

# 热水处理控制柠檬绿霉病及其抑菌机理初探

洪阳<sup>1</sup>, 田理刚<sup>1</sup>, 邓丽莉<sup>1,2</sup>, 曾凯芳<sup>1,2</sup>

(1.西南大学 食品科学学院, 重庆 400715; 2.西南大学 食品贮藏与物流研究中心, 重庆 400715)

**摘要:** **目的** 针对采后柠檬绿霉病问题, 探究热水处理对采后柠檬绿霉病的控制效果及离体条件下对柠檬指状青霉的抑菌机理。 **方法** 以‘尤力克’柠檬为实验材料, 研究不同温度和不同时间热水处理对柠檬果实绿霉病的控制效果, 并在离体条件下探索热水处理对指状青霉活力和致病力的影响。 **结果** 从具有典型发病症状的柠檬果实上分离得到指状青霉。筛选出柠檬果实适宜的热水处理条件为 53 °C 热水浸泡 3 min, 该处理组能够有效控制柠檬采后绿霉病, 果实在贮藏 5 d 时的发病率和病斑直径分别降低 93% 和 97%。在离体条件下, 热水处理能够显著抑制指状青霉菌落的扩展, 改变其细胞膜通透性, 且热水处理后的指状青霉回接发病率显著降低 ( $P < 0.05$ )。 **结论** 该实验中, 采用 53 °C 热水浸泡 3 min 处理对指状青霉引起的柠檬果实绿霉病控制效果显著, 在离体条件下采用热水处理降低了指状青霉的活力和致病力。

**关键词:** 柠檬果实; 热水处理; 绿霉病; 指状青霉; 抑菌机理

中图分类号: TS255.3 文献标识码: A 文章编号: 1001-3563(2020)07-0016-09

DOI: 10.19554/j.cnki.1001-3563.2020.07.003

## Effects of Hot Water Treatment on Green Mold Control of Lemon Fruits and Its Inhibition Mechanism

HONG Yang<sup>1</sup>, TIAN Li-gang<sup>1</sup>, DENG Li-li<sup>1,2</sup>, ZENG Kai-fang<sup>1,2</sup>

(1.College of Food Science, Southwest University, Chongqing 400715, China;

2.Food Storage and Logistics Research Center, Southwest University, Chongqing 400715, China)

**ABSTRACT:** The work aims to investigate the effect of hot water treatment on green mold control of harvested lemon fruits and the inhibition mechanism of *Penicillium digitatum* (*P. digitatum*) in vitro in view of the green mold of harvested lemon. With *Citrus limon* (L.) Burm as the experimental material, the effect of hot water treatment at different temperatures and time on the control of lemon fruits' green mold was studied, and the effect of hot water treatment on the viability and pathogenicity of *P. digitatum* in vitro was explored. The pathogen was isolated from the lemon fruit with typical symptoms of green mold and identified as *P. digitatum*. The suitable hot water treatment conditions at 53 °C for 3 minutes could effectively control the green mold of harvested lemon compared with the control group, the disease incidence and lesion diameter of lemon fruits were respectively reduced by 93% and 97% after 5 d storage. In vitro, the growth of *P. digitatum* could be significantly inhibited by hot water treatment, its cell membrane permeability could be changed, and the inoculated disease incidence of *P. digitatum* treated by hot water was remarkably reduced ( $P < 0.05$ ). In this experiment, the hot water treatment conditions at 53 °C for 3 min can significantly control green mold of lemon fruits caused by *P.*

收稿日期: 2019-11-11

基金项目: 重庆市社会事业与民生保障科技创新专项一般项目 (cstc2017shms-xdny80058); “十三五”国家重点研发计划 (2018YFD0401301)

作者简介: 洪阳 (1993—), 男, 西南大学硕士生, 主攻为食品生物技术。

通信作者: 曾凯芳 (1972—), 女, 博士, 西南大学教授, 主要研究方向为农产品贮藏工程。

*digitatum* and decrease the viability and pathogenicity of *P. digitatum* in vitro.

**KEY WORDS:** lemon fruit; hot water treatment; green mold; *Penicillium digitatum*; inhibition mechanism

柠檬由于具有不同于其他水果的酸爽口感和独特的清新香气,成为广受大众喜爱的食品和调味品<sup>[1]</sup>。为保证鲜果全年供应,需进行保鲜贮藏,而果实在贮藏过程和货架期间易发生腐烂,造成较大的经济损失<sup>[2]</sup>。柠檬果实的采后腐烂主要由青霉属、炭疽菌属、链格孢属、地霉属和拟茎点霉属等病原微生物引起<sup>[3]</sup>。由指状青霉引起的绿霉病,是柠檬贮藏期普遍发生、危害严重且直接造成经济损失的主要病害,因此绿霉病是防治的重点<sup>[4]</sup>。目前,采后病害的控制主要通过化学杀菌剂来实现,由于滥用化学杀菌剂会造成环境污染以及对人体危害较大,使得化学杀菌剂越来越不被公众所接受<sup>[5-6]</sup>。

相对于采用化学方法来控制果蔬采后病害,利用物理方法进行处理更能保证安全无残留,对环境造成最低限度的影响<sup>[7]</sup>。热水处理是一种基于应用 40 °C 以上的热水来控制采后病害的新型物理保鲜手段。作为一种对人体和环境无害,无农药残留,操作简单、节能高效的物理保鲜技术,热水处理特别适合于果蔬的贮藏保鲜<sup>[8]</sup>。已有研究证明热水处理可以控制苹果扩展青霉<sup>[9]</sup>、柑橘指状青霉<sup>[10]</sup>、番木瓜胶孢炭疽菌<sup>[11]</sup>、甜瓜尖孢镰刀菌<sup>[12]</sup>、桃子褐腐病菌<sup>[13]</sup>所造成的腐烂。虽然已有研究表明 50 ~ 55 °C, 150 s 热水处理能够有效控制损伤接种指状青霉的橙类和宽皮柑橘果实的发病率,并且维持了贮藏中的果实品质<sup>[14-15]</sup>,但大多数研究均集中于热水处理对橙、柑采后病害的控制,较少关注对柠檬采后病害的控制效果,且鲜有对热水处理抑制病原菌机理的报道。

文中以‘尤力克’柠檬为实验原料,分离纯化及鉴定‘尤力克’柠檬的主要病原菌,在研究不同温度 and 不同时间热水处理对采后柠檬果实绿霉病控制效果的基础上,筛选出柠檬果实适宜的热水处理温度和时间,并探究离体条件下热水处理对病原菌(指状青霉)的抑菌机理,旨在为热水处理控制采后柠檬果实绿霉病和抑制柠檬采后病原菌提供一定的理论和依据。

## 1 实验

### 1.1 材料与设备

实验材料为尤力克柠檬 (*Citrus limon* (L.) Burm), 采自重庆市万州区燕山乡。挑选大小均一、完全转黄、无机械损伤的果实作为实验材料,采摘后运回通风良好的房间贮藏备用。

选取农户库房中具有典型发病症状的柠檬果实作为分离病原菌的实验材料。

主要仪器设备: DHP-9082 电热恒温培养箱,上海齐欣科学仪器有限公司; BXM-30R 立式压力蒸汽灭菌锅,上海博讯实业有限公司医疗设备厂; XB.K.25 型血球计数板,上海求精生化试剂有限公司; D7200 单镜头反光式取景照相机,尼康映像仪器销售(中国)有限公司; 1000TM 梯度 PCR 仪,美国 BIO-RAD 公司; PowerPac™ Basic 电泳仪,美国 BIO-RAD 公司; Tanon 4100 全自动数码凝胶成像分析系统,上海天能科技有限公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 病原菌的分离纯化及鉴定

##### 1.2.1.1 病原菌的分离与纯化

采用组织分离法。采集自然发病,具有典型绿霉病症状的病果,用沾有酒精(体积分数为 75%)的脱脂棉擦拭果实表面,切取病健交界处的小块病组织(5 mm×5 mm),浸入酒精(体积分数为 75%)消毒 30 s,用无菌水冲洗 3 次,移至 PDA 平板上,置于 25 °C 恒温培养箱中培养。长出菌落后,从菌落边缘取直径为 5 mm 菌苔接到新的 PDA 平板上继续培养,待出现单菌落后进行单孢分离,得到纯化的病原菌<sup>[12]</sup>。

##### 1.2.1.2 病原菌的形态学特征观察

用接种环将孢子悬浮液接种在 PDA 平板中央,在 25 °C 恒温培养箱中倒置培养,观察并记录菌落的形状、颜色、边缘形态、气味等性状。参照《真菌鉴定手册》对分离所得的病原菌进行鉴定。

##### 1.2.1.3 病原菌孢子悬浮液的制备

将病原菌接种到 PDA 培养基上于 25 °C 培养 7 d 后,用无菌水清洗菌丝收集孢子,用血球计数板计数,并用无菌水稀释到  $5 \times 10^5$  个/mL 待用。

##### 1.2.1.4 病原菌致病性检测

选取无机械损伤、大小一致的柠檬果实,用次氯酸钠溶液(体积分数为 2%)浸泡 2 min 后,用自来水清洗干净,自然晾干。在果实赤道部位损伤接种 10 μL  $5 \times 10^5$  个/mL 的孢子悬浮液,待菌液吸收后单果包装,置于 25 °C 恒温培养箱中贮藏,观察果实发病症状,并与自然发病果实发病症状相比较。根据柯赫氏法则,对回接发病果实再次进行病原菌的分离纯化,判断与所接菌株的菌落形态是否一致<sup>[16]</sup>。

##### 1.2.1.5 病原菌分子生物学鉴定

参考吴发红等<sup>[17]</sup>的方法,略有改动。将纯化得到的病原菌培养 6 d,挑取菌丝接种于 60 mL PDB 液体培养基中,在温度 25 °C 条件下,180 r/min 摇床培养 3 d,菌液通过 4 层纱布过滤并用无菌水洗涤 4 次,除去菌丝表面附着的培养基,用灭菌滤纸吸干多余水

分。称取 50 mg 菌丝液氮研磨成粉状, 移入 2 mL 的离心管中, DNA 采用 DNA 提取试剂盒(上海生工生物工程股份有限公司)提取, 将提取的 DNA 在  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  下保存备用。

采用真菌 rDNA-ITS 序列通用引物进行 PCR 扩增, 引物由上海生工生物工程股份有限公司合成, 包括上游引物 ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') 和下游引物 ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATA TGC-3')。按以下反应条件进行 PCR 扩增。

1) 50  $\mu\text{L}$  反应体系。2 $\times$ Taq PCR MasterMix 25  $\mu\text{L}$ , DNA Template 2  $\mu\text{L}$ , ITS1 2.5  $\mu\text{L}$ , ITS4 2.5  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 18  $\mu\text{L}$ 。

2) PCR 反应参数。预变性,  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 3 min; 变性,  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 20 s; 退火,  $53\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 1 min; 延伸,  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 1 min; 循环次数, 35; 终延伸,  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 5 min; 保存,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

取 5  $\mu\text{L}$  PCR 扩增产物进行琼脂糖(质量分数为 1%)凝胶电泳检测, 在全自动化凝胶成像分析仪中观测是否有特异性目的条带, 并拍照记录。PCR 产物送交上海生工生物工程股份有限公司测序, 测序结果提交到 NCBI, 与 GenBank 中核酸数据进行 BLAST 比对分析。

## 1.2.2 柠檬果实适宜热水处理温度与时间筛选

### 1.2.2.1 热水浸泡处理温度筛选

参考 Palou 等<sup>[14]</sup>的方法, 并进行一定修改。将柠檬果实随机分成 8 组, 采用次氯酸钠溶液(体积分数为 2%)浸泡 2 min 后, 再用自来水清洗干净, 自然晾干, 用沾有酒精(体积分数为 75%)的脱脂棉擦拭赤道部位并晾干, 用无菌打孔器在赤道部位对称打 2 个孔(深 3 mm, 直径 2 mm)。每个孔接种 10  $\mu\text{L}$   $5\times 10^5$  个/mL 的指状青霉孢子悬浮液, 损伤接种的果实在  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 相对湿度 90%~95%的环境中放置 24 h, 使指状青霉孢子在伤口处定殖, 模拟采后侵染过程。损伤接种果实放置 24 h 后置于 40, 43, 47, 50, 53, 57, 60  $^{\circ}\text{C}$  的热水处理装置中浸泡处理 2 min, 清水浸泡处理作为对照, 取出自然晾干, 用 PU-薄膜单果包装, 置于  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  的环境中贮藏, 每天统计发病率(Disease incidence)和病斑直径(Lesion diameter)。发病率=(果实发病孔数/果实总孔数) $\times 100\%$ ; 病斑直径=(病斑横向直径+病斑纵向直径)/2。每个处理组有 10 个果实, 重复做 3 次实验。

### 1.2.2.2 热水浸泡处理时间筛选

将损伤接种果实放置 24 h 后, 置于  $53\text{ }^{\circ}\text{C}$  的热水处理装置中, 分别浸泡处理 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5 min。由预实验可知清水浸泡处理不同时间后, 其发病率与病斑直径无显著性差异, 故以清水浸泡处理 3 min 作为对照。接种方法及贮藏条件同 1.2.2.1 节, 每天统计发病率和病斑直径。每个处理组有 10 个果

实, 重复做 3 次实验。

## 1.2.3 热水处理对病原菌的离体抑菌机理

### 1.2.3.1 热水处理对指状青霉菌落扩展的影响

参考张红印等<sup>[18]</sup>的方法, 做一定修改。模拟损伤接种实验条件, 将指状青霉孢子悬浮液加入 PDB 培养基中, 使其浓度最终为  $5\times 10^6$  个/mL, 放置在  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  环境中预先培养 24 h。将装有 4500  $\mu\text{L}$  无菌水的离心管放入  $53\text{ }^{\circ}\text{C}$  恒温水浴锅中, 当试管中无菌水的温度达到  $53\text{ }^{\circ}\text{C}$  时, 加入 500  $\mu\text{L}$  已培养 24 h 的指状青霉孢子悬浮液, 恒温水浴 3 min 立即取出后快速冷却待用, 以  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  恒温水浴 3 min 作为对照处理。将移液枪吸取 10  $\mu\text{L}$  经热水处理的孢子悬浮液滴加在 PDA 平板中心, 置于  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  恒温培养箱中培养, 每天测定菌落直径, 每个处理设置平行实验 8 个。

### 1.2.3.2 热水处理对指状青霉胞外电导率的影响

参照 Tao<sup>[19]</sup>的方法, 略有修改。按照 1.2.3.1 中的方法将指状青霉孢子预先培养 24 h, 8000 r/min 离心, 倒去 PDB 培养基, 用无菌水清洗 3 次, 彻底洗掉孢子表面附着的培养基。将收集的指状青霉孢子重新悬浮于无菌水中并调整到  $5\times 10^6$  个/mL, 取 500  $\mu\text{L}$  孢子悬浮液加入 4.5 mL 已恒温至  $53\text{ }^{\circ}\text{C}$  的无菌水中处理 3 min, 以  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  恒温水浴 3 min 作为对照处理, 用微型电导仪分别测定热水处理组和对照组在 0, 3, 6, 9, 12, 24, 48 h 时指状青霉孢子的胞外电导率。重复做 3 次实验。

### 1.2.3.3 热水处理对指状青霉致病力的影响

柠檬果实随机分成 2 组, 按照 1.2.2.1 节的方法对柠檬果实进行消毒处理, 用无菌打孔器在赤道部位对称打 2 个孔(深 3 mm, 直径 2 mm), 1 h 后接种 10  $\mu\text{L}$  按照 1.2.3.1 节中的方法进行热水处理后的孢子悬浮液, 待菌液吸收后单果包装, 置于  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  的环境中贮藏, 每天统计发病率和病斑直径。每个处理组有 10 个果实, 重复做 3 次实验。

### 1.2.3.4 热水处理对果实伤口处指状青霉生长的影响

参照 Nafussi<sup>[20]</sup>的方法, 略有修改。按照 1.2.2.1 节的方法对柠檬果实进行消毒处理, 用无菌打孔器在赤道部位对称打 2 个孔(深 3 mm, 直径 2 mm)。每个孔接种 10  $\mu\text{L}$   $5\times 10^5$  个/mL 的指状青霉孢子悬浮液, 在温度为  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度为 90%~95%的环境中放置 24 h 后用  $53\text{ }^{\circ}\text{C}$  热水浸泡 3 min, 以清水( $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ )浸泡 3 min 作为对照。待果实自然晾干后, 用打孔器截取以伤口为中心直径 5 mm, 厚度 3 mm 的果皮圆片, 放置于 PDA 平板中心, 置于  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  恒温培养箱中培养, 用十字交叉法测定菌落直径, 每个处理做 3 个平行实验, 实验重复 3 次。

## 1.3 数据分析

研究中所获得的数据在 Excel 2016 中统计分析, 运

用 GraphPad Prism 7 软件, Adobe Photoshop CS6 作图, 并采用 SPSS 21.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 对数据进行方差分析, 利用 Duncan's 多重比较进行差异显著性分析 ( $P < 0.05$ ), 不同字母表示有显著性差异。

## 2 结果与分析

### 2.1 指状青霉的分离纯化及鉴定

#### 2.1.1 病原菌传统形态学分析

病原菌的菌落形态见图 1。将分离纯化的病原菌在 PDA 培养基上培养 5 d, 菌落直径约为 45 ~ 50 mm, 呈圆形, 菌落绒状, 菌丝体为白色, 生长较快, 表面产生大量绿色分生孢子, 基质颜色没有变化, 产生特殊的香味。根据菌落形态特征初步确定为指状青霉 (*P. digitatum*)。

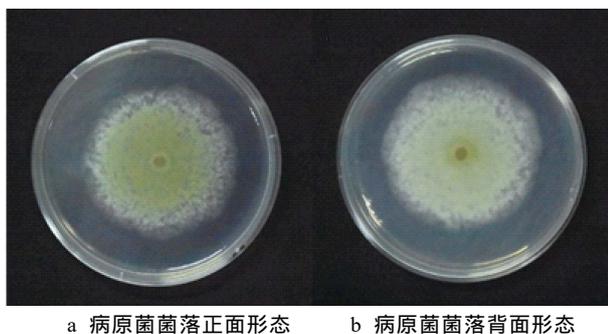


图 1 病原菌的形态特征

Fig.1 Morphologic characteristics of pathogen

#### 2.1.2 病原菌致病性实验

如图 2 所示, 将分离纯化的病原菌回接后, 果实从第 3 天开始发病, 初期果实表面呈现水渍状, 果皮变软, 发病后快速形成白色菌丝, 且迅速在果实表面扩展, 边缘不整齐, 最后产生大量绿色孢子, 形成绿色霉层, 逐渐覆盖全果, 有特殊香味。此症状与自然发病果实发病症状相一致, 并且通过组织分离法从回接果实上分离得到的菌株与回接病原菌形态一致。

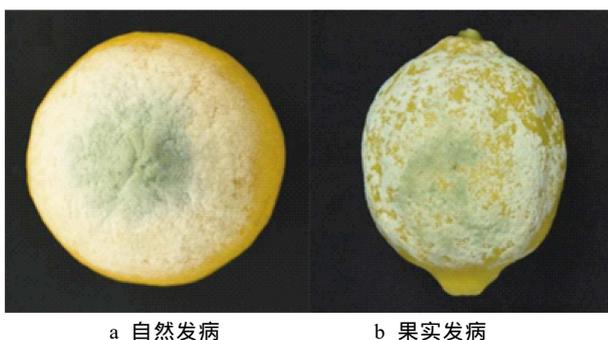


图 2 柠檬自然发病和回接病原菌果实发病症状

Fig.2 Naturally infected lemon and infestation of pathogen inoculated on the lemon

#### 2.1.3 病原菌分子生物学鉴定

将 PCR 扩增产物用琼脂糖 (质量分数为 1%) 凝胶电泳检测, 得到电泳条带见图 3。将测得的 ITS 序列提交到 GenBank 中比对分析发现 ITS 序列全长 525, 与指状青霉 *Penicillium digitatum* (MH864871.1, MH862889.1, MH630059.1, MF568039.1, MF926242.1, MF527231.1) 的 ITS 序列同源性高达 100%。该鉴定结果表明, 分离纯化的病原菌为指状青霉 *P. digitatum*。

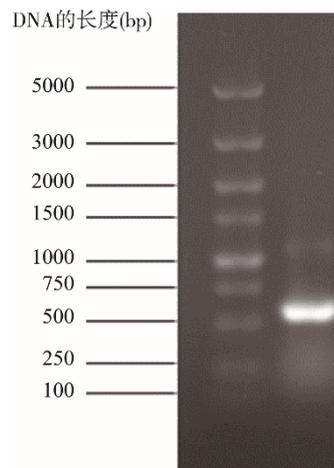


图 3 病原菌 ITS-PCR 扩增电泳图谱

Fig.3 ITS-PCR amplified electrophoresis for isolated strains

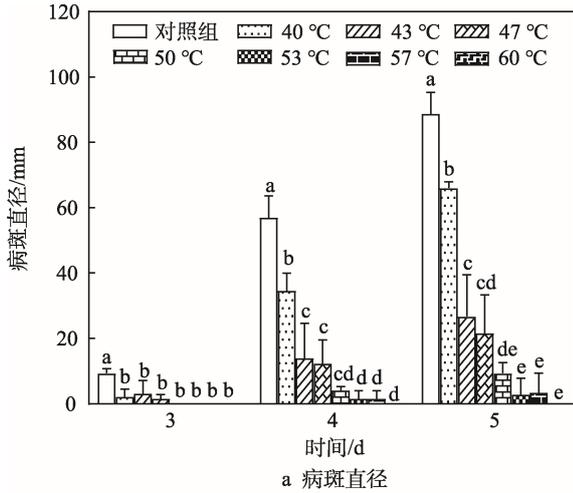
### 2.2 柠檬果实适宜热水处理温度与时间筛选

#### 2.2.1 柠檬果实适宜热水处理温度筛选

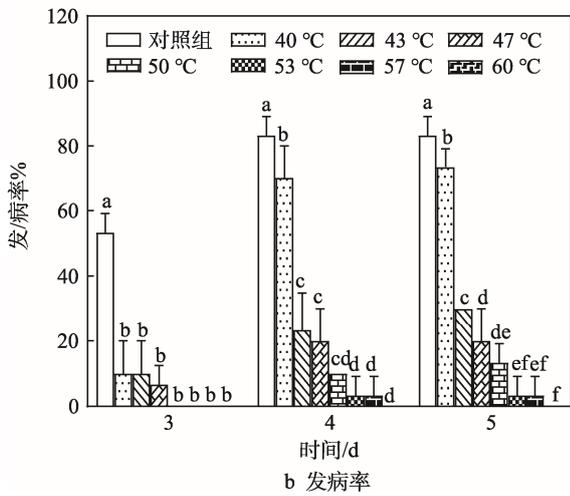
不同温度处理柠檬果实绿霉病发病情况见图 4。实验结果表明, 不同温度的热水浸泡处理 2 min 都能显著降低损伤接种果实的发病率和病斑直径。在贮藏 5 d 时, 对照组果实发病率达到 83.3%, 病斑直径为 8.9 cm; 用 40, 43, 47, 50, 53, 57, 60 °C 热水浸泡处理的果实发病率分别比对照组低 12%, 64%, 76%, 84%, 96%, 96% 和 100%, 病斑直径分别比对照组低 25%, 70%, 76%, 89%, 97%, 96% 和 100%。随着热水处理温度升高, 柠檬果实绿霉病发病率与病斑直径逐渐降低, 但热水处理温度为 57 °C 与 60 °C 时会使柠檬果皮产生锈红色斑, 影响果实外观品质, 故不能选择上述温度进行热水浸泡处理。与其他热水处理温度相比, 采用 53 °C 热水处理能够显著降低果实的发病率和病斑直径 ( $P < 0.05$ ), 且不影响果实外观, 故选取 53 °C 热水处理进行后续实验。不同温度处理 2 min 处理组果实与对照组果实之间的发病情况及果实外观情况见图 5。

#### 2.2.2 柠檬果实适宜热水处理时间筛选

如图 6 所示, 与对照组相比, 不同热水处理时间都能显著降低损伤接种柠檬果实的发病率和病斑直径



a 病斑直径



b 发病率

注：竖线代表标准误差；不同字母代表差异显著(P<0.05)

图4 不同温度热水处理对柠檬果实采后绿霉病病斑直径、发病率的影响

Fig.4 Effect of hot water treatment at different temperatures on green mold lesion diameter and disease incidence of harvested lemon fruits

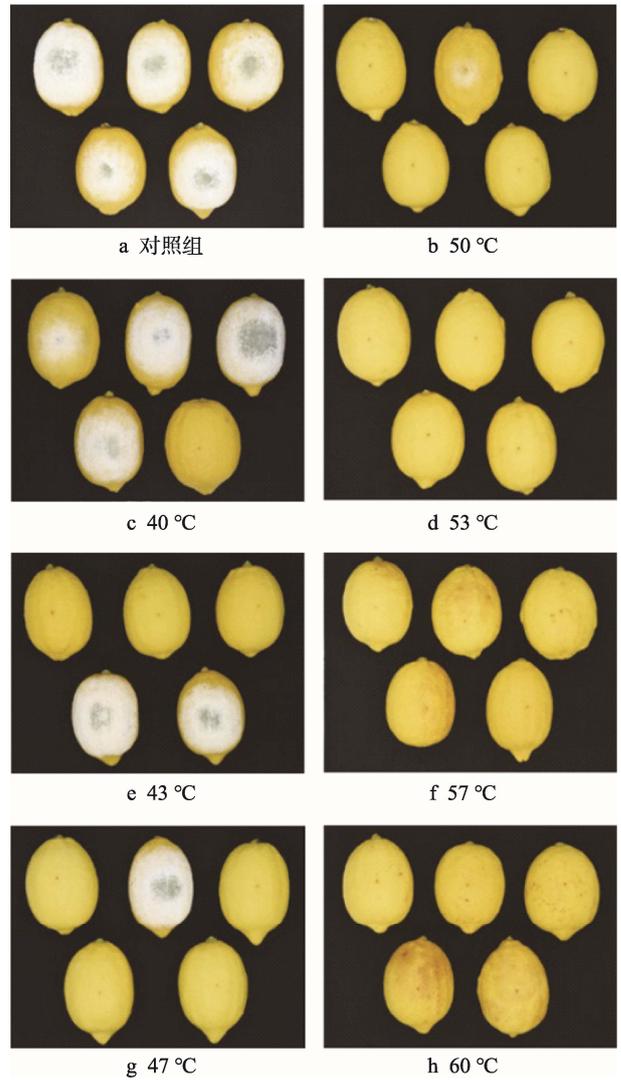
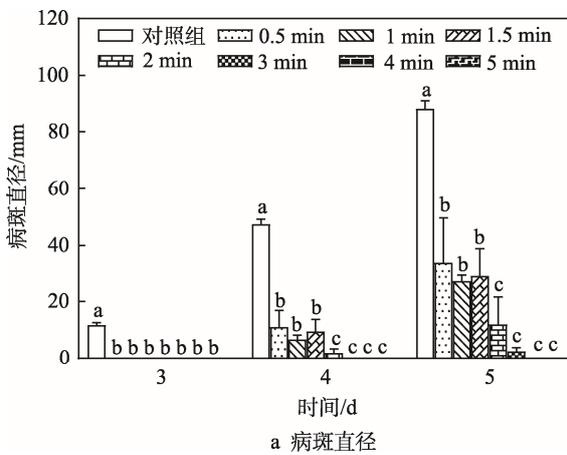
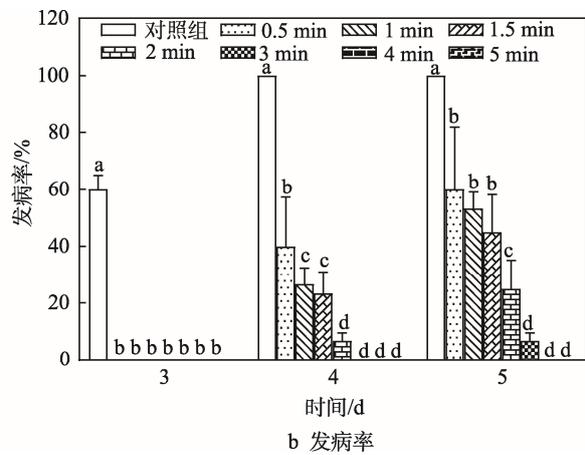


图5 不同温度热水处理对柠檬果实采后绿霉病果实发病外观情况的影响(贮藏5d)

Fig.5 Effect of hot water treatment at different temperatures on the appearance of harvested lemon fruits with green mold (stored for 5 d)



a 病斑直径



b 发病率

注：竖线代表标准误差；不同字母代表差异显著(P<0.05)

图6 不同时间热水处理对柠檬果实采后绿霉病病斑直径、发病率的影响

Fig.6 Effect of hot water treatment at different time on green mold lesion diameter and disease incidence of harvested lemon fruits

( $P < 0.05$ )。贮藏第 5 天, 对照组果实发病率达到 100%, 病斑直径为 8.8 cm; 浸泡 0.5, 1, 1.5, 2, 3 min 的果实发病率分别比对照组低 40%, 47%, 55%, 75%, 93%, 病斑直径分别比对照组低 61%, 69%, 67%, 86%, 97%; 热水浸泡 4 min 和 5 min 的果实均未发病。实验结果表明, 热水浸泡 3 min 的果实发病率和病斑直径低于其他短时间浸泡处理, 且与热水浸泡 4 min 和 5 min 无显著差异 ( $P > 0.05$ ), 从商业化经济角度考虑, 选择 53 °C 热水浸泡 3 min 为最佳处理。53 °C 热水不同处理时间处理组果实与对照组果实之间的发病情况及果实外观情况见图 7。

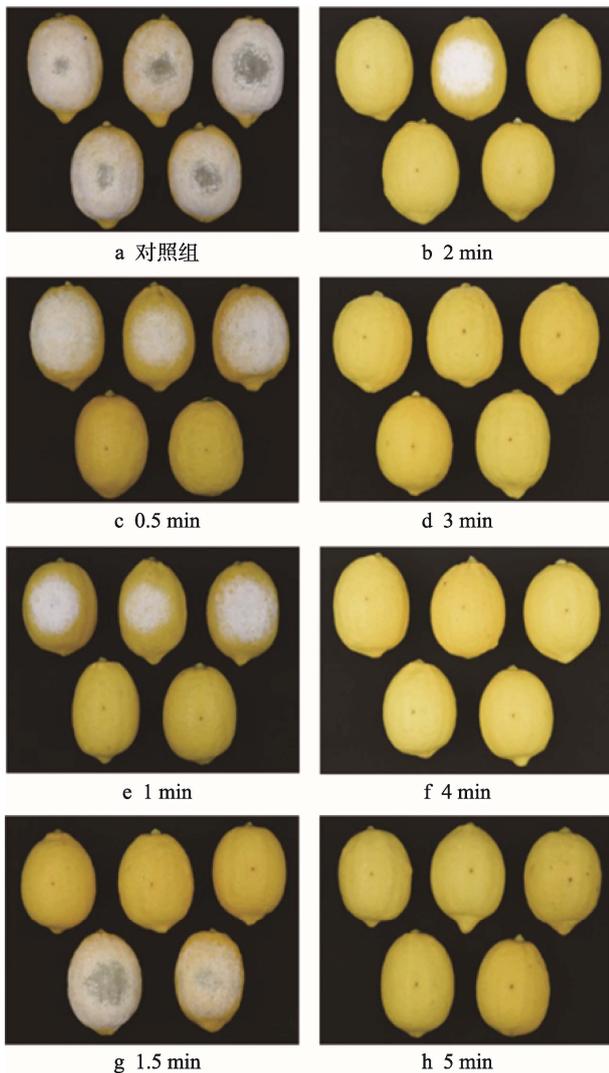


图 7 不同时间热水处理对柠檬果实采收后绿霉病果实发病外观情况的影响 (贮藏 5 d)

Fig.7 Effect of hot water treatment at different time on the appearance of harvested lemon fruits with green mold (stored for 5 d)

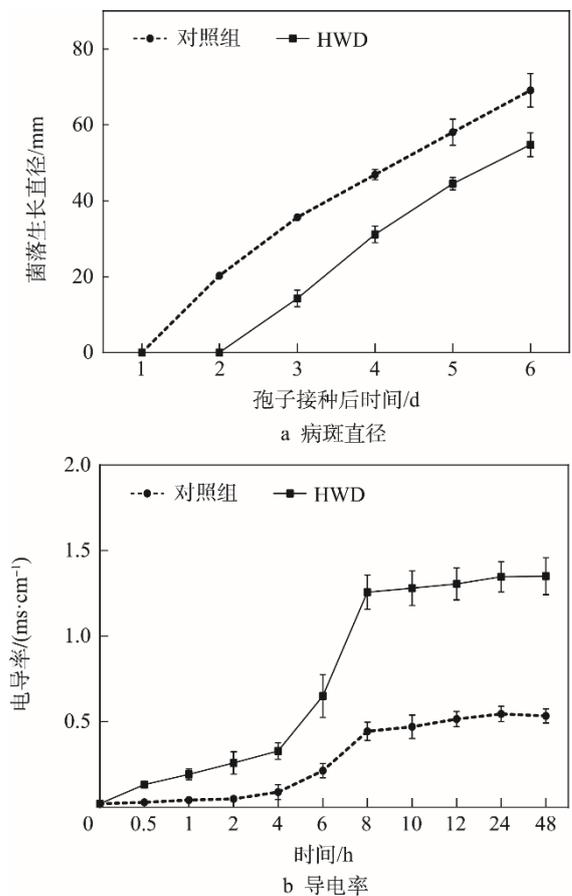
### 2.3 热水处理对病原菌的离体抑菌机理

#### 2.3.1 热水处理对指状青霉菌落扩展和胞外电导率的影响

如图 8a 所示, 在离体条件下, 用 53 °C 热水直接

作用于指状青霉孢悬液 3 min 能够显著抑制指状青霉的菌落扩展 ( $P < 0.05$ )。热水处理组在第 3 天开始有菌落出现, 相对于对照组滞后 24 h, 但处理组与对照组的菌落生长速率无显著差异。在观察的第 6 天, 热水处理组的菌落直径只有对照组的 79%。

如图 8b 所示, 实验测定了热水处理对于指状青霉胞外电导率的影响。结果表明, 随着时间的延长, 对照组和热水处理组的孢子胞外电导率都呈现升高的趋势, 至测定 8 h 后逐渐趋于平缓。热水处理组的胞外电导率在测定的各个时间段均显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ), 在 8 h 后, 热水处理组指状青霉胞外电导率是对照处理组的 2.8 倍。



注: 竖线代表标准误差; 不同字母代表差异显著 ( $P < 0.05$ )

图 8 热水处理对指状青霉菌落生长和胞外电导率的影响  
Fig.8 Effects of hot water treatment on fungal growth and extracellular conductivity of *P. digitatum*

#### 2.3.2 热水处理对指状青霉致病力的影响

如图 9 所示, 热水处理可以使指状青霉的孢子致病力明显减弱, 热水处理后指状青霉回接果实发病率显著低于对照处理组 ( $P < 0.05$ )。当柠檬果实接种经过对照处理后的孢子悬浮液时, 果实第 3 天观察到发病症状, 且在第 3 ~ 4 天内发病迅速, 到第 5 天时果实全部发病, 而将柠檬果实接种热水处理之后的指

状青霉能够明显延缓果实的发病,到贮藏第4天果实才开始发病,且发病率仅为对照组的16%,而后果实发病率逐渐增加,贮藏第7天时,热水处理组柠檬果实的发病率约为对照组的83%。

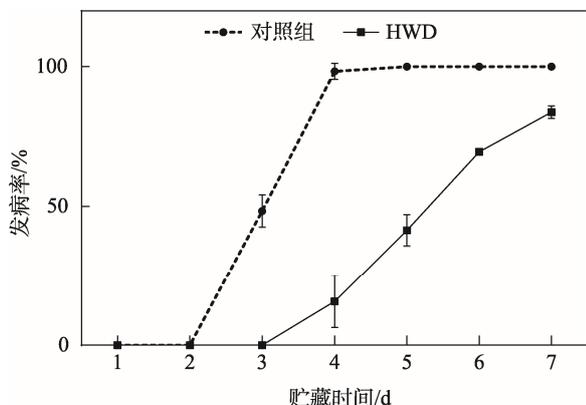


图9 热水处理对指状青霉致病力的影响

Fig.9 Effects of hot water treatment on pathogenicity of *P. digitatum*

### 2.3.3 热水处理对果实伤口处指状青霉的影响

如图10所示,损伤接种后的果实在25℃的清水中浸泡后将果实伤口处回接于PDA平板上,培养24h后开始出现指状青霉的菌落,而经过53℃热水浸泡的损伤接种果实,其伤口处的指状青霉在平板上的生长明显滞后于对照组,且初期生长相对缓慢,在观察的第6天热水处理组果实伤口处的指状青霉菌落直径约为对照处理组的74%。该实验结果表明,53℃热水处理能够延缓果实伤口处的指状青霉的生长,但未能对果实伤口处的病原菌起到致死作用,单一热水处理不能完全控制指状青霉对柠檬果实的侵染。

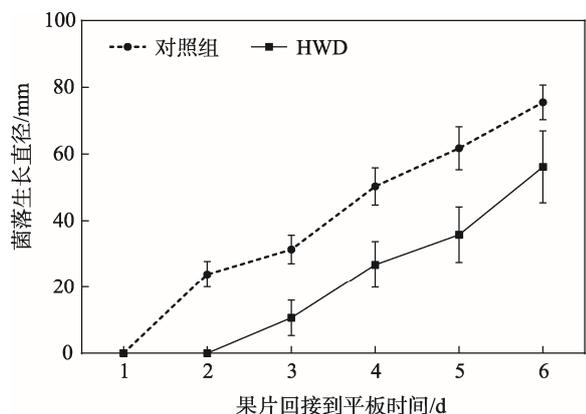


图10 热水处理对果实伤口处指状青霉的影响

Fig.10 Effects of hot water treatment on *P. digitatum* from the cut of inoculated fruit

## 3 讨论

热水处理作为一种无污染、高效安全的绿色保鲜

技术,已广泛应用于不同的果实采后处理中,以减少致病真菌引起的腐烂,延长其贮藏寿命<sup>[21]</sup>。大量研究发现,筛选出适宜热水处理时间和温度,可有效控制果蔬采后病害。对苹果的研究表明,45℃热水处理10 min能够显著降低苹果灰霉病与炭疽病的发病率<sup>[22]</sup>。50℃热水处理1 min可降低桃果实贮藏期内的褐腐病的发病率<sup>[23]</sup>。研究中,筛选出柠檬果实适宜的热水处理条件,即53℃热水浸泡3 min,该处理能够明显控制绿霉病的发生且不会影响果实外观品质,这一结果与Palou等研究结果相似<sup>[7]</sup>。

研究发现,离体条件下,热水处理有效抑制了指状青霉的菌落扩展。Alvindhia<sup>[24]</sup>等发现52℃,10 min的热水处理在离体条件下有效抑制了胶孢炭疽菌的菌落扩展,证明热水处理对病原真菌活力有一定抑制作用<sup>[9]</sup>。细胞膜也在维持细胞正常生命活动方面起着重要作用,细胞膜损坏可能会造成细胞通透性增加,使细胞内维持正常生命活动所需的物质产生泄漏,导致胞外电导率增大,因此,胞外电导率常被作为评定细胞膜不可逆损伤的指标<sup>[25]</sup>。研究发现,热水处理显著改变了指状青霉菌孢子的细胞膜通透性,使胞外电导率显著增大,证明热水处理能够破坏指状青霉菌孢子的细胞膜,这可能是热水处理离体抑菌机理的重要组成部分。

53℃热水处理3 min能够延缓果实伤口处的指状青霉的生长,前人研究也表明48℃,20 min热水处理能够延缓胶孢炭疽菌的生长<sup>[26]</sup>;45℃,10 min热水处理能够延缓灰霉病菌的生长<sup>[27]</sup>。此外,将离体条件下热水处理后的指状青霉回接到柠檬果实上,延缓了果实发病症状的出现,降低了果实发病率,证明热水处理降低了指状青霉的致病力。在适宜热水处理温度与时间筛选中,损伤接种的果实在经过53℃热水处理3 min后发病率只有10%,低于回接发病率。这可能是由于热水处理除了对病原菌直接造成影响外,还会诱导柠檬产生抗病性,抵御病原菌的侵染。有研究发现,热水处理能够诱导果实抗病相关的酶活性提高,增强果实抗病能力<sup>[28-29]</sup>。

## 4 结语

文中的研究证明,53℃热水处理3 min可显著控制指状青霉引起的柠檬果实绿霉病。同时,53℃热水处理3 min能有效抑制指状青霉菌落的扩展,改变指状青霉菌细胞膜通透性,降低了指状青霉的活力和致病力,但单一热水处理不能对指状青霉起到致死作用。由此可见,热水处理能够在一定程度上控制柠檬果实绿霉病发生,在实践应用时,还可通过与其他采后保鲜技术的结合应用,以达到更好的贮藏保鲜效果。

## 参考文献:

- [1] 韩国辉, 魏召新, 龚亮, 等. 柠檬绿色栽培技术要点[J]. 中国南方果树, 2018, 47(1): 136—139.  
HAN Guo-hui, WEI Zhao-xin, GONG Liang, et al. Key Points of Lemon Green Cultivation Technology[J]. South China Fruits, 2018, 47(1): 136—139.
- [2] 李昂, 张鹏, 李春媛, 等. 1-MCP 和丁香精油对苹果链格孢和曲霉抑性的影响[J]. 包装工程, 2019, 40(11): 17—25.  
LI Ang, ZHANG Peng, LI Chun-yuan, et al. Effects of 1-MCP and Clove Essential Oil on Inhibition of *Alternaria Alternata* and *Aspergillus*[J]. Packaging Engineering, 2019, 40(11): 17—25.
- [3] BIRD G W, OGAWA J M, RITCHIE D F, et al. Compendium of Stone Fruit Diseases[M]. Saint Paul: The American Phytopathological Society, 1995: 32—40.
- [4] 杨秀燕, 杨冲, 王亮, 等. 安岳柠檬贮藏期主要病害及防治措施[J]. 四川农业科技, 2016(3): 32—33.  
YANG Xiu-yan, YANG Chong, WANG Liang, et al. Main Diseases and Control Measures of Anyue Lemon During Storage[J]. Sichuan Agricultural Science and Technology, 2016(3): 32—33.
- [5] SANCHEZ-TORRES P, TUSET J J. Molecular Insights into Fungicide Resistance in Sensitive and Resistant *Penicillium Digitatum* Strains Infecting Citrus[J]. Postharvest Biology and Technology, 2011, 59(2): 159—165.
- [6] NICOLOPOULOU-STAMATI P, MAIPAS S, KOTAMPASI C, et al. Chemical Pesticides and Human Health: the Urgent Need for a New Concept in Agriculture[J]. Frontiers in Public Health, 2016, 4: 148.
- [7] PALOU L, SMILANICK J L, DROBY S. Alternatives to Conventional Fungicides for the Control of Citrus Postharvest Green and Blue Moulds[J]. Stewart Postharvest Review, 2008, 2(2): 1—16.
- [8] USALL J, IPPOLITO A, SISQUELLA M, et al. Physical Treatments to Control Postharvest Diseases of Fresh Fruits and Vegetables[J]. Postharvest Biology and Technology, 2016, 122: 30—40.
- [9] 李颖超. 采后热处理对苹果青霉病的控制及其部分机理[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2011: 17—23.  
LI Yin-chao. Postharvest Heat Treatments Control Blue Mould in Apple Fruit and Its Partial Mechanism[D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2011: 17—23.
- [10] 熊宇. 热水结合杀菌剂处理对“纽荷尔”脐橙果实采后生理及贮藏效果的影响[D]. 南昌: 江西农业大学, 2015: 26—38.  
XIONG Yu. Effect of Hot Water Combined with Fungicides on Fruit Postharvest Physiology and Storage of 'Newhall' Navel Orange[D]. Nanchang: Jiangxi Agricultural University, 2015: 26—38.
- [11] LI X, ZHU X, ZHAO N, et al. Effects of Hot Water Treatment on Anthracnose Disease in Papaya Fruit and Its Possible Mechanism[J]. Postharvest Biology and Technology, 2013, 86: 437—446.
- [12] SUI Y, DROBY S, ZHANG D, et al. Reduction of *Fusarium* Rot and Maintenance of Fruit Quality in Melon Using Eco-friendly Hot Water Treatment[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2014, 21(24): 13956—13963.
- [13] KARABULUT O A, COHEN L, WIESS B, et al. Control Brown Rot and Blue Mold of Peach by Short Hot Water Brushing and Yeast Antagonists[J]. Postharvest Biology and Technology, 2002, 24(2): 103—111.
- [14] PALOU L, USALL J, MUNOZ J A, et al. Hot Water, Sodium Carbonate, and Sodium Bicarbonate for the Control of Postharvest Green and Blue Molds of Clementine Mandarins[J]. Postharvest Biology and Technology, 2002, 24(1): 93—96.
- [15] SCHIRRA M, D'HALLEWIN G, CABRAS P, et al. Seasonal Susceptibility of Tarocco Oranges to Chilling Injury as Affected by Hot Water and Thiabendazole Postharvest Dip Treatments[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1998, 46(3): 1177—1180.
- [16] 朱从一. 柑橘采后青霉属病原菌生物学特性及其系统发育[D]. 武汉: 华中农业大学, 2011: 8—21.  
ZHU Cong-yi. The Biological Characterization and Molecular Phylogenetic Analysis of *Penicillium* Spp That Causing the Mold Fruit of Citrus[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2011: 8—21.
- [17] 吴发红, 黄东益, 黄小龙, 等. 几种真菌 DNA 提取方法的比较[J]. 中国农学通报, 2009, 25(8): 62—64.  
WU Fa-hong, HUANG Dong-yi, HUANG Xiao-long, et al. Comparing Study on Several Methods for DNA Extraction from Endophytic Fungi[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2009, 25(8): 62—64.
- [18] 张红印, 王世珍, 黄星奕, 等. 热水处理对桃果采后青霉病及自然腐烂的控制[J]. 农业工程学报, 2008(8): 294—297.  
ZHANG Hong-yin, WANG Shi-zhen, HUANG Xing-yi, et al. Effect of Hot Water Treatment on Control of Postharvest Blue Mold and Natural Rot. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2008(8): 294—297.
- [19] TAO N, OUYANG Q, JIA L. Citral Growth of *Penicillium Italicum* by a Membrane Damage Mechanism[J]. Food Control, 2014, 41(2): 116—121.
- [20] NAFUSSI B, BEN-YEHOSHUA S, RODOV V, et al. Mode of Action of Hot-Water Dip in Reducing Decay of Lemon Fruit[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001, 49(1): 107—113.
- [21] SUI Y, WISNIEWSKI M, DROBY S, et al. Recent Advances and Current Status of the Use of Heat Treatments in Postharvest Disease Management Systems: is it Time to Turn up the Heat[J]. Trends in Food Science and Technology, 2016, 51: 34—40.
- [22] FRANCESCO A D, MARI M, ROBERTI R. Defense

- Response against Postharvest Pathogens in Hot Water Treated Apples[J]. *Scientia Horticulturae*, 2018, 227: 181—186.
- [23] 周文娟, 陈晨, 胡文忠, 等. 热水处理对桃果实采后病害及生理变化的影响[J]. *食品工业科技*, 2017, 38(7): 311—314.  
ZHOU Wen-juan, CHEN Chen, HU Wen-zhong, et al. Effects of Heat Water Treatment on the Postharvest Disease and Physiological Changes of Peach Fruits[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2017, 38(7): 311—314.
- [24] ALVINDIA D G, ACDA M A. Revisiting the Efficacy of Hot Water Treatment in Managing Anthracnose and Stem-end Rot Diseases of Mango cv 'Carabao'[J]. *Crop Protection*, 2015, 67: 96—101.
- [25] WANG W, DENG L, YAO S, et al. Control of Green and Blue Mold and Sour Rot in Citrus Fruits by the Cationic Antimicrobial Peptide PAF56[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2018, 136: 132—138.
- [26] LIDIA E A, JOSE A L, FRANCISCO D, et al. Effect of the Combination Hot Water-calcium Chloride on the in Vitro Growth of *Colletotrichum Gloeosporioides* and the Postharvest Quality of Infected Papaya[J]. *Plant Pathology Journal*, 2017, 33(6): 572—581.
- [27] 陈会珍. 热水处理对猕猴桃采后病害的防治及灰霉病发生机制的研究[D]. 合肥: 合肥工业大学, 2016: 14—20.  
CHEN Hui-zhen. Effect of Hot Water Treatment on Control of the Postharvest Decay in Kiwifruit and the Mechanism of Gray Mold Pathogenesis[M]. Hefei: Hefei University of Technology, 2016: 14—20.
- [28] CHEN H, CHENG Z, WISNIEWSKI M, et al. Eco-friendly Hot Water Treatment Reduces Postharvest Decay and Elicits Defense Response in Kiwifruit[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2015, 22(19): 15037—15045.
- [29] USALL J, IPPOLITO A, SISQUELLA M, et al. Physical Treatments to Control Postharvest Diseases of Fresh Fruits and Vegetables[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2016, 122: 30—40.