

凉山州石榴贮藏期病害病原菌的鉴定

孙 劲¹, 何子文², 郑晓慧^{3*}

(¹西昌学院资源与环境学院, 四川西昌 615013; ²四川农业大学农学院, 成都 611130;

³西昌学院农业科学学院, 四川西昌 615013)

摘 要:【目的】对凉山彝族自治州会理县石榴贮藏期病害进行系统研究, 明确其病原菌种类。【方法】按照柯赫氏法则对冻库中采集的病果进行组织分离与纯化、单孢分离、接种试验、再纯化等步骤, 依据其形态学特征并结合 rDNA-ITS 序列分析方法对病原菌种类进行鉴定。【结果】根据凉山州石榴贮藏期病害病果的症状将其分为干腐和软腐, 软腐又分为 3 类, 从 4 种病害类型中分离出 4 株优势菌株, 分别记为 A、B、C、D。通过形态学特征并结合 rDNA-ITS 序列分析方法, 结果表明, 凉山州石榴贮藏期病害病原菌主要有 4 类, 即垫壳孢(*Coniella granati*)、光孢青霉(*Penicillium glabrum*)、黑曲霉(*Aspergillus niger*)、灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*)。【结论】结合形态学特征和 rDNA-ITS 序列分析, 将来自凉山州石榴贮藏期干腐病的病原菌鉴定为垫壳孢(*Coniella granati*), 软腐病的病原菌鉴定为光孢青霉(*Penicillium glabrum*)、黑曲霉(*Aspergillus niger*)、灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*)。

关键词: 石榴; 贮藏期病害; 鉴定; 垫壳孢; 光孢青霉; 黑曲霉; 灰葡萄孢

中图分类号: S665.4

文献标志码: A

文章编号: 1009-9980(2017)Suppl.-161-07

Identification of pathogenic bacteria in the storage period of pomegranate in Liangshan state

SUN Jin¹, HE Ziwen², ZHENG Xiaohui^{3*}

(¹Institute of Resources and Environment, Xichang University, Xichang 615013, Sichuan, China; ²Agriculture College, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, Sichuan, China; ³College of Agricultural Sciences, Xichang University, Xichang 615013, Sichuan, China)

Abstract: 【Objective】In order to systematically study the disease of pomegranate storage in Huili County of Liangshan Yi Autonomous Prefecture, and clarify the pathogen species. 【Methods】The isolates were collected and purified according to the Koch's law, separation, inoculation and re-purification. The pathogen was identified according to its morphological characteristics and rDNA-ITS sequence analysis. 【Results】According to the symptoms of pomegranate storage in Liangshan Prefecture, it was divided into three types: dry rot and soft rot, and soft rot was divided into three groups. Four dominant strains were isolated from four disease types, B, C, D. The morphological characteristics and the rDNA-ITS sequence analysis showed that there were four major pathogens in the pomegranate storage period in Liangshan Prefecture, namely, *Coniella granati*, *Penicillium glabrum*, *Aspergillus niger*, and *Botrytis cinerea*. 【Conclusion】Combining morphological characteristics and rDNA-ITS sequence analysis, the pathogens of dry rot from Liangshan state were identified as *Coniella granati*, and the pathogens of soft rot were identified as *Penicillium glabrum*, *Aspergillus niger*, and *Botrytis cinerea*.

Key words: Pomegranate; Storage period disease; Identification; *Coniella granati*; *Penicillium glabrum*; *Aspergillus niger*; *Botrytis cinerea*

石榴(*Punica granatum* L.)原产阿富汗、伊朗等中亚地区国家,之后经丝绸之路传至我国,至今在我

国已经有 2 000 多年的栽培历史^[1]。其果实中含有独特、丰富的天然活性物质,具有很强的延缓衰老、抗

收稿日期: 2017-08-20 接受日期: 2017-09-11

基金项目: 西昌市科技项目计划(15YYJS002)

作者简介: 孙劲, 硕士, 讲师, 研究方向应用微生物及生物化学。E-mail: sunjinjoe@126.com

*通信作者 Author for correspondence. Tel: 18981536708, E-mail: 491698683@qq.com

氧化、减缓癌变进程的作用,因此具有很高的开发与利用价值,给当地石榴产业和发展带来了巨大的经济效益,从而栽培面积逐步增大,截止 2015 年我国石榴中的 5 个重要产区栽培面积已达 79 300 hm²。其中凉山州会理县是我国最大的石榴产区,到 2015 年,石榴种植面积已达到 20 000 hm²,总产量达 44.37 万 t,种植规模占全国总栽培面积的 1/4,石榴产业已成为促进当地农村经济发展、增加人民收入的支柱产业^[2]。

随着当地石榴栽培面积的不断扩大,产量增加,石榴果实贮藏率也随之逐年增大,但在石榴贮藏过程中,果实腐烂病害的发生日益严重,贮藏期冻库病果率一般为 17%~60%,发病严重的冻库病果率甚至超过 90%,已经严重威胁到了贮藏果品的商品性,而贮藏期病害则是造成石榴贮藏期烂果的最主要原因。因此,对石榴贮藏期病害进行系统研究,明确病原菌种类,将对凉山州石榴产业的可持续发展具有重要意义。

为了系统地研究石榴贮藏期病害病害的病原物种类,笔者从凉山州会理县不同冻库中采集石榴,严格按照柯赫氏法对其进行组织分离与纯化、单孢分离、接种试验、再纯化等步骤,依据其形态学特征并结合 rDNA-ITS 序列分析方法对病原菌种类进行鉴定,以期有效地防治石榴贮藏期病害提供一定的依据。

1 材料和方法

1.1 供试材料

石榴品种为‘青皮软籽石榴’,选择凉山州会理县冻库贮藏期发病的病果。

1.2 病原菌的分离与纯化

参照方中达^[3]的植病研究方法。挑选具有典型症状的果实,擦拭清洗并剪取病健交界处 5 mm×5 mm 的组织块,依次放入 75%无水乙醇、0.1%升汞中消毒处理,用无菌水浸泡清洗后放置于 PDA 平板上,25℃的恒温培养箱恒温培养 7 d,再从中挑选出优势菌落,经多次分离得到纯化菌株。将纯化菌株保存于 PDA 斜面试管中,于 4℃贮存备用。

1.3 病原菌形态学特征观察

将不同纯化分离株的 PDA 平板置于 25℃恒温培养箱培养,观察菌落的颜色、形状、气生菌丝的疏密程度,并用解剖针挑取病原菌于光学显微镜下观

察菌丝、分生孢子梗、分生孢子的形态学特征,采用一体化显微摄像系统对相关数据测量和图像采集,最后根据观察的结果并参考相关文献对病原菌的种类进行初步形态鉴定^[4-7]。

1.4 病原菌单孢分离

将分离纯化好的菌株分别在 PDA 上培养 7~10 d,待产生大量孢子后,用 5 mL 无菌水洗脱,配置成孢子悬浮液,用 U 型玻璃棒蘸取孢子悬浮液涂抹在划好小方格的水琼脂培养基中,在光学显微镜中,用 10 倍的物镜观察标记只有 1 个孢子的小方块,并用接种针挑取标记好的小方块放置在 PDA 培养基上,标记好后放置于 25℃的恒温培养箱中培养^[8-11]。

1.5 病原菌致病性测定

1.5.1 接种病原菌孢子悬浮液的配置 将单孢分离的菌株分别在 PDA 上培养 7 d 后取出,在无菌条件下注入 5 mL 无菌水混匀,获得均匀的孢子悬浮液,用无菌的 4 层纱布过滤转移到 10 mL 刻度试管中,用血球计数板计数,逐渐添加无菌水调整至所需浓度(每 mL 1×10^6 个),待用。

1.5.2 病原菌接种试验 用 75%无水乙醇对石榴果实进行表面消毒,再用无菌水擦洗 3 次,用脱脂棉擦干后,将配置好的孢子悬浮液采用针刺法接种健康石榴果实,用塑料膜封口保湿培养放入 25℃恒温恒湿培养箱中,每 24 h 观察发病情况。

接种果实试验采用针刺法处理,在成熟果实腰部等距离 3 处做针刺伤接种试验,垫壳孢(*Coniella granati*)、光孢青霉(*Penicillium glabrum*)、黑曲霉(*Aspergillus niger*)、灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*) 4 种病原菌分别各选择 3 个健康石榴接种,每个菌株设 9 次重复,2 个石榴接种无菌水作空白对照,6 次重复。

1.6 菌株 rDNA-ITS 序列分析

1.6.1 DNA 的提取 将单孢分离的菌株在 PDA 平板上培养 10 d 后,刮取菌丝用真菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒(上海生工生物有限公司)提取 DNA,按说明书操作。

1.6.2 基因序列的测定 以石榴贮藏期病害病原菌单孢分离的菌株基因组 DNA 为模板进行 rDNA-ITS 基因的 PCR 扩增。采用的引物为真菌基因组转录间隔区通用引物 ITS1 和 ITS4,ITS1:5'-TCCGTAG-GTGAACCTGCGG-3'与 ITS4:5'-TCCTCCGCTTAT-FGATATGC-3'。使用诺唯赞的高保真酶 Phanta® Max Super-Fidelity DNA Polymerase 扩增 rDNA-ITS

区域,PCR反应体系:2×Phanta Max Buffer 12.5 μL、dNTP Mix(10 mmol·L⁻¹)0.5 μL、模板 DNA 0.5 μg、引物各 1 μL、Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase 0.5 μL,加 ddH₂O 补齐至 25 μL。扩增程序:95 ℃ 3 min,95 ℃ 15 s,54 ℃ 15 s,72 ℃ 1 min,共 20 个循环,72 ℃ 10 min。将 PCR 扩增产物送往上海生工生物有限公司进行 DNA 测序。

1.6.3 同源性分析 将测序所得结果进行 BLAST 比对,利用 MEGA 软件将测序所得序列与 GeneBank 中选取的参比菌株的 18S rDNA 基因序列进行同源性分析,并构建系统发育树进化树。

2 结果与分析

2.1 石榴贮藏期病害症状

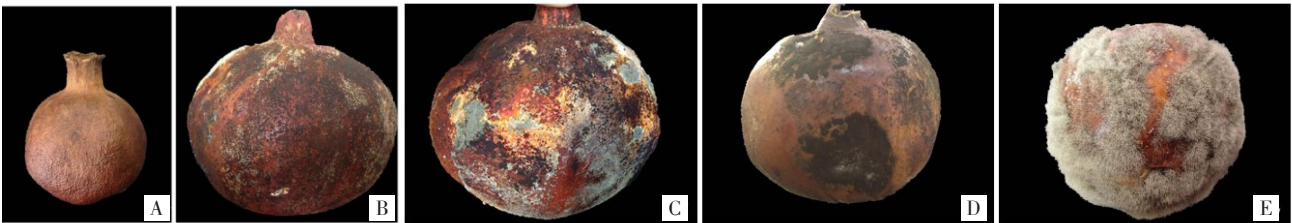
从凉山州会理县冻库中采集到的病果,根据其症状将其分为干腐和软腐,软腐又分为 3 类:Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ。干腐病病害通常在果实的萼筒处首先产生豆粒

大小的浅褐色病斑,后逐渐向外扩展,直到整个果实腐烂、干缩。发病初期病斑呈黄褐色,之后迅速扩大,果肉内部大量腐烂,籽粒间松散;后期果实逐渐失水,形成僵果,表面密集丛生许多小黑点(图 1-A、B)。

软腐Ⅰ型病害发病初期果面出现黄褐色的湿润状病斑,之后迅速扩展至全果,对发病果实稍加用力按压,即流出大量黄褐色汁液;发病后期籽粒与隔膜腐烂,伴有酒糟味出现,萼筒及果实表面可观察到大量暗绿色孢子(图 1-C)。

软腐Ⅱ型病害初期果面出现黄褐色的湿润状病斑,之后病斑扩展迅速;发病后期果实内部腐烂,果面布满熟褐色的分生孢子和白色的菌丝体(图 1-D)。

软腐Ⅲ型病害初期出现褐色的病斑,与健部交界不规则,在潮湿条件下病斑扩展迅速,果面出现灰白色的霉层;发病后期果实内部完全糜烂,果面布满一层灰白色的霉层(图 1-E)。



A. 干腐病幼果发病症状;B. 干腐病成熟果实发病症状;C-E. 软腐Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ型病害的症状。
A. Dry rot disease young fruit symptoms; B. Dry ripening ripe fruit disease symptoms; C-E. Soft rot Ⅰ, Ⅱ, Ⅲ type disease symptoms.

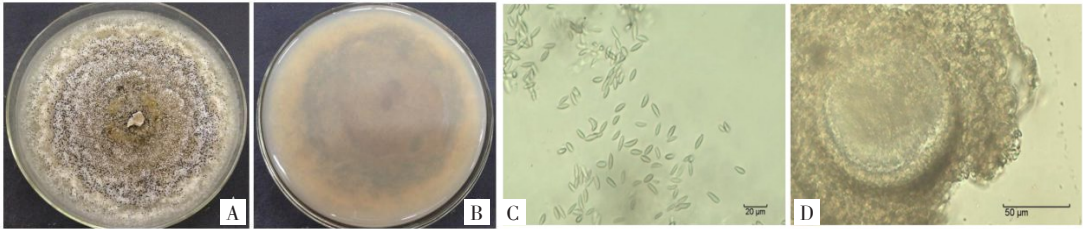
图 1 石榴果实贮藏期病害的症状

Fig. 1 Pomegranate fruit storage disease symptoms

2.2 优势菌的分离和形态学观察

从 4 种病害类型中分离出 4 株优势菌株,分别记为 A、B、C、D。菌株 A 在 PDA 培养基上菌丝初期白色,呈放射状向四周扩展,菌丝近圆形,边缘波浪状,培养半个

月后第 1 圈菌丝边缘开始产生黑色颗粒,即分生孢子器,半埋于基质中并逐渐向外扩展(图 2-A、B)。镜检观察分生孢子器近球形,淡褐色,单生,半埋生,器壁较薄,产孢区呈垫状隆起,大小为(54~143)μm×(63~132)μm。产孢细胞圆柱形,无色,光滑,内壁



A, B. 在 PDA 培养基上的培养性状;C. 分生孢子(比例尺为 20 μm);D. 分生孢子器(比例尺为 50 μm)。
A, B. Culture properties on PDA medium; C. Conidia (scale 20 μm); D. Pycnidium (scale 50 μm).

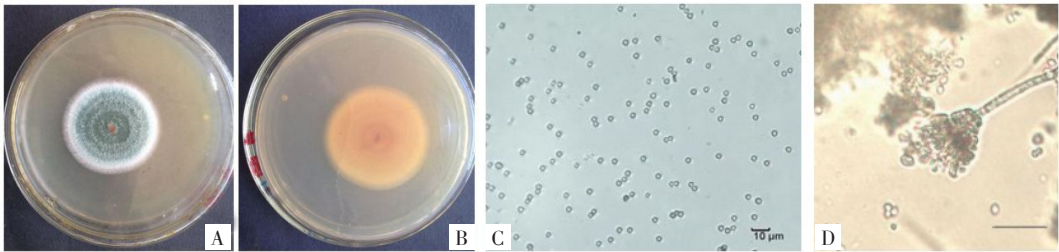
图 2 A 菌株的形态学特征

Fig. 2 Morphological characteristics of strain A

芽生瓶体式产孢,从基部垫状隆起伸出。分生孢子纺锤形或镰刀形,无色或淡褐色,无隔膜,表面光滑,两端细尖中间粗或微弯,(9~13) $\mu\text{m} \times (3\sim4)\mu\text{m}$ (图2-C、D)。

菌株B初期长满暗绿色小颗粒,之后逐渐向外扩展,形成近圆形菌落,边缘形成一圈布满茸状的白

色气生菌丝(图3-A、B)。镜检观察分生孢子梗从菌丝上垂直生出,无足细胞,有横隔膜,光滑,顶端排列成帚状间枝,分枝多次,对称,分枝顶端产生瓶状小梗,其上着生成串的内壁芽生式分生孢子。分生孢子无色,单孢,圆形表面光滑,直径为2 μm ,聚集时多呈青色(图3-C、D)。



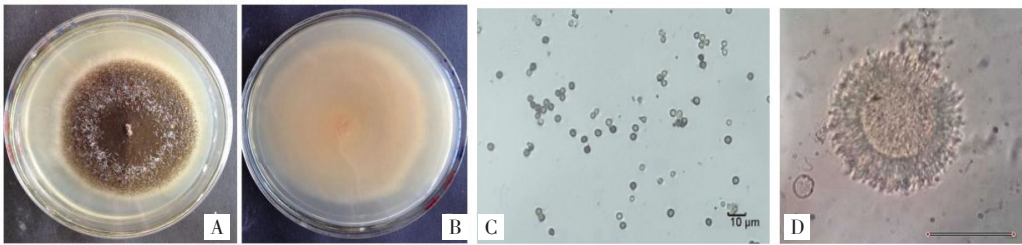
A、B. 在 PDA 培养基上的培养性状;C. 分生孢子(比例尺为 10 μm);D. 分生孢子梗(比例尺为 20 μm)。
A, B. Culture properties on PDA medium; C. Conidia (scale 10 μm); D. Conidiophore (scale 20 μm).

图 3 B 菌株的形态学特征

Fig. 3 Morphological characteristics of strain B

菌株C初期产生熟褐色的孢子,并不断向外扩展,形成近圆形菌落,边缘产生1圈气生菌丝(图4-A、B)。镜检观察菌丝有隔,淡色。分生孢子梗直立,大小为(95~116) $\mu\text{m} \times (108\sim128)\mu\text{m}$,顶端膨大

成球形或椭圆形,从泡囊的全部表面放射状的生出小梗,小梗再分枝成2个至多个的小梗。分生孢子串生于小梗顶端,作辐射状排列,褐色,单孢,圆形,直径为3 μm (图4-C、D)。



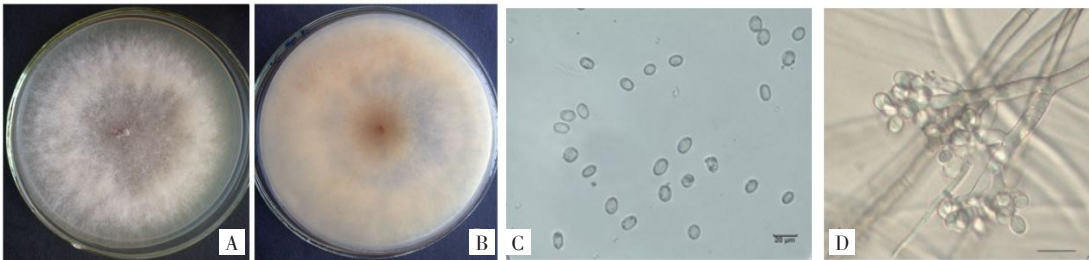
A、B. 在 PDA 培养基上的培养性状;C. 分生孢子(比例尺为 10 μm);D. 分生孢子梗(比例尺为 50 μm)。
A, B. Culture properties on PDA medium; C. Conidia (scale 10 μm); D. Conidiophore (scale 50 μm).

图 4 C 菌株的形态学特征

Fig. 4 Morphological characteristics of strain C

菌株D初期长满较长的茸毛状菌丝,并不断向外扩展,菌丝生长速度较快,后期菌丝上布满灰白色

的孢子(图5-A、B)。镜检观察菌丝匍匐,灰色。分生孢子梗细长,稍有色,不规则的呈树形状,分枝,顶



A、B. 在 PDA 培养基上的培养性状;C. 分生孢子(比例尺为 20 μm);D. 分生孢子梗(比例尺为 20 μm)。
A, B. Culture properties on PDA medium; C. Conidia (scale 20 μm); D. Conidiophore (scale 20 μm).

图 5 D 菌株的形态学特征

Fig. 5 Morphological characteristics of strain D

端细胞膨大成球形,上生小梗,梗上生分生孢子。分生孢子聚集成葡萄穗状,无色,单孢,卵圆形,大小为(6~10)μm×(7~14)μm(图5-C、D)。

根据其形态特征,鉴定A菌株为垫壳孢属(*Coniella*),B菌株为青霉属(*Penicillium*),C菌株为曲霉属(*Aspergillus*),D菌株为葡萄孢属(*Botrytis*)。

2.3 菌株致病性检测

A菌株采用针刺法处理的3个果实、9次重复均发病,接种初期伤口处形成椭圆形病斑,中期病斑进一步扩大,扩展迅速,并有大量水渍侵出,病斑呈深褐色边缘伴有1圈黄色晕圈,后期果实整个内部糜烂,有酒糟味。取感病的组织块重新进行组织分离培养,成功分离出与接种前相同的病原菌(图6-A)。B菌株采用针刺法处理的3个果实、9次重复均发病,接种初期和中期与干腐病同时期发病症状相同,但发病速度较干腐病稍慢,后期果实除了表现干腐病的症状外,病斑表面还会产生大量暗蓝

色霉层,果实内部也会产生暗蓝色的霉层。取感病的组织块重新进行组织分离培养,成功分离出与接种前相同的病原菌(图6-B)。C菌株采用针刺法处理的3个果实、9次重复均发病,接种初期伤口周围出现红褐色病斑,中期病斑迅速向外扩展,果实内部出现腐烂有大量汁液侵出,病斑颜色变暗,呈深褐色,果面密集大量熟褐色的颗粒,后期整个果实腐烂,果面被霉层覆盖。取感病的组织块重新进行组织分离培养,成功分离出与接种前相同的病原菌(图6-C)。D菌株采用针刺法处理的3个果实、9次重复均发病,接种初期伤口处出现不规则深褐色的病斑,病斑中心颜色发黑,接种中期病斑迅速扩展,果实内部部分腐烂,果面产生大量灰白色的菌丝,后期整个果实完全腐烂,果面被菌丝覆盖,菌丝上产生大量灰黑色的颗粒。取感病的组织块重新进行组织分离培养,成功分离出与接种前相同的病原菌(图6-D)。



A. 接种 A 菌株发病症状;B. 接种 B 菌株发病症状;C. 接种 C 菌株发病症状;D. 接种 D 菌株发病症状;E. 对照。
A. Inoculation of A strain of the disease symptoms; B. Inoculation of B strains of the symptoms; C. Inoculation of C strains of disease symptoms; D. Inoculation of D strains of disease symptoms; E. Control.

图 6 接种病原菌后发病的病果
Fig. 6 Inoculation of pathogens after the disease

2.4 菌株的rDNA-ITS序列分析

将测序结果与GenBank上已登录的基因序列进行比对,选取相近的参考菌株,利用MEGA4.1软件基于18S rDNA序列采用NJ法构建系统发育树,确定其进化地位,结果如图7所示。

从系统发育进化树来看,A与垫壳孢(*Coniella granati*)聚在一起,与Genbank中的基因序列比对后,A与垫壳孢(*Coniella granati*)(KF560320.1)的相似率为99%,因此,初步将A鉴定为垫壳孢*Coniella granati*;B与光孢青霉(*Penicillium glabrum*)聚在一起,与Genbank中的基因序列比对后,B与光孢青霉(*Penicillium glabrum*)(KJ775634)的相似率为99%,因此,初步将B鉴定为光孢青霉(*Penicilli-*

um glabrum);C与黑曲霉(*Aspergillus niger*)亲缘关系最近,与Genbank中的基因序列比对后,C与黑曲霉(*Aspergillus niger*)(EF661186)的相似率为99%,因此,初步将C鉴定为光孢青霉(*Penicillium glabrum*);D与灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*)的亲缘关系最近,与Genbank中的基因序列比对后,D与灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*)(KR080290)的相似率为99%,因此,初步将D鉴定为灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*)。

结合传统形态学特征,综合鉴定结果为:A为垫壳孢(*Coniella granati*),B为光孢青霉(*Penicillium glabrum*),C为黑曲霉(*Aspergillus niger*),D为灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*)。

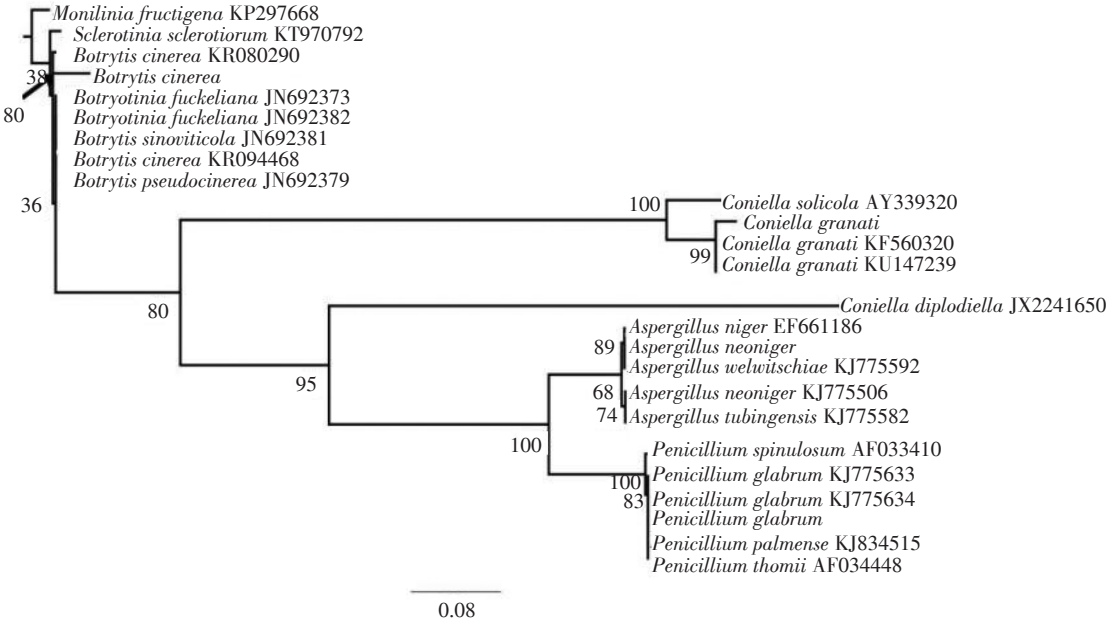


图 7 基于 18S rDNAITS 区序列和 Neighbor-Joining 分析构建的系统发育树
Fig. 7 Systematic tree based on 18S rDNA ITS region sequence and neighbor-joining analysis

3 讨 论

该研究结果与 Kwon 等^[12]报道的发生在韩国石榴果实的腐烂病害及 Tziros^[13]报道的在希腊石榴果实的腐烂病害的结果较一致,但与国内周又生等^[14]研究鉴定结果认为是石榴鲜壳孢(*Zythia versoniana* Sacc)的结果不一致,而陆家云^[15]则认为石榴壳座月孢(又名垫壳孢)是石榴鲜壳孢的异名,但 2 者之间关于无性态的描述不同,其中对于分生孢子大小的叙述则差异明显^[16]。

目前国内外对于石榴贮藏期软腐病病原菌的鉴定结果存在很大的分歧。李喜宏^[17]研究认为,造成果实烂果的病原菌为曲霉菌属(*Aspergillus* sp.)。Labuda 等^[18]报道引起石榴果实软腐的主要病原菌是纠缠青霉(*Penicillium implicatum* Biourge)。张润光等^[19]发现低温条件下石榴品种‘净皮甜’在贮藏期的主要病原菌为小刺青霉(*Penicillium spinulosum*)和富氏葡萄核盘菌(*Botryotinia fuckeliana*)。Loukas 等^[20]提出灰葡萄孢属菌(*Botrytis* spp.)是导致希腊和塞浦路斯地区果实贮藏期病害腐烂的主要病原菌种类。然而由于各地石榴贮藏环境条件、温湿度、栽培品种的不同,加之菌物的形态多样、种类繁多复杂,以及在石榴果实腐烂病害的鉴定上大多仍然采用传

统的形态学特征的方法进行判定,因此鉴定结果分歧较大。

在本研究中观察到垫壳孢(*Coniella granati*)与光孢青霉(*Penicillium glabrum*)具有复合侵染致病的现象,但具体的发病机制还有待进一步的研究。

4 结 论

结合形态学特征和 rDNA-ITS 序列分析,将采自凉山州石榴贮藏期干腐病的病原菌鉴定为垫壳孢(*Coniella granati*),软腐病的病原菌鉴定为光孢青霉(*Penicillium glabrum*)、黑曲霉(*Aspergillus niger*)和灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*)。

参考文献 References:

[1] 马齐,秦涛,王丽娥,田萍. 石榴的营养成分及应用研究现状[J]. 食品工业科技,2007,28(2): 237-241.
MA Qi, QIN Tao, WANG Li'e, TIAN Ping. Nutritional composition and application of pomegranate[J]. Food Industry, 2007, 28 (2): 237-241.
[2] 王彩,张国薇,易言郁,廖光全,易尔霖,余爽,晋一棠. 攀西地区石榴冷藏现状及对策分析[J]. 四川农业科技,2015(10): 52-54.
WANG Cai, ZHANG Guowei, YI Yanyu, LIAO Guangquan, YI Erlin, YU Shuang, JIN Yitang. Present situation and countermeasure analysis of pomegranate refrigeration in Panxi area[J]. Jour-

- nal of Sichuan Agricultural Sciences, 2015(10): 52-54.
- [3] 方中达. 植物病研究方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998: 46-75.
- FANG Zhongda. Disease research methods[M]. Beijing: China Agriculture Press, 1998: 46-75.
- [4] 许志刚. 普通植物病理学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2009.
- XU Zhigang. General plant pathology[M]. Beijing: Higher Education Press, 2009.
- [5] 郑晓慧. 石榴病虫害原色图志[M]. 北京: 科学出版社, 2013.
- ZHENG Xiaohui. Pomegranate pests and diseases[M]. Beijing: Science Press, 2013.
- [6] 戴芳澜. 中国真菌总汇[M]. 北京: 科学出版社, 1979.
- DAI Fanglan. China fungus group company[M]. Beijing: Science Press, 1979.
- [7] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979: 725-759.
- WEI Jingchao. Fungal identification manual[M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 1979: 725-759.
- [8] 邱小燕, 汤智鹏, 张敏, 荆海瑜. 一种适用于多数植物病原真菌的单孢分离方法[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(9): 5263-5264.
- QIU Xiaoyan, TANG Zhipeng, ZHANG Min, JING Haiyu. Research on the isolation method of single spore of most plant pathogenic fungi[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2011, 39(9): 5263-5264.
- [9] 张书建, 何月秋. 介绍一种简单的真菌孢子分离法[J]. 云南农业大学学报, 2003, 18(3): 315-316.
- ZHANG Shujian, HE Yueqiu. A simple method to isolate single fungal spore[J]. Journal of Yunnan Agricultural University, 2003, 18(3): 315-316.
- [10] 高玉亮, 李葵花. 病原真菌单孢子显微镜下分离技巧[J]. 植物保护, 1999, 25(6): 48.
- GAO Yuliang, LI Kuihua. A microspore microspore separation technique[J]. Journal Plant Protection, 1999, 25(6): 48.
- [11] 龚国淑, 徐琴, 张敏, 杨继芝, 陈华保, 申世安, 唐太飞. 一种简便的病原真菌单孢分离方法研究[J]. 玉米科学, 2010, 18(1): 126-127.
- GONG Guoshu, XU Qin, ZHANG Min, YANG Jizhi, CHENG Huabao, SHEN Shian, TANG Taifei. A simple method for single fungal spore isolation[J]. Journal of Maize Sciences, 2010, 18(1): 126-127.
- [12] KWON J H, PARK C S. Fruit rot of pomegranate (*Punica granatum*) caused by *Coniella granati* in Korea[J]. The Plant Pathology Journal, 2002, 8(4): 215-219.
- [13] TZIROS G T. Pomegranate fruit rot caused by *Coniella granati* confirmed in Greece[J]. Plant Pathology, 2008, 57(4): 783.
- [14] 周又生, 陆进, 朱玉贵, 王世龙, 罗贵林, 伊忠华, 番俊. 石榴干腐病生物生态学发生流行规律和治理研究[J]. 西南农业大学学报, 1999, 21(6): 551-555.
- ZHOU Yousheng, LU Jin, ZHU Yugui, WANG Shilong, LUO Guilin, YI Zhonghua, PAN Jun. Bioecology and epidemics of *Zythia versonia* Sall in pomegranate and its integrated control[J]. Journal of Southwest Agricultural University, 1999, 21(6): 551-555.
- [15] 陆家云. 植物病原真菌学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001: 61-533.
- LU Jiayun. Phyto bacteriology of plant pathogens[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2001: 61-533.
- [16] 孙德茂. 陕西石榴干腐病发生规律与防治研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2008.
- SUN Demao. Occurrence of dry rot *Zythia versoniana* Sacc. and its control in Shaanxi[D]. Yangling: Northwest A & F University, 2008.
- [17] 李喜宏. 实用果蔬保鲜技术[M]. 北京: 科学技术文献出版社, 2000.
- LI Xihong. Practical fruit and vegetable preservation technology [M]. Beijing: Science and Technical Documentation Press, 2000.
- [18] LABUDA R, HUDEC K, PIECKOVA E, MEZEY J, BOHVIC R, MATEOVA S, LUKAC S S. *Penicillium implicatum* causes a destructive rot of pomegranate fruits[J]. Mycopathologia, 2004, 157(2): 217-223.
- [19] 张润光, 田呈瑞, 张有林. 复合保鲜剂涂膜对石榴果实采后生理、贮藏品质及贮期病害的影响[J]. 中国农业科学, 2016, 49(6): 1173-1186.
- ZHANG Runguang, TIAN Chengrui, ZHANG Youlin. Effects of multiplex antistaling agent coating on postharvest physiology, storage quality and storage diseases of pomegranate fruit[J]. Scientia Agricultural Sinica, 2016, 49(6): 1173-1186.
- [20] LOUKAS K, STEFANOS T, VLASIOS G, STYLIANOS S, CHARALAMPOS M, GEORGE S K. Identification and mycotoxigenic capacity of fungi associated with pre- and postharvest fruit rots of pomegranates in Greece and Cyprus[J]. International Journal of Food Microbiology, 2015, 208: 84-92.