公司), 有效成分含量 98%; 山梨酸钾 (天津市科密欧化学试剂有限公司), 有效成分含量 98%。

### 1.2 仪器与设备

主要仪器与设备: 超灵敏多功能成像仪 (UV 版), 美国 GE 公司; 立式压力蒸汽灭菌锅, 上海博讯实业有限公司; DYY-10C 型电泳仪, 北京市六一仪器厂; ND-ONE, Thermo 公司; TC-XP-D 型 XP 基因扩增仪, 杭州博日科技有限公司; HY-5A 回旋振荡器, 国华电器有限公司; FYL-YS-138L 型恒温箱, 北京福意电器有限公司; BX43 光学显微镜, Olympos 公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 病原菌分离、纯化方法

参照《植病研究方法》<sup>[21]</sup>采用常规组织分离法分离发病果实上的病原菌, 并经单孢分离纯化获得纯培养菌株。

#### 1.3.2 致病力测定方法

对所有分离菌株进行致病能力测定。采用孢子悬浮液接种健康蓝莓果实测定致病能力。将待测菌株在 PDA 平板上进行培养, 待其产孢后分别配置成  $1.0 \times 10^5$  CFU/mL 的孢子悬浮液备用。选用健康蓝莓果实 (横径为 14 mm), 用酒精 (体积分数为 75%) 对果实进行表面消毒, 无菌水清洗并晾干。在果蒂处用无菌针进行轻微刺伤, 同时接种 10  $\mu$ L 不同待测菌的孢子悬浮液, 以接种无菌水作为对照。接种后的蓝莓果实置于 25  $^{\circ}$ C 下存放 5 d, 观察果实发病情况, 计算发病面积, 进行待测菌株致病能力评价。

病斑面积按  $\pi r^2$  计算 ( $r$  为病斑直径的一半)。蓝莓果实总面积按  $4\pi r^2$  计算 ( $r$  为蓝莓横径的一半)。

致病力等级划分: 按病斑面积占蓝莓果实总面积的比值将致病力划分为 5 个等级, 其中病斑面积占蓝莓果实总面积等于 0% 为 0 级、大于 0% 且小于等于 5% 为 1 级 (弱)、大于 5% 且小于等于 10% 为 2 级 (较弱)、大于 10% 且小于等于 15% 为 3 级 (一般)、大于 15% 且小于等于 20% 为 4 级 (较强)、大于 20% 为 5 级 (强)。

### 1.3.3 链格孢属真菌初筛方法

采用 ITS 序列比对进行分离菌株属水平分析, 从中筛选得到链格孢属真菌。

DNA 提取, DNA 提取试剂盒 (万类生物科技有限公司); DNA 纯度检测, NanoDrop 2000。

PCR 扩增及产物测序: 25  $\mu$ L PCR 反应体系, 2  $\times$  GoTaq Green Master Mix (美国 Promega 公司) 12.5  $\mu$ L, 正向引物和反向引物各 1.0  $\mu$ L (10  $\mu$ mol/L), 模板 DNA 1.0  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 补足至 25  $\mu$ L。引物为 ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')。PCR 扩增产物经质量分数为 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 送至上海生工生物有限公司测序。

### 1.3.4 链格孢属真菌种水平鉴定方法

采用 ATP 系统发育分析法及形态学观察共同来进行链格孢属真菌种水平鉴定。ATP 序列分析参照 Lawrence 等<sup>[16]</sup>、Zhu 等<sup>[17]</sup>以及 Elfar 等<sup>[18]</sup>的方法。链格孢形态鉴定方法参照 Simmons 等<sup>[22]</sup>的方法。

ATP 序列扩增引物为 ATPDF1 (5'-ATCGTCTC CATGACCGAGTTCG-3') 和 ATPDR1 (5'-TCCGAT GGAGTTCATGATAGCC-3')。PCR 扩增产物经质量分数为 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 送至上海生工生物有限公司进行测序。相关文献中涉及的参考菌株及外群菌株的 ATP 序列在 Genebank 中下载。将供试菌株与参考菌株的 ATP 基因进行对位排列 (Clustal X 2.1 软件), 采用 MEGA X 软件构建系统发育树。

代表菌株的形态学观察以 PDA 平板上的菌落形态及 PCA 上的分生孢子链特性为主。以在 PDA、温度为 28  $^{\circ}$ C、黑暗条件下培养 5 d 的菌落作为观察对象, 对其大小、形态、颜色进行描述。PCA 上观察分生孢子链特性的方法: 需将灭菌后的载玻片置于 90 mm 培养皿中; 之后向培养皿内倒入一层薄薄的 PCA 培养基; 再将代表菌株接种于含 PCA 的载玻片上, 在温度为 28  $^{\circ}$ C, 光暗交替条件下培养至产孢后将载玻片取出; 利用 Olympus BX43 光学显微镜观察孢子成链特性进行观察。

### 1.3.5 L-精氨酸和山梨酸钾对不同链格孢代表菌株的抑制效果比较方法

采用平板抑菌法测定药剂对菌株的抑制效果。参考刘闯<sup>[10]</sup>的方法, 分别将不同浓度的 L-精氨酸和不同浓度的山梨酸钾混入 PDA 培养基, 配成最终质量浓度分别为 100、200、400、800、1 500、2 000  $\mu$ g/mL 含 L-精氨酸的 PDA 平板和最终质量浓度分别为 125、250、500、1 000、2 000、4 000、8 000  $\mu$ g/mL 含山梨酸钾的 PDA 平板。对照组为不含药剂的 PDA 平板。分别将靶标菌接种在供试平板上, 每个处理 3 次重复, 放置于 25  $^{\circ}$ C 恒温培养箱, 5 d 后测定菌落直径。抑菌率 ( $X$ ) 计算公式:  $X = (A_0 - A_1) / (A_0 - A_2) \times 100\%$ 。其中,  $A_0$  为对照组直径,  $A_1$  为处理组直径,  $A_2$  为菌饼直径。用 Excel 绘制 L-精氨酸和山梨酸钾对供试菌株抑菌效果的回归曲线图, 获得毒力回归方程、相关系数  $r$  及 EC<sub>50</sub> 值, 根据 EC<sub>50</sub> 值来评价待测药剂对供试菌株的毒力大小。

## 2 结果与分析

### 2.1 病原菌分离、致病力测定及链格孢属真菌初筛结果

从腐烂蓝莓果实中共分离获得 78 个菌株。致病力测定结果表明, 致病力 2 级及以下的菌株有 10 株, 致病力 3 级的菌株有 44 株, 致病力 4 级的有 21 株, 致病力 5 级的有 3 株。由于链格孢为重要的产毒真菌, 因此本研究对其进行了重点研究。采用 ITS 序列比对发现, 78 株菌中有 34 株链格孢属真菌, 其中致病力 2 级的有 2 株, 致病力 3 级的有 21 株, 致病力 4 级的有 8 株, 致病力 5 级的有 3 株。

### 2.2 链格孢种水平鉴定结果

基于 ATP 序列构建供试链格孢菌株与参考菌株的系统发育树 (图 1), 以 *A. argyroxiphii* 作为外群。结果表明 B20190623E3 等 23 个菌株与细极链格孢 (*Alternaria tenuissima*) 处于同一分支; B20190623B1 等 7 个菌株与互隔交链孢 (*A. alternata*) 处于同一分支; B20190623C1 等 4 个菌株与云南铁杉链格孢 (*A. dumosa*) 处于同一分支。模式菌株信息详见表 1。

与 *A. tenuissima* 属于同一分支的 23 株菌中, 致病力 3 级的有 16 株, 致病力 4 级的有 4 株, 致病力 5 级有 1 株; 与 *A. alternata* 属于同一分支的 7 株菌中, 致病力 3 级的有 4 株, 致病力 4 级有 3 株; 与 *A. dumosa* 属于同一分支的 4 株菌中, 致病力 5 级的有 2 株, 致病力 4 级和 3 级的各 1 株。

因致病力 3 级和 4 级的占比较多, 因此各分支代表菌株筛选时重点考虑致病力 3 级菌和 4 级菌。基于

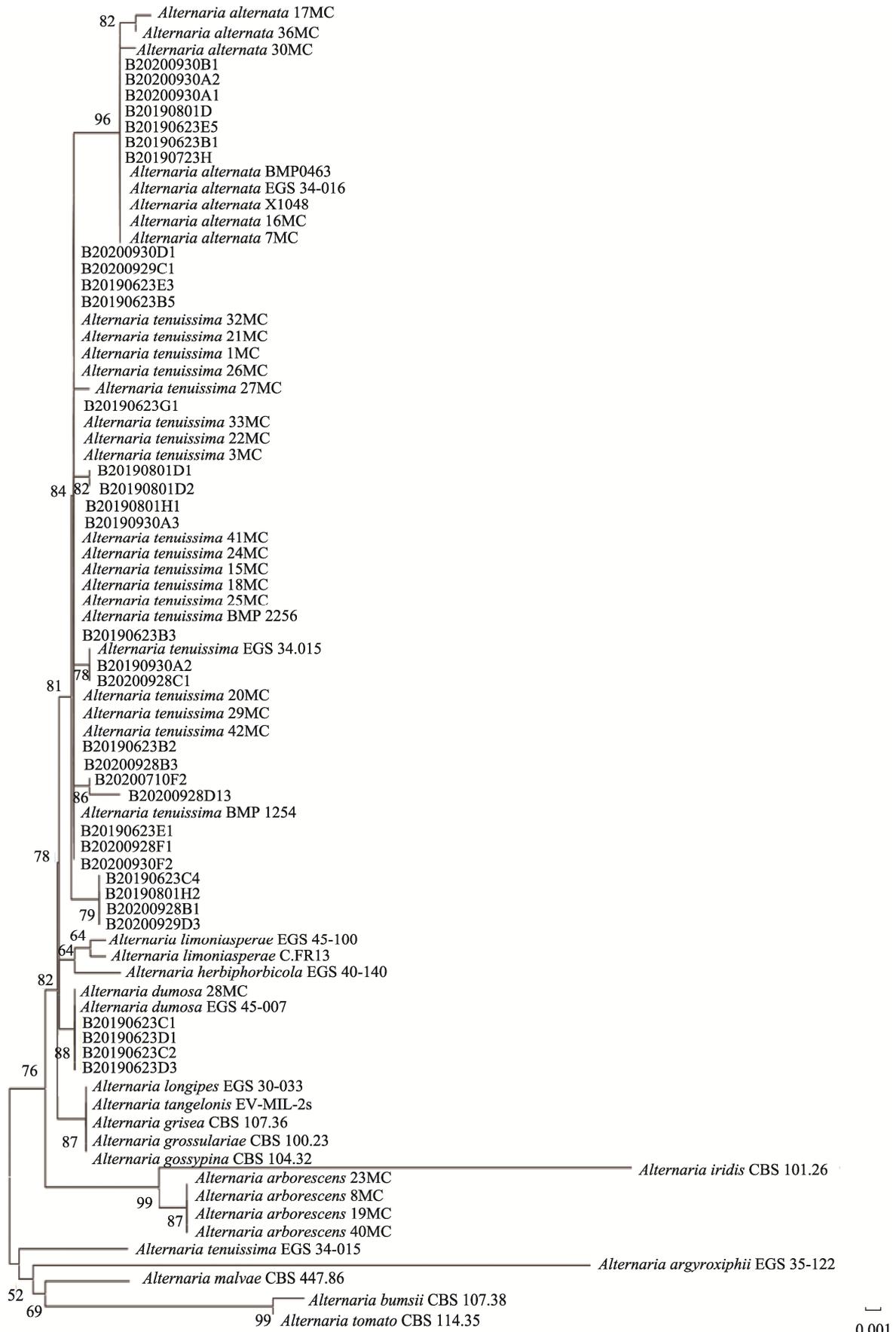


图1 供试链格孢菌基于 ATP 序列构建的系统发育树 (NJ 法)  
 Fig.1 Phylogenetic tree based on ATP sequence of the tested *Alternaria* (NJ method)

表 1 链格孢属参考菌株相关信息  
Tab.1 Information on reference strains of *Alternaria*

参考菌株	拉丁名	基因登录号 (ATP)
EGS 34-016	<i>Alternaria alternata</i>	JQ671874
BMP0463	<i>Alternaria alternata</i>	JQ881981
X1048	<i>Alternaria alternata</i>	KJ908230
7MC	<i>Alternaria alternata</i>	MG740627
16MC	<i>Alternaria alternata</i>	MG740628
16MC	<i>Alternaria alternata</i>	MG740628
17MC	<i>Alternaria alternata</i>	MG740629
30MC	<i>Alternaria alternata</i>	MG740630
36MC	<i>Alternaria alternata</i>	MG740631
8MC	<i>Alternaria arborescens</i>	MG740632
19MC	<i>Alternaria arborescens</i>	MG740633
40MC	<i>Alternaria arborescens</i>	MG740635
23MC	<i>Alternaria arborescens</i>	MG740637
EGS 35-122	<i>Alternaria argyroxiphii</i>	JQ671926
CBS 107.38	<i>Alternaria_burnsii</i>	JQ671860
EGS 45-007	<i>Alternaria dumosa</i>	JQ671877
28MC	<i>Alternaria dumosa</i>	MG740640
CBS 104.32	<i>Alternaria gossypina</i>	JQ671868
CBS 100.23	<i>Alternaria grossulariae</i>	JQ671867
CBS 107.36	<i>Alternaria grisea</i>	JQ671866
EGS 40-140	<i>Alternaria herbiphorbicola</i>	JQ671888
CBS 101.26	<i>Alternaria iridis</i>	JQ671876
EGS 30-033	<i>Alternaria longipes</i>	JQ671864
EGS 45-100	<i>Alternaria limoniaspera</i>	JQ671879
C.FR13	<i>Alternaria limoniaspera</i>	MH492694
CBS 447.86	<i>Alternaria malvae</i>	JQ671878
EV-MIL-2s	<i>Alternaria tangelonis</i>	JQ671865
EGS 34-015	<i>Alternaria tenuissima</i>	JQ671875
BMP 2256	<i>Alternaria tenuissima</i>	JQ811983
BMP 1254	<i>Alternaria tenuissima</i>	JQ811988
EGS 34.015	<i>Alternaria tenuissima</i>	JQ811989
1MC	<i>Alternaria tenuissima</i>	MG740644
3MC	<i>Alternaria tenuissima</i>	MG740645
15MC	<i>Alternaria tenuissima</i>	MG740646
18MC	<i>Alternaria tenuissima</i>	MG740647
20MC	<i>Alternaria tenuissima</i>	MG740648
21MC	<i>Alternaria tenuissima</i>	MG740649
22MC	<i>Alternaria tenuissima</i>	MG740650
24MC	<i>Alternaria tenuissima</i>	MG740651
25MC	<i>Alternaria tenuissima</i>	MG740652
26MC	<i>Alternaria tenuissima</i>	MG740653
27MC	<i>Alternaria tenuissima</i>	MG740654
29MC	<i>Alternaria tenuissima</i>	MG740655
32MC	<i>Alternaria tenuissima</i>	MG740656
33MC	<i>Alternaria tenuissima</i>	MG740657
41MC	<i>Alternaria tenuissima</i>	MG740658
42MC	<i>Alternaria tenuissima</i>	MG740659
CBS 114.35	<i>Alternaria tomato</i>	JQ671861

以上原则, 菌株 B20190623E3 被挑选出作为 *A. tenuissima* 的代表菌株, 致病力 3 级; 菌株 B20190623B1 作为 *A. alternata* 的代表菌株, 致病力 3 级; 菌株 B20190623C1 作为 *A. dumosa* 的代表菌株, 致病力 4 级, 并对 3 株代表菌进行形态学观察与鉴定。

供试 3 株代表菌株在 25 °C 下在 PDA 上生长速度较快, 7 d 后直径约 80 mm。其中 B20190623E3 (*A. tenuissima*) 菌落颜色呈浅灰色至暗青褐色, 菌株 B20190623B1 (*A. alternata*) 颜色呈灰白色至暗青褐色, 菌株 B20190623C1 (*A. dumosa*) 菌落颜色呈灰黑色至暗青褐色。在 PCA 培养条件下, B20190623E3 (*A. tenuissima*) 孢子链为长直链, 多数分生孢子长链不分支, 长链可超过 10 个孢子; B20190623B1 (*A. alternata*) 和菌株 B20190623C1 (*A. dumosa*) 孢子链为短支链, 分生孢子单生或短链生, 多支链, 支链一般长 1~5 个孢子。利用在 PCA 培养基上的分生孢子链和分生孢子的形态特征可明显区分为 3 个代表菌株。3 株链格孢代表菌株的形态特征见图 2。

*A. dumosa* 的分生孢子较小, 约占 *A. alternata* 分生孢子大小的一半。*A. tenuissima* 分生孢子呈倒棍棒形或长椭圆形, 颜色呈淡褐色至中褐色, 处于链基部的孢子, 有时表面生明显的疣突, 成熟分生孢子具 4~7 个横隔膜, 1~4 个纵或斜隔膜, 1~4 个主横隔, 且主横隔因较粗而色深, 更为醒目, 孢身尺寸为 (23.0~41.5)  $\mu\text{m}$  × (8.5~12.0)  $\mu\text{m}$ , 假喙尺寸为 (3.5~12.0)  $\mu\text{m}$  × (2.0~4.5)  $\mu\text{m}$ 。*A. alternata* 分生孢子呈倒棍棒形、卵形、倒梨形或近椭圆形, 颜色为淡褐色至褐色, 表面光滑或具微刺, 具有 3~8 个横隔膜和 1~4 个纵、斜隔膜, 孢身尺寸为 (22.5~40.0)  $\mu\text{m}$  × (8.0~13.5)  $\mu\text{m}$ 。*A. dumosa* 分生孢子多数为卵形, 具有 1~3 个横隔和 1 个纵隔, 孢身尺寸为 (10~20)  $\mu\text{m}$  × (6~10)  $\mu\text{m}$ 。

结合 ATP 系统发育分析结果及对比 SIMMONS 等<sup>[22]</sup>的形态学鉴定指导, 供试链格孢菌可分为 3 个种群, 分别为 *A. tenuissima*、*A. alternata* 和 *A. dumosa*。

## 2.3 L-精氨酸和山梨酸钾对供试链格孢菌株的抑制效果

L-精氨酸与山梨酸钾对链格孢 3 株代表菌的抑制结果见图 3、图 4、表 2 和表 3。

L-精氨酸对 *Alternaria tenuissima*、*Alternaria alternata*、*Alternaria dumosa* 的毒力回归方程分别为  $y=2.4397x-1.1089$  (相关系数  $r=0.891$ )、 $y=2.6613x-1.6938$  ( $r=0.9153$ )、 $y=2.8979x-2.9948$  ( $r=0.8553$ )。山梨酸钾对 3 株病原菌的毒力回归方程分别为  $y=3.2251x-4.112$  ( $r=0.9559$ )、 $y=1.9338x-0.6835$  ( $r=0.8029$ )、 $y=2.302x-1.615$  ( $r=0.9244$ )。L-精氨酸对 3 个代表菌株 *A. tenuissima*、*A. alternata* 和 *A. dumosa* 的  $EC_{50}$  值分别为 319.0803、327.4915 和 573.8521  $\mu\text{g/mL}$ 。而山梨酸钾对供试菌株的  $EC_{50}$  值分别为 668.8057、868.9604、747.4807  $\mu\text{g/mL}$ 。结果表明 L-精氨酸对供试菌株的抑制效果好于山梨酸钾对供试菌株的抑制效果。

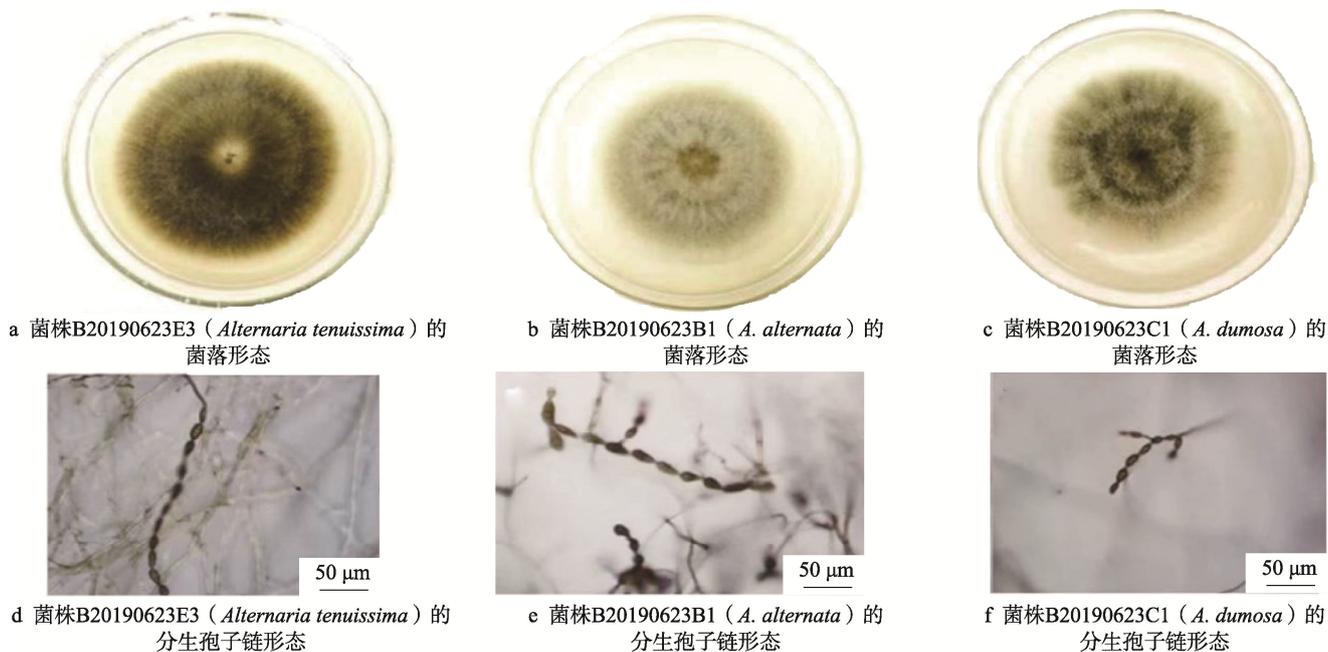


图2 链格孢3株代表菌株的形态特征

Fig.2 Morphological characteristics of three representative strains of *Alternaria*

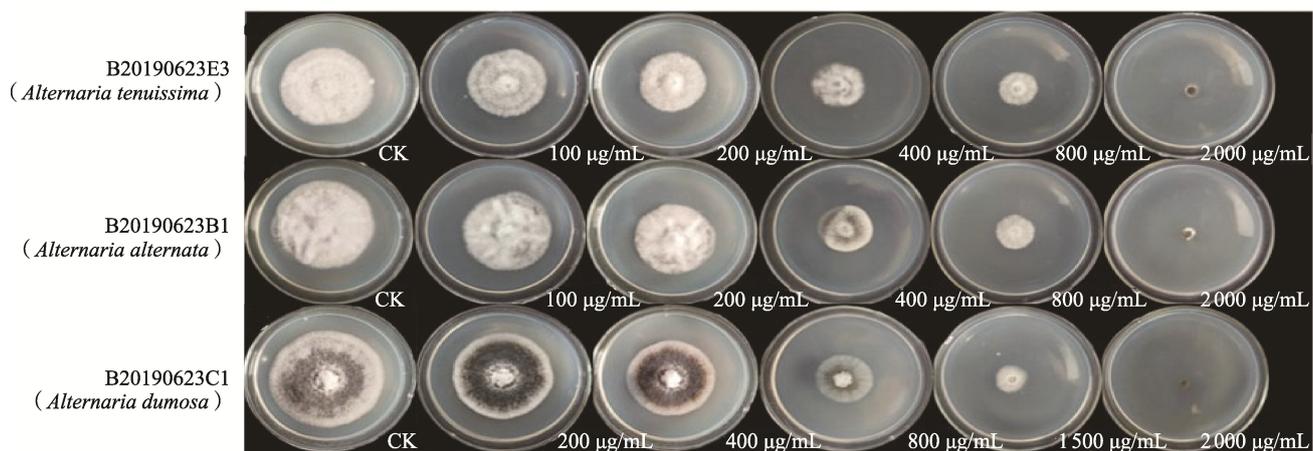


图3 L-精氨酸对供试菌株的抑菌试验

Fig.3 Inhibition effect of L-arginine on tested strains

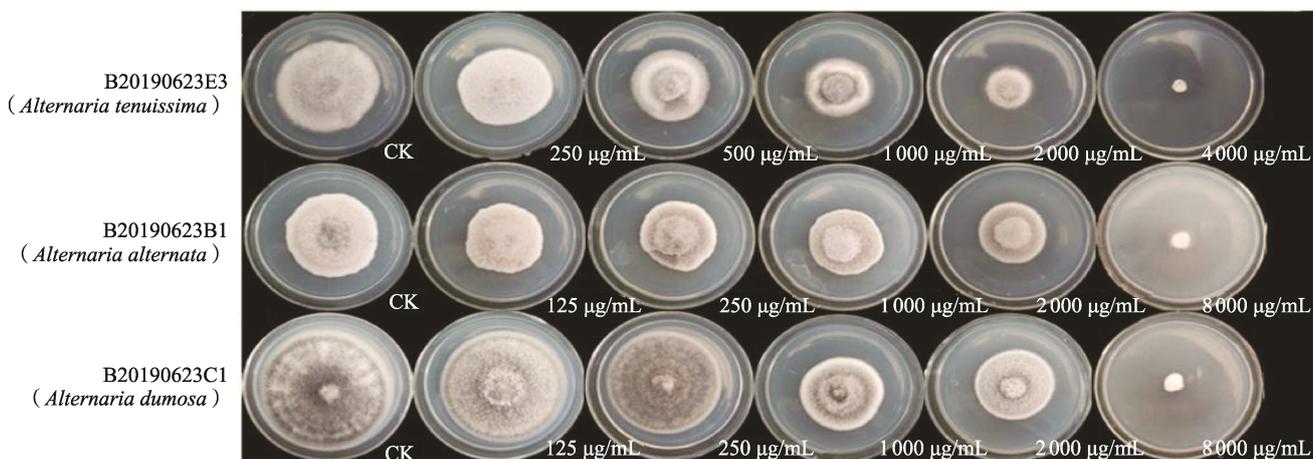


图4 山梨酸钾对供试菌株的抑菌试验

Fig.4 Inhibition test of potassium sorbate on tested strains

表 2 不同质量浓度的 L-精氨酸对供试菌株的菌落直径的影响 (5 d)

Tab.2 Effect of different concentrations of L-arginine on colony growth of pathogens (5 d)

供试菌株	不同质量浓度 梯度/( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	菌落直径 平均值/cm	抑菌 率/%
B20190623E3 ( <i>Alternaria tenuissima</i> )	CK	5.572	0
	100	4.632	18.53
	200	4.019	30.62
	400	3.152	47.71
	800	2.178	66.92
	2 000	0.534	99.33
B20190623B1 ( <i>Alternaria alternata</i> )	CK	6.104	0
	100	5.284	14.63
	200	4.607	26.71
	400	3.251	50.91
	800	2.244	68.88
	2 000	0.523	99.59
B20190623C1 ( <i>Alternaria dumosa</i> )	CK	6.826	0
	100	5.833	15.70
	200	5.174	26.11
	400	3.416	53.90
	800	2.008	76.16
	2 000	0.573	98.85

表 3 不同浓度的山梨酸钾对供试菌株的菌落直径的影响 (5 d)

Tab.3 Effect of different concentrations of potassium sorbate on colony growth of pathogens (5 d)

供试菌株	不同浓度梯度/ ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	菌落直径 平均值/cm	抑菌 率/%
B20190623E3 ( <i>Alternaria tenuissima</i> )	CK	6.102	0
	250	5.267	14.90
	500	4.174	34.42
	1 000	3.021	55.00
	2 000	1.326	85.25
	4 000	0.514	99.75
B20190623B1 ( <i>Alternaria alternata</i> )	CK	5.654	0
	125	4.741	17.71
	250	4.673	19.03
	1 000	4.472	22.93
	2 000	4.125	29.67
	8 000	0.521	99.59
B20190623C1 ( <i>Alternaria dumosa</i> )	CK	7.753	0
	125	7.232	7.18
	250	6.772	13.52
	500	5.003	37.91
	2 000	4.528	44.46
	8 000	0.562	99.14

### 3 结语

链格孢属真菌是引起采后蓝莓腐烂的主要致病病菌之一,同时作为一种产毒真菌,其威胁的不仅是采后蓝莓果实的品质,带毒原料进入加工领域还会威胁人和动物的健康。因此对蓝莓致腐链格孢种群及相关特性的研究可为精准筛选靶标菌株提供依据。为后续蓝莓采后抑菌剂的开发及效果评价提供更具代表性的靶标菌。

本研究分析了分离自蓝莓病果的 34 株链格孢菌,所有菌株均有致病性,大部分菌株的致病力为 3 级,少数菌株具有较强致病能力,达到 5 级。供试 34 株菌分别属于 3 个种群,分别为 *A. tenuissima*、*A. alternata* 和 *A. dumosa*。其中 *A. tenuissima* 为优势菌群,而 *A. dumosa* 为引起蓝莓果实腐烂的新纪录种。筛选出菌株 B20190623E3 (*A. tenuissima* 代表菌株)、菌株 B20190623B1 (*A. alternata* 代表菌株)、菌株 B20190623C1 (*A. dumosa* 代表菌株)作为靶标菌,为今后采后蓝莓抑菌剂的研发提供更具代表性的靶标菌株。

在此基础上,本研究进一步对比了 L-精氨酸与食品领域常用抑菌剂山梨酸钾的抑制效果。结果表明,L-精氨酸对供试菌株的抑制效果强于山梨酸钾,其对 *A. tenuissima*、*A. alternata* 和 *A. dumosa* 的  $EC_{50}$  值分别为 319.080 3、327.491 5 和 573.852 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,明显好于山梨酸钾的抑制效果。该研究为后续采用 L-精氨酸处理果实防治蓝莓链格孢腐烂病提供了前期研究基础。

### 参考文献:

- [1] 姜爱丽,周福慧,胡文忠,等.采后茉莉酸甲酯处理对蓝莓果实抗病性的影响[J].包装工程,2018,39(17):75-83.  
JIANG A L, ZHOU F H, HU W Z, et al. Effect of Post-harvest Methyl Jasmonate Treatment on Blueberry Fruit Disease Resistance During Storage[J]. Packaging Engineering, 2018, 39(17): 75-83.
- [2] 李亚东,盖禹含,王芳,等.2021年全球蓝莓产业数据报告[J].吉林农业大学学报,2022,44(1):1-12.  
LI Y D, GAI Y H, WANG F, et al. Global Blueberry Industry Report 2021[J]. Journal of Jilin Agricultural University, 2022, 44(1): 1-12.
- [3] CHU W J, Gao H Y, Chen H J, et al. Effects of Cuticular Wax on the Postharvest Quality of Blueberry Fruit[J]. Food Chemistry, 2018, 239: 68-74.
- [4] 周倩.冷藏蓝莓果蒂凹陷的发生机理及控制技术研究

- [D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2014.
- ZHOU Q. Mechanism and Control Technology of Fruit Pit of Refrigerated Blueberry Study[D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2014.
- [5] WANG J Q, WANG Y J, LI Y X, et al. L-Arginine Treatment Maintains Postharvest Quality in Blueberry Fruit by Enhancing Antioxidant Capacity during Storage[J]. Journal of Food Science, 2023, 88(9): 3666-3680.
- [6] PRATAP-SINGH, A, SHOJAEI, M, SINGH, A, et al. Effects of Pulsed Light on the Postharvest Quality and Shelf-Life of Highbush Blueberries (cv. Draper)[J]. Applied Food Research, 2023, 3(1): 100273.
- [7] 巴良杰, 马立志, 余磊, 等. 乙醇熏蒸结合乙烯吸附剂对蓝莓保鲜效果的影响[J]. 包装工程, 2019, 40(19): 66-72.
- BA L J, MA L Z, YU L, et al. Effects of Ethanol Fumigation Combined with Ethylene Adsorbent on Preservation Effect of Blueberry[J]. Packaging Engineering, 2019, 40(19): 66-72.
- [8] ANDREW M, PEEVER T L, PRYOR B M. An Expanded Multilocus Phylogeny does not Resolve Morphological Species within the Small-Spored *Alternaria* Species Complex[J]. Mycologia, 2009, 101(1): 95-109.
- [9] WANG Y, WANG J, LI Y, et al. Controlling Effect and Mechanism of Burdock Fructooligosaccharide Against *Alternaria* Fruit rot in Blueberry During Postharvest[J]. Postharvest Biology and Technology, 2023, 196, 112175.
- [10] 刘闯. 辽宁省蓝莓果腐病病原菌鉴定及其抑菌剂筛选研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2021.
- LIU C. Identification of Pathogen of Blueberry Fruit Rot in Liaoning Province and Screening of Antimicrobial Agents[D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2021.
- [11] WANG F, SAITO S, MICHAELIDES T J. Postharvest Use of Natamycin to Control *Alternaria* Rot on Blueberry Fruit Caused by *Alternaria alternata* and *A.arborescens*[J]. Postharvest Biology and Technology, 2021, 172: 111383.
- [12] 张荣, 岳海梅, 孙广宇. 小孢子链格孢 OPA2-1 核苷酸序列分析及系统发育研究[J]. 菌物学报, 2009, 28(4): 553-557.
- ZHANG R, YUE H M, SUN G Y. Sequence and Phylogenetic Analysis of OPA2-1 Region from *Alternaria* Small-Spored Species[J]. Mycosystema, 2009, 28(4): 553-557.
- [13] ZHAO J, BAO S W, MA G P, et al. Characterization of *Alternaria* Species Associated with Muskmelon Foliar Diseases in Beijing Municipality of China[J]. Journal of General Plant Pathology, 2016, 82(1): 29-32.
- [14] ZHANG Y, TIAN P Y, DUAN G H, et al. Histone H3 Gene is not a Suitable Marker to Distinguish *Alternaria Tenuissima* from *A. Alternata* Affecting Potato[J]. PLoS One, 2020, 15(4): e0231961.
- [15] WOUDEBERG J H C, SEIDL M F, GROENEWALD J Z, et al. *Alternaria* Section *Alternaria*: Species, Formae Speciales or Pathotypes?[J]. Studies in Mycology, 2015, 82: 1-21.
- [16] LAWRENCE D P, GANNIBAL P B, DUGAN F M, et al. Characterization of *Alternaria* Isolates from the Infectoria Species-Group and a New Taxon from Arrhenatherum, *Pseudoalternaria Arrhenatheria* Sp. Nov[J]. Mycological Progress, 2014, 13(2): 257-276.
- [17] ZHU X Q, XIAO C L. Phylogenetic, Morphological, and Pathogenic Characterization of *Alternaria* Species Associated with Fruit Rot of Blueberry in California[J]. Phytopathology, 2015, 105(12): 1555-1567.
- [18] EL FAR K, ZOFFOLI J P, LATORRE B A. Identification and Characterization of *Alternaria* Species Associated with Moldy Core of Apple in Chile[J]. Plant Disease, 2018, 102(11): 2158-2169.
- [19] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 食品添加剂使用标准: GB 2760—2014[S]. 北京: 中国标准出版社, 2015.
- National Food Safety Standard Food Additive Usage Standard: GB 2760-2014[S]. Beijing: Standards Press of China, 2015.
- [20] 洪伟. 山梨酸钾抑制食源性致病菌的活性研究[D]. 长春: 吉林大学, 2017: 5.
- HONG W. Study on the Foodborne Pathogens Activity of Potassium Sorbate[D]. Changchun: Jilin University, 2017: 5.
- [21] 方中达. 植病研究方法[M]. 第3版. 北京: 中国农业出版社, 2007.
- FANG Z D. Research Methods of Plant Diseases[M]. The third edition. Beijing: China Agriculture Press, 2007.
- [22] SIMMONS E G. *Alternaria: An Identification Manual*[M]. The Netherlands: CBS Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, 2007.