郑福庆, 张少平, 赖金雁, 等. 青霉种类对贡柑果实致病性、贮藏品质及防御生理的影响 [J]. 食品工业科技, 2026, 47(14): 368−379. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025020037
ZHENG Fuqing, ZHANG Shaoping, LAI Jinyan, et al. Effects of *Penicillium* Species on Pathogenicity, Storage Quality and Defense Physiology of Gonggan Mandarin (*Citrus reticulata* 'Gonggan') Fruit[J]. Science and Technology of Food Industry, 2026, 47(14): 368−379. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025020037

· 贮运保鲜 ·

青霉种类对贡柑果实致病性、贮藏品质及防御生理的影响

郑福庆, 张少平, 赖金雁, 黄海玲, 徐呈祥*
（肇庆学院生命科学学院, 广东 肇庆 526061）

摘　要: 目的：阐明青霉病原对贡柑（*Citrus reticulata* ‘Gonggan’）果实致病的时序特性、生理响应及互作关系，为靶向保鲜技术提供理论支撑。方法：第 1 项实验为贡柑果实贮藏病害观察，第 2 项实验为贡柑青霉接种生理响应。接种青霉的实验：以从广东西江流域贡柑中分离鉴定的 3 种主要致病菌（指状青霉 *Penicillium digitatum*，Pd；意大利青霉 *P. italicum*，Pi；扩展青霉 *P. expansum*，Pe）为病原材料，设置单一接种与复合接种共 7 种处理及 2 种对照（0.1% NaClO 溶液浸果 3 min，CK1；划伤果皮未接种，CK2）；动态观察病征表现，统计计算发病率（incidence rate，IR）与病情指数（disease index，DI），分析果实贮藏品质，测定活性氧代谢指标及防御酶活性，构建病害-生理回归模型。结果：贡柑贮藏期间绿霉病为优势病害，发生程度高于青霉病，且复合染病普遍存在；单一接种后，Pi 与 Pe 较早显示病征，但 Pd 扩展速度更快，且侵染力更强，接种 4 d IR 即显著高于 Pi 和 Pe；复合接种后，3 种青霉共同接种（Pd+Pi+Pe），DI 较（Pd+Pi）组合显著降低（$P<0.05$），显示青霉种间竞争显著延缓病害进程；果实损伤显著促进贡柑品质劣变，质量损失率大幅升高，并诱导 H_2O_2 积累及 CAT 活性显著升高（$P<0.05$）；病原侵染加剧贡柑果实氧化应激和防御酶系统响应失衡，$O_2^{-\cdot}$ 产生速率和 H_2O_2 及丙二醛（malondialde-hyde，MDA）含量大幅升高，PAL 与 CAT 活性显著降低且与病害程度指标 IR 和 DI 极显著负相关（$P<0.01$）。结论：贡柑贮藏期病害以绿霉病为主导且常伴发复合感染；机械损伤通过促进青霉侵染加速贡柑腐烂；指状青霉作为贡柑优势致病菌，通过持续抑制苯丙氨酸解氨酶（phenylalanine ammonia-lyase，PAL）活性、诱导过氧化氢酶（catalase，CAT）活性崩溃而驱动果实氧化损伤及品质劣变；青霉种间竞争互作缓解贡柑病害。

关键词: 柑橘采后病害, 病原真菌互作, 氧化损伤, 防御酶系统, 采后病害防控
中图分类号: TS255.36　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2026)14−0368−12
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2025020037　　本文网刊:

Effects of *Penicillium* Species on Pathogenicity, Storage Quality and Defense Physiology of Gonggan Mandarin (*Citrus reticulata* 'Gonggan') Fruit

ZHENG Fuqing, ZHANG Shaoping, LAI Jinyan, HUANG Hailing, XU Chengxiang*
（College of Life Sciences, Zhaoqing University, Zhaoqing 526061, China）

Abstract: Objective: This study aimed to elucidate the temporal characteristics, physiological responses and interactive relationships of *Penicillium* pathogens in Gonggan mandarin (*Citrus reticulata* 'Gonggan') fruits, thereby providing a theoretical basis for targeted preservation technologies. Methods: Experiment 1 involved observing storage diseases in Gonggan mandarin fruits, while experiment 2 focused on the physiological responses of the fruits to *Penicillium* inoculation. In the *Penicillium* inoculation experiment, three major pathogenic fungi — *Penicillium digitatum* (Pd),

收稿日期: 2025−02−08
基金项目: 广东省自然科学基金项目（S2013010015195）; 广东省科技计划项目（2014A020208143）; 广东省肇庆市科技创新项目（201624031004）。
作者简介: 郑福庆（1969−）, 男, 本科, 助理研究员, 研究方向: 园林植物保护、柑橘采后生理, E-mail: 156559338@qq.com。
*** 通信作者:** 徐呈祥（1963−）, 男, 博士, 教授, 研究方向: 植物逆境生理、柑橘采后生理, E-mail: xucx2013@163.com。

P. italicum (Pi), and *P. expansum* (Pe)—were isolated and identified from Gonggan mandarin fruits in the Xijiang River Basin of Guangdong Province and used as pathogen material. A total of seven treatments were set up, including single and combined inoculations, along with two control groups (CK1: Fruits immersed in 0.1% NaClO solution for 3 min; CK2: Peel wounded but not inoculated). Disease symptoms were dynamically observed, incidence rate (IR) and disease index (DI) were statistically calculated, fruit storage quality was analyzed, reactive oxygen species metabolism indicators and defense enzyme activities were measured, and a disease-physiology regression model was constructed. Results: During the storage of Gonggan mandarin fruits, green mold was the predominant disease, exhibiting a higher severity than blue mold, with complex infections being commonly observed. In single inoculation treatments, Pi and Pe developed symptoms earlier, but Pd exhibited faster spread and stronger infectivity, with a significantly higher incidence rate (IR) than Pi and Pe just 4 days after inoculation. Following combined inoculation, the DI of the triple mixed inoculation (Pd+Pi+Pe) was lower than that of the (Pd+Pi) combination (P<0.05), indicating that interspecific competition among *Penicillium* species significantly delayed disease progression. Fruit injury significantly promoted quality deterioration in Gonggan mandarin fruits, resulting in a substantial increase in weight loss rate, and it also induced H_2O_2 accumulation and a significant rise in CAT activity (P<0.05). Pathogen infection induced severe oxidative stress and a disrupted defense enzyme system in Gonggan mandarin fruits, which was manifested by a substantial increase in the generation rate of $O_2^{-}\cdot$ and the contents of H_2O_2 and malondialdehyde (MDA); In contrast, the activities of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and catalase (CAT) were significantly inhibited, exhibiting a highly significant negative correlation with disease severity indices IR and DI (P<0.01). Conclusion: During the storage of Gonggan mandarin, green mold was the dominant disease, often accompanied by complex infections. Mechanical damage accelerated fruit decay by facilitating the infection of *Penicillium* spp. As the predominant pathogen, *Penicillium digitatum* drove oxidative damage and quality deterioration in the fruit through sustained suppression of PAL activity and induction of CAT activity collapse. Moreover, interspecific competition among *Penicillium* species mitigated disease development in Gonggan mandarin.

Key words: *Citrus* postharvest disease; pathogenic fungi interaction; oxidative damage; defense enzyme system; postharvest disease control

广东省是柑橘主要原产地和中国柑橘重点产区之一。贡柑(*Citrus reticulata* 'Gonggan')主产广东肇庆，是驰名地方特色柑橘品种，果形规整、饱满，果皮呈金黄色、富有光泽；果实通常无核或很少核；果皮厚度小于等于 2.0 mm，易于剥离，不沾手；果肉脆嫩，化渣率高；可溶性固形物含量不低于 13.5%，糖酸比大于 20:1，出汁率超过 60%[1]。贡柑兼具甜橙(*C. sinensis*)含糖量高的特性、砂糖橘（*C. reticulate* 'Shatangju'）果皮易剥离的优势以及蜜柚(*C. maxima*)芳香物质丰富的特点，风味清甜且带有蜜香，口感极佳，深受消费者喜爱，多次荣获"岭南十大佳果"等称号[2−4]。广东肇庆地处北回归线以南，贡柑成熟期(12 月上旬后)温度湿度仍然较高，加之果皮薄、含糖量高、汁液丰富、易受机械损伤，因此，果实采后容易失水萎蔫和腐烂变质，耐贮性显著低于沃柑(*C. reticulata* 'Orah')、茂谷柑(*C. reticulata* 'Murcott')、冰糖橙(*C. sinensis* 'Jinhong')[5]。对此问题，已有研究开展了多项保鲜技术探索，表明低温冷藏结合薄膜包装能维持果皮蜡质与果实风味[6]；15 mg/L 以上浓度的 ClO_2 溶液可有效抑制果实腐烂和营养物质下降损失[7]；1% 壳聚糖涂膜也能延缓失重并维持较好的感官和营养品质[8]；咪鲜胺锰盐(2.0~3.0 g/L，浸果 60 s)可使室温贮藏 30 d 腐烂率<5%，但贮藏 60 d 后腐烂率急剧上升[9]。这些研究为贡柑贮藏保鲜提供了重要技术参考，但迄今比较深入的研究很少，对引发腐烂的优势病原菌种类、其致病机理及果实采后防御生理响应等基础问题未见有研究；现有防控措施因针对性不足而难以实现精准靶向，导致果实贮藏中后期腐烂率居高不下，制约产业效益提升，还存在因杀菌剂过度使用引发的食品安全风险。

青霉属(*Penicillium* spp.)真菌在全球广泛分布，已被国内外的研究证实是导致柑橘采后腐烂的主要病原菌，其中意大利青霉(*P. italicum*, Pi)和指状青霉(*P. digitatum*, Pd)引起的青霉病和绿霉病危害远重于酸腐病(*Aspergillus usamii*)、蒂腐病(*Botryosphaeria dothidea*)等[10]。除 Pi 和 Pd 外，其他青霉如扩展青霉(*P. expansum*, Pe)、波兰青霉(*P. polonicum*)、黄青霉(*P. chrysogenum*)、皮落青霉(*P. crustosum*)、小刺青霉(*P. spinulosum*)等也对柑橘具致病性[11]；四川还从腐烂柑橘中鉴定出的 Pd 菌株中进一步鉴定出与维多利亚病毒属(*Victorivirus*) PdV1 同种的不同病毒株，为基于真菌病毒的生物防治提供了新资源[12]。近年，我国对柑橘采后青霉病害的研究已从病原鉴定转向致病机理、抗药性和绿色防控技术研究。研究发现：脱氢乙酸钠可抑制咪鲜胺抗性 Pi 菌株[13]，植物源活性物质安托芬能通过多靶点作用降低脐橙、椪柑发病率[14]，产酶溶杆菌代谢产物可减少咪鲜胺用量[15]。但这些研究基本上聚焦华中和西南地区的大宗柑橘品种，对华南地方特色品种的青霉病害鲜少涉及。

肇庆贡柑采后贮藏中青霉病害很普遍，常造成严重经济损失。青霉病原具有显著的多样性与区域特异性。当前对贡柑青霉病原的种群结构、优势菌株侵染特性及其与贡柑薄皮高糖特性互作的腐烂机

制尚不清楚，尤其缺乏复合侵染下病原互作及病原胁迫下果实活性氧代谢与抗氧化防御响应的解析。鉴于此，本研究以肇庆本地分离出的致病青霉菌株为材料，模拟单一侵染、复合侵染，评价果实病害特点、品质降解规律，重点剖析 ROS 爆发、膜脂过氧化及防御酶活性的动态变化，旨在阐明贡柑与青霉病原互作的特异机制，为研发精准防控策略奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

浓 H_2SO_4、三氯乙酸、H_3PO_4、$FeCl_3$、NaCl、NaClO、NaOH、$Na_2HPO_4{\cdot}2H_2O$、KH_2PO_4、$Na_2B_4O_7$、$K_2B_4O_7{\cdot}5H_2O$、醋酸　化学纯，上海申博化工有限公司；乙醇、葡萄糖、柠檬酸、抗坏血酸、邻菲咯啉、邻苯二酚、3,5-二硝基水杨酸、2,6-二氯酚靛酚、二甲氨基苯甲醛（DMAB）、N-乙酰氨基葡萄糖、对氨基苯磺酸、α-萘胺　分析纯，上海国药集团化学试剂公司；蜗牛酶（Snailase，218 kDa）　BR，上海康朗生物科技有限公司；贡柑果实　采自广东省德庆县马圩镇果园（23° 24′N，111°26′E），盛果期果树，树势健壮，生长良好，果形端正、大小均匀、表面基本全黄，果实纵径、横径、果形指数、单果质量平均分别为5.22±0.33 cm、5.62±0.37 cm、0.93±0.01 g、119.5±6.5 g，采摘时间为贡柑成熟期的 12 月 20 日，采摘后置于塑胶周转筐中带回实验室过夜备用；青霉　种类为指状青霉、意大利青霉和扩展青霉，系本课题组前期采集广东西江流域 15 个柑橘果园所产贡柑，在室温下贮藏 30 d 时，从病征典型的 86 个发病果实中经分离纯化、形态学观察、PCR 扩增、同源性比较、发育关系分析而鉴定确认的 3 种致病菌，保存于低温冰箱中保存备用。接种前，准备菌株在 PDA 培养基上活化培养 14 d（图 1），以获得供试孢子；贮藏保鲜袋　实验室自主研发的聚乙烯薄膜微孔保鲜袋，膜厚 0.06 mm，袋规格 300 mm×450 mm；袋中部两面各设置菱形排列、直径 2.0 mm 气调孔 4 个。

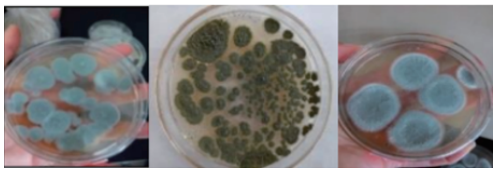


图 1　供试 3 种青霉在 PDA 培养基上的菌落形态

Fig.1　Colony morphology of three experimental *Penicillium* species cultured on PDA medium

注：培养条件：PDA 培养基 26±1 ℃ 培养 14 d；自左至右依次为意大利青霉、指状青霉、扩展青霉。

冷藏库　作者单位研制的西大自动调控 I 型冷库，可设置的最低温度为−20 ℃（实验设置 6.5 ℃ 用于贡柑冷藏）；XMT 数显温控调节仪　乐清奥特仪表有限公司；HZT-A+200 电子天平　福州科华仪器有限公司；HH-4 数显恒温水浴锅　常州国华电器有限公司；TGL-16G 离心机　上海安亭科学仪器厂；UV1100 紫外可见分光光度计　上海美析仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 实验设计　同时开展两项实验。第 1 项为果实贮藏病害观察实验，旨在观察贡柑贮藏期间不同种类病害的发病特性，设计 3 种贮藏处理：S1 为自然条件贮藏（12.5±3.5 ℃）；S2 为贡柑在清水中轻柔搅动 30 s，沥干后，于自然条件下贮藏；S3 为冷藏（6.5±0.5 ℃）。每处理设计 5 袋，每袋盛装贡柑 30 个。贮藏前，用 75% 乙醇溶液对室内空间及器物表面喷雾消毒，在无人状态下开启紫外线灯 30 min 辅助消毒，定期于 30、60、90 d 取样测定果实发病率。

第 2 项为贡柑接种青霉实验，选择 NaClO 作为浸果消毒剂[16]，探究青霉种类对贡柑致病性、贮藏品质、ROS 代谢及防御酶活性的影响；采用单因素对比法，以菌种及其组合为唯一变量，设置 2 种对照及 7 种接种处理，分别是：0.1% NaClO 浸果 3 min；0.1% NaClO 浸果 3 min，在果皮上划 3 条 10 mm 长浅层伤口；0.1% NaClO 浸果 3 min、划 3 条 10 mm 长浅层伤口，分别单一接种指状青霉（Pd）、扩展青霉（Pe）、意大利青霉（Pi）及复合接种（Pd+Pe）、（Pe+Pi）、（Pd+Pi）、（Pd+Pe+Pi）。青霉接种菌液浓度为 100 CFU/μL，通过调整接种体积使每果接种总量均为 1500 CFU（表 1）。

表 1　不同青霉菌种组合的设计

Table 1　Experimental design of different *Penicillium* species combinations

序号	代码	接种处理	总接种量（CFU/果）	单菌种接种量（CFU/果）
1	CK1	0.1% NaClO浸果3 min	–	–
2	CK2	0.1% NaClO浸果3 min及划3条长10 mm伤口	–	–
3	T1	接种Pd，15 μL×100 CFU/μL Pd	1500	1500（Pd）
4	T2	接种Pe，15 μL×100 CFU/μL Pe	1500	1500（Pe）
5	T3	接种Pi，15 μL×100 CFU/μL Pi	1500	1500（Pi）
6	T4	接种（Pd+Pe），7.5 μL×100 CFU/μL Pd+7.5 μL×100 CFU/μL Pe	1500	750（Pd）+750（Pe）
7	T5	接种（Pe+Pi），7.5 μL×100 CFU/μL Pe+7.5 μL×100 CFU/μL Pi	1500	750（Pe）+750（Pi）
8	T6	接种（Pd+Pi），7.5 μL×100 CFU/μL Pd+7.5 μL×100 CFU/μL Pi	1500	750（Pd）+750（Pi）
9	T7	接种（Pd+Pe+Pi），5 μL×100 CFU/μL Pd+5 μL×100 CFU/μL Pe+5 μL×100 CFU/μL Pi	1500	500（Pd）+500（Pe）+500（Pi）

注：“–”表示无接种。

1.2.2　接种方法及贮藏　供试的青霉菌株，在 PDA 培养基上培养 14 d 以获得供试孢子（图 1），然后制成孢子悬浮液，孢子浓度为 100 CFU/μL。制备方法及浓度测定：在 PDA 培养基上的菌落表面，轻轻刮取 20 环，置于无菌水中充分摇匀，用血球计数板计算出孢子液浓度。

接种时，沿果实圆周方向，间隔 120°，先用解剖针在果实赤道线上方、赤道线及赤道线下方 3 个方位分别划开 1 条线形创面，长度均为 10 mm，深度和宽度为轻微划破表皮，接着进行接种处理。方法：用移液器沿创面长度方向分 3 次均匀点涂 15 μL 该种青霉孢子悬浮液（100 CFU/μL），每次 5 μL（每次间隔 5 min），保证液体完全覆盖创面且无流动。复合接种时，按设计的青霉菌种组合（表 1），制备相同浓度的混合孢子悬浮液。

接种 2 h 后，按处理和重复分别装进本课题组研制的聚乙烯塑料薄膜微孔保鲜袋中（薄膜厚度 0.06 mm，袋宽 300 mm，袋长 350 mm，袋中部两面对应位置各设计圆形、直径 2.0 mm 的气调孔 4 个，两面共 8 孔，菱形排列），扎住袋口，做好标记，在实验室无菌操作室中贮藏、培养。自然条件，经上午 8:00、晚上 8:00观测并计算，接种后 0~10 d 的日平均温度为 14.6±2.3 ℃。

1.2.3　果实发病率测算　贡柑贮藏病害观察实验每隔 30 d、贡柑接种青霉实验每隔 1 d 观察、测定、记载 1 次果实发病情况，包括病斑出现时间及病征，分别计算不同处理相应日数的果实发病率和病情指数。发病标准为：果实表面出现直径≥0.50 cm 的菌落，通过肉眼观察统计病害种类。接种青霉实验中，由于第 10 d 后所有接种青霉的果实病情已无明显差异，第 14 d 后均已完全腐烂，故统计分析时采用前 10 d 的数据。发病病征采用通过手机定期采集图像法记录；每次每处理选取 1 个代表性果实，从正面视角拍摄后放回原处，下次采集时重新随机选取果实。

果实表面接种部位出现肉眼可见的水渍状斑块（腐烂），即为病果。果实发病率按公式（1）计算，按处理分别抽检 5 个果实，3 次重复，总共抽检 15 个果实。按公式（2）计算果实病情指数。设 R 为接种后果实腐烂面积占果实表面积的百分率（%），分为 8 级：0 级：无腐烂；1 级：0<R≤1%；2 级：1%<R≤5%；3 级：5%<R≤10%；4 级：10%<R≤20%；5 级：20%<R≤50%；6 级：50%<R≤80%；7 级：R>80%。

$$果实发病率(\%)=\frac{发病果实个数}{贮藏总果数}\times 100 \qquad 式（1）$$

$$病情指数(\%)=\sum\frac{病级代表值\times该病级发病果实数}{最高病级代表值\times果实总数}\times 100 \qquad 式（2）$$

发病病征采用手机定期采集图像，每次每处理选择 1 个代表性果实，从正面视角拍摄后放回原处，下次采集时重新选择。

1.2.4　果实质量损失率测定　入贮当日，每袋果实分别编号标记并测定质量（鲜重），贮藏后定期测定，果实质量损失率按公式（3）计算。

$$果实质量损失率(\%)=\frac{入贮时质量-贮藏后质量}{入贮时质量}\times 100 \qquad 式（3）$$

1.2.5　果实可溶性总糖与有机酸含量测定　以果实中部未染病囊瓣为试样，分别参照 NY/T 2742-2015《水果及制品可溶性糖的测定 3,5-二硝基水杨酸比色法》、GB 12456-2021《食品安全国家标准 食品中总酸的测定》（NaOH 滴定法）、GB 5009.86-2016《食品中抗坏血酸含量的测定方法》（2,6-二氯酚靛酚法）测定，均取 1.0 g 鲜样。

1.2.6　O_2^{-}·产生速率测定　参照李玲[17] 的方法。从参试贡柑果实中随机选取 3 个，分别取相对健康果皮 1.0 g，用去离子水冲洗 3 次，剪碎，加入 5 mL 50 mmol/L PBS 缓冲液（pH7.8，含 1% PVP），冰浴研磨匀浆，12000 r/min、4 ℃ 离心 20 min，收集上清液并记录总体积。取 0.5 mL 上清液，加入 0.5 mL PBS 缓冲液和 0.1 mL 65 mmol/L 盐酸羟胺溶液，混匀后 25 ℃ 保温 20 min；加入 1.0 mL 58 mmol/L 对氨基苯磺酸溶液和 1.0 mL 7 mmol/L α-萘胺溶液，混匀，25 ℃ 继续保温 20 min；加入等体积三氯甲烷萃取色素，10000 r/min 离心 3 min，取上层粉红色水相于 530 nm 波长下测定吸光度，重复 3 次。按公式（4）计算 O_2^{-}·产生速率。

$$O_2^{-}\cdot产生速率(nmol/(min\cdot g\ FW))=n\times V\times 1000/Vs\times t\times m \qquad 式（4）$$

式中：n 为从标准曲线查得的 O_2^{-}·物质量（μmol）；V 为样品提取液总体积（mL）；Vs 为测定时所取样品液体积（mL）；t 为样品与羟胺反应时间（min）；m 为样品质量（g FW）。

1.2.7　过氧化氢（H_2O_2）含量测定　参照李玲[17] 的方法。从参试果实中随机抽取 3 个，各取相对健康果皮组织 1.0 g，经去离子水冲洗 3 次后剪碎，加入 5 mL 预冷丙酮，通风橱中冰浴研磨匀浆，12000×g、4 ℃ 离心 20 min，收集上清液；沉淀用−20 ℃ 预冷丙酮洗涤 3 次以完全去除色素，随后加入 3.0 mL 2.0 mol/L 硫酸溶液使沉淀充分溶解，再次按上述离心条件离心后收集上清液。合并全部上清液，记录总体积（mL）。取 1.0 mL 上清液，依照标准曲线制作方法同步操作，于 415 nm 波长处测定吸光度，重复 3 次。根据测定的吸光度值从标准曲线中查得相应 H_2O_2 含量（nmol），按公式（5）计算样品中 H_2O_2 含量（nmol/g FW）。

$$H_2O_2含量(nmol/g\ FW)=n\times V\times 1000/V_s\times m \qquad 式（5）$$

式中：n 为从标准曲线查得的 H_2O_2 物质的量(nmol)；V 为样品提取液总体积(mL)；V_s 为测定时所取样品液体积(mL)；m 为样品质量(g FW)。

1.2.8 MDA 含量测定 参照李玲[17]的方法。随机选取 3 个贡柑果实，分别取相对健康果皮组织 1.0 g，用去离子水冲洗 3 次，剪碎后加入 10 mL 50 mmol/L PBS 缓冲液(pH7.8，含 1% PVP)，研磨匀浆，4000 r/min 离心 10 min。取上清液 2.0 mL，加入 2.0 mL TBA 反应液(含 20% TCA 与 0.5% TBA)，混匀后沸水浴显色 15 min，冷却后再次于 4000 r/min 离心，取上清液分别在 450 nm 和 532 nm 波长下测定吸光度值(OD_{450}、OD_{532})。每个样品重复 3 次。按公式(6)和公式(7)分别计算可溶性糖浓度 C_1(nmol/L)和 MDA 浓度 C_2(μmol/L)，并进一步根据 C_2/100 换算得 MDA 含量(nmol/g FW)。

$$C_1(\text{nmol/L}) = 11.71OD_{450} \quad \text{式（6）}$$

$$C_2(\mu\text{mol/L}) = 6.45OD_{532} - OD_{600} - 0.56OD_{450} \quad \text{式（7）}$$

1.2.9 超氧化物歧化酶(SOD)活性的测定 参照李玲[17]的方法测定。取贡柑果皮样品 1.0 g，制备酶粗提液并记录总体积。设 5 支反应管，其中 3 支为测定管，每管含 1.7 mL 0.05 mol/L 磷酸钠缓冲液(pH7.8)、0.3 mL 100 μmol/L EDTA-Na_2、0.3 mL 750 μmol/L 氮蓝四唑、0.3 mL 130 mmol/L 蛋氨酸、0.1 mL 酶液和 0.3 mL 20 μmol/L 核黄素；另 2 支为对照管，组成与测定管相同，但以 0.1 mL 缓冲液代替酶液。将一支对照管置暗处作为空白管，其余各管于 4000 lx 日光灯下反应 20 min，立即移入暗处终止反应。以避光管调零，于 560 nm 波长下比色。SOD 活性定义为每克鲜果皮组织抑制 NBT 光化还原 50% 所需的酶量为一个单位(U)。重复 3 次，按公式(8)计算 SOD 活性。

$$\text{SOD活性}(\text{U/(g FW}\cdot\text{min)}) = \frac{(ODc - ODs)V}{0.5 \times ODc \times Vs \times t \times m} \quad \text{式（8）}$$

式中：ODc 为照光对照管吸光度；ODs 为样品管吸光度；V 为提取液总体积(mL)；Vs 为测定用酶液体积(mL)；t 为反应时间(min)；m 为样品质量(g FW)。

1.2.10 过氧化氢酶(CAT)活性测定 参照李玲[17]的方法测定。取 0.3 g 样品，加入 6 mL 预冷提取缓冲液(含 5 mmol/L DTT 与 5% PVP)，冰浴研磨，4 ℃、1200×g 离心 30 min，收集上清液作为酶提取液。以 3 mL 蒸馏水作为对照，先加入 2.9 mL 20 mmol/L H_2O_2 溶液，再迅速加入 0.1 mL 酶液至石英比色皿中并立即计时，于 240 nm 波长下测定吸光度(OD 值)。以 15 s 为初始值，每 30 s 读取一次数据，持续 3 min，重复实验两次。按公式(9)计算 CAT 活性。

$$\text{CAT活性}(\text{U/(g FW}\cdot\text{min)}) = \Delta OD_{240} \times V/(0.01 \times V_s \times m) \quad \text{式（9）}$$

式中：ΔOD_{240} 为单位时间吸光度变化，V 为样品提取液总体积(mL)；V_s 为测定所用提取液体积(mL)；m 为样品质量(g FW)，0.01 表示每分钟 ΔOD_{240} 降低 0.01 定义为 1 个酶活单位(U)。

1.2.11 多酚氧化酶(polyphenol oxidose, PPO)活性测定 参照 Zauberman 等[18]的方法。取 3 个果实，于菌落外围 1 cm 处取相对健康果皮试样各 1.0 g，加入 5 mL pH6.8 磷酸缓冲液，冰浴研磨，转移至 10 mL 离心管，8000 r/min 离心 10 min。取 0.5 mL 上清液(酶提取液)，加入 2 mL 磷酸缓冲液和 1 mL 0.5% 邻苯二酚，混匀后于 420 nm 波长下测定吸光度(A_{420})。以每分钟 A_{420} 变化 0.01 为 1 个酶活力单位(U)，PPO 活性表示为 U/(g FW·min)。

1.2.12 几丁质酶(chitinase, CHI)活性测定 参照 Boller 等[19]的方法，略作修改。取 3 个果实，于菌落外围 1 cm 处取相对健康果皮试样各 1.0 g，加入 5 mL pH5.2 醋酸缓冲液，冰浴研磨，8000 r/min 离心 10 min。取 0.5 mL 上清液，加入 0.5 mL 胶体几丁质，37 ℃ 水浴温育 40 min；加 3% 蜗牛酶 0.1 mL，37 ℃ 继续保温 40 min；再加 0.3 mL 四硼酸钾溶液，沸水浴 5 min，自来水冷却；加入 2 mL 1% 对二甲氨基苯甲醛，37 ℃ 温育 10 min，于 585 nm 波长下测定吸光度。以每分钟每克鲜重组织催化产生 1.0 μg N-乙酰氨基葡萄糖定义为 1 个酶活性单位(U)，CHI 活性表示为 U/(g FW·min)。

1.2.13 苯丙氨酸解氨酶(PAL)活性测定 参照李翠丹等[20]、刘亚光等[21]方法提取酶液、测定酶活性。取 3 个果实，分别在离菌落 1 cm 周围取相对健康的果皮试样 1.0 g，加入 5 mL 0.1 mol/L pH8.8 硼酸缓冲液，研磨、匀浆，2000 r/min 离心 10 min，取上清液测 A_{290}。以每分钟 A_{290} 改变 0.01 为 1 个酶活力单位(U)，按公式(10)计算。

$$\text{PAL活性}(\text{U/(g FW}\cdot\text{min)}) = (U \times V_1)/(0.01W \times T \times V_2) \quad \text{式（10）}$$

式中：V_1 为酶提取液的总体积(mL)；W 为样品鲜重(g)；T 为反应时间(min)；V_2 为反应体系中所用酶液的体积(mL)。

1.3 数据处理

实验平行重复三次，使用 Microsoft Office Excel 2016 软件进行测试数据平均数、标准差计算及作图，用邓肯氏(Duncan's)新复极差法分析不同处理平均数之间的方差，用不同小写字母表示数据间的差异显著性，$P<0.05$ 表示有显著性差异。

2 结果与分析

2.1 贡柑贮藏中果实不同种类病害的发病率

贮藏条件显著影响贡柑果实采后病害的发生。

表 2　贡柑贮藏中果实不同种类病害的发病率

Table 2　Incidence of different diseases in Gonggan mandarin fruits during storage

贮藏条件	果实发病率(%)								
	30 d			60 d			90 d		
	青霉病	绿霉病	复合染病	青霉病	绿霉病	复合染病	青霉病	绿霉病	复合染病
S1：自然条件贮藏(12.5±3.5 ℃)	3.3±0.5^{ijk}	16.7±5.2^{efg}	4.0±1.5^{ijk}	22.3±6.5^{de}	33.3±6.0^{ab}	21.0±4.9^{de}	33.3±5.8^{ab}	36.7±6.2^{a}	30.0±4.5^{bc}
S2：清水浸洗30 s，自然条件贮藏	7.7±2.1^{hijk}	4.5±1.5^{ijk}	1.1±0.8^{jk}	16.5±4.8^{efg}	20.1±5.2^{e}	16.7±3.9^{efg}	18.1±3.2^{ef}	26.6±4.0^{cd}	32.0±4.5^{abc}
S3：冷藏(6.5±0.5 ℃)	4.5±0.9^{ijk}	1.0±0.5^{k}	1.0±0.5^{k}	6.8±0.8^{hijk}	8.0±1.0^{hijk}	1.2±0.1^{jk}	5.2±0.5^{ijk}	12.6±1.2^{fgh}	10.8±1.1^{ghi}

注：不同小写英文字母表示数据之间差异显著(P<0.05)。

低温贮藏(S3，6.5±0.5 ℃)可有效抑制病害的发展，至贮藏 90 d 时，青霉病、绿霉病和复合染病发病率分别仅为 5.2%、12.6% 和 10.8%，均显著低于自然条件下贮藏(S1，P<0.05)。在自然条件(S1)贮藏条件下，绿霉病为主要病害，发病率在贮藏后期(90 d)达 36.7%；同时，复合染病亦较为严重，发病率达 30.0%。清水浸洗处理(S2)在一定程度上可延缓病害发生，但效果有限，贮藏末期青霉病、绿霉病和复合染病发病率分别为 18.1%、26.6% 和 32.0%，病害构成中仍以绿霉病和复合染病为主。贡柑贮藏期间绿霉病为优势病害，发生程度高于青霉病，且复合染病普遍存在，尤其在非低温条件下更为突出。低温贮藏可显著抑制上述所有病害类型的发生(表 2)。

2.2　贡柑果实接种不同种类青霉的发病病征

接种后 1 d，所有果实表面均未观察到菌落生长。接种后 2 d，单一接种青霉的处理均有果实开始长出菌落：意大利青霉(Pi)最早形成菌落，其次为扩展青霉(Pe)，指状青霉(Pd)出现肉眼可见菌落的时间最晚。图 2 为贡柑果实接种单一青霉菌种 4、6、8 d 后的发病症状。如图 2 所示，接种后 4 d，较早出现的 Pi 与 Pe 菌落均呈青蓝色粉状霉层，病斑外缘具较窄白色环状带；Pd 菌落呈草绿色粉状霉层，外围白色环状带较宽，其后菌落扩展迅速，至接种后 8 d，其病斑面积较 Pi 和 Pe 分别大 96.5% 和 205.6%。接种后 10 d，各接种果实发病程度趋于一致。

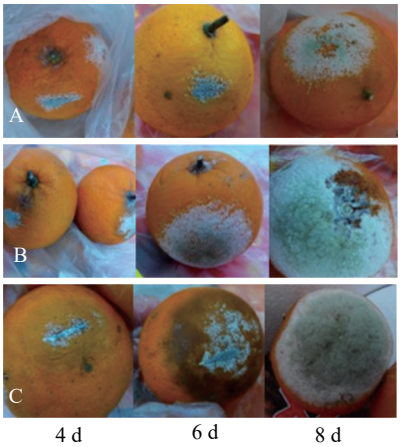


图 2　贡柑果实接种单一种类青霉的发病病征

Fig.2　Disease signs on Gonggan mandarin fruits inoculated with single *Penicillium* species

注：A：意大利青霉(Pi)；B：指状青霉(Pd)；C：扩展青霉(Pe)。

复合接种处理中，接种后 1 d 果实状况与单一接种无显著差异；接种后 2 d，各处理均有果实开始长菌，初始病征与单一接种相似，表现为伤口处软腐并出现水渍状病变，但 3 d 后长出边缘不规则的白色霉菌层，菌层中央逐渐出现青蓝色或草绿色粉状物，总体出现时间晚于单一接种。图 2 展示了接种后 4、6、8 d 的典型发病症状，可清晰观察到不同菌种的菌落形态差异与扩展动态。不论何种组合，最终均以 Pd 生长占优，其余两种青霉局限于较小区域。此外，随菌落持续扩展，不同菌斑之间形成明显分界，Pd 可包围生长较慢的 Pi 或 Pe 菌落，并在相接处形成清晰、规则的边界。图 3 为贡柑果实复合接种青霉 6、8、10 d 的发病病征。

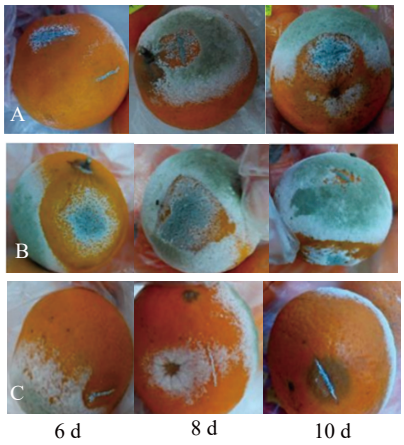


图 3　贡柑果实复合接种青霉的发病病征

Fig.3　Disease signs on Gonggan mandarin fruits co-inoculated with *Penicillium* species

注：A：Pd+Pe；B：Pd+Pi；C：Pd+Pe+Pi。

2.3　贡柑果实接种不同种类青霉的病害程度差异

在整个贮藏期间，两种对照的发病情况差异显著。CK1 直至第 10 d 才出现个别病果，最终发病率(IR)极低(3.5%)；而 CK2 自第 8 d 起 IR 呈明显上升趋势，第 10 d IR 即达 50.0%；随贮藏时间延后，IR 持续升高，第 16 d 全部果实发病(IR=100%，图 4 中未呈现)。所有接种青霉的处理均在接种后第 2 d 开始发病，IR 迅速上升，第 6 d IR 均大于 50%，第 10 d 达 90%~100%，表明伤口可显著加速果实腐烂进程(图 4)。

病情指数(DI)分析进一步揭示了不同青霉菌种

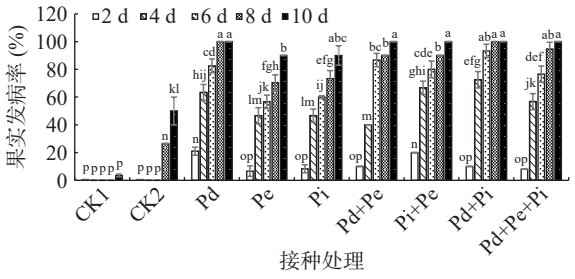


图 4 贡柑果实接种不同种类青霉的发病率差异

Fig.4 Difference of incidence rate of Gonggan mandarin fruits inoculated with different *Penicillium* species

注: 不同小写字母表示数据之间差异显著(P<0.05), 图 5~图 8 同。

的致病性差异(图 5)。单独接种时, 指状青霉(Pd)的致病性最强, 其 DI 始终显著高于其他处理(P<0.05), 接种后 10 d DI 达 55.4%; 扩展青霉(Pe)次之(44.8%), 意大利青霉(Pi)相对最弱(39.3%), 表明 Pd 在贡柑果实中具有更强的侵染和扩展能力。

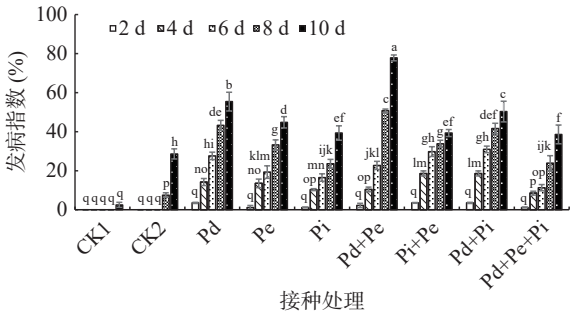


图 5 贡柑果实接种不同种类青霉的发病指数差异

Fig.5 Difference of disease index of Gonggan mandarin fruits inoculated with different *Penicillium* species

复合接种处理表现出较复杂的互作关系。接种(Pd+Pi)处理中, 其 DI 在贮藏前期(接种后 2~6 d)与接种(Pi+Pe)处理相当, 但大于接种(Pd+Pe)处理; 贮藏后期(接种后 8~10 d)显著小于接种(Pd+Pe)处理(P<0.05), 显著大于接种(Pi+Pe)处理(P<0.05); 接种(Pd+Pe+Pi), DI 在 10 d 期间均为最小, 病害相对最轻。结果表明, Pi 和 Pe 之间存在协同致病效应, Pd、Pe、Pi 共存产生竞争抑制效应, 暗示病原青霉间的互作关系对贡柑病害进程具调控作用(图 5)。

2.4 接种不同种类青霉对贡柑果实贮藏品质的影响

贮藏品质是评价贮藏保鲜措施和果实抗病性的关键依据。质量损失率(Weight Loss Rate, WLR)是反映果实新鲜度与贮藏稳定性的关键指标, 可溶性固形物含量(Soluble Solids Content, SSC)是衡量果实甜度和营养积累的核心指标, 有机酸含量(Organic Acid Content, OAC)是决定果实风味“平衡性”、反映果实生理活性的重要指标, 三者协同表征果实采后生理状态与耐贮性[1]。

分析表明, 贮藏期间的贡柑果实(CK1), WLR 呈持续上升趋势、SSC 与 OAC 则呈逐渐下降趋势; 轻微机械伤处理(CK2)仅在贮藏早期因失水浓缩效应

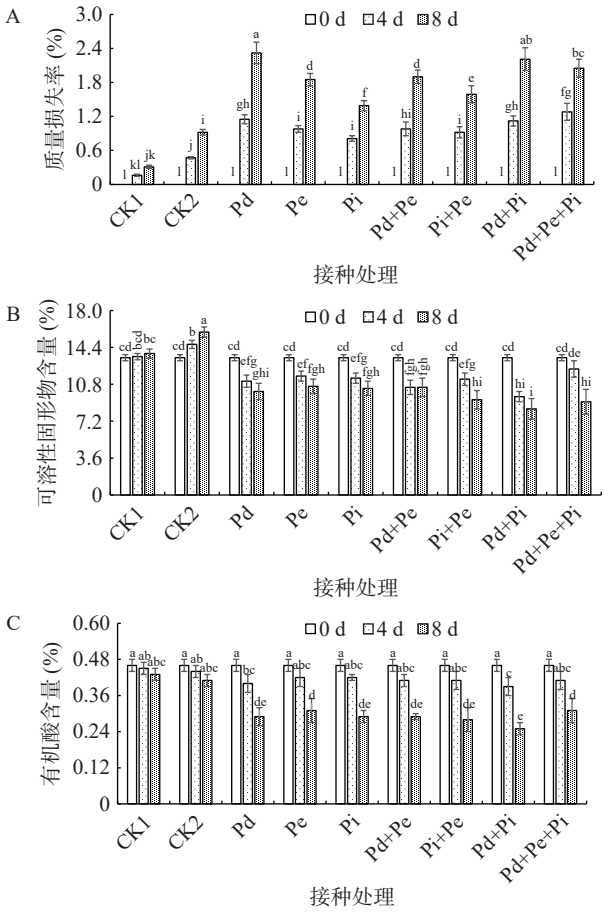


图 6 接种不同种类青霉对贡柑果实 3 项品质指标的影响

Fig.6 Effects of inoculating different *Penicillium* species on three quality parameters of Gonggan mandarin fruits

使 SSC 略高于其他处理, 后续仍呈机械伤诱导的品质劣变趋势; 青霉侵染显著加速贡柑贮藏品质劣变进程(图 6)。其中, 单独接种后 8 d, 接种 Pd 果实 WLR 为 2.32%, 显著高于接种 Pe(1.85%)、Pi(1.39%)(P<0.05)(图 6A); 同时, 接种 Pd 果实 SSC 和 OAC 降低幅度大于接种 Pe、Pi, 两项指标平均分别高 5.1%、4.9%(图 6B、图 6C)。结果说明, 不同青霉菌种侵染在加剧贡柑水分损耗、干扰糖酸代谢平衡、加速品质衰退强度方面存在差异。

复合接种表明, 青霉菌种间互作对贡柑品质劣变的影响较为复杂。接种后 8 d, 双菌组合中(Pd+Pi) WLR 最高(2.21%), 显著高于(Pd+Pe)(1.95%)和(Pi+Pe)(1.59%)(P<0.05)(图 6A), 可能源于生态位重叠及致病因子的叠加作用; 三菌共接种(Pd+Pe+Pi)果实, 同期 WLR 为 2.05%, 介于(Pd+Pi)与其余双菌组合之间, 未表现出累加或协同增强效应, 即一定程度上延缓了贡柑品质劣变进程。从 SSC、OAC 响应看(图 6B、图 6C), 三菌共接种的贡柑果实品质劣变程度总体轻于接种(Pd+Pi), 与接种(Pd+Pe)、(Pi+Pe)相近或略优, 说明多菌种共存时可能在种间竞争, 部分抵消了青霉病菌的协同致劣效应。轻微机械损伤前期失水致使贡柑 SSC 短暂升高(图 6B), 全程品质仍显著优于所有接种处理; 青霉侵染则随接种进程

持续加剧果实劣变。随接种后日数延长，贡柑果实 OAC 降幅持续增大，至接种后 8 d，所有接种处理的 OAC 降幅均超过 30%（图 6C），表明青霉侵染显著加速有机酸降解。

上述结果表明，青霉侵染通过影响水分、糖分与有机酸代谢显著加速贡柑果实贮藏品质劣变，其效应因菌种类型及互作模式而异。Pd 在单菌侵染中破坏性最强，复合接种可能通过种间竞争而在一定程度上缓和品质劣变，提示青霉种群结构与互作关系对贡柑采后病害发生发展及果实品质保持具有重要调控潜力。

2.5　接种不同种类青霉对贡柑果皮 $O_2^{-}\cdot$ 产生速率、H_2O_2 和 MDA 含量的影响

活性氧（Reactive Oxygen Species，ROS）爆发与膜脂过氧化是评价果实抗病性和贮藏稳定性的核心生理响应。$O_2^{-}\cdot$ 作为 ROS 的起始信号分子，其产生速率直接反映氧化还原稳态的失衡程度；H_2O_2 作为可扩散信使，通过浓度依赖方式调控 MAPK 等抗逆通路；MDA 作为脂质过氧化终产物，定量表征膜系统结构完整性与功能损伤程度，是细胞氧化崩溃的关键生物标志物[22]。

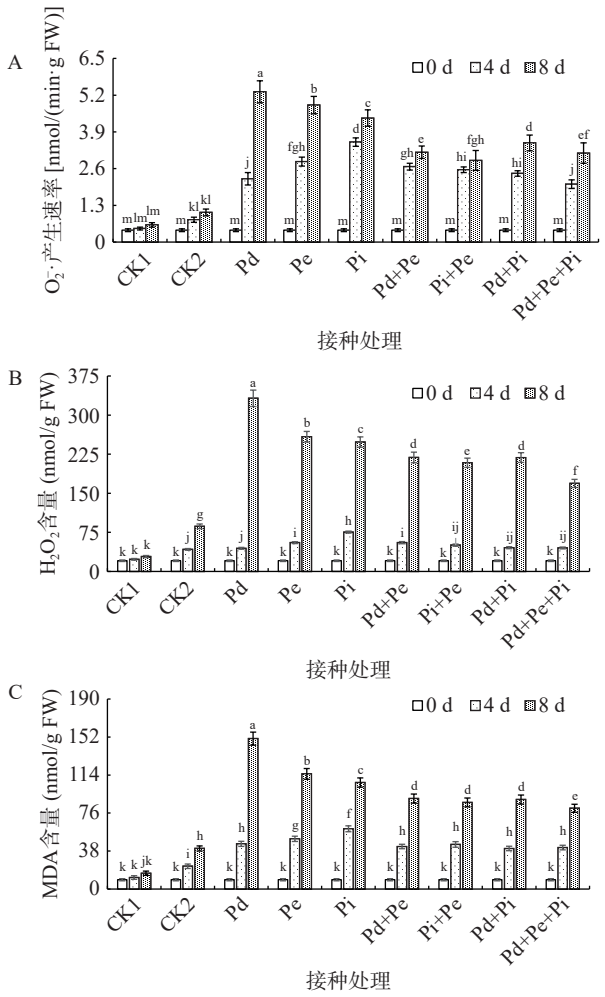


图 7　接种不同种类青霉对贡柑果皮 $O_2^{-}\cdot$ 产生速率、H_2O_2 和 MDA 含量的影响

Fig.7　Effects of inoculating different *Penicillium* species on $O_2^{-}\cdot$ generation rate, H_2O_2 and MDA content of Gonggan mandarin peel

分析结果表明，所有处理中贡柑果皮 $O_2^{-}\cdot$ 产生速率、H_2O_2 和 MDA 含量均随贮藏时间延长而上升，与品质指标的劣变趋势一致（图 7A~图 7C）。机械损伤处理（CK2），贮藏第 4 d 即引起这 3 项指标显著上升（$P<0.05$），至贮藏第 8 d $O_2^{-}\cdot$ 产生速率、H_2O_2 和 MDA 含量分别较 CK1 升高 72.1%、203.5% 和 156.9%（$P<0.05$），说明创伤显著诱发氧化应激与膜脂过氧化，是导致果实贮藏稳定性下降的重要生理机制，但青霉侵染进一步加剧氧化应激响应。

青霉侵染诱导的氧化应激响应呈现显著的菌种差异与时间动态特征。接种后第 4 d，意大利青霉（Pi）处理组的 $O_2^{-}\cdot$ 产生速率、H_2O_2 和 MDA 含量最高，指状青霉（Pd）最低（图 7A~图 7C），扩展青霉（Pe）居间；至第 8 d 时，接种 Pd 的 3 项指标显著高于接种 Pi 和 Pe，上升为最高（$P<0.05$），反映 Pd 在侵染中后期表现出更强的氧化胁迫应激状况，表明不同青霉在致病过程中存在时序差异的侵染策略：Pi 早期迅速诱发 ROS 迸发，而 Pd 则随病程推进逐渐增强氧化攻击。处理后相同天数下，所有接菌处理的 3 项氧化损伤指标均显著高于同期机械损伤对照 CK2（$P<0.05$）；伴随贮藏进程，CK2 过氧化作用不断增强，贮藏 8 d 的 3 项指标高于部分接菌处理 0、4 d 的测定值，但同日仍低于对应接菌处理，说明青霉侵染所导致的氧化系统紊乱远超过纯机械创伤，其引发的 ROS 爆发与膜脂过氧化是导致果实抗病性下降和品质劣变的关键生理基础。

复合接种处理表现出的拮抗效应在氧化应激指标中尤为突出。三菌共接种（Pd+Pe+Pi）的 $O_2^{-}\cdot$ 产生速率、H_2O_2 和 MDA 含量水平表现为较复杂的非同步动态变化：接种后 8 d，$O_2^{-}\cdot$ 产生速率（3.15 nmol/(min·g FW)）低于（Pd+Pe）（3.18 nmol/(min·g FW)），但高于（Pi+Pe）（2.89 nmol/(min·g FW)）；H_2O_2 含量（168.9 nmol/g FW）显著低于单菌及多数双菌组合；MDA 含量（80.8 nmol/g FW）显著低于单菌（Pd、Pe、Pi）及（Pd+Pe）（90.5 nmol/g FW），且低于（Pi+Pe）（86.6 nmol/g FW）与（Pd+Pi）（89.5 nmol/g FW）。整体来看，三菌共接种的氧化应激水平显著低于高致病力的单菌及部分双菌组合（$P<0.05$），说明多菌共存可通过种间竞争抑制 ROS 爆发性积累，缓解膜脂过氧化进程。这一发现表明，青霉种间互作对氧化胁迫具有重要调节作用，复合侵染未产生协同增效，反而因竞争关系削弱了高致病菌株致病力。

上述结果说明，青霉侵染通过诱发 ROS 爆发和膜脂过氧化显著加速贡柑果实的氧化损伤，其程度与动态因菌种及互作方式而异。Pd 在处理后期表现出最强的氧化胁迫诱导能力，而多菌复合接种因种间竞争反而缓和了氧化进程。病原互作模式对氧化应激响应具有重要调节作用。

2.6 接种不同种类青霉对贡柑果实防御酶活性的影响

果实采后防御能力在很大程度上依赖于防御酶系统的协同响应。其中，SOD 和 CAT 共同清除 ROS，维持氧化还原稳态；PPO 和 CHI 分别参与酚类氧化和病原菌细胞壁降解过程；PAL 作为苯丙烷代谢途径的关键限速酶，调控植保素与木质素的合成。在“果实–病原菌”互作体系中，防御酶活性变化既直接反映果实的生理与抗病状态，也可用于评价病原菌的致病性强弱，是评价双方相互作用的核心指标[23]。

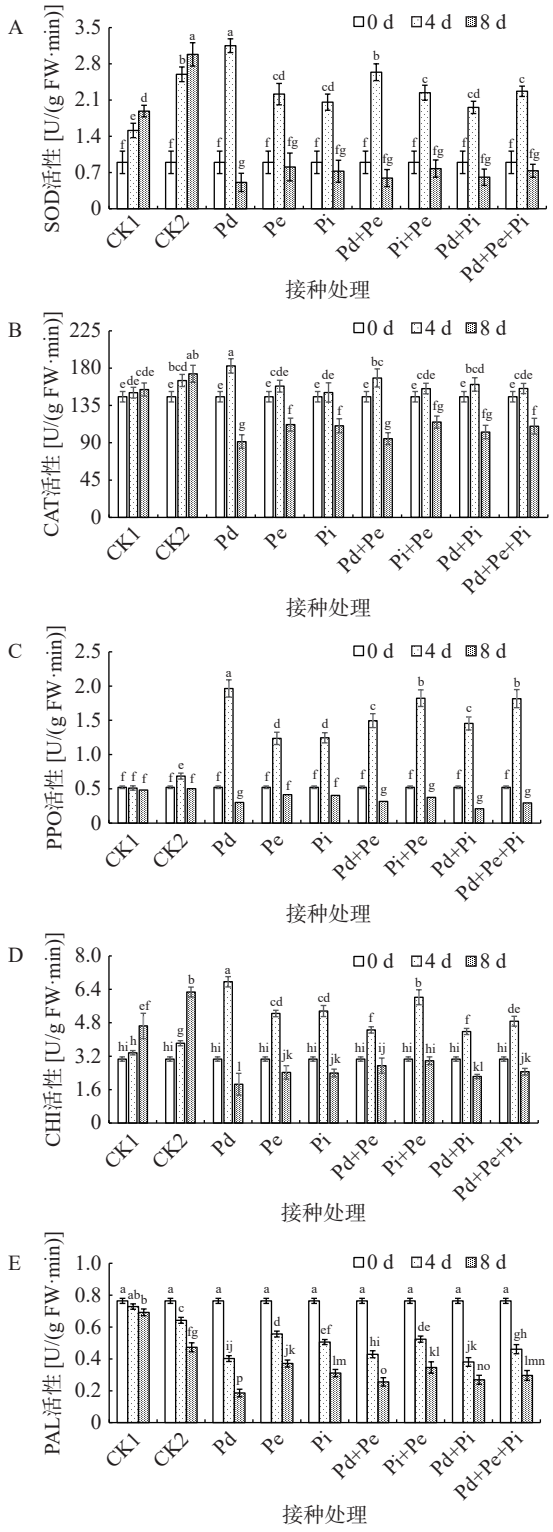


图 8 接种不同种类青霉对贡柑果皮 5 种防御酶活性的影响

Fig.8 Effects of inoculating different *Penicillium* species on the activity of five defensive enzymes of Gonggan mandarin peel

测定结果表明，不同处理对贡柑果皮防御酶活性的影响具有显著的时序与处理特异性。CK1 的 SOD 活性在贮藏 4 和 8 d 分别较 0 d 上升 40.8% 和 52.5%（P<0.05），CAT 活性则保持稳定；CK2（机械损伤）处理的 SOD 和 CAT 活性也显著上升（P<0.05），显示创伤可激活抗氧化响应（图 8A、图 8B）。然而，所有青霉接种处理在初期（贮藏 4 d）虽诱导 SOD 和 CAT 活性升高，但至第 8 d 均大幅下降（P<0.05），表明病原菌侵染后期导致抗氧化酶活性显著降低。单一接种中，指状青霉（Pd）引起 SOD 和 CAT 活性下降最为显著（P<0.05）；复合接种中，Pd+Pe 组合导致的酶活性降低幅度最大，而 3 菌共接种（Pd+Pe+Pi）则表现出一定的缓解效应（图 8A、图 8B）。

PPO 与 CHI 活性对不同处理的响应与 SOD 和 CAT 有所不同。与 CK1 相比，CK2 在处理后 4 d，PPO 和 CHI 活性分别显著升高 34.0% 和 13.6%（P<0.05）；至第 8 d，PPO 活性回落至对照以下，而 CHI 活性则进一步显著升高（图 8C、图 8D）。接种青霉，显著诱导这两种防御酶的活性在短期（处理后 4 d）内升高，其中：PPO 平均较 CK1 和 CK2 分别高 216.5% 和 136.2%、CHI 分别高 57.6% 和 27.9%（P<0.05）；然而至第 8 d，所有接种处理的 PPO 与 CHI 活性均急剧下降，且 Pd 处理引起的酶活性下降程度仍最为显著（图 8D）。与单一接种相比，复合接种并未表现出酶活性下降的叠加效应；相反，3 种青霉同时接种（Pd+Pe+Pi）在一定程度上缓解了酶活下降，其 PPO 和 CHI 活性在第 8 d 的下降幅度显著小于部分双菌组合（P<0.05）。

与上述 4 种酶的响应截然不同，PAL 活性在所有处理中均持续下降（图 8E）。CK1 的 PAL 活性降幅最小，贮藏 8 d 时降低 9.4%（P<0.05），而 CK2 的降幅显著大于 CK1，达 38.1%（P<0.05）。接种青霉，尤其接种 Pd，PAL 活性降低最为显著（P<0.05）；复合接种中，含 Pd 的组合 PAL 活性降幅最大，但 3 种青霉同时接种仍表现出一定的缓解效应。显见，青霉侵染通过干扰抗氧化酶活性、削弱次生代谢防御及抑制苯丙烷通路，破坏贡柑果实的防御网络，尤以 Pd 在单菌接种中破坏性最强，而 3 种菌复合接种时可维持相对较高的酶活性，再次表明微生物互作可调节病原致病力。

2.7 贡柑果实发病率、病情指数与品质和生理指标变化的相关性

贡柑接种不同种类青霉及其组合后，其 IR、DI、WLR、防御酶活性的响应不仅存在显著差异，这些指标间的相关性也存在不同程度的差异性。其中：果实 IR 与 DI 极显著正相关（P<0.01，R=0.923），两指标与果实品质指标中的 WLR 极显著正相关（P<0.01），与 SSC 和 OAC 极显著负相关（P<0.01）；与所

表 3　贡柑果实发病率、病情指数与品质和生理指标的相关性

Table 3　Correlations among disease incidence, disease index, quality, and physiological indicators of Gonggan mandarin fruits

指 标	发病率（IR，%）	病情指数（DI，%）	质量损失率（WLR，%）	可溶性固形物含量（SSC，%）	有机酸含量（OAC，%）	MDA含量（nmol/g）	H_2O_2含量（nmol/g）	O_2^{-}·产生速率[nmol/(g·min)]	SOD活性[U/(g·min)]	CAT活性[U/(g·min)]	PPO活性[U/(g·min)]	CHI活性[U/(g·min)]	PAL活性[U/(g·min)]
发病率(IR，%)	1												
病情指数(DI，%)	0.923**	1											
质量损失率(WLR，%)	0.965**	0.909**	1										
可溶性固形物含量（SSC，%）	–0.888**	–0.834**	–0.805**	1									
有机酸含量(OAC，%)	–0.913**	–0.950**	–0.936**	0.810**	1								
MDA含量(nmol/g)	0.889**	0.907**	0.928**	–0.745**	–0.922**	1							
H_2O_2含量(nmol/g)	0.811**	0.898**	0.871**	–0.677**	–0.937**	0.968**	1						
O_2^{-}·产生速率[nmol/(g·min)]	0.901**	0.849**	0.904**	–0.808**	–0.854**	0.957**	0.868**	1					
SOD活性[U/(g·min)]	–0.066	–0.262	–0.057	0.234	0.289	–0.215	–0.390	–0.063	1				
CAT活性[U/(g·min)]	–0.573**	–0.712**	–0.608**	–0.578**	0.764**	–0.718**	–0.831**	–0.570**	0.802**	1			
PPO活性[U/(g·min)]	0.123	–0.133	0.006	–0.110	0.235	0.138	–0.361	0.099	0.757**	0.638**	1		
CHI活性[U/(g·min)]	–0.054	–0.255	–0.112	0.226	0.325	–0.256	–0.373	–0.094	0.919*	0.782**	0.790**	1	
PAL活性[U/(g·min)]	–0.962**	–0.883**	–0.975**	0.801**	0.913**	–0.910**	–0.838**	–0.912**	0.039	0.519**	–0.094	0.021	1

注：$R_{0.05}$=0.381，$R_{0.01}$=0.487；*表示显著相关（P<0.05），**表示极显著相关（P<0.01），均基于双侧检验；表中的g为g FW。

测试的膜脂过氧化作用的 3 项指标—O_2^{-}·产生速率、H_2O_2 和 MDA 含量极显著正相关（P<0.01）；与所测试的 5 种防御酶中的 CAT、PAL 活性极显著负相关（P<0.01），与 SOD、PPO、CHI 活性的相关性不显著（P>0.05）。SOD 活性与质量损失率相关性不显著，与 CAT、PPO、CHI 活性显著正相关（P<0.01，P<0.05）；CAT 活性与测试分析的所有指标均存在极显著相关性（P<0.01），其中，与 4 种防御酶的活性极显著正相关（P<0.01），与 IR 等其余 8 项指标极显著负相关（P<0.01）。PPO 活性与 SOD、CAT 及 CHI 活性极显著正相关（P<0.01），与其他 9 项指标相关性均不显著；PAL 活性与果实 WLR 及膜脂过氧化作用的 3 项指标极显著负相关（P<0.01），与 SSC 和 OAC 极显著正相关（P<0.01）（表 3）。青霉侵染导致贡柑病害发生发展、生理生化及果实品质劣变存在内在且紧密的联系。

对上述存在极显著相关性的指标分别进行回归分析，结果表明，果实 IR（X）与 DI（Y）的最优回归关系式为直线回归，Y=−1.28403+0.37232X（R^2=0.8520**）；在所测试分析的指标中，果实 IR（X）、果实 DI（X）与果实 WLR（Y）等的最优回归关系式均为多项式回归。这些回归方程提示：贡柑果实 IR 每升高 1.0%，DI 增大 0.372%；发病率每上升 1%，WLR 增大 0.021%，SSC 降低 0.046%，ORC 降低 0.002%，MDA 含量升高 0.961 nmol/g FW，H_2O_2含量升高 3.177 nmol/g FW，O_2^{-}·产生速率增大 0.034 nmol/(min·g FW)；IR 每升高 1.0%，CAT 活性降低 0.563 U/(g FW·min)，PAL 活性降低 0.005 U/(g FW·min)。DI 每增大 1%，WLR 增大 0.017%，SSC 降低 0.024%，ORC 降低 0.003%，MDA 含量升高 0.766 nmol/g FW，H_2O_2 含量升高 4.818 nmol/g FW，O_2^{-}·产生速率增大 0.074 nmol/(min·g FW)。

3　讨论

柑橘采后青霉病害防控长期受限于对病原-宿主互作机制认识不足。以往研究多集中于厚皮柑橘品种，并将意大利青霉（Pi）视为首要病原，对贡柑这类薄皮高糖型柑橘的病原生态位分化及种间互作缺乏解析。本研究发现，指状青霉（Pd）是贡柑腐烂的关键致病菌，其侵染率及扩展速度均显著高于 Pi 和扩展青霉（Pe）。基于果胶酶底物特异性理论[24]，Pd 分泌的多聚半乳糖醛酸酶可能更易降解贡柑薄壁组织。同时，研究发现贡柑致病青霉种间存在竞争拮抗：3 种青霉同时接种时病情指数（DI）显著低于双菌组合，表明微生物互作具备天然的病害控制潜力，这与产酶溶杆菌 LE16 的广谱抑菌效应[15] 具有一致性。贡柑对 Pd 的高度敏感也凸显柑橘品种特性对病理机制具有重要影响。

与传统“复合侵染协同增效”的认知不同，本研究在贡柑-青霉互作系统中观察到的以拮抗为主导的种间互作现象，其本质超越了资源竞争。菌斑间清晰分界，Pd 的优势地位，3 种青霉共存未加剧病害反而延缓病情发展，这些都提示存在化感拮抗机制[25]。Pd 可能通过释放特异性拮抗物质而抑制 Pi 和 Pe 的扩展，同时其自身在侵染进程也可能受代谢资源限制或环境反馈而形成“自我抑制”，最终降低整体病害水平。这一发现提示：在一定微生态条件下，病原多样性可能通过种间化学拮抗形成天然的病害抑制缓冲带。深入解析此种拮抗网络的关键化学信号，不仅有助于阐明贡柑青霉微生物互作的化学生态基础，更可为开发基于“病原群落靶向调控”的贡柑绿色防控策略提供新范式。

本研究表明，采前轻微机械损伤是青霉侵染的重要通道。即使经次氯酸钠表面消毒，被划伤的果实在自然条件下贮藏仍表现出较高发病率，印证了潜伏带菌对采后腐烂的显著影响[26]。这提示需要建立涵

盖贡柑采收规范、果面保护和病原基数控制的综合采前管理体系，以及采后即时预冷处理的技术规范。广东肇庆地处南亚热带，冬季自然温度显著高于贡柑最适贮藏温度，是协同加速腐烂的重要环境驱动因子[27]，不仅促进青霉菌生长与侵染，也加剧果实呼吸代谢、品质降解和膜脂过氧化。相比之下，低温贮藏（6 ℃）通过直接抑制病原和延缓寄主代谢发挥双重保护效应，尤其有助于保持果皮蜡质结构与功能，对于保持贡柑果实外观品质（金黄光洁）及减少失水至关重要。

果实采后衰老有生理型、病理型、胁迫诱导型、激素调控型、代谢失调型、程序性衰老等多种类型，核心机制均与 ROS 积累的氧化还原稳态失衡及代谢网络崩溃有关[28]。本研究表明，青霉侵染通过双重路径破坏贡柑果实 ROS 代谢网络：一是直接激发 ROS 爆发，二是系统性瓦解抗氧化防御——CAT 活性崩溃及 PAL 活性持续被抑制。前者会导致 H_2O_2 清除能力丧失，后者则会阻断酚类和木质素等抗病物质合成，最终导致膜系统不可逆损伤[29]。但是，三种青霉同时接种的 ROS 与 MDA 积累量最低，表示青霉病原间的竞争可能削弱单一菌株的侵染强度，间接缓解宿主氧化损伤。未来贡柑保鲜技术可考虑靶向强化防御酶活性：如利用茉莉酸甲酯激活 PAL 通路，或设计纳米载体递送 CAT 模拟酶以清除 H_2O_2，阻断“PAL 抑制→CAT 失活→ROS 失控→膜系统崩溃”的致病链。

植物宿主与致病青霉互作的核心，是青霉效应蛋白与宿主防御枢纽之间形成分子层面的攻防拮抗。这些效应蛋白，包括细胞壁降解酶类、蛋白酶和几丁质酶抑制剂类，与宿主和青霉种类密切相关，致病力强的青霉其效应蛋白库可能更加高效和特异[30]。本研究发现，PPO 和 CHI 虽早期升高但与病害发展无显著相关性；相反，PAL 活性受抑制与病害进程极显著负相关。青霉特别是指状青霉（Pd）可能分泌特异效应蛋白，有效抑制贡柑防御系统的“枢纽”节点——PAL 的活性或表达，阻断酚类/木质素等物理屏障物质的快速合成，最终导致结构性防御崩溃。贡柑贮藏保鲜中分子抗病策略之一可聚焦 PAL 通路的时空精准调控。

4 结论

指状青霉是贡柑采后腐烂的优势病原菌，致病力显著高于其他青霉，对薄皮柑橘组织具有特异性适应能力。三种青霉共存通过生态位竞争而延缓病害，菌斑分界现象表明存在种间化拮抗作用。

青霉侵染通过持续抑制贡柑 PAL 活性、阻断抗病物质合成，并共同诱导 CAT 系统性失活，导致活性氧代谢失衡与膜脂过氧化加剧，导致品质劣变。该双路径机制是贡柑抗病失效的生理基础。

贡柑青霉病害防控应建立多级体系：采前控制病原基数、避免机械损伤；采后采用低温冷藏结合拮抗菌微生态调控技术；通过维持防御酶 PAL/CAT 稳态抑制氧化崩溃，病害防控与品质维持协同。

© The Author(s) 2026. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

参考文献

[1] 徐呈祥, 郑福庆, 马艳萍, 等. 贮藏温度对耐贮性不同的柑橘品种果皮蜡质含量及其化学组成的影响[J]. 食品科学, 2021, 42(13): 223−232. [XU Chengxiang, ZHENG Fuqing, MA Yanping, et al. Effect of storage temperature on peel wax content and chemical composition of *Citrus* cultivars with different storability [J]. Food Science, 2021, 42(13): 223−232.]

[2] 朱晓婷, 肖更生, 余元善, 等. 不同采摘期德庆有机和非有机贡柑果皮挥发性风味物质差异分析[J]. 食品工业科技, 2025, 46(17): 1−13. [ZHU Xiaoting, XIAO Gengsheng, YU Yuanshan, et al. Analysis of volatile flavor compounds differences in organic and non-organic Gonggan mandarin peel at different harvest periods in Deqing County[J]. Science and Technology of Food Industry, 2025, 46(17): 1−13.]

[3] ZHANG L, LIU S, CHEN R, et al. Hypoglycemic effects of Gonggan peel extract in diabetic mice: Modulation of glucose metabolism and gut microbiota[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2022, 70(12): 3820−3832.

[4] LI J, CHEN X, WANG H, et al. Gonggan polyphenols inhibit colorectal cancer growth via ROS-mediated apoptosis[J]. Food & Function, 2023, 14(5): 2567−2579.

[5] 徐呈祥. 基于 CNKI 的我国贡柑研究进展分析[J]. 广东农业科学, 2015, 42(23): 86−90. [XU Chengxiang. Bibliometric analysis on progress in research of ‘Gonggan’ (*Citrus reticulata* Blanco) based on CNKI[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2015, 42(23): 86−90.]

[6] 徐呈祥, 郑福庆, 马艳萍, 等. 贡柑果皮显微结构及其对贮藏温度的响应研究[J]. 广东农业科学, 2016, 43(9): 51−55,封 2. [XU Chengxiang, ZHENG Fuqing, MA Yanping, et al. Pericarp microstructure of ‘Gonggan’ mandarin (*Citrus reticulata*) fruit and its responses to different temperatures[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2016, 43(9): 51−55,封 2.]

[7] 徐呈祥, 郑福庆, 马艳萍, 等. 二氧化氯处理对贡柑采后贮藏品质的影响[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(3): 201−206. [XU Chengxiang, ZHENG Fuqing, MA Yanping, et al. Effect of chlorine dioxide on the quality of Gonggan mandarin fruits during postharvest storage[J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(3): 201−206.]

[8] 谢玉花, 罗杨合, 谢冬娣, 等. 不同浓度壳聚糖涂膜对贡柑贮藏品质的影响[J]. 食品研究与开发, 2017, 38(22): 209−213. [XIE Yuhua, LUO Yanghe, XIE Dongdi, et al. Effects of different concentrations chitosan coating on sorage quality of Gonggan[J]. Food Research and Development, 2017, 38(22): 209−213.]

[9] 郑福庆, 徐呈祥, 马艳萍, 等. 咪鲜胺锰盐对贡柑果实保鲜作用[J]. 浙江农业科学, 2017, 58(1): 103−106. [ZHENG Fuqing, XU Chengxiang, MA Yanping, et al. Fresh-keeping effect of prochloraz manganese salt on Gonggan fruit[J]. Journal of Zhejiang Agricultural Sciences, 2017, 58(1): 103−106.]

[10] 陶能国, 王华, 王长锋, 等. 两株柑橘采后致病真菌的分离及生物学特性研究[J]. 湘潭大学自然科学学报, 2013, 35(3): 75−78. [TAO Nengguo, WANG Hua, WANG Changfeng, et al. Research

on the isolating of two *Citrus* postharvest pathogens and their biological characteristics[J]. Natural Science Journal of Xiangtan University, 2013, 35(3): 75−78.]
[11] 张翠香, 李娜, 李倩, 等. 柑橘青霉菌的分离鉴定与特性分析[J]. 华中师范大学学报(自然科学版), 2014, 48(1): 86−90. [ZHANG Cuixiang, LI Na, LI Qian, et al. Identification and charateristic analysis about *Penicillium* spp. from *Citrus*[J]. Journal of HuaZhong Normal University (Natural Sciences), 2014, 48(1): 86−90.]
[12] 张廷富, 文国琴, 王守长, 等. 柑橘采后青霉病原中寄生病毒的筛选与鉴定[J]. 西南农业学报, 2023, 36(2): 348−355. [ZHANG Tingfu, WEN Guoqin, WANG Shouchang, et al. Screening and identification of parasitic viruses in *Penicillium pathogen* of postharvest *Citrus*[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2023, 36(2): 348−355.]
[13] 谭小丽, 龙春燕, 李路, 等. 脱氢乙酸钠抑制指状青霉的作用机制[J]. 食品科学, 2022, 43(23): 19−26. [TAN Xiaoli, LONG Chunyan, LI Lu, et al. Antifungal mechanism of sodium dehydroacetate against *Penicillium digitatum*[J]. Food Science, 2022, 43(23): 19−26.]
[14] PENG Xuan, WAN Chunpeng, ZHANG Yajie, et al. Integrative cytology and proteome alterations unravel the multitarget effect of a novel alkaloid antofine against *Penicillium italicum*[J]. Food Quality and Safety, 2023, 710.1093: fyad001.
[15] 邓成凤, 李素平, 张瑞轩, 等. 产酶溶杆菌 LE16 对采后柑橘青霉绿霉病的防治作用[J]. 园艺学报, 2023, 50(7): 1574−1586. [DENG Chengfeng, LI Suping, ZHANG Ruixuan, et al. Control effect of *Lysobacter enzymogenes* LE16 on rot disease in post-harvest *Citrus* fruit caused by *Penicillium digitatum* and *P. italicum*[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2023, 50(7): 1574−1586.]
[16] 高佳, 朱永清, 罗芳耀, 等. 次氯酸钠溶液对鲜毛豆荚清洗杀菌效果的研究[J]. 食品工业科技, 2016, 37(11): 96−99. [GAO Jia, ZHU Yongqing, LUO Fangyao, et al. Effect of sodium hypochlorite water solution on the washing sterilization of fresh green soybean pods[J]. Science and Technology of Food Industry, 2016, 37(11): 96−99.]
[17] 李玲. 植物生理学模块实验指导[M]. 北京: 科学出版社, 2009. [LI Ling. Experimental guidance of plant physiology module[M]. Beijing: Science Press, 2009.]
[18] ZAUBERMAN G, RONGEN R, AKERMAN M. Postharvest retention of the red color of litchi fruit pericarp[J]. Plant Physiology, 1970, 45(4): 395−400.
[19] BOLLER T, GEHRI A, MAUCH F, et al. Chitinase in bean leaves: Induction by ethylene, purification, properties, and possible function[J]. Planta, 1983, 157(1): 22−31.
[20] 李翠丹, 申琳, 生吉萍. 一氧化氮参与水杨酸诱导的采后番茄果实抗病性反应[J]. 食品科学, 2013, 34(8): 294−298. [LI Cuidan, SHEN Lin, SHENG Jiping. Involvement of nitric oxide in defense response of salicylic acid-induced disease in postharvest tomato fruits[J]. Food Science, 2013, 34(8): 294−298.]
[21] 刘亚光, 李海英, 杨庆凯. 大豆品种的抗病性与叶片内苯丙氨酸解氨酶活性关系的研究[J]. 大豆科学, 2002, 21(3): 195−198. [LIU Yaguang, LI Haiying, YANG Qingkai. Study on the relationship between resistance of soybean and activity of pal in leaves of soybean infected by *Cercospora sojina* Hara[J]. Soybean Science, 2002, 21(3): 195−198.]
[22] 葛永红, 董雪, 魏美林, 等. 壳聚糖复合多聚赖氨酸对苹果果实青霉病及抗氧化酶和苯丙烷代谢的影响[J]. 食品工业科技, 2018, 39(13): 281−286. [GE Yonghong, DONG Xue, WEI Meilin, et al. Effect of chitosan combined with polylysine on blue mould of apple fruit and antioxidant enzymes and phenylpropanoid pathway [J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(13): 281−286.]
[23] KHAN A, KANWAL F, ULLAH S, et al. Plant secondary metabolites: Central regulators against abiotic and biotic stresses[J]. Metabolites, 2025, 15(4): 276.
[24] ZHAO Lina, LI Huifang, YU Jiang, et al. A mechanistic study of *Citrus* infection by *Penicillium expansum*[J]. Food Science, 2019, 40(16): 97−106.
[25] ROJAS E C, SAPKOTA R, LUKENS L N. Transcriptional regulation of plant defense responses by WRKY transcription factors[J]. Phytopathology, 2022, 112(5): 1023−1032.
[26] DROBY S, WISNIEWSKI M, TEIXIDÓ N, et al. The science, development, and commercialization of postharvest biocontrol products[J]. Postharvest Biology and Technology, 2016, 122: 22−29.
[27] 郑福庆, 徐呈祥, 马艳萍, 等. '贡柑'果实冷藏保鲜效果与果皮蜡质含量和化学组成及表面微形态结构的关系[J]. 果树学报, 2019, 36(12): 1720−1730. [ZHENG Fuqing, XU Chengxiang, MA Yanping, et al. Relationship between fruit fresh-keeping effect with cold storage and peel wax content, chemical composition and surface micro-morphological structure in 'Gonggan' mandarin(*Citrus* reticulate)[J]. Journal of Fruit Science, 2019, 36(12): 1720−1730.]
[28] WASZCZAK C, ŚWIEŻAWSKA B, SOBIESZCZUK-NOWICKA E, et al. Spatial H_2O_2 signaling specificity: H_2O_2 from chloroplasts and peroxisomes modulates the plant transcriptome differentially[J]. Molecular Plan, 2021, 14(7): 979−996.
[29] ZHANG Y X, LIN X Y, LI Y, et al. Nanozyme-enabled antioxidant defense for fruit preservation against oxidative stress[J]. ACS Nano, 2022, 16(11): 17729−17742.
[30] SARI L, KAFKAS E, ERKAN M. UV-B irradiation induces phenolic accumulation by activating phenylpropanoid pathway in citrus fruit[J]. Postharvest Biology and Technology, 2024, 207: 112602.