

甜樱桃果实采后病原菌的分离鉴定及其生物学特性研究

杜小琴, 李杰, 秦文*, 李玉, 何靖柳, 王玮琼, 陈琴媛, 叶昕轶

(四川农业大学食品学院, 四川雅安 625014)

摘要:为研究危害采后甜樱桃果实的病原菌,以‘拉宾斯’甜樱桃果实为试材,对低温贮藏过程中的病原菌进行分离鉴定,并对其生物学特性进行初步研究。根据病原菌形态学特征和18S rDNA序列分析结果将2个病原菌鉴定为子囊菌亚门锤舌菌纲柔膜菌目核盘菌科核盘菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)和子囊菌亚门粪壳菌纲肉座菌亚纲肉座菌目生赤壳科螺旋聚孢霉属(*Clonostachys sp.*)。核盘菌菌丝在以牛肉膏为氮源的SDA培养基、20℃、pH=5.0及黑暗条件下生长最好,产孢量最佳条件为以乳糖为碳源,牛肉膏为氮源的SDA培养基,30℃、pH=7.0,黑暗环境;螺旋聚孢霉菌丝在以硝酸钾为氮源的SDA培养基、30℃、pH=6.0及光照条件下生长最好,产孢量最佳条件为20℃、pH=6.0,光照培养。

关键词:甜樱桃,病原菌,鉴定,生物学特性

Isolation, identification and biological characteristics of pathogenic bacteria for sweet cherry

DU Xiao-qin, LI Jie, QIN Wen*, LI Yu, HE Jing-liu, WANG Wei-qiong, CHEN Qin-yuan, YE Xin-yi

(College of Food Science, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China)

Abstract: For further research on the main pathogenic bacteria of post-harvest sweet cherry fruit (cv. Labinsi), the pathogenic bacteria was isolated, identified in low temperature storage and their biological characteristics were studied. According to the characters of morphology and sequences analysis of 18S rDNA, the pathogenic bacteria was *Pezizomycotina Leotiomyces Helotiales Sclerotiniaceae Sclerotinia sclerotiorum* and *Pezizomycotina Sordariomycetes Hypocreomycetidae Hypocreales Bionectriaceae Clonostachys sp.*. SDA medium with beef extract as nitrogen source, 20℃, pH=5.0 and dark condition were the best for mycelia growth of *Sclerotinia sclerotiorum*. lactose as carbon source, beef extract as nitrogen source, 30℃, pH=7.0 and dark condition were the best for spore production. SDA medium with KNO₃ as nitrogen source, 30℃, pH=6.0 were the best for mycelia growth of *Clonostachys sp.*, 20℃, pH=6.0 and light condition were the best for spore production.

Key words: sweet cherry; pathogenic bacteria; identification; biological characteristics

中图分类号: TS255.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2015)18-0197-06

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2015.18.031

甜樱桃 (*Prunus avium* L.) 又名大樱桃、车厘子、西洋樱桃, 原产欧洲和西亚, 为蔷薇科 (*Rosaceae*) 樱桃属 (*Cerasus*) 植物。甜樱桃果实营养价值高^[1], 具有良好的补血功效^[2], 长期食用可以有效减轻关节炎引起的疼痛^[3]、减少患神经退行性疾病的风险^[4]。甜樱桃果实皮薄、柔软多汁, 易受到病原微生物的侵染, 加上采收时气温较高, 采后极不耐贮藏, 据报道每年甜樱桃果实因微生物侵染引起的腐烂损失可占采后损失的1/2以上^[5]。引起甜樱桃果实采后腐烂的微生物主要是真菌, 包括扩展青霉 (*Penicillium expansum*)^[6]、链核盘菌 (*Monilinia sp.*)^[7]、匍枝根霉 (*Rhizopus*

stolonifer)^[8]、链格孢菌 (*Alternaria alternata*)^[9]、炭疽菌 (*Colletotrichum sp.*)、灰霉菌 (*Botrytis cinerea* Pers. ex Fr.)^[10]等。目前对甜樱桃果实的研究主要集中在采后生理和保鲜技术这两个方面^[10-12], 而对其采后致病菌的研究较少^[13]。本文主要对‘拉宾斯’甜樱桃果实采后低温贮藏过程中的病原菌进行分离鉴定, 并对其生物学特性进行研究, 旨在为甜樱桃果实采后贮藏过程中的微生物病害防治提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

供试甜樱桃 品种为‘拉宾斯’, 购于雅安汉源

收稿日期: 2014-12-19

作者简介: 杜小琴 (1990-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 农产品加工及贮藏工程, E-mail: duxiaoqin1814@sina.com。

* 通讯作者: 秦文 (1967-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 果蔬采后生理及贮藏技术, E-mail: qinwen1967@aliyun.com.cn。

农贸市场,选择颜色均匀、无病虫害、无机械损伤的果实预冷24 h后于 (4 ± 1) °C冷库中贮藏,待果实自然发病后进行分离;Ezup柱式真菌基因组DNA抽提试剂盒、SanPrep柱式DNA胶回收试剂盒 上海生工生物工程有限公司;沙保弱培养基(SDA)配方 葡萄糖40 g,蛋白胨10 g,琼脂14~16 g,pH6.0~6.5,蒸馏水1000 mL,121 °C、0.1 MPa灭菌20 min。

LDZX-40AI型立式自动电热压力蒸汽灭菌锅 上海三申医疗核子仪器厂;SW-CJ-1F洁净工作台 苏州安泰空气技术有限公司;PHS-3C型数显酸度计 中国雷磁仪器分析厂;DHG-9162电热恒温培养箱 上海一恒科技有限公司;尼康E200生物显微镜。

1.2 实验方法

参照董维^[4]的方法,略作修改。

1.2.1 潜在病原菌的分离及纯化 将具有相同病症的发病果实分组,采用组织分离法分离病原菌。剪取病健交接处约2 mm的组织,用75%酒精表面消毒5 s后,用无菌水清洗3次,置于马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)平板上,每一病症组5皿,25 °C恒温培养箱中暗培养。当菌落直径生长至1 cm时,用接种针挑取菌丝尖端,置入另一PDA培养基内培养(同上),重复上述操作3~5次,直至获得纯培养物,4 °C冰箱保存。

1.2.2 致病性实验 取健康果实,先用清水洗净,再用75%的酒精表面消毒5 s后无菌水清洗3次,晾干备用。取在PDA培养基上连续培养2代后的新鲜菌株供试,在平板上生长7 d后,用无菌打孔器打取菌饼,直径约为6 mm,采用有伤接种,用灭菌牙签将果实刺破3个孔(孔眼集中在一起),将准备好的菌饼移植在刺破处,对照为同样大小的无菌培养基块。

将处理完的甜樱桃置于25 °C的恒温培养箱中培养,定期观察发病情况,显症后再次分离鉴定,将分离出的菌株与所接菌株的菌落形态及菌丝形态进行比较,以判断是否一致,若一致则为病原菌。

1.2.3 病原菌的18S rDNA序列测定 测定病原菌18S rDNA序列,通过进化树分析确定病原菌种属。18S rDNA序列PCR扩增引物为NS1:5,GTAGTCATATGCTTGCTCTC3;NS6:5,GCATCACAGACCTGTTATTCCTC3。PCR反应体系:Template(基因组DNA 20~50 ng/ μ L)0.5 μ L,10 \times Buffer(含 Mg^{2+})2.5 μ L,dNTP(各2.5 mmol/L)1 μ L,酶0.2 μ L,F(10 μ mmol/L)0.5 μ L,R(10 μ mmol/L)0.5 μ L,加双蒸 H_2O 至25 μ L。PCR循环条件为94 °C预变性4 min,94 °C 45 s,55 °C 45 s,72 °C 1 min共30个循环,72 °C修复延伸10 min,4 °C保存。PCR产物用1%琼脂糖进行凝胶电泳,电压150 V,时间20 min。

1.2.4 病原菌的进化树构建 将病原菌的18S rDNA序列提交至NCBI,通过Blast程序与GenBank中相似DNA序列进行比对,并以相似度较高的序列使用MEGA5.1软件构建进化树。

1.2.5 病原菌生物特性研究 将分离病原菌接种到PDA平板上,25 °C暗培养3~7 d后,以直径6 mm的无菌打孔器沿各菌落边缘打孔,将打好的菌饼以接种环转移至PDA平板中心。实验设不同的温度、pH、光

照条件和碳、氮源处理。连续6 d测量菌落直径,并于培养13 d时以血球计数板法观察并记录产孢量。

1.2.5.1 碳、氮源对菌落生长和产孢量的影响 采用SDA为基础培养基,供试碳源有5种:葡萄糖、麦芽糖、乳糖、蔗糖和可溶性淀粉,按照葡萄糖的量分别称取等量的供试碳源进行置换,配制成5种培养基。供试氮源有5种:酵母膏、硝酸铵、牛肉膏、氯化铵、柠檬酸铵,按照蛋白胨的量进行等量置换。将打好的菌饼转移至不同碳氮源的平板中心,25 °C暗培养。

1.2.5.2 培养温度对菌落生长和产孢量的影响 将打好的菌饼转移至新的PDA平板中心,分别放置在5、10、15、20、25、30、35 °C的温度中培养,光照条件为黑暗。

1.2.5.3 培养基pH对菌落生长和产孢量的影响 将打好的菌饼转移至含不同pH的PDA平板中心,培养基pH为3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0,用0.1 mol/L HCl和0.1 mol/L NaOH调节,25 °C暗培养。

1.2.5.4 光照条件对菌落生长和产孢量的影响 光照条件设置为暗培养、光培养和光暗交替(光、暗各12 h)培养,培养基为PDA,培养温度为25 °C。

1.3 数据处理

所有数据均重复3次,利用SPSS软件进行统计处理,采用ANOVA进行邓肯氏多重差异分析,Origin绘图,图中的竖线代表标准偏差。

2 结果与分析

2.1 甜樱桃果实采后病原菌的分离、纯化及致病性测试

从甜樱桃果实的发病部位分离出两种微生物,编号为D2、B3。致病性实验结果表明,有伤接种时D2



图1 病原菌D2菌丝形态

Fig.1 Morphology of pathogen D2

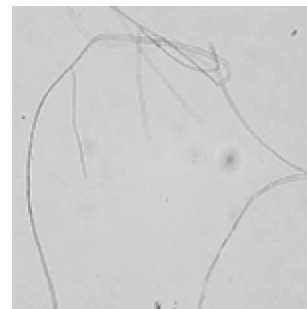


图2 病原菌B3菌落形态

Fig.2 Morphology of pathogen B3

在第2 d就出现病症, B3在第3 d出现, 5 d后可以明显观察到D2、B3的染病率为100%, 对照组未见染病。将发病部位的组织进行再次分离, 结果得到的菌株与所接菌株的菌落形态及菌丝形态一致, 由此可证明D2、B3两种微生物均是采后甜樱桃果实的病原菌, D2、B3的菌丝形态分别如图1、图2所示。

D2在甜樱桃果实上引起的病症表现为果实表面有淡灰色菌丝, 染病后果肉迅速变软, 发褐, 且病症很快会扩散至全果, 从而失去商品性。D2菌落在PDA平板上呈圆形, 浅灰色; 菌丝光滑, 分支较少, 有明显的隔膜。B3引起的病症为果实表面有白色菌丝生长, 呈圆心轮纹状排列, 发病组织具有明显的边缘, 较干爽, 没有软腐症状, 菌落在PDA平板上呈圆形, 致密, 短绒状, 乳白色, 边缘轮廓清晰, 培养初期菌落反面为白色, 2~3 d后呈浅黄色, 之后颜色逐渐加深, 菌丝光滑, 呈树枝状, 长而无隔膜。

2.2 甜樱桃果实采后病原菌18S rDNA序列测定与进化树构建

以通用引物进行PCR扩增, D2、B3菌株分别获得大小1418、1416 bp的特异条带, PCR结果见图3。胶回收后用病原菌18SrDNA序列在GeneBank中进行搜索和比对, 使用MEGA5.1软件以Neighbor-Joining法构建进化树(图4)。

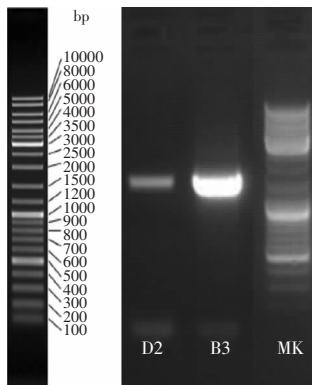


图3 B2、D3电泳图

Fig.3 Electrophoregram of B2、D3

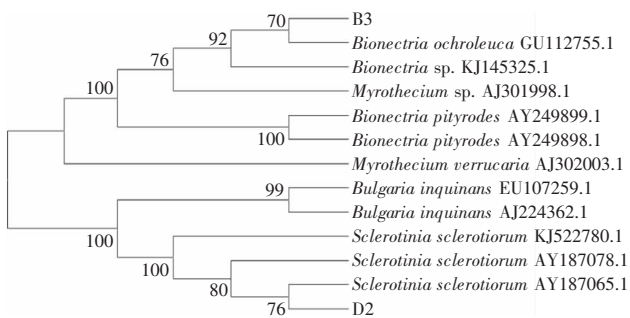


图4 核盘菌, 螺旋聚孢霉进化树

Fig.4 Evolutionary tree of *Sclerotinia sclerotiorum*, *Clonostachys* sp.

进化树分析结果表明, D2菌株与核盘菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)有较高的同源性, 包括AY187065.1、AY187078.1和KJ522780., 与胶鼓菌(*Bulgaria*

inquinans)关系较远, 结合其形态学特征鉴定为子囊菌亚门锤舌菌纲柔膜菌目核盘菌科核盘菌属核盘菌(*Sclerotinia sclerotiorum*); B3菌株与生赤壳属(*Bionectria* sp.)关系较近, 与淡色生赤壳菌(*Bionectria ochroleuca* GU112755.1)同源性为70%, 与疣孢漆斑菌(*Myrothecium verrucaria* AJ302003.1)关系较远, 结合其形态学特征鉴定为子囊菌亚门粪壳菌纲肉座菌亚纲肉座菌目生赤壳科螺旋聚孢霉属(*Clonostachys* sp.)。

2.3 甜樱桃果实采后病原菌生物学特性研究

2.3.1 不同碳源对病原菌菌落生长及产孢量的影响

不同碳源对病原菌菌落生长的影响见图5, *Sclerotinia sclerotiorum*菌落在以乳糖、蔗糖、葡萄糖为碳源时生长均较佳, 菌落直径分别为54.11、57.63、67.03 mm, 显著大于其他碳源的菌落直径($p \leq 0.05$), 当以可溶性淀粉为碳源时菌落直径为41.81 mm, 显著低于其他碳源($p \leq 0.05$), 该结果说明乳糖、蔗糖、葡萄糖均适合作为培养*Sclerotinia sclerotiorum*的培养基碳源; 培养*Clonostachys* sp.的5中供试碳源中麦芽糖、乳糖、蔗糖、葡萄糖的菌落直径之间差异均不显著($p \geq 0.05$), 而以可溶性淀粉为碳源时菌落直径仅为23.59 mm, 显著低于其他碳源($p \leq 0.05$), 说明相对于其他四种, 可溶性淀粉不适合作为培养*Clonostachys* sp.的碳源。

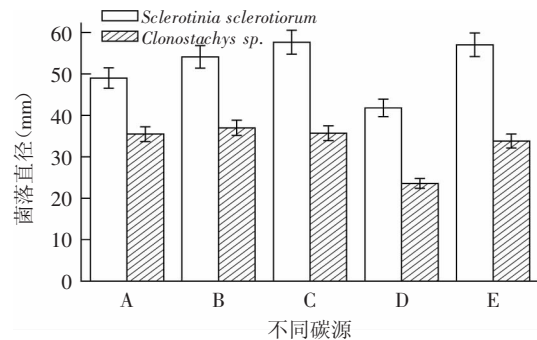


图5 不同碳源对病原菌菌丝生长的影响

Fig.5 Effect of different carbon source on the growth of pathogens
注: A麦芽糖, B乳糖, C蔗糖, D可溶性淀粉, E葡萄糖; 图6同。

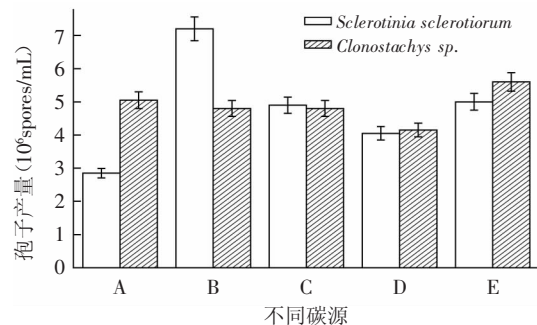


图6 不同碳源对病原菌产孢量的影响

Fig.6 Effect of different carbon source on the influence of spore yields

不同碳源对病原菌孢子产量的影响见图6, 碳源对*Sclerotinia sclerotiorum*产孢量的影响较大, 对*Clonostachys* sp.的影响较小。*Sclerotinia sclerotiorum*

在以乳糖为碳源时产孢量最多,达到 7.2×10^6 spores/mL,显著大于其他碳源($p \leq 0.05$),而在以麦芽糖为碳源时产孢量仅为 2.85×10^6 spores/mL,显著低于其他碳源($p \leq 0.05$); *Clonostachys sp.*在以麦芽糖、乳糖、蔗糖、葡萄糖为碳源时产孢量均较多,彼此之间差异不显著($p \geq 0.05$)。

2.3.2 不同氮源对病原菌菌落生长及产孢量的影响
不同氮源对病原菌菌落生长的影响见图7,氮源对*Sclerotinia sclerotiorum*菌落生长的影响较大,各氮源之间差异均达到显著($p \leq 0.05$),其中以牛肉膏为氮源时的菌落直径最大,达到56.14 mm,氯化铵最小,为25.85 mm,由此说明牛肉膏最适合作为培养*Sclerotinia sclerotiorum*的培养基氮源;在以硝酸钾为氮源时*Clonostachys sp.*菌落直径为30.39 mm,显著大于其他氮源($p \leq 0.05$),而在以氯化铵为氮源时菌落直径最小,仅为17.02 mm,比硝酸钾的少了43.99%,由此说明硝酸钾是培养*Clonostachys sp.*的最佳氮源。

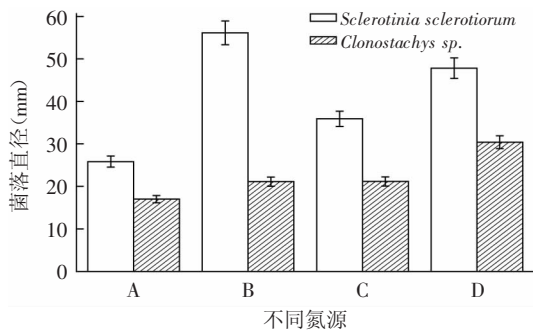


图7 不同氮源对病原菌菌落生长的影响

Fig.7 Effect of different nitrogen source on the growth of pathogens

注:A氯化铵,B牛肉膏,C硝酸铵,D硝酸钾;图8同。

不同氮源对病原菌孢子产量的影响见图8,氮源对*Sclerotinia sclerotiorum*产孢量的影响较大,其中以牛肉膏为氮源时产孢量最多,为 5.20×10^6 spores/mL,显著大于其他氮源($p \leq 0.05$),而以氯化铵和硫酸铵为氮源时,*Sclerotinia sclerotiorum*产孢量均较少;由图8可知氮源对*Clonostachys sp.*产孢量的影响较小,在以牛肉膏、硝酸铵、硝酸钾为氮源时均能产生较多孢子,分别为 4.50×10^6 、 4.05×10^6 和 4.65×10^6 spores/mL。

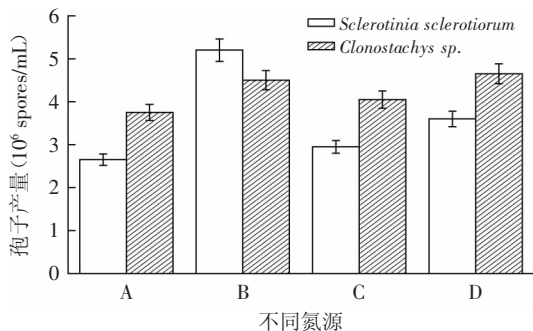


图8 不同氮源对病原菌产孢量的影响

Fig.8 Effect of different nitrogen source on the influence of spore yields

2.3.3 不同培养温度对病原菌菌落生长及产孢量的影响
不同培养温度对*Sclerotinia sclerotiorum*菌落生长及产孢量的影响见图9,培养温度在5~20℃时,*Sclerotinia sclerotiorum*菌落直径呈上升趋势,并在20℃时达到最大值79.30 mm,显著大于其他温度($p \leq 0.05$),而当温度高于20℃菌落生长受到抑制,35℃时菌落直径为6.00 mm,菌落几乎不生长。5℃时该菌株产孢子,为 1.50×10^6 spores/mL,产孢量在5~30℃时呈上升趋势,最高达到 10.05×10^6 spores/mL,显著大于其他温度($p \leq 0.05$),而当温度大于30℃时产孢量呈下降趋势。由此可知适合*Sclerotinia sclerotiorum*生长的最佳温度为20℃,最适合的产孢温度为30℃。

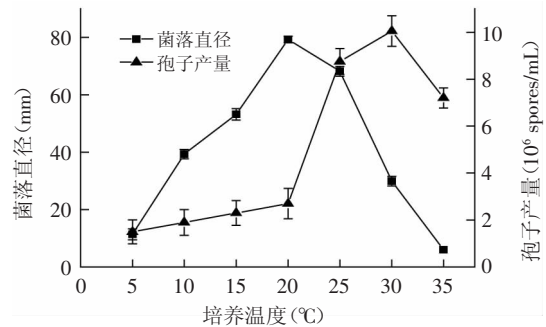


图9 不同温度对核盘菌生长和产孢量的影响

Fig.9 Effect of different temperature on the growth of *Sclerotinia sclerotiorum* and spore yields

不同培养温度对*Clonostachys sp.*菌落生长及产孢量的影响见图10,由图可知培养温度在5~10℃时*Clonostachys sp.*菌落几乎不生长,说明*Clonostachys sp.*耐低温能力不强,在10~30℃内时菌落直径呈上升趋势,在30℃时达到最大值38.98 mm,之后迅速下降,到35℃时菌落也几乎不生长,由此可知适宜*Clonostachys sp.*生长的温度范围比较狭窄;低温下该菌产孢子,在5~20℃时孢子产量呈上升趋势,在20℃时达到最大值 2.8×10^7 spores/mL后发生下降,由此说明最适合*Clonostachys sp.*的产孢温度为20℃。

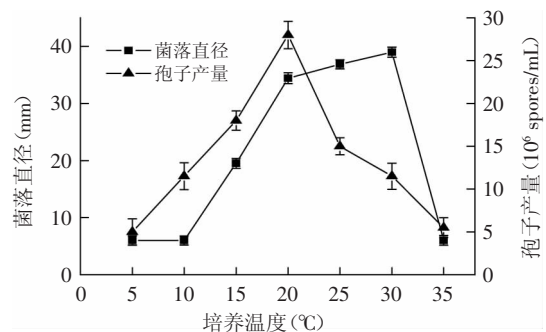


图10 不同温度对螺旋聚孢霉生长和产孢量的影响

Fig.10 Effect of different temperature on the growth of *Clonostachys sp.* and spore yields

2.3.4 不同pH对病原菌菌落生长及产孢量的影响
不同pH对*Sclerotinia sclerotiorum*菌落生长及产孢量

的影响见图11,由图可知*Sclerotinia sclerotiorum*在pH为4.0~8.0时生长均较好,在培养2 d后的菌落直径均在43.00~49.00 mm内,当pH为5.0时,菌落直径达到最大值48.42 mm,之后菌落直径呈下降趋势,由此说明该菌在偏酸性的环境中生长较好;*Sclerotinia sclerotiorum*在pH为4.0~9.0时均能产孢,当pH为7.0时产孢量最大,为 8×10^6 spores/mL,之后产孢量迅速下降,到pH为9.0时,孢子产量仅为 1.7×10^6 spores/mL,说明最适合*Sclerotinia sclerotiorum*产孢的pH为7.0。

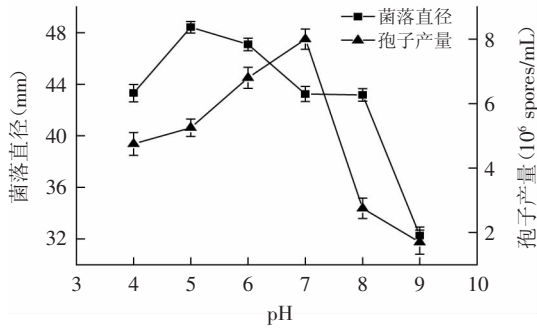


图11 不同pH对核盘菌生长和产孢量的影响

Fig.11 Effect of different pH value of medium on the growth of *Sclerotinia sclerotiorum* and spore yields

不同pH对*Clonostachys sp.*菌落生长及产孢量的影响见图12,该菌株在pH为4.0~9.0时均能生长,当pH为6.0时,菌落直径达到最大值44.20 mm,之后随pH的升高菌落直径减小;当pH为4.0~6.0时,*Clonostachys sp.*产孢量呈上升趋势,之后下降,最大值为 10.25×10^6 spores/mL。由此可知最适合*Clonostachys sp.*生长和产孢的pH均为6.0。

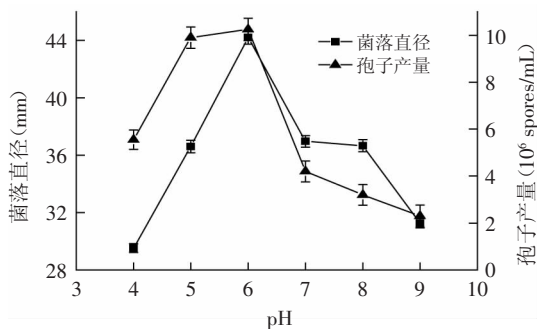


图12 不同pH对螺旋聚孢霉生长和产孢量的影响

Fig.12 Effect of different pH value of medium on the growth of *Clonostachys sp.* and spore yields

2.3.5 光照条件对菌落生长及产孢量的影响 光照条件对病原菌菌落生长的影响如表1所示,*Sclerotinia sclerotiorum*在暗培养至第2 d时菌落直径为50.62 mm,显著大于光照培养($p \leq 0.05$),但差异仅达到5.71 mm;*Clonostachys sp.*在光照培养至第6 d时,菌落直径为53.95 mm,显著大于暗培养($p \leq 0.05$),差异达到16.71 mm。

Sclerotinia sclerotiorum、*Clonostachys sp.*在光照、

表1 不同光照条件对病原菌生长情况的影响

Table 1 Effect of different light conditions on the growth of pathogens

光照	菌落直径(mm)	
	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	<i>Clonostachys sp.</i>
光照培养	44.91±2.2455 ^b	53.95±2.4975 ^a
光暗交替	47.67±2.1835 ^{ab}	36.92±2.0183 ^b
暗培养	50.62±2.031 ^a	37.24±1.8304 ^b

注:同一列中数字后面的不同字母表示显著性达到 $p \leq 0.05$ 水平;表2同。

表2 不同光照条件对病原菌孢子产量的影响

Table 2 Effect of different light conditions on the influence of spore yields

光照	孢子产量(10^6 spores/mL)	
	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	<i>Clonostachys sp.</i>
光照培养	9.35±0.9274 ^b	15.00±0.9721 ^a
光暗交替	11.35±0.7832 ^a	12.75±0.9021 ^b
暗培养	12.15±0.9113 ^a	12.70±0.8273 ^b

光暗交替、黑暗条件下培养至13 d时的孢子产量如表2所示,*Sclerotinia sclerotiorum*在黑暗条件下培养时孢子产量达到 12.15×10^6 spores/mL,显著大于光照培养($p \leq 0.05$);*Clonostachys sp.*光照条件培养时孢子产量为 15.00×10^6 spores/mL,显著大于暗培养($p \leq 0.05$)。综合菌落直径和孢子产量这两个指标可以得出*Sclerotinia sclerotiorum*适合黑暗培养,*Clonostachys sp.*适合光照培养。

3 结论与讨论

从甜樱桃‘拉宾斯’果实上分离出两种病原菌,分别是子囊菌亚门锤舌菌纲柔膜菌目核盘菌科核盘菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)和子囊菌亚门粪壳菌纲肉座菌亚纲肉座菌目生赤壳科螺旋聚孢霉(*Clonostachys sp.*)。目前关于这两种菌株的报道多集中在其他果蔬上,核盘菌在油菜、大豆、黄瓜、向日葵上均有报道^[15-17],兰玉菲等^[18]报道*Bionectria ochroleuca*是鸡腿菇的病原菌,曹晋忠等^[19]在黄芩中也分离鉴定出该菌株。甜樱桃果实采后由病原菌引起的腐烂严重,而目前国内对外对导致腐烂的病原菌报道较少,在采后贮藏过程中如何控制病原菌的发展还需深入研究。

核盘菌菌丝在以乳糖、蔗糖、葡萄糖为碳源、牛肉膏为氮源的SDA培养基中生长较好,最适培养温度为20℃,最佳pH是5.0,黑暗条件下生长较好;孢子产量较高的条件是以乳糖为碳源、牛肉膏为氮源的SDA培养基,30℃、pH7.0和黑暗环境。

螺旋聚孢霉菌丝在麦芽糖、乳糖、蔗糖、葡萄糖为碳源、硝酸钾为氮源的SDA培养基中生长较好,最适培养温度为30℃,最佳pH是6.0,光照条件下生长较好;螺旋聚孢霉在以乳糖、蔗糖、可溶性淀粉、葡萄糖为碳源,牛肉膏、硝酸铵、硝酸钾为氮源的SDA培养基中孢子产量较高,孢子最适培养温度为20℃,最佳pH是6.0,光照条件下产孢量较高。

参考文献

- [1] 高佳, 王宝刚, 冯晓元, 等. 甜樱桃和酸樱桃品种果实性状的综合评价[J]. 北方园艺, 2011(17):17-21.
- [2] 邱圆媛. 甜樱桃抗氧化物质的提取及生物学活性的研究[D]. 大连: 辽宁师范大学, 2010.
- [3] Jacob R A, Spinozzi G M, Simon V A, et al. Consumption of cherries lowers plasma urate in healthy women[J]. J Nutr, 2003, 133(6):1826-1829.
- [4] Kim D, Heo H J, Kim Y J, et al. Sweet and Sour Cherry Phenolics and Their Protective Effects on Neuronal Cells[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53(26):9921-9927.
- [5] 张娜, 关文强, 阎瑞香, 等. 甜樱桃果实采后致病菌的分离及定性分析[J]. 中国农学通报, 2012, 28(13):190-194.
- [6] 杨娟侠. 二氧化氯对甜樱桃‘红灯’和‘布鲁克斯’贮藏保鲜效果研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2011.
- [7] 刘志恒, 白海涛, 杨红, 等. 大樱桃褐腐病菌生物学特性研究[J]. 果树学报, 2012(3):423-427.
- [8] 何煜波, 王如意, 胡文忠, 等. 樱桃软腐病原菌的分离鉴定和特性分析[C]. 中国食品科学技术学会第七届年会, 中国北京, 2010.
- [9] 赵远征, 刘志恒, 李俞涛, 等. 大樱桃黑斑病原鉴定及其致病性研究[J]. 园艺学报, 2013(8):1560-1566.
- [10] 王志华, 王文辉, 佟伟, 等. 高O₂和高CO₂浓度以及近冰温贮藏对樱桃保鲜效果的影响[J]. 辽宁农业科学, 2010(5):28-32.
- [11] Wang Y, Long L E. Respiration and quality responses of sweet cherry to different atmospheres during cold storage and shipping[J]. Postharvest Biology and Technology, 2014, 92:62-69.
- [12] Serradilla M J, Villalobos M D C, Hernández A, et al. Study of microbiological quality of controlled atmosphere packaged ‘Ambrunés’ sweet cherries and subsequent shelf-life[J]. International Journal of Food Microbiology, 2013, 166(1):85-92.
- [13] Oro L, Feliziani E, Ciani M, et al. Biocontrol of postharvest brown rot of sweet cherries by *Saccharomyces cerevisiae* Disva 599, *Metschnikowia pulcherrima* Disva 267 and *Wickerhamomyces anomalus* Disva 2 strains[J]. Postharvest Biology and Technology, 2014, 96:64-68.
- [14] 董维. UV-C对甜樱桃采后腐烂的控制[D]. 北京: 中国农业大学, 2003.
- [15] Xu S, Zhong L, Wang H. Occurrence, Damage and Control Index of Rape *Sclerotinia sclerotiorum* in Mechanical Direct Seeding Fields[J]. Plant Diseases and Pests, 2012, 3(3/4):12.
- [16] 宋淑云, 张伟, 刘影, 等. 大豆品种对大豆菌核病(*Sclerotinia sclerotiorum*)的抗性分析[J]. 吉林农业科学, 2009(03):30-32.
- [17] 部建雯. 核盘菌(*Sclerotinia sclerotiorum*(Lib.) de Bary) 侵染抑制黄瓜光合作用的机理[D]. 泰安: 山东农业大学, 2009.
- [18] 兰玉菲, 安秀荣, 王庆武, 等. 一种鸡腿菇病害病原菌的分离及鉴定[J]. 山东农业科学, 2012, 44(3):84-87.
- [19] 曹晋忠, 郑朝辉, 刘艳云, 等. 4个黄芩内生真菌菌株的鉴定及抗菌活性研究[J]. 安徽农业大学学报, 2011, 38(3):393-399.

(上接第196页)

定化酶方法在工业应用中具有较好的实用前景。

参考文献

- [1] 崔建东, 李艳, 牟德华. 苯丙氨酸解氨酶(PAL)的研究进展[J]. 食品工业科技, 2008(7):306-308.
- [2] 贺立红, 张进标, 宾金华. 苯丙氨酸解氨酶的研究进展[J]. 食品科技, 2006(7):31-34.
- [3] Kuan I C, Wu J Ch, Lee Sh L, et al. Stabilization of D-amino acid oxidase from *Rhodospiridium toruloides* by encapsulation in polyallylamine-mediated biomimetic silica[J]. Biochemical Engineering Journal, 2010, 49:408-413.
- [4] 王静云, 马翠丽, 包永明. 脂肪酶仿生固定化及性质[J]. 分子催化, 2011(4):341-347.
- [5] Forsyth C, Yip T W S, Siddharth V, et al. CO₂ sequestration by enzyme immobilized onto bioinspired silica[J]. Chemical Communications, 2013, 49:3191-3193.
- [6] Cui J D, Zhang S, Sun L M. Cross-linked enzyme aggregates of phenylalanine ammonia lyase: novel biocatalysts for synthesis of L-Phenylalanine[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2012, 167:835-844.
- [7] 江柯. 粘红酵母(*Rhodotorula glutinis*) CIBAS A1401苯丙氨酸解氨酶(PAL)的分离纯化与性质研究[D]. 四川: 四川大学, 2004.
- [8] 李连连, 崔建东. 以大孔硅胶为载体的苯丙氨酸解氨酶交联酶聚体的制备及性质研究[J]. 食品工业科技, 2014(11):160-165.
- [9] Wang J Y, Ma C L, Bao Y M, et al. Lipase entrapment in protamine-induced bio-zirconia particles: characterization and application to the resolution of (R,S)-1-phenylethanol[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2012, 51:40-46.
- [10] Kroger N, Lorenz S, Brinner E. Self-assembly of highly phosphorylated silaffins and their function in biosilica morphogenesis[J]. Science, 2002, 298:584-586.
- [11] 李林. 仿生氧化硅凝胶固定化D-葡萄糖醛酸苷酶的研究[D]. 天津: 天津大学, 2008.
- [12] Avnir D, Coradin T, Lev O. Recent bio-applications of sol-gel materials[J]. Material Chemistry, 2006, 16:1013-1030.
- [13] Zhou Y L, Wang C, Jiang Y J, et al. Immobilization of papain in biosilica matrix and its catalytic property[J]. Chinese journal of Chemical Engineering, 2013, 21:670-675.
- [14] 张羽飞. 仿生固定化酶制备及其催化特性研究[D]. 天津: 天津大学, 2008.