

红阳猕猴桃中葡萄座腔菌的生物学特性及致病性研究

Biological characteristics and pathogenicity of *Botryosphaeria parva* isolated from 'Hongyang' kiwifruit

何靖柳^{1,2} 秦文¹ 刘晓燕¹ 李洪怡¹ 沈丹丹¹

HE Jing-liu^{1,2} QIN Wen¹ LIU Xiao-yan¹ LI Hong-yi¹ SHEN Dan-dan¹

(1. 四川农业大学食品学院, 四川 雅安 625014; 2. 雅安职业技术学院, 四川 雅安 625000)

(1. College of Food Science, Sichuan Agricultural University, Ya'an, Sichuan 625014, China;
2. Ya'an Polytechnic College, Ya'an, Sichuan 625000, China)

摘要:为全面了解引起红阳猕猴桃软腐病的致病菌葡萄座腔菌的生物学特性,采用光学显微镜、透射电镜观察致病菌菌丝结构,用干重法绘制致病菌的生长曲线,多种方式诱导致病菌产孢,探究其最适生长条件、致死温度和时间,及病原菌致病性。结果表明:葡萄座腔菌的菌丝呈分枝状、内含隔膜,具有完整的细胞结构;生长曲线分为 3 个时期,延滞期(0~36 h)、对数期(36~96 h)、稳定期(96~168 h);经多种方式诱导该菌均不产生孢子;最适生长条件为:生长温度 30 ℃, pH 6, 以葡萄糖为碳源,牛肉膏为氮源,对光照条件不敏感;菌丝致死条件为 42 ℃ 处理 10 min 或 43 ℃ 处理 5 min; 10 种供试水果均可通过伤口感染而发病。

关键词:猕猴桃;葡萄座腔菌;生物学特性;致病性

Abstract: Objects: In order to understand the biological characteristics of *Botryosphaeria parva* causing soft rot of 'Hongyang' kiwifruit. Methods: The mycelial structure was observed by optical microscopy and transmission electron microscopy. The growth curve was established with dry cell weight. Multiple methods could be induced to sporulate. The optimum growth condition of *Botryosphaeria parva*, and its relationship between lethal temperature and lethal time, as well as its pathogenicity in other fruits were studied. Results: There were branching, diaphragm and intact cell for the mycelium of *Botryosphaeria parva*. The growth curve of *Botryosphaeria parva* was divided into three periods, including lag phase (0~36 h), logarithmic phase (36~96 h) and stationary phase (96~168 h). The pathogen did not produce spores. *Botryosphaeria parva* grew well in 30 ℃, pH 6, glucose, and beef extract. *Botryosphaeria parva* was not sensitive to illumination. *Botryosphaeria parva* was

died of 42 ℃ for 10min or 43 ℃ for 5 min. The 10 kinds of fruits could be contaminated by *Botryosphaeria parva* through a wound.

Keywords: kiwifruit; *Botryosphaeria parva*; biological characteristics; pathogenicity

红阳猕猴桃由四川苍溪县龙岗山选育而成,属世界首个红肉型猕猴桃特优新品种^[1]。课题组^[2]前期研究发现,红阳猕猴桃易出现熟(软)腐病,并从腐烂的猕猴桃中分离出主要致病菌——葡萄座腔菌(*Botryosphaeria parva*, *B. parva*)。 *Botryosphaeria* spp. 是一类球状、双囊壁的子囊菌,不仅危害果实,对树木的致病性也是全球性的^[3-5]。中国因葡萄座腔菌科引起的树木溃疡类病害较多,会造成各种林木(杨树、松树、桉树等)材质下降和果树(苹果、梨、桃等)减产^[6]。据研究^[7]报道山核桃的干腐病致病菌为 *Botryosphaeria dothidea*, 简称 *B. dothidea*, 属于囊菌门(*Ascomycota*)、葡萄座腔菌科(*Botryosphaeriaceae*)、葡萄座腔菌属(*Botryosphaeria*)。李诚等^[8-9]从江西奉新县猕猴桃果实中分离出 6 种致病菌,其中包括 *B. dothidea*, 但仅对葡萄座腔菌进行了鉴定,并未对葡萄座腔菌的相关生物学特性进行深入的研究。韩青梅等^[10]将 *B. dothidea* 接种至苹果果肉,研究了葡萄座腔菌感染苹果组织的细胞学特征,也未对致病菌的生物学特性进行全面研究;课题组^[2]前期研究显示分离出的葡萄座腔菌不产孢子,而韩青梅等^[10]研究表明该菌可通过孢子进行繁殖,研究结果出现差异,因此,需进一步对其探索。Slippers 等^[11-12]发现逆境可诱导 *Botryosphaeria* spp. 产孢,可通过菌落划伤、紫外线照射、营养缺乏(碳源、氮源)等作用方式。Cunnington 等^[13]对维多利亚和新南威尔士园艺作物中 *Botryosphaeria* 物种多样性进行研究,发现该致病菌主要来自病变的葡萄,少量来自核果和仁果类水果,其中最常见的致病菌是 *B. parva*。

目前,国内外关于 *B. parva* 的研究较少,主要集中在

作者简介:何靖柳,女,四川农业大学在读博士研究生。
通信作者:秦文(1967—),女,四川农业大学教授,博士。

E-mail: qinwen1967@aliyun.com

收稿日期:2017-09-13

Botryosphaeriaceae 的分子学鉴定及 *Botryosphaeria* 中其他亚种引起病害的防治等方面。为了更全面地呈现 *B. parva* 的相关生物学特性,课题组将对红阳猕猴桃中的 *B. parva* 生长特性、是否产孢子、最适生长环境、致死条件、致病性等进行研究,为明确病害的发生、发展规律提供试验基础,同时为相关病害的防治提供科学有效的依据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与amp;仪器

1.1.1 材料与amp;试剂

Botryosphaeria parva:由本实验室贮藏的红阳猕猴桃分离而得,分离方法依据柯赫氏法则^[14],鉴定,纯化,保存;

寄主范围试验水果:购自雅安市吉选超市;

无水乙醇、乳酸、苯酚、苯胺蓝、甘油、氯化钠、戊二醛、丙酮、葡萄糖、麦芽糖、淀粉、乳糖、果糖、蔗糖、牛肉膏、蛋白胨、硫酸铵、硝酸铵、硝酸钾、尿素:分析纯,北京奥博星生物技术有限责任公司。

1.1.2 主要仪器设备

电子显微镜:Olympus CX31RTSF型,日本Olympus公司;

电热恒温培养箱:DNP. 9162型,上海精宏实验设备有限公司;

手提式压力蒸汽灭菌锅:YXQ. SG41. 280型,上海华线医用核子仪器有限公司;

高速冷冻离心机:BR4i型,美国Thermo公司;

恒温振荡培养箱:HZQ. X100型,金坛市杰瑞尔电器有限公司;

冰箱:海尔BCD-190TMPK型,海尔电器集团;

洁净工作台:SW-CJ-1F型,苏净集团安泰公司;

透射电显微镜:H-600型,日本Hitachi公司。

1.2 方法

1.2.1 致病菌菌丝结构的观察

(1)光学显微镜菌丝结构的观察:用乳酸石炭酸棉蓝作为染液染色后观察 *B. parva* 菌落形态^[15]。

(2)透射电镜菌丝超微结构的观察:将无菌水加入长势良好的 *B. parva* 斜面,菌丝与无菌水混合均匀制成菌悬液,于4℃、10 000 r/min离心15 min,弃去上清液,离心后菌丝切分成1 cm³的组织块,用2.5%戊二醛固定2 h后,用0.1 mol/L磷酸缓冲液漂洗15 min,重复3次。用100%丙酮室温脱水15~20 min,重复3次。用纯包埋液37℃处理2~3 h,45℃烘箱内固化12 h,用超薄切片机切片,厚度为50~60 nm,3%醋酸铀—枸橼酸铅双染色,透射电镜观察并拍照^[16]。

1.2.2 致病菌生长曲线的测定 干重法测定生长曲线。将等量的致病菌菌丝分别接种至50 mL已灭菌的马铃薯营养液(PDB)中,于25℃、150 r/min培养24,36,48,60,72,84,96,108,120,144,168 h。分别搜集不同培养期的 *B. parva* 菌丝细胞,80℃烘至恒重后称重,各处理重复3次,取平均值。以致病菌培养时间为横坐标,菌丝干重为纵坐标,绘制

生长曲线。

1.2.3 致病菌分生孢子的研究

(1)菌落划伤:将活化后长势良好的 *B. parva* 菌株接种至马铃薯营养琼脂培养基(PDA),25℃暗培养7 d后,用无菌刀片将菌落划伤,再培养7~28 d。每7 d对菌丝进行镜检观察是否产孢,若产孢用血细胞计数板测量其产孢数量。

(2)紫外线照射:将 *B. parva* 菌株接种至PDA平板上,于25℃条件下分别紫外照射6,12,24 h后全黑暗培养7~28 d。

(3)营养缺乏:以查氏培养基为基础培养基,测定蔗糖、麦芽糖、淀粉、乳糖、果糖、葡萄糖6种碳源对菌丝产孢量的影响,以不加碳源的查氏培养基为对照组;测定牛肉膏、蛋白胨、硫酸铵、硝酸铵、硝酸钾、尿素6种氮源对致病菌菌丝产孢量的影响,以不加氮源的查氏培养基为对照组,于25℃暗培养7~28 d。

(4)致病菌孢子数的测定:用血细胞培养法计数,测定致病菌的产孢数量。

1.2.4 致病菌最适生长条件 采用平板测定法^[17]。将 *B. parva* 菌株接种于培养基中央,培养3~7 d后,用十字交叉法测定菌落直径。选取可能影响菌株生长的不同温度、pH值及光照情况和不同碳、氮源进行单因素试验。除碳、氮源所用培养基不同外,其余各组均采用PDA培养基;除温度和光照2组外,其他各组处理均采用25℃暗培养。每处理重复3次,取平均值。

(1)温度的影响:将 *B. parva* 菌株接种于PDA中央,分别置于5,10,15,20,25,30,35,40℃暗培养,定期测定菌落直径。

(2)pH的影响:将 *B. parva* 菌株接种于pH分别为4.0~10.0,以1为梯度,共7个pH的PDA中央,置于25℃暗培养,定期测定菌落直径^[18]。

(3)光照的影响:将 *B. parva* 菌株接种于PDA中央,分别置于全光照、全黑暗、12 h光暗交替培养3种处理,试验用光源为普通荧光灯(60 W),于25℃培养,定期测定菌落直径。

(4)碳源的影响:将 *B. parva* 菌株分别接种于不加蔗糖的查氏培养基(对照组)及分别添加蔗糖、麦芽糖、淀粉、乳糖、果糖、葡萄糖6种碳源的培养基,于25℃暗培养,定期测定菌落直径。

(5)氮源的影响:将 *B. parva* 菌株分别接种于不加硝酸钠的查氏培养基(对照组)及分别添加牛肉膏、蛋白胨、硫酸铵、硝酸铵、硝酸钾、尿素6种氮源的培养基,于25℃暗培养,定期测定菌落直径。

1.2.5 致病菌菌丝致死温度的确定 *B. parva* 菌丝接种于PDB培养液,分别将锥形瓶于40,45,50,55℃的恒温水浴锅中加热20 min,对照组不进行水浴处理^[19]。水浴处理后将锥形瓶置于振动培养箱中,25℃恒温黑暗振荡(100 r/min)培养,3 d后观察各组菌丝生长状况。再以菌丝能够生长的可耐受最高温度为基础,以每增加1℃为1个温度梯度进行

处理,共设 5 个温度梯度,在每个处理中又设置水浴时间为 5,10,15,20 min,最终确定致病菌的致死温度及其与处理时间的关系。

1.2.6 致病菌的致病性 将 *B. parva* 菌块(5 mm)通过有伤和无伤分别接种至健康的爱媛柑、赣南橙、柠檬、火龙果、香蕉、新疆哈密瓜、梨、苹果、蜜枣、葡萄 10 种水果,设置空白对照组。观察 *B. parva* 在不同水果上的发病情况,分离回接确认致病性。

1.3 数据处理

用 Origin 8.0 制图;采用 SPSS 19.0 统计软件利用邓肯氏多重比较(Duncan's multiple range test)对差异显著性进行分析, $P < 0.05$ 为显著水平, $P < 0.01$ 为极显著水平。

2 结果与分析

2.1 致病菌菌丝结构

由图 1 可知,经乳酸石炭酸棉蓝液染色后的 *B. parva* 菌丝,在光学显微镜下菌丝呈明暗 2 种状态,菌丝相互缠绕。高倍镜下,菌丝呈明显分节生长,菌丝内含横隔膜,其将菌丝分隔成多个细胞,同时,菌丝呈分枝状态。由图 2 可知,*B. parva* 具有完整的细胞结构,细胞壁光滑、清晰可见,细胞膜和细胞器结构完整,属真核生物。

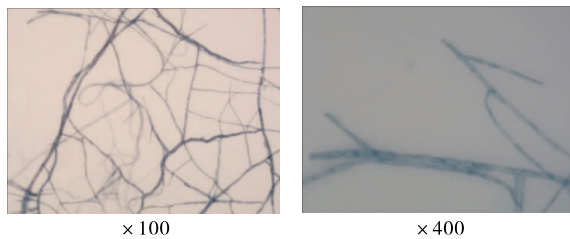


图 1 葡萄座腔菌菌丝图

Figure 1 Morphological characteristics of *B. parva*

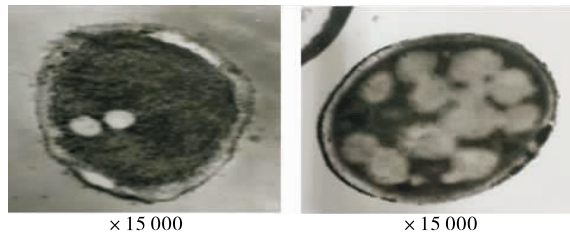


图 2 葡萄座腔菌的透射电镜图

Figure 2 Transmission electron microscope of *B. parva* (Bar=1 μm)

2.2 致病菌生长曲线的测定

由图 3 可知,*B. parva* 的生长分为 3 个时期,分别为延滞期(0~36 h)、对数期(36~96 h)、稳定期(96~168 h)。*B. parva* 处于延滞期时,是把致病菌接种到新鲜培养基中,表现出细胞数目不增加,其在生长曲线上表现的特点为菌丝生长的速率常数为 0;*B. parva* 处于对数期时,细胞分裂周期短,其在生长曲线上表现的特点为生长速率常数 R 最大;*B. parva* 处于稳定期时,此时的细胞数目没有净增加或净减少,即正生长和负生长达到动态平衡,特点为菌丝生长的速率常数趋于 0。

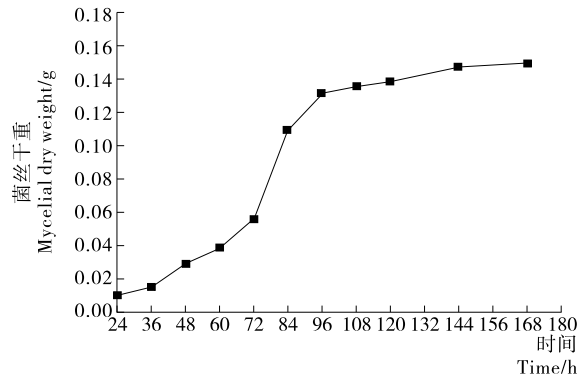


图 3 葡萄座腔菌的生长曲线

Figure 3 Growth curve of *B. parva*

2.3 不同条件诱导致病菌产孢

本试验通过菌落划伤、紫外线照射、碳源、氮源这几种方式诱导,从菌丝生长第 7 天开始连续观察至第 28 天,发现菌丝均不产生分生孢子。经以上诱导试验结果表明:*B. parva* 与韩青梅等^[10]研究的 *B. dothidea* 繁殖方式不相同,推测该种菌主要是通过菌丝进行繁殖。

2.4 致病菌最适生长条件的测定

2.4.1 温度对菌丝生长的影响 由表 1 可知,*B. parva* 在温度 15~35 $^{\circ}\text{C}$ 时均能生长,在温度低于 10 $^{\circ}\text{C}$ 和高于 40 $^{\circ}\text{C}$ 时菌丝不能生长。由试验数据可知,最适宜 *B. parva* 菌丝生长温度为 30 $^{\circ}\text{C}$;在温度 15~30 $^{\circ}\text{C}$ 时,随着环境温度升高,菌落直径不断增大,说明菌丝在此温度范围内,生长速率与温度呈正相关;但当温度高于 30 $^{\circ}\text{C}$ 时,菌丝生长速率呈现降低趋势,生长速率与温度呈负相关。综上所述,*B. parva* 属中温型微生物,所产生的酶在此温度下活性最佳,在过低或过高温时,相关酶可能会失活或变性。

表 1 温度对菌丝生长的影响[†]

Table 1 Effects of temperatures on mycelial growth($n=3$)

温度/ $^{\circ}\text{C}$	菌落直径/cm	温度/ $^{\circ}\text{C}$	菌落直径/cm
5	0.000 \pm 0.000	25	6.580 \pm 0.162 ^a
10	0.000 \pm 0.000	30	6.854 \pm 0.126 ^a
15	3.674 \pm 0.124 ^c	35	3.058 \pm 0.128 ^d
20	5.436 \pm 0.264 ^b	40	0.000 \pm 0.000

[†] 同列上标字母相同表示在 0.05 水平上无显著性差异。

2.4.2 pH 对菌丝生长的影响 由表 2 可知,*B. parva* 在 pH 4.0~10.0 时均能较好生长,在 pH 4.0~6.0 时,菌落直径随着 pH 值的升高逐渐增大,*B. parva* 生长速率不断加快;当 pH 6.0 时菌落直径最大,菌丝生长速率相对最高,可见 pH 6.0 是菌丝生长的最适 pH 值;当 pH 7.0~10.0 时,菌落直径差异不明显,但均低于 pH 6.0 时的菌丝长度,说明高 pH 值不利于菌落生长。综上所述,*B. parva* 较适于偏酸性环境中生长。

2.4.3 碳源、氮源对菌丝生长的影响 由表 3 可知,致病菌在以上 6 种碳源上均能生长,但在不同碳源上菌丝的生长存在显著差异。*B. parva* 在以葡萄糖为碳源时生长最快,在蔗

表2 pH对菌丝生长的影响[†]

Table 2 Effects of pH value on mycelial growth (n=3)

pH值	菌落直径/cm	pH值	菌落直径/cm
4.0	5.786±0.166 ^c	8.0	6.644±0.128 ^b
5.0	6.548±0.242 ^b	9.0	6.858±0.146 ^b
6.0	8.146±0.246 ^a	10.0	6.386±0.098 ^b
7.0	6.798±0.158 ^b		

† 同列上标字母相同表示在0.05水平上无显著性差异。

糖、果糖、麦芽糖为碳源时生长情况次之,以乳糖为碳源时生长最慢,但都显著高于无碳源对照组的菌丝生长速度。综上所述可知,碳源是致病菌正常生长的重要条件,但致病菌对每种碳源的吸收利用能力存在一定的差异。这取决于细胞呼吸消耗的能量直接来源物质,葡萄糖是呼吸作用中的直接供能物质,因此,葡萄糖更利于致病菌的吸收利用,而其他的碳源要被病原菌利用还必须在细胞内进行分解转化后才行,病原菌最佳碳源为葡萄糖。

病原菌在6种氮源上均能生长,但不同氮源间存在显著差异。*B. parva*在牛肉膏上菌丝生长最好,其次为硝酸铵、蛋白胨、硝酸钾、硫酸铵,在尿素上生长最慢,生长速率远低于其他各组,且菌落形态畸形。综上所述可知,合适的氮源是病原菌正常生长的重要条件,病原菌对氮源的吸收利用能力主要取决于氮源的存在形式。有机氮化合物最易被微生物吸收利用,尤其是氨基氮;其次是无机氮化合物,如铵态氮、硝态氮和简单的有机氮化物(尿素);最后是空气中分子态氮。在上述6种氮源中,牛肉膏主要以氨基酸和多肽组成,较蛋白质分子量小,更易于为病原菌提供氮源,更利于被吸收;尿素提供氮源的能力最差,推测可能由于尿素需先经微生物分解才能被利用。

表3 营养物质对菌丝生长的影响[†]

Table 3 Effects of nutrients on mycelial growth (n=3)

处理组	营养物质	菌落直径/cm
碳源	葡萄糖	7.864±0.124 ^a
	蔗糖	6.738±0.148 ^b
	果糖	6.484±0.166 ^b
	麦芽糖	6.366±0.128 ^b
	可溶性淀粉	5.478±0.162 ^c
	乳糖	5.184±0.184 ^d
氮源	对照	4.186±0.142 ^e
	牛肉膏	6.926±0.234 ^b
	硝酸铵	6.814±0.184 ^b
	蛋白胨	6.806±0.216 ^b
	硝酸钾	6.598±0.246 ^b
	硫酸铵	5.368±0.236 ^c
	尿素	1.732±0.188 ^f
对照	1.378±0.148 ^g	

† 同列上标字母相同表示在0.05水平上无显著性差异。

2.4.4 光照对菌丝生长的影响 由表4可知,在不同的光照条件下,*B. parva*菌丝生长速率无显著差异,说明菌丝对光不敏感。

表4 光照对病原菌菌丝生长的影响

Table 4 Effects of lights on mycelial growth (n=3)

光照	菌落直径/cm
全光	6.894±0.238
光暗交替	6.802±0.266
全黑	6.856±0.142

2.5 病原菌菌丝致死温度的测定

由表5可知,*B. parva*菌丝致死温度为42℃处理10min或43℃处理5min。先在40,45,50,55℃的恒温水浴锅中处理20min,确定*B. parva*的最高生长温度为40℃,45℃及以上温度*B. parva*均无法生长;再以40℃为基础,每增加1℃为一个处理,共设5个温度处理。在每个处理中又设置5,10,15,20min4种时间处理,最终确定*B. parva*在42℃处理10min或43℃处理5min不能生长,即为其致死温度。

表5 葡萄座腔菌菌丝致死温度的测定[†]

Table 5 Test on lethal temperature of *B. parva*

温度/℃	处理时间/min			
	5	10	15	20
40	+	+	+	+
41	+	+	+	+
42	+	-	-	-
43	-	-	-	-
44	-	-	-	-
45	-	-	-	-
50	-	-	-	-
55	-	-	-	-

† “+”表示有菌丝生长,“-”表示无菌丝生长。

2.6 病原菌的致病性

由表6、图4和5可知,接种后第3天10种水果均通过伤口被*B. parva*感染,香蕉还可通过无伤被感染,其他水果在无伤条件下均未出现发病症状。在供试的10种水果中,柑橘类发病症状相似,均表现为接种部位果皮干枯、褐变且凹陷;火龙果接种部位出现干枯与凹陷;香蕉接种部位变黑,病斑呈圆形;哈密瓜病斑呈圆形,无明显扩散状态;梨和苹果接种部位出现淡褐色水渍状斑纹;蜜枣接种部位表面凹陷,果肉呈水渍状;葡萄接种部位明显软烂塌陷。将各寄主上引起病变的微生物,重新接种到PDA培养基上,培养观察其菌落形态后,确定引起各寄主病变的微生物其菌落形态与*B. parva*菌落形态一致,结果表明,*B. parva*对各寄主具有致病性。

表 6 葡萄座腔菌的寄主范围检测[†]

Table 6 Host range of *B. parva*

供试菌株	接种方式	爱媛柑	赣南橙	柠檬	火龙果	香蕉	新疆哈密瓜	梨	苹果	蜜枣	葡萄
葡萄座腔菌	有伤	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	无伤	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
空白	有伤	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	无伤	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

† “+”表示感染,“-”表示未感染。

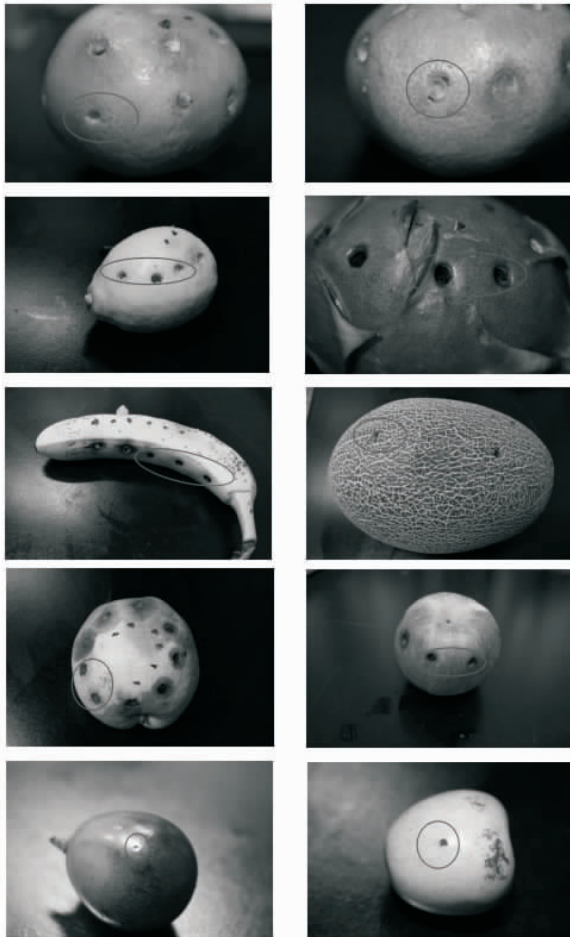


图 4 葡萄座腔菌致病性(空白组)

Figure 4 Pathogenicity of *B. parva* (control)

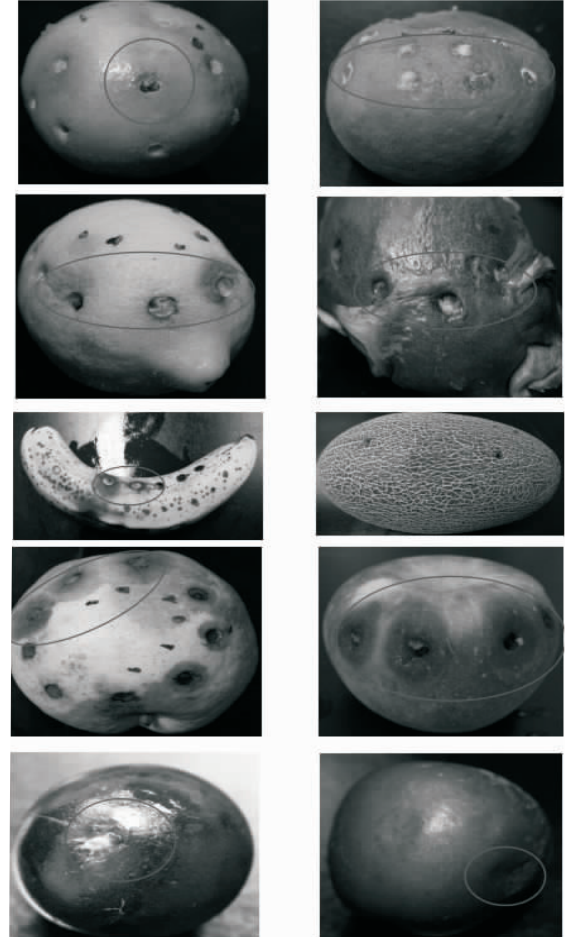


图 5 葡萄座腔菌致病性(处理组)

Figure 5 Pathogenicity of *B. parva* (treatments)

3 结论

研究显示,葡萄座腔菌的菌丝呈分枝状、内含隔膜,具有完整的细胞结构;生长曲线分为 3 个时期,延滞期(0~36 h)、对数期(36~96 h)、稳定期(96~168 h);经多种方式诱导该病原菌不产生孢子,与韩青梅等^[10]研究相反,是对葡萄座腔菌生物学特性研究的补充;最适生长条件为:生长温度 30 ℃,pH 6,以葡萄糖为碳源,牛肉膏为氮源,对光照条件不敏感;菌丝致死条件为 42 ℃处理 10 min 或 43 ℃处理 5 min;葡萄座腔菌均可通过伤口对 10 种供试水果感染而发病,表明该病原菌具有广谱致病性,在贮藏发病的果实时,需避免交互式感染。但葡萄座腔菌在红阳果实上的发病机制有待进一步研究。

参考文献

- [1] 丁捷,刘书香,宋会会,等.红阳猕猴桃果实生长发育规律[J].食品科学,2010,31(20):473-476.
- [2] 王瑞玲.红阳猕猴桃采后病害生理及臭氧保鲜技术研究[D].雅安:四川农业大学,2010:20.
- [3] CROUS P W, BERNARD S, WINGFIELD M J, et al. Phylogenetic lineages in the *Botryosphaeriaceae* [J]. *Studies in Mycology*, 2006, 55: 235-253.
- [4] LIU Ye, WANG Wei-hao, ZHOU Ya-han, et al. Isolation, identification and in vitro screening of Chongqing orangery yeasts for the biocontrol of *Penicillium digitatum* on citrus fruit [J]. *Biological Control*, 2017, 110: 18-24.

(下转第 124 页)

- 2015, 61(5): 524-531.
- [5] HOZBOR M C, SAIZ A I, YEANNES M I, et al. Microbiological changes and its correlation with quality indices during aerobic iced storage of sea salmon (*Pseudoperca semifasciata*) [J]. LWT-Food Science and Technology, 2006, 39(3): 99-104.
- [6] SATHIVEL S, LIN Quan, HUANG Jia-qi, et al. The influence of chitosan glazing on the quality of skinless pink salmon (*Oncorhynchus gorbusha*) fillets during frozen storage[J]. Journal of Food Engineering, 2007, 81(12): 366-373.
- [7] MURADO M A, MONTEMAYOR M I, CABO M L, et al. Optimization of extraction and purification process of hyaluronic acid from fish eyeball[J]. Food and Bioproducts Processing, 2012, 90(7): 491-498.
- [8] SOON Sik Kwon, BONG Ju Kong, SOO Nam Park. Physicochemical properties of pH-sensitive hydrogels based on hydroxyethyl cellulose-hyaluronic acid and for applications as transdermal delivery systems for skin lesions[J]. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2015, 92(5): 146-154.
- [9] 宋永民, 丁厚强, 郭学平. 透明质酸在食品中的应用[J]. 食品与药品, 2014, 16(4): 299-301.
- [10] ZHU Ying-chun, MA Li-zhen, YANG Hua, et al. Super-chilling ($-0.7\text{ }^{\circ}\text{C}$) with high- CO_2 packaging inhibits biochemical changes of microbial origin in catfish (*Clarias gariepinus*) muscle during storage [J]. Food Chemistry, 2016, 206: 182-190.
- [11] SÁNCHEZ-ALONSO I, CARECHE M, MORENO P, et al. Testing caffeic acid as a natural antioxidant in functional fish-fibre restructured products[J]. LWT-Food Science and Technology, 2011, 44(4): 1 149-1 155.
- [12] LAN Yang, SHANG Yong-biao, SONG Ying, et al. Changes in the quality of superchilled rabbit meat stored at different temperatures[J]. Met Science, 2016, 117(7): 173-181.
- [13] 杨茜, 谢晶. 中间温度带理论在海产品贮藏保鲜中的应用研究进展[J]. 食品与机械, 2015, 31(2): 187-190.
- [14] MUELA E, SANUDO C, CAMPO M M, et al. Effect of freezing method and frozen storage duration on instrumental quality of lamb throughout display[J]. Meat Science, 2010, 84(4): 662-669.
- [15] 唐文艳, 王苗丹. 异硫氰酸烯丙酯壳聚糖复合涂膜对鲫鱼保鲜作用研究[J]. 安徽农业科学, 2015, 43(5): 241-243.
- [16] 凌沛学. 透明质酸[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2000: 58.
- [17] 张强. 罗非鱼片真空微冻保鲜工艺的研究[D]. 海口: 海南大学, 2011: 23.
- [18] 茅林春, 段道富, 许勇泉, 等. 茶多酚对微冻鲫鱼的保鲜作用[J]. 中国食品学报, 2006, 6(4): 106-110.
- [19] 陆利霞, 李霞, 孙荟, 等. 鲫鱼贮藏鲜度评价物理特性指标的研究[J]. 食品与发酵工业, 2007, 33(5): 162-165.
- [20] 胡玥, 杨水兵, 余海霞, 等. 微冻保鲜方法对带鱼品质及组织结构的影响[J]. 食品科学, 2016, 37(18): 290-297.
- [21] 何其, 王晶, 曹雪涛, 等. 基于质构变化的罗非鱼片冻藏保质期预测[J]. 食品科学, 2014, 35(10): 241-245.
- [22] 高海, 蔡欢欢, 朱志伟. 光照和温度对草鱼和三文鱼鱼肉贮藏品质的比较研究[J]. 食品科学, 2017, 38(15): 244-249.
- [23] 刘敏, 包静, 刘均忠, 等. 壳寡糖抗氧化性及对鲫鱼保鲜性能的研究[J]. 安徽农业科学, 2015, 43(20): 268-271.
- [24] 阙婷婷, 郑家闻, 陈士国, 等. 微冻保鲜与冻藏保鲜对乌鳢品质的影响[J]. 中国食品学报, 2015, 15(6): 136-147.
- [25] 曹雷鹏, 牛丽红, 孙晓华. 草鱼冰藏期间新鲜度及热加工性质的变化[J]. 食品科学, 2016, 37(12): 267-272.
- (上接第 119 页)
- [5] MENDEZCASTILLO L, PRIETOCORREA E, JIMENEZJUNCA C. Identification of fungi isolated from banana rachis and characterization of their surface activity[J]. Letters in Applied Microbiology, 2017, 64(3): 246-251.
- [6] 程燕林, 梁军, 吕全, 等. 葡萄座腔菌科研究进展: 鉴定, 系统发育学和分子生态学[J]. 生态学报, 2011, 31(11): 3 197-3 207.
- [7] ZHANG Chuan-qing, XU Bing-cheng. First report of canker on Chinese hickory (*Carya cathayensis*) caused by *Botryosphaeria dothidea* in China [J]. Plant Disease, 2011, 95(10): 1 319.
- [8] 李诚, 蒋军喜, 冷建华, 等. 奉新县猕猴桃果实腐烂病原菌分离鉴定[J]. 江西农业大学学报, 2012, 34(2): 259-263.
- [9] 李诚, 蒋军喜, 冷建华, 等. 猕猴桃枝枯病病原菌鉴定[J]. 北方园艺, 2013(24): 130-133.
- [10] 韩青梅, 王婧群, 林月莉, 等. 葡萄座腔菌 *Botryosphaeria dothidea* 侵染及其对苹果果实影响的组织细胞学研究[J]. 菌物学报, 2014, 33(1): 36-46.
- [11] SLIPPERS B, CROUS P W, DENMAN S, et al. Combined multiple gene genealogies and phenotypic characters differentiate several species previously identified as *Botryosphaeria dothidea*[J]. Mycologia, 2004, 96(1): 83-101.
- [12] 秦瑞凤. 陕西省苹果和葡萄炭疽病原菌鉴定[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2011, 24-25.
- [13] CUNNINGTON J H, PRIEST M J, POWNEY R A, et al. Diversity of *Botryosphaeria* species on horticultural plants in Victoria and new south wales[J]. Australasian Plant Pathology, 2007, 36(2): 157-159.
- [14] 杨锡洪, 解万翠, 吴海燕, 等. 快速发酵金线鱼挥发性风味成分的 SPME-GC-MS 检测 [J]. 食品与机械, 2009, 25(6): 103-105.
- [15] CHEN Juan, WANG Hui, GUO Shun-xing. Isolation and identification of endophytic and mycorrhizal fungi from seeds and roots of *Dendrobium* (Orchidaceae) [J]. Mycorrhiza, 2012, 22(4): 297-307.
- [16] SOUZA A R, BALDONI D B, PORTO V, et al. Selection, isolation, and identification of fungi for bioherbicide production [J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2016, 48(1): 101-108.
- [17] TRONCOSO E, BARAHONA S, CARRASCO M, et al. Identification and characterization of yeasts isolated from the South Shetland Islands and the Antarctic Peninsula[J]. Polar Biology, 2016, 40(3): 1-10.
- [18] 钱茜茜, 吴燕燕, 魏涯, 等. 海鲈鱼腌制过程中产胺菌的分离筛选与生物学特性研究[J]. 食品与发酵工业, 2016, 42(1): 70-75.
- [19] 柴兆祥, 李金花, 辛剑锋. 砖红镰孢生物学特性研究[J]. 植物病理学报, 2004, 34(5): 409-413.