

热处理对柑橘霉菌生活力和致病力的影响

林丽萍¹, 陈于陇², 朱丽琴¹, 刘姬栾¹, 李玉梅¹, 吴国平¹

(1. 江西农业大学, 南昌市农产品加工与质量控制重点实验室, 江西南昌 330045)

(2. 广东省农业科学院蚕业与农产品加工研究所, 广东广州 510610)

摘要: 试验研究了热处理对柑橘采后致病霉菌生活力和致病力的影响。生活力试验: 分别对霉菌孢子悬液及脐橙皮与霉菌孢子悬液进行热处理 (52 ± 1 °C, 10 min, 下同), 检测两组热处理后 5 株霉菌 (分别标记为 A、B、C、D 和 E) 孢子的生活力指标: 孢子死亡率、孢子形态、孢子悬液上清液电导率值和 $OD_{260\text{nm}}$ 值。致病力试验: 以 A 菌为例, 对比研究与脐橙分开进行热处理的霉菌孢子及与脐橙共同进行热处理的霉菌孢子引起脐橙发病规律的变化情况。结果显示: 单独进行热处理的霉菌孢子, 其生活力有所下降, 但致病力未受到影响。与单独热处理的霉菌孢子相比, 脐橙皮与热同时作用于致病霉菌孢子时, 其结构受损伤程度加大, 生活力和致病力明显下降; A 菌孢子死亡率由 48% 上升至 72%, 脐橙出现典型病灶时间由单独热处理的 4 天推迟到了 7 天以上。

关键词: 柑橘; 致病霉菌; 热处理; 生活力; 致病力

文章编号: 1673-9078(2015)4-222-227

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.4.036

The Effect of Heat Treatment on the Vitality and Pathogenicity of Citrus Fungi

LIN Li-ping¹, CHEN Yu-long², ZHU Li-qin¹, LIU Ji-luan¹, LI Yu-mei¹, WU Guo-ping¹

(1. Key Lab for Agricultural Products Processing and Quality Control of Nanchang City, Nanchang 330045, China)

(2. Sericulture and Agri-food Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510610, China)

Abstract: This study investigated the effect of heat treatment on the vitality and pathogenicity of citrus pathogenic fungi after harvest. The vitality of the fungi was tested by heat-treatment of the fungal spore suspension as well as fungal spore suspension with navel orange skin at 52 ± 1 °C for 10 min. Fungal spore viability indices, such as the mortality, morphology, suspension supernatant conductivity value, and $OD_{260\text{nm}}$ of five strains of fungus (marked A, B, C, D, and E) were examined after the two heat treatments, respectively. The pathogenicity of strain A (as an example) was determined by analyzing and comparing the changes in disease incidence in navel oranges, caused by contamination with fungal spores heat treated with or without navel orange skin. The results of these analyses revealed that heat-treatment without orange skins resulted in a decrease in fungal spore vitality, while not affecting its pathogenicity. However, simultaneous heat and navel orange peel treatment caused great structural damage to the pathological fungal spores, affecting a significant decrease in its vitality and pathogenicity, compared to fungal spores that were only subjected to heat-treatment. The mortality of strain A spores increased from 48% to 72%; in addition, the emergence time of typical disease lesions in navel oranges was delayed from 4 days to over 7 days.

Key words: citrus; pathogenic fungi; heat treatment; vitality; pathogenicity

在中国, 柑橘是种植面积最广, 也是我国南方最

收稿日期: 2014-08-12

基金项目: 江西省教育厅青年基金项目 (GJJ14315); 广东省农业科学院农业部功能食品重点实验室开放基金项目 (201351); 江西省科技支撑计划 (2012BBF60075); 江西农业大学大学生创新创业训练计划项目 (201410410043)

作者简介: 林丽萍 (1979-), 女, 讲师, 从事食品质量与安全方向的教学与科研工作

通讯作者: 吴国平 (1972-), 男, 博士, 副教授, 从事食品质量与安全方向的教学与科研工作

重要的经济作物之一。在柑橘果品收获及贮运期间极易遭受柑橘霉菌病害, 尤其是青、绿霉病害。这两类侵染性病害严重影响果品的商业价值, 一般造成的经济损失占柑橘采后病害损失的 30%~50%^[1]。目前对于柑橘霉菌病害防治的主要手段是使用化学杀菌剂进行喷雾、浸泡等, 虽然取得较好的防治效果, 但仍然面临着严峻的问题, 如致病菌抗药性的产生, 农药在柑橘果实内大量残留, 药效不能长期保持等^[2,3]。

在当前柑橘产业结构问题 (全国范围内, 柑橘主要以鲜食为主)^[4-5]尚未缓解之前, 政府应对鲜销首要

的策略就是降低损耗, 延长贮藏时间, 以提高利润。目前水果霉菌病害, 可替代化学杀菌剂的防治办法有物理和生物等防治措施。作为一种环境友好且无残留的新型贮藏保鲜技术, 水果采后热处理已被应用于某些果实的病虫害控制, 热处理方法有热水、热蒸汽、热空气、强力热风 and 热灰掩埋等方法。热水处理不但时间短、便于操作、能耗低, 而且热水喷淋还有消毒和清洁果实的作用, 所以热水处理适合于并已部分应用于商业化生产。商业化应用采取的温度一般是43~53 °C, 时间为数分钟到两小时^[6-7]。热水处理可有效预防柑橘类水果采后青、绿霉病害的发生^[8], 而热激处理抑制柑橘霉菌生长的机理还有待研究^[9-10]。

因此, 本文以霉变柑橘类水果的优势霉菌为研究对象, 以52±1 °C (正文涉及试验操作内容, 除特殊说明外, 热处理温度均指52±1 °C) 热水处理霉菌孢子, 研究温度及柑橘皮对致病霉菌生活力及致病力的影响, 从而探究商业化生产所应用的热水处理法对柑橘致病霉菌的作用机制, 期望为柑橘类水果的保鲜技术与开发提供科学的数据支持, 降低贮藏损失, 为柑橘产业保值、增值提供更有有效的病害防治措施。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验原料

健康脐橙: 购于江西农业大学后街, 要求果实健康, 成熟度及大小较均匀, 表面无伤口。

分离材料: 纽荷尔脐橙(自然霉变), 南丰蜜桔(自然霉变)。

1.1.2 分离培养基

PDA培养基: 马铃薯200 g, 葡萄糖20 g, 琼脂20 g, 水1000 mL。

1.1.3 主要仪器设备

自动立式压力蒸汽灭菌器(LDZX-40B), 上海申安医疗器械厂; 生化培养箱(SHP-160型), 上海三发科学仪器有限公司; 数显恒温水浴锅(HH-4), 国华电器有限公司; 高速冷冻离心机(HC-2518R), 安徽中科中值科学仪器有限公司; 电导率仪(DDS-11A), 上海虹益仪器仪表有限公司, 紫外可见分光光度计(UV752), 上海佑科仪器仪表有限公司, 数码生物显微镜(BK5000), 重庆奥特光学仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 柑橘霉菌的分离、纯化

挑选自然霉变且有典型青、绿霉病灶的纽荷尔脐橙和南丰蜜桔果实做分离材料, 用无菌接种针沾取少量霉菌孢子划线接种于PDA平板上, 同时用无菌的刀片切取果实病健交界处果肉, 置于PDA平板, 于28±1 °C生化培养箱中培养。以优势菌落为对象, 结合稀释法和划线法进一步分离纯化, 以获得纯菌株。

1.2.2 柑橘霉菌的形态观察

将获得纯菌株点接于无菌的PDA平板上, 置于28±1 °C生化培养箱中培养, 每天观察记录其菌落形态变化。霉菌个体形态观察采用载片培养法, 定期于数码生物显微镜下观察记录个体形态发育过程。

1.2.3 供试菌悬液的制备

将长满PDA斜面的各供试菌株, 分别加入一定量的无菌水, 以无菌接种环轻轻将霉菌孢子刮下, 用血球计数板计数后, 统一用无菌水将各菌株孢子悬液浓度稀释至 $n \times 10^6$ 个/mL ($n < 10$)。

1.2.4 不同热处理方式对柑橘霉菌生活力的影响

1.2.4.1 单独热处理对柑橘霉菌孢子生活力的影响

将制备好的各供试菌悬液分别置于温度为52±1 °C的水浴锅中热处理10 min, 后置于冰水浴中冷却待用。以未进行热处理的各菌株孢子悬液为对照测定热处理后霉菌孢子的死亡率、形态特征、菌悬液上清液的电导率值及OD_{260nm}值。

1.2.4.2 与脐橙皮共同热处理对柑橘霉菌孢子生活力的影响

脐橙皮制备: 选取健康脐橙, 清洗干净, 再以2%次氯酸钠溶液浸泡10 min, 然后以无菌水(自来水敞盖煮沸、晾凉)冲洗后自然晾干。取脐橙果皮, 用无菌模具将脐橙的果皮切成直径为3 mm的圆片(厚度约2 mm)。

热处理: 将处理好上述脐橙皮20片分别加入到盛有4 mL各菌悬液试管中, 均置于温度为52±1 °C的水浴锅中热处理10 min, 后置于冰水浴中冷却待用。以未进行热处理的各菌株孢子悬液为对照测定热处理后霉菌孢子的死亡率和形态特征; 以加相应数量脐橙皮热处理的无菌水为对照测定加脐橙皮各组菌悬液电导率及OD_{260nm}值变化情况。

1.2.5 不同热处理方式对柑橘霉菌致病力的影响

1.2.5.1 致病菌单独热处理对其致病力的影响

脐橙消毒: 方法同1.2.4.2。

菌体热处理: 取各菌株孢子悬液两份, 一份不做加热处理; 另一份置于温度为52±1 °C的水浴锅中热处理10 min, 后置于冰水浴中冷却待用。

接种脐橙：以相同规格移液枪枪头刺破果实表皮（深度约 2 mm）获得接种伤口，将同一菌株的两份孢子悬液分别接种 5 个脐橙果实，每个果实接种量为 20 μ L。单个脐橙套袋，置于温度为 28 \pm 1 $^{\circ}$ C 的生化培养箱中保温，逐日观察并记录果实发病情况。

1.2.5.2 致病菌和脐橙共同热处理对其致病力的影响

选取健康脐橙，表面消毒方法同 1.2.4.2。无菌条件下，移液枪分别取 20 μ L 孢子悬液接种于 5 个脐橙上，用保鲜袋包装好，置于 52 \pm 1 $^{\circ}$ C 水浴锅中热处理 10 min，取出冰水浴中冷却后，置于 28 \pm 1 $^{\circ}$ C 的生化培养箱中保温，逐日观察并记录果实发病情况。

1.2.5.3 致病菌和脐橙分别热处理对其致病力的影响

选取健康脐橙，表面消毒方法同 1.2.4.2。将备好的孢子悬液和完好的脐橙同时置于 52 \pm 1 $^{\circ}$ C 水浴锅中热处理 10 min，孢子悬液和脐橙取出，冰水浴中冷却后，移液枪分别取 20 μ L 各菌株孢子悬液接种于 5 个脐橙上，用保鲜袋包裹，置于 28 \pm 1 $^{\circ}$ C 的生化培养箱中保温，逐日观察并记录果实发病情况。

1.2.6 数据分析

本文数据采用数据处理软件 Excel2010 进行分析和处理。

2 结果与讨论

2.1 柑橘霉菌的分离纯化结果

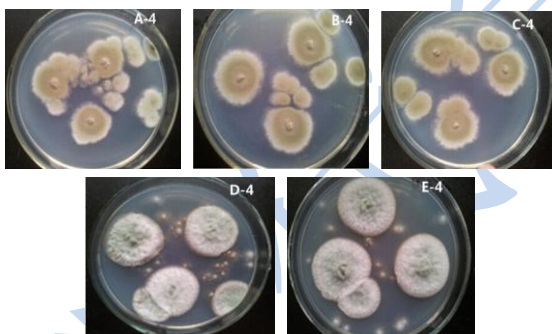


图 1 柑橘霉菌菌落形态

Fig.1 Colony morphology of citrus fungi

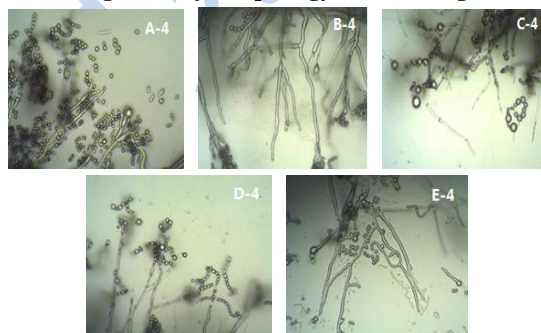


图 2 柑橘霉菌个体形态 (16 \times 40)

Fig.2 The morphology of individual citrus fungus (16 \times 40)

从发病南丰蜜桔和纽荷尔脐橙表面及果肉中共分离获得 5 株优势致病霉菌，分别标记为 A、B、C、D 和 E。28 \pm 1 $^{\circ}$ C 培养 4 天，菌体发育完全（图 1、图 2）。

A、B、C 这三个菌株在培养基上形态特征基本一致，在 PDA 平板上菌落均为青色，呈粉粒状，生长较快，有白色边缘，最后变褐色。随着培养时间的延长出现同心环。显微镜观察其形态，菌丝先端具有 1~3 个分枝，分生孢子近球形，大小为 3.9 μ m~5.5 μ m。

D、E 形态特征基本一致，在 PDA 平板上菌落呈绒毛状，生长快，菌丝体初为白色，后形成蓝绿色霉层，基质背面为淡黄色。显微镜观察发现，其分枝较多，分生孢子椭圆形，大小为 2.2 μ m~5.4 μ m。

2.2 不同热处理方式对柑橘霉菌生活力的影响

2.2.1 不同热处理温度下各柑橘霉菌的死亡率

以试验获得的 5 株优势柑橘霉菌为对象，单纯对其进行热处理，结果（表 1）表明随着温度的升高，各菌株死亡率呈上升趋势，且在 62 \pm 1 $^{\circ}$ C 及 72 \pm 1 $^{\circ}$ C 时，各菌株的死亡率均为 100%。而实践中应用的热处理温度（43~53 $^{\circ}$ C），并不能彻底杀死柑橘霉菌孢子。后续试验将以热处理对霉菌孢子的死亡率，形态变化及菌悬液上清电导率和 OD_{260nm} 值为指标，进一步探究温度（52 \pm 1 $^{\circ}$ C）及柑橘对柑橘霉菌生活力的影响。

表 1 各菌株在不同温度处理下的死亡率 (%)

Table 1 Strain mortality (%) after heat treatment at different temperatures

菌株	42 \pm 1 $^{\circ}$ C	52 \pm 1 $^{\circ}$ C	62 \pm 1 $^{\circ}$ C	72 \pm 1 $^{\circ}$ C
A	33 \pm 1.55	48 \pm 1.20	100	100
B	38 \pm 1.87	41 \pm 2.31	100	100
C	29 \pm 1.46	52 \pm 3.20	100	100
D	43 \pm 2.08	60 \pm 1.72	100	100
E	50 \pm 1.64	53 \pm 2.30	100	100

2.2.2 不同热处理方式对柑橘霉菌生活力的影响

试验分别对对 5 株柑橘霉菌孢子悬液进行 52 \pm 1 $^{\circ}$ C 热处理 10 min，每株菌同时做无菌水悬液和含有脐橙皮的无菌水悬液处理，分别测定每株菌两种热处理后的孢子死亡率、孢子形态变化及菌悬液上清液电导率值和 OD_{260 nm} 值。结果显示（图 3~图 6），在光学显微镜下，两种热处理后的各霉菌孢子与未进行加热处理的霉菌孢子相比，形态和大小无明显变化，但同一菌株加了脐橙皮进行热处理后，该菌株的孢子

死亡率明显上升, 5 株菌的死亡率数值达到了 69.8%~83.7% (未加脐橙皮的霉菌孢子悬液热处理后, 5 株菌的死亡率数值为 40.9~60.3%), 且菌悬液上清的电导率值和 OD_{260nm} 值也明显升高, 说明脐橙皮加强了热对柑橘霉菌的抑杀作用, 造成了柑橘霉菌生活力的明显下降。

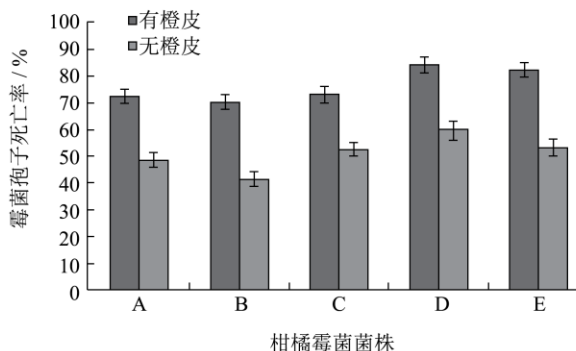


图 3 热处理各柑橘霉菌孢子死亡率

Fig.3 Mortality of fungal spores after heat treatment (with and without navel orange peel)

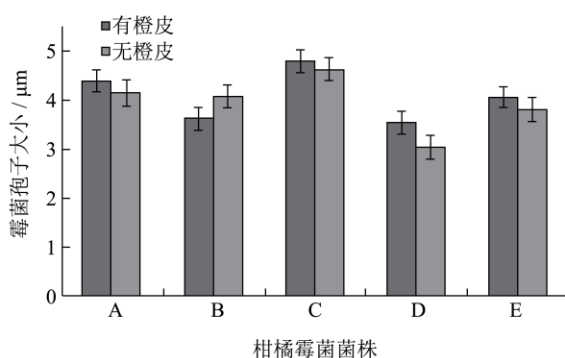


图 4 热处理各柑橘霉菌孢子大小

Fig.4 Size of fungal spores after heat treatment (with and without navel orange peel)

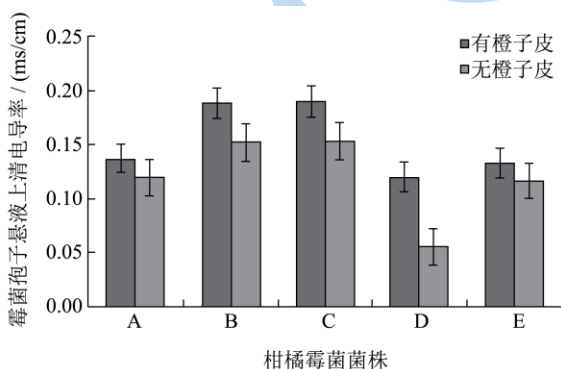


图 5 热处理各柑橘霉菌孢子悬液上清电导率

Fig.5 Conductivity of fungal spore suspension supernatant conductivity after heat treatment (with and without peel)

2.3 V 不同热处理方式对柑橘霉菌致病力的影响

影响

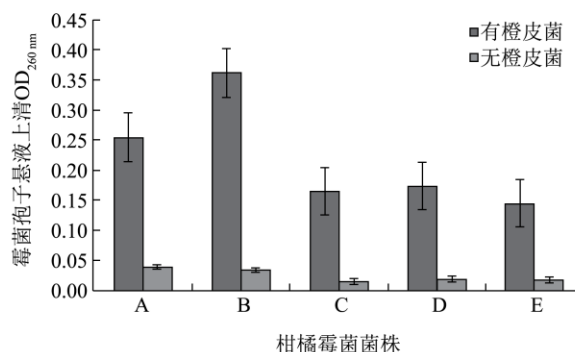


图 6 热处理各柑橘霉菌孢子悬液上清 OD_{260nm}

Fig.6 Absorbance of fungal spore suspension supernatant at OD_{260nm} after heat treatment (with and without orange peel)

2.3.1 致病菌单独热处理对其致病力的影响

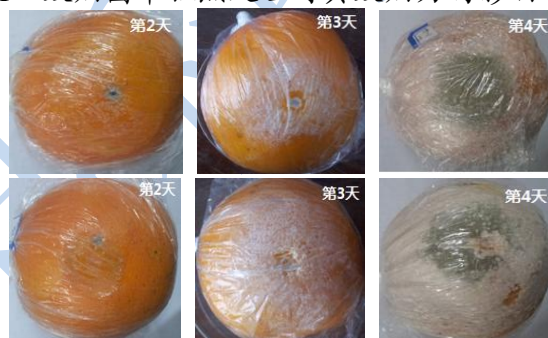


图 7 单独热处理 A 菌对脐橙的致病力

Fig.7 Pathogenicity of heat-treated strain A (separately heated) on navel orange

注: 每组图上面一排是未经热处理霉菌孢子接种脐橙后的致病力结果; 下面一排是经热处理相应霉菌孢子接种脐橙后的致病力结果。

5 株霉菌孢子悬液 52±1 °C 热处理 10 min, 冷却后接种健康脐橙, 套袋, 28±1 °C 恒温保藏, 与对照相比, 热处理对五株菌的致病力均无明显影响。图片展示以 A 菌为例, 接种第 2 d, 接种点形成褐色水渍斑, 第 3 d 长出白色菌丝, 第 4 d 即长出青绿色霉层, 第 6~7 d 全果腐烂。

2.3.2 致病菌和脐橙均进行热处理对其致病力的影响

图 8 和图 9 表明, 菌体与脐橙均进行 52±1 °C 热处理 10 min, 28±1 °C 恒温套袋保藏, 与菌体单独热处理 (图 7) 相比, 对脐橙发病的典型特征无明显影响, 但出现病症的时间明显延迟。直到第 7 d, 菌体和脐橙分别热处理的一组脐橙才长出典型的青绿色霉层, 而菌体与脐橙共同热处理的一组脐橙只长出白色菌丝; 到保温第 10 d 菌体和脐橙分别热处理的一组脐

橙全果腐烂,而菌体与脐橙共同热处理的一组脐橙果实,至保温第16 d全果软烂。这表明,孢子悬液与脐橙都进行热处理对致病霉菌的致病力具有明显的抑制作用;并且热(52 ± 1 °C)与脐橙共同作用于霉菌孢子的过程中,可能导致霉菌孢子发生了某种不可逆的损伤,致使其致病力出现了明显的下降。



图8 与脐橙均进行热处理, A菌对脐橙的致病力(7 d)

Fig.8 Pathogenicity of strain A fungal spores heat treated with or without navel orange peel on navel oranges (7 Days)



图9 与脐橙均进行热处理, A菌对脐橙的致病力(10 d)

Fig.9 Pathogenicity of strain A fungal spores heat-treated with and without orange peel on navel oranges (10 days)

注:每组图第一排的5个脐橙是菌体与脐橙共同热处理的,第二排的5个脐橙是菌体与脐橙分别热处理结果。

3 结论

3.1 热处理对柑橘霉菌生活力的影响

以试验分离得到5株优势致病柑橘霉菌为对象,研究热处理对其生活力的影响,结果表明,同一菌株加了脐橙皮进行 52 ± 1 °C热处理的孢子悬液与单 52 ± 1 °C热处理的孢子悬液相比,相应菌株死亡率明显升高,以A菌株为例,死亡率由47.7%上升到了71.8%。每株菌经两种热处理的孢子悬液上清液电导率值和 OD_{260nm} 值数据也进一步说明脐橙皮加强了热对霉菌孢子的抑杀作用。

3.2 热处理对柑橘霉菌致病力的影响

为验证脐橙皮与热对柑橘霉菌确实对柑橘霉菌有叠加的抑杀效应,试验进一步研究不同热处理方式对柑橘霉菌致病力的影响,试验结果表明,同一柑橘霉菌单独热处理后接种健康脐橙,与未进行热处理的对照组相比,对其致病力无明显影响;柑橘霉菌与脐橙

都进行热处理后,与单独热处理柑橘霉菌组相比,其致病力明显下降,以A菌为例,出现典型病灶的时间由第4天推迟到第7天。另外,柑橘霉菌与脐橙同时进行热处理组与柑橘霉菌与脐橙分开进行热处理组相比,前一处理方式,柑橘霉菌致病力相对有所下降,至保藏第7天仍无明显病灶,只有白色菌丝长出。

致病力试验结果进一步证实,脐橙皮与热共同作用,抑制了柑橘霉菌的生活力,降低了柑橘霉菌的致病能力;而未与热共同作用于霉菌孢子的脐橙皮可能对热损伤的霉菌孢子有修复作用。孢子悬液上清液电导率值和 OD_{260nm} 值数据也说明了,有脐橙皮存在的情况下,联合热对霉菌孢子细胞结构有明显破坏作用。

作为环境友好型热处理水果保鲜技术,已应用于柑橘类水果保藏实践,并取得了很好的预防控制青、绿霉病害发生的效果。试验采用直观有效的柑橘霉菌生活力和致病力指标,探究热处理预防柑橘类水果霉菌病害的机制。研究表明,水果热处理后,不仅可以提高其本身的抗病力^[11],水果中某种化学成分与热共同作用,还可导致霉菌某种不可逆的损伤,这将为揭示柑橘热处理预防其霉菌病害机制的研究提供新思路 and 方向。具体作用机制,有待于进一步从细胞的超显微结构及细胞凋亡的机理方面做深入探究,期望能够获得更有效的柑橘热处理保鲜加工调控技术。

参考文献

- [1] 邓伯勋.园艺产品贮藏运销学[M].北京:中国农业出版社,2002
DENG Bo-xun. Storage-transportation and marketing of horticultural products [M]. Beijing: Chinese Agricultural Press, 2002
- [2] Manso T, Nunes C. *Metschnikowia andauensis* as a new biocontrol agent of fruit postharvest diseases [J]. Postharvest Biology and Technology, 2011, 61 (1): 64-71
- [3] Hernandez-Montiel L G, Ochoa J L, Troyo-Dieguez E, et al. Biocontrol of postharvest blue mold (*Penicillium italicum* Wehmer) on Mexican lime by marine and citrus *Debaryomyces hanseni* isolates [J]. Postharvest Biology and Technology, 2010, 56 (2): 181-187
- [4] 陈仕俏,赵文红,白卫东.我国柑橘的发展现状与展望[J].农产品加工·学刊,2008,(3):21-25
CHEN Shi-qiao, ZHAO Wen-hong, BAI Wei-dong. The current situation and prospect of the development of citrus in China [J]. Academic Periodical of Farm Products Processing, 2008, (3): 21-25
- [5] 胡志华.我国柑橘产销研究[J].北京农业,2011,2:57-60

- HU Zhi-hua. Citrus production and marketing of outcountry [J]. Beijing Agriculture, 2011, 2: 57-60
- [6] Vicente A R, Martinez G A, Chaves A R, et al. Effect of heat treatment on strawberry fruit damage and oxidative metabolism during storage [J]. Postharvest Biology and Technology, 2006,40: 116-122
- [7] 韦莹莹,刘威,沙嫣,等.拮抗酵母结合热空气处理对樱桃番茄采后病害防治及其品质的影响[J].农产品加工(学刊), 2013, 8:8-11
WEI Ying-ying, LIU Wei, SHA Yan, et al. Effects of antagonistic yeast in combination with hot air treatment on postharvest diseases and quality in Cherry Tomato [J]. Academic Periodical of Farm Products Processing, 2013, 8: 8-11
- [8] 王青云,龚吉军,钟海雁.柑橘果实采后热处理研究进展[J].食品科学,2010,31,(11):316-319
WANG Qing-yun, GONG Ji-jun, ZHONG Hai-yan. Research progress of peating treatment for citrus fruits postharvest. Food Science, 2010, 31, (11):316-319
- [9] Obagwu J, Korsten L. Integrated control of citrus green and blue molds using *Bacillus subtilis* in combination with sodium bicarbonate or hot water [J]. Postharvest Biology and Technology, 2003, 28 (1): 187-194
- [10] Lahlali R, Hamadi Y, Guilli EM, et al. Efficacy assessment of *Pichiaguilliermondii* strain Z1, a new biocontrol agent, against citrus blue mould in morocco under the influence of temperature and relative humidity [J]. Biological Control, 2011, 56(3): 217-224
- [11] 赵云峰,林河通,林艺芬,等.热处理延缓采后龙眼果实果皮褐变及其与酚类物质代谢的关系[J].现代食品科技, 2014, 30(5): 218-224
ZHAO Yu-feng, LIN He-tong, LIN Yi-fen, et al. Effect of heat treatment on browning delaying and phenolics metabolism in pericarp of harvested longan fruit [J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 30(5): 218-224