

1-MCP 和丁香精油对苹果链格孢和曲霉抑性的影响

李昂¹, 张鹏², 李春媛², 颜廷才¹, 李江阔², 徐勇³, 李博强³

(1.沈阳农业大学 食品学院, 沈阳 110866;

2.国家农产品保鲜工程技术研究中心(天津) 天津市农产品采后生理与贮藏保鲜重点实验室, 天津 300384;

3.中国科学院植物研究所资源植物重点实验室, 北京 100093)

摘要:目的 研究 1-MCP 和丁香精油在离体和活体条件下对采后苹果的主要致腐菌(苹果链格孢和曲霉)的抑制作用。方法 以‘寒富’苹果为实验材料, 通过分离纯化腐烂寒富苹果上的菌后, 再进行体外抑菌实验和苹果活体接种试验。结果 从腐烂寒富苹果中分离得到链格孢和曲霉等 2 个属。致腐能力由大到小为曲霉、链格孢。在离体条件下, 1-MCP 和丁香精油对供试菌种有显著的抑制作用, 1-MCP 对苹果链格孢、曲霉的最低抑制含量分别为 8 $\mu\text{L/L}$ 和 9 $\mu\text{L/L}$ 。丁香精油对苹果链格孢、曲霉的最低抑制含量分别为 5 $\mu\text{L/L}$ 和 7 $\mu\text{L/L}$ 。在活体实验中, 1-MCP (5 $\mu\text{L/L}$) 处理对苹果果实病斑直径扩展的控制作用最显著, 对链格孢的抑菌率在第 6 d 时达到 18.17%, 对曲霉的抑菌率在第 6 d 时达到 27.31%。丁香精油的活体最佳抑菌含量为 12 $\mu\text{L/L}$, 在第 6 d 时对链格孢的抑菌率可达 79.36%, 对曲霉的抑菌率达到 34.82%。**结论** 实验中 1-MCP 的最佳用药含量为 5 $\mu\text{L/L}$, 丁香精油为 12 $\mu\text{L/L}$ 。1-MCP 对果实上曲霉的抑制效果较显著, 而丁香精油对链格孢的抑制作用更好。

关键词: 苹果; 致病菌; 丁香精油; 1-MCP; 抑菌

中图分类号: S661.1 文献标识码: A 文章编号: 1001-3563(2019)11-0017-09

DOI: 10.19554/j.cnki.1001-3563.2019.11.003

Effects of 1-MCP and Clove Essential Oil on Inhibition of *Alternaria Alternata* and *Aspergillus*

LI Ang¹, ZHANG Peng², LI Chun-yuan², YAN Ting-cai¹, LI Jiang-kuo², XU Yong³, LI Bo-qiang³

(1.College of Food Science, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China;

2.Tianjin Key Laboratory of Postharvest Physiology and Storage of Agricultural Products, National Engineering and Technology Research Center for Preservation of Agricultural Products (Tianjin), Tianjin 300384, China;

3.Key Laboratory of Plant Resources, Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China)

ABSTRACT: The paper aims to study the inhibitory effects of 1-MCP and clove essential oil on the main decaying strains of postharvest apples, *Alternaria alternata* and *Aspergillus* in vitro and in vivo conditions. “Hanfu” apple was used as experimental material to isolate and purify the rot and clove essential oil apples, and then in vitro experiments and apple inoculation experiments were carried out. Two genera were isolated from the rot and clove essential oil apples: *Alternaria* and *Aspergillus*. The ability to cause rot decreased from *Aspergillus* and *Alternaria*. Under in vitro conditions, 1-MCP and clove essential oil had significant inhibitory effects on the tested strains. The minimum inhibitory concentration of 1-MCP

收稿日期: 2019-03-05

基金项目: “十三五”国家重点研发计划 (2016YFD0400903)

作者简介: 李昂 (1994—), 女, 满族, 沈阳农业大学硕士生, 主攻农产品贮藏与加工。

通信作者: 李江阔 (1974—), 男, 博士, 国家农产品保鲜工程技术研究中心 (天津) 副研究员, 主要研究方向为农产品安全与果蔬贮运保鲜新技术。

against *Alternaria alternata* and *Aspergillus* were 8 $\mu\text{L/L}$ and 9 $\mu\text{L/L}$ respectively. The minimum inhibitory concentration of clove essential oil on *Alternaria alternata* and *Aspergillus* were 5 $\mu\text{L/L}$ and 7 $\mu\text{L/L}$ respectively. In the in vivo experiment, 5 $\mu\text{L/L}$ 1-MCP treatment had the most significant effect on the control of the diameter expansion of apple fruit. The inhibition rate against *Alternaria* was 18.17% at the 6th day, and that against *Aspergillus* reached 27.31% at the 6th day. The optimal inhibitory concentration of clove essential oil 12 $\mu\text{L/L}$. At the 6th day, the inhibition rate against *Alternaria* was 79.36%, and that against *Aspergillus* was 34.82%. In this experiment, the optimal concentration of 1-MCP is 5 $\mu\text{L/L}$, and that of the essential oil of clove is 12 $\mu\text{L/L}$. 1-MCP has a significant inhibitory effect on *Aspergillus*, while clove essential oil has a better inhibitory effect on *Alternaria*.

KEY WORDS: apple; pathogen; clove essential oil; 1-MCP; antibacterial

‘寒富’苹果是一种果形端正、多汁酥脆、果香四溢,且具有极强抗寒性、含酸量相对较高的优质杂交品种,不论是鲜食还是加工都很适合^[1-2]。由于‘寒富’苹果的产量高,超出鲜销需求,因此必须进行贮藏,以延长供应期。苹果属于呼吸跃变型果实,在长期低温贮藏或常温货架期间易发生腐烂,造成严重的经济损失^[3]。腐烂是由于病原微生物侵染所致,如青霉病由青霉(*Penicillium*)引起,链格孢烂果病由链格孢菌(*Alternaria*)引起,灰霉病由灰霉引起,霉心病由曲霉(*Aspergillus*)引起^[4-9]。由青霉引起的青霉病是采后苹果的主要病害之一^[10]。灰霉病是在贮藏期侵染水果的病害,侵染一般在苹果花期或者田间接近成熟时发生^[11]。目前在苹果致病菌的研究上,学者们较多关注青霉和灰霉,如低温贮藏条件下1-甲基环丙烯(1-MCP)对诱导苹果灰霉病抗性的研究^[12],而关于链格孢和曲霉的相关报道较少。

1-MCP 因其与果实上的乙烯受体进行了不可逆的结合,阻断了乙烯受体与乙烯的结合,因此被大量应用于苹果采后贮藏中。很多研究结果显示,1-MCP 具有调控乙烯的作用,从而达到减缓果实营养物质的流失速度、延长货架期的目的^[13-15]。此外,1-MCP 还能够充当一种具有激发作用的因子,可以提高果实防御和抵抗病害的能力,减轻果蔬产品的采后病害^[16]。目前关于 1-MCP 对链格孢和曲霉抑菌性的相关报道较少。近些年来,有关拮抗菌(细菌、真菌以及放线菌)以及植物提取物的生物防治等的相关研究较多,其中,植物提取物含有抑菌活性的物质,且不易产生抗药性,如丁香精油和丁香酚能够降低果实采后腐烂病害的发生^[17]。丁香的抑菌成分主要集中于丁香精油中,丁香油树脂对曲霉、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、汉逊氏酵母、大肠杆菌、青霉等经常在食品中出现的污染菌都有十分显著的抑制作用,且抑制真菌的作用很强^[18]。关文强等^[19]研究了丁香精油对葡萄链格孢菌的抑制效果,但针对丁香精油在苹果链格孢的作用方面的相关研究未见报道。

文中实验以‘寒富’苹果为材料,分离纯化‘寒富’苹果的主要致病菌,在研究不同含量 1-MCP 和丁香精油的抑菌效果,以确定其最低抑制含量的基础上,

探索不同含量 1-MCP 和丁香精油的活体抑菌试验,以确定抑菌剂的抑菌效果,旨在为抑制苹果采后腐烂致病菌(苹果链格孢、曲霉)提供理论依据。

1 实验

1.1 材料、试剂与仪器设备

以‘寒富’苹果为实验材料,于 2017 年 10 月采自辽宁鞍山苹果示范园。实验采用 16 μm 微孔袋,由国家农产品保鲜工程技术研究中心(天津)提供。试剂:1-MCP 原药(质量分数为 0.14%);丁香精油(99.99%),吉安市中香天然植物有限公司;链格孢、曲霉,从感染相关病原菌的苹果果实中分离纯化所得,后于 4 $^{\circ}\text{C}$ PDA 培养基中暂存;无水乙醇,汇杭化工科技有限公司;马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA),北京奥博星生物技术有限责任公司。仪器设备:灭菌锅,重庆雅马拓科技有限公司;紫外线消毒车,江苏申星光电医疗器械有限公司;BX51 型显微镜,日本奥林巴斯公司;恒温恒湿培养箱,天津市泰斯特仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 苹果中霉菌的分离培养

用体积分数为 70%的酒精将苹果腐烂病组织表面消毒后,于超净工作台上从果实表皮内部挑取少许腐烂组织,置于 PDA 培养基上,于 25 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养。等到菌落长出后,在边缘用接种环挑取小部分菌丝接种到新的 PDA 培养基上,培养后继续进行转接,多次转接得到纯化的菌株,转入 PDA 斜面保存。菌种的初步鉴定通过培养特征和形态特征进行判定。

1.2.2 腐烂霉菌苹果刺伤接种实验

霉菌孢子悬浮液制备:在 PDA 培养基上接种纯化后的霉菌,置于 25 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养 5~7 d,之后挑取菌落孢子置于含吐温 800(体积分数为 5%)的无菌水中,振荡均匀后使用血球计数板计数,进行梯度稀释,使孢子悬浮液的含量为 1×10^6 CFU/mL。

实验步骤: ‘寒富’苹果→清水清洗→消毒(酒精(70%)喷涂苹果表皮)→自然晾干→于苹果赤道部刺直径 3 mm×深度 3 mm 的伤口→注入霉菌孢子悬浮液 20 μL (以注入无菌水 20 μL 为空白对照)→保鲜盒包装→25 $^{\circ}\text{C}$ 培养 6 d→每 2 d 测量病斑直径, 做 3 组平行试验。使用游标卡尺测定病斑直径, 若苹果的病斑直径大于 2 mm, 则此霉菌为腐烂霉菌, 反之为非腐烂霉菌。根据病斑直径的大小来比较腐烂霉菌的致病能力。

1.2.3 离体抑菌实验方法

1.2.3.1 1-MCP 溶液配制

称取 1.579 g 1-MCP(质量分数为 0.14%), 将其溶解在 10 mL 蒸馏水中, 现配现用。

1.2.3.2 体外试验测定最低抑制含量

1) 取直径为 6 mm 的菌饼置于 PDA 培养基中央, 在培养皿(直径为 90 mm, 体积为 60 mL)的盖中央放置滤纸片, 然后将 1.8, 3.0, 4.2, 4.8, 5.4 μL 的 1-MCP 溶液分别点在滤纸片上(使 1-MCP 在培养皿中的含量分别为 3, 5, 7, 8, 9 $\mu\text{L/L}$)。将培养皿立即密封, 并在 25 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 72 h。将 1.8, 3.0, 4.2, 4.8, 5.4 μL 蒸馏水分别点滴在 PDA 空白样上, 作为对照组。以不生长菌或以长出的菌落数少于 5 个的滤纸片所含药剂含量为该药物的最低抑制含量(MIC)^[20]。

2) 将 0.06, 0.18, 0.30, 0.42, 0.48 μL 的丁香精油分别点在滤纸片上(使丁香精油在培养皿中的含量分别为 1, 3, 5, 7, 8 $\mu\text{L/L}$)。将培养皿立即密封, 并在 25 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 72 h。将 0.06, 0.18, 0.30, 0.42, 0.48 μL 蒸馏水点滴在 PDA 空白样上, 作为对照组。其他操作同前一步骤。

1.2.3.3 菌落直径和抑菌率的测定

1) 选用直径为 90 mm 的一次性培养皿, 在超净工作台上倒入高温灭菌的 PDA 培养基, 制成平板, 等到培养基凝固成型后接入待接种菌, 用微生物膜密封后置于 25 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱进行培养, 至菌丝长满培养皿时, 用直径为 6 mm 的打孔器在上述菌落边缘切下带菌培养基, 培养基制备均在无菌条件下进行。在培养皿(直径为 90 mm, 体积为 60 mL)的盖中央放置滤纸片, 然后将 1.8, 3.0, 4.2, 4.8, 5.4 $\mu\text{L/L}$ 的 1-MCP 溶液分别点在滤纸片上(使 1-MCP 在培养皿中的含量分别为 3, 5, 7, 8, 9 $\mu\text{L/L}$)。每种含量重复进行 3 次实验, 以加入无菌水作为空白对照。用镊子将每片的一块菌饼转移到不同含量的含药物培养基中, 并快速密封。每种含量重复进行 3 次实验, 置于 25 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中, 并在对照培养皿长满时测量菌落的直径。通过十字交叉方法对每个菌落测量 2 次, 以平均值代表菌落的大小, 抑菌率的计算公式如下:

纯生长量=菌落的平均直径-菌饼直径;

抑菌率=(对照纯生长量-处理纯生长量)/对照纯生长量×100%。

2) 将 0.06, 0.18, 0.30, 0.42, 0.48 μL 的丁香精油溶液分别点在滤纸片上(使丁香精油在培养皿中的含量分别为 1, 3, 5, 7, 8 $\mu\text{L/L}$)。其他操作同前一步骤。

1.2.4 活体试验处理

1) 为避免果实表面的微生物影响试验, 用乙醇(70%)消毒苹果表面, 然后用直径 3 mm 的消毒针沿苹果赤道均匀穿刺 2 个 3 mm 深的伤口。将伤口处的果汁晾干后, 分别接种 20 μL , 1×10^6 个/mL 霉菌悬浮液。将果实分别放入密封的保鲜盒(体积为 7 L)中, 分别含有 1, 3, 5, 7, 10 $\mu\text{L/L}$ 1-MCP 溶液(1-MCP 的含量分别为 70, 210, 350, 490, 700 μL)。同时, 用 70, 210, 350, 490, 700 μL 无菌水作为空白对照。于 25 $^{\circ}\text{C}$ 下贮藏 24 h 后, 将果实装入微孔袋于 25 $^{\circ}\text{C}$ 下贮藏, 每 2 d 测量 1 次病斑直径。每个处理重复做 2 次实验, 每次重复实验用果 10 个。

2) 将果实分别放入密封的保鲜盒(体积为 7 L)中, 分别含有 5, 7, 9, 10, 12 $\mu\text{L/L}$ 丁香精油溶液(丁香精油含量分别为 35, 49, 63, 70, 84 μL)。同时, 用 35, 49, 63, 70, 84 μL 无菌水作为空白对照。其他操作同前一步骤。

1.2.5 数据分析

采用 Excel 2010 软件处理数据, 采用 dps 软件进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 寒富苹果主要致病菌

从腐烂的寒富苹果中分离纯化出 2 种霉菌, 记为 M_1 , M_2 。对 2 株霉菌在 PDA 培养基上的菌落形态和水浸片进行镜检观察, 并查阅中国真菌志^[21-22]和相关鉴定手册^[23-25], 将其分为 2 个属, 其中 M_1 为链格孢属, M_2 为曲霉属, 具体描述见表 1。^[26]

M_1 的菌落特征及分生孢子形态见图 1。将菌落于 PDA 培养基上在 25 $^{\circ}\text{C}$ 条件下培养 7 d, 菌落颜色呈现出暗绿色或者黑色, 表现为绒状, 或者有同心圆环, 在光学显微镜(20 倍)下观察, 发现菌丝呈现出放射状; 孢子有隔膜; 分生孢子形状类似于保龄球。鉴定 M_1 为链格孢(*Alternaria*)。 M_2 的菌落特征及分生孢子形态见图 2, PDA 培养基在 25 $^{\circ}\text{C}$ 条件下培养菌落 7 d, 观察到菌落的颜色开始时为白色, 后来变成黑色, 背面无色, 质地为粉末状, 生长速度较快, 可铺满整个平板; 分生孢子头表现为顶囊球形, 呈褐黑色, 同时为放射状, 顶端孢子如同链形, 鉴定 M_2 为曲霉(*Aspergillus*)。

表1 霉菌菌落的特征
Tab.1 Characteristics of mold colonies

种类	编号	菌落特征	分生孢子特征
链格孢属	M ₁	菌落颜色为黑色或暗绿色, 呈绒状	分生孢子梗为单枝或不规则分枝, 长短不一, 黑色, 有隔膜, 单生或丛生
曲霉属	M ₂	菌丝开始时呈灰白色, 并且气生菌丝发育良好。经过一段时间后, 菌丝发生变化, 呈灰褐色, 孢子呈黑色, 菌落的蔓延性强, 生长旺盛, 菌丝可以覆盖整个平板	菌丝有隔膜, 顶囊明显, 呈椭圆形

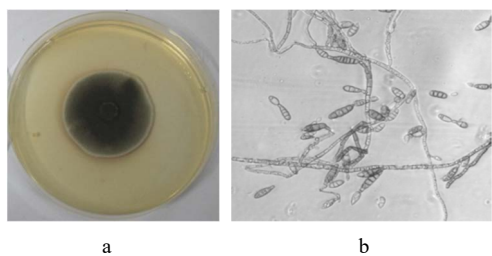


图1 链格孢的菌落特征及分生孢子特征
Fig.1 Colony characteristics and conidial characteristics of *Alternaria*

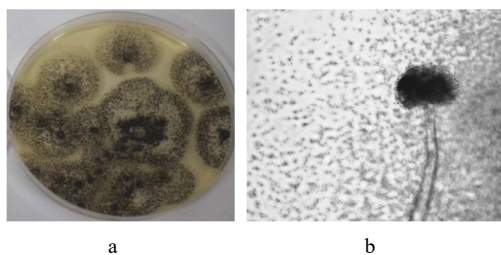


图2 曲霉的菌落特征及分生孢子特征
Fig.2 Colony characteristics and conidial characteristics of *Aspergillus*

2.2 寒富苹果主要病原菌致病力

由图3(同一组中, 不同字母表示差异显著($P<0.05$))可知, 接种链格孢和曲霉的寒富苹果病斑直径变化均大于2 mm, 可认为其为腐败霉菌。接种链格孢后, 在第2 d时寒富苹果的病斑直径可达到5.10 mm, 在第4 d时为8.28 mm, 在第6 d时达到12.21 mm。接种曲霉的寒富苹果在第6 d时, 病斑直径可达到53.59 mm。经显著性分析, 在2 d后接种曲霉的寒富苹果病斑直径增长量显著高于接种链格孢的寒富苹果($P<0.05$), 说明曲霉对寒富苹果的致病力显著高于链格孢。

2.3 1-MCP 对寒富苹果链格孢和曲霉的最低抑制含量、菌落直径和抑菌率的影响

如表2所示, 与CK组相比, 1-MCP最低使用含量(3 $\mu\text{L/L}$)对苹果链格孢几乎没有抑制作用, 而1-MCP含量为5 $\mu\text{L/L}$ 和7 $\mu\text{L/L}$ 的抑菌率分别为15.14%和64.90%, 因此可知1-MCP含量不同对苹果链格孢都有一定程度的抑制效果, 且抑制作用与1-MCP含量成正比。余下的2组含量梯度(8 $\mu\text{L/L}$ 和

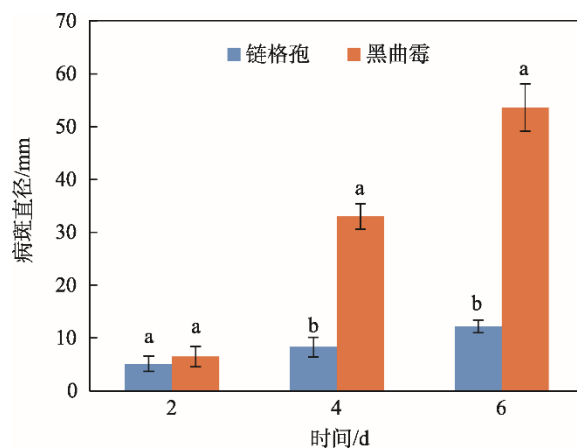


图3 引起寒富苹果腐烂的致病菌的链格孢和曲霉致病力比较

Fig. 3 Comparison of causality of *Alternaria* and *Aspergillus* causing pathogenic bacteria of "Hanfu" apples

9 $\mu\text{L/L}$)皆可完全抑制病原菌的生长, 所以从数据结果来看, 1-MCP对苹果链格孢的最低抑制含量为8 $\mu\text{L/L}$ 。

如表2所示, 与CK组相比, 1-MCP最低使用含量(3 $\mu\text{L/L}$)对苹果曲霉的抑制作用很小, 而1-MCP为5 $\mu\text{L/L}$ 和7 $\mu\text{L/L}$ 时的抑菌率分别为70.00%和77.14%, 因此可知不同含量1-MCP对苹果曲霉都有一定程度的抑制效果, 且抑制作用与1-MCP含量成正比。余下的2组含量梯度中, 1-MCP含量为8 $\mu\text{L/L}$ 的抑菌率为95.38%, 而1-MCP含量为9 $\mu\text{L/L}$ 可完全抑制病原菌的生长。从数据结果来看, 1-MCP对苹果曲霉的最低抑制含量为9 $\mu\text{L/L}$ 。

2.4 1-MCP 对苹果链格孢和曲霉病斑直径的影响

由图4可知, 5 $\mu\text{L/L}$ 1-MCP处理显著控制了苹果果实链格孢病斑直径的扩展。6 d后, 对照果的病斑直径达到17.10 mm, 在1-MCP含量为1, 3, 5 $\mu\text{L/L}$ 时, 随着1-MCP含量的升高, 病斑直径的扩展减缓, 5 $\mu\text{L/L}$ 1-MCP处理的病斑直径为14.54 mm。当1-MCP的含量为7, 10 $\mu\text{L/L}$ 时, 寒富苹果的病斑直径反而升高得更多, 大于对照组果实的病斑直径。此外, 接种链格孢在2, 4, 6 d后, 5 $\mu\text{L/L}$ 1-MCP处理组的果实病变直径分别为3.83, 6.32, 14.54 mm, 对照组分别为6.50, 11.75, 17.10 mm, 1 $\mu\text{L/L}$ 1-MCP处理组的果实分别为5.56, 10.54, 16.08 mm, 3 $\mu\text{L/L}$

1-MCP 处理的果实分别为 4.00, 8.04, 15.25 mm, 由表 3 可知, 随着时间的延长, 1-MCP 对链格孢的抑菌率有所下降。经显著性分析, 各处理组间都存在显著性差异, 在各时间段 5 μL/L 1-MCP 处理的抑菌率均为最高, 得出 5 μL/L 1-MCP 处理对苹果果实链格孢的病斑直径扩展具有显著的控制作用。在 1-MCP 含量小于 5 μL/L 时, 抑菌效果与含量成正比, 但是 7,

10 μL/L 的 1-MCP 处理反而会导致腐烂的增加, 这与徐小宁^[27]将 1-MCP 应用于红富士苹果贮藏中的研究结果一致。

由图 5 可以看出, 曲霉病斑直径随着接种时间的增加而不断扩大, 而采用 1-MCP 处理可起到抑制作用。在接种 2 d 后 1-MCP 处理果实的病斑直径加速扩展, 在 1-MCP 含量为 1, 3, 5 μL/L 时始终低于对照

表 2 不同含量 1-MCP 对链格孢和曲霉的菌落直径和抑菌率的影响
Tab.2 Effects of different concentrations of 1-MCP on colony diameter and antibacterial rate of *Alternaria* and *Aspergillus*

1-MCP 含量/(μL·L ⁻¹)	链格孢		曲霉	
	菌落直径/mm	抑菌率/%	菌落直径/mm	抑菌率/%
0(CK)	47.6±0.52 ^a	0±0.28 ^e	90.0±0.01 ^a	0±0.22 ^f
3	45.9±0.23 ^b	4.09±0.23 ^d	57.5±0.22 ^b	38.69±0.15 ^e
5	41.3±0.51 ^c	15.14±0.15 ^c	31.2±0.13 ^c	70.00±0.31 ^d
7	20.6±0.26 ^d	64.90±0.15 ^b	25.2±0.19 ^d	77.14±0.64 ^c
8	0	100±0.28 ^a	8.2±0.01 ^e	97.38±0.54 ^b
9	0	100±0.26 ^a	0	100±0.38 ^a

注：同一行数据后的小写字母不同者差异显著（*P*<0.05）

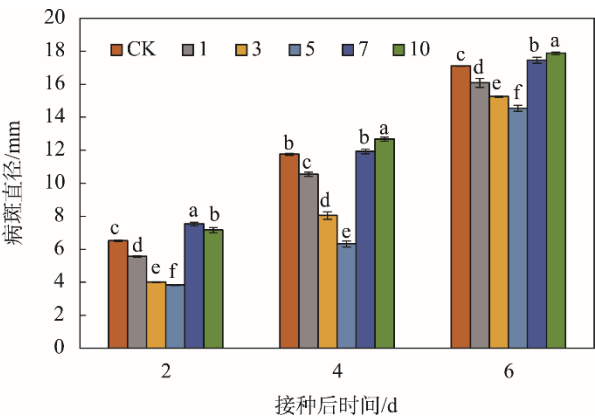


图 4 1-MCP 对寒富苹果采后链格孢病斑直径的影响
Fig.4 Effects of 1-MCP on diameter of *Alternaria* in postharvest Hanfu apple

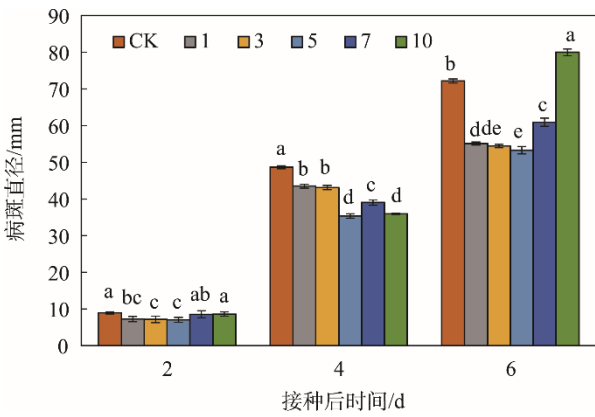


图 5 1-MCP 对寒富苹果采后曲霉病斑直径的影响
Fig.5 Effects of 1-MCP on diameter of *Aspergillus* in postharvest Hanfu apple

表 3 不同含量 1-MCP 对链格孢、曲霉抑菌率的影响
Tab.3 Effects of different concentrations of 1-MCP on antibacterial rate of *Alternaria* and *Aspergillus*

菌种	1-MCP 含量/(μL·L ⁻¹)	抑菌率/%		
		2 d	4 d	6 d
链格孢	1	26.95 ±5 ^e	13.79±0.13 ^c	7.25±0.27 ^c
	3	71.33±3 ^b	42.37±0.23 ^b	13.12 ±0.04 ^b
	5	76.29±3 ^a	62.10±0.18 ^c	18.17±0.18 ^a
	7	-29.24±0.11 ^e	-1.98±0.14 ^d	-2.53 ±0.18 ^d
	10	-18.81±0.16 ^d	-10.48±0.13 ^e	-5.44±8 ^e
曲霉	1	28.31±0.73 ^c	11.32±0.54 ^d	24.67±0.39 ^b
	3	30.20±0.88 ^b	12.20±0.58 ^d	25.66±0.46 ^b
	5	32.06±0.69 ^a	29.16±0.62 ^a	27.31±1.00 ^a
	7	6.85±0.95 ^d	21.14±0.72 ^c	16.28±1.13 ^c
	10	5.79±0.58 ^d	27.84±0.16 ^b	-11.30±0.90 ^d

注：同一列数据后小写字母不同者差异显著（*P*<0.05）

组, 10 $\mu\text{L/L}$ 处理组接种 6 d 后, 病斑直径达到 80 mm, 病变的直径大于对照组果实, 与对照组显著不同。在接种 4 d 后, 处理组的病斑直径均小于对照组, 但在 6 d 后 7, 10 $\mu\text{L/L}$ 处理组的病斑直径大于 1, 3, 5 $\mu\text{L/L}$ 处理组, 各处理组间差异性显著。同时由表 3 可知, 5 $\mu\text{L/L}$ 的 1-MCP 处理对寒富苹果上曲霉的抑菌率最高, 6 d 时仍可达到 27.31%。与 1-MCP 对链格孢的作用效果相同, 当 1-MCP 的含量低于 5 $\mu\text{L/L}$ 时, 随着 1-MCP 含量的升高, 1-MCP 对寒富苹果曲霉的抑菌率也呈现上升趋势。当 1-MCP 的含量高于 5 $\mu\text{L/L}$ 时, 抑菌率均下降。说明 1-MCP 的使用量不宜过高, 含量为 5 $\mu\text{L/L}$ 时对寒富苹果曲霉的抑制效果最好。

2.5 丁香精油对寒富苹果链格孢和曲霉的最低抑制含量、菌落直径和抑菌率的影响

此次实验结果表明 (见表 4), 与 CK 组相比, 丁

香精油最低使用含量 (1 $\mu\text{L/L}$) 对苹果链格孢的抑菌率仅为 7.20%, 而 3 $\mu\text{L/L}$ 丁香精油处理的抑菌率为 65%, 因此可知不同含量丁香精油对苹果链格孢都有一定程度的抑制效果, 且抑制作用与丁香精油的含量成正比。余下的 3 组含量梯度 (5, 7, 8 $\mu\text{L/L}$) 的抑菌率为 100%, 可完全抑制病原菌的生长。从数据结果来看, 丁香精油对苹果链格孢的最低抑制含量为 5 $\mu\text{L/L}$ 。

此次实验结果表明 (见表 4), 与 CK 组相比, 丁香精油最低使用含量 (1 $\mu\text{L/L}$) 对苹果曲霉的抑菌率仅为 53.81%, 而 3, 5 $\mu\text{L/L}$ 丁香精油处理的抑菌率分别 68.69% 和 80.71%。由此可知, 不同含量丁香精油处理对苹果曲霉都有一定的抑制效果, 且抑制作用与丁香精油含量成正比。余下的 2 组含量梯度 (7, 8 $\mu\text{L/L}$) 的抑菌率为 100%, 可完全抑制病原菌的生长。从数据结果来看, 丁香精油对苹果曲霉的最低抑制含量为 7 $\mu\text{L/L}$ 。

表 4 不同含量丁香精油对链格孢、曲霉菌落直径和抑菌率的影响

Tab.4 Effects of different concentrations of clove essential oil on colony diameter and antibacterial rate of *Alternaria* and *Aspergillus*

丁香精油含量/($\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$)	链格孢		曲霉	
	菌落直径/mm	抑菌率/%	菌落直径/mm	抑菌率/%
0(CK)	46.3 $\pm$ 0.36 ^a	0 $\pm$ 0.21 ^d	90 $\pm$ 0.55 ^a	0 $\pm$ 0.61 ^c
1	43.4 $\pm$ 0.45 ^b	7.20 $\pm$ 0.55 ^c	44.8 $\pm$ 0.46 ^b	53.81 $\pm$ 0.31 ^d
3	22.1 $\pm$ 0.67 ^c	65 $\pm$ 0.79 ^b	32.3 $\pm$ 0.23 ^c	68.69 $\pm$ 0.21 ^c
5	0	100 $\pm$ 0.26 ^a	22.2 $\pm$ 12 ^d	80.71 $\pm$ 12 ^b
7	0	100 $\pm$ 0.19 ^a	0	100 $\pm$ 0.25 ^a
8	0	100 $\pm$ 0.24 ^a	0	100 $\pm$ 0.31 ^a

注: 同一行数据后小写字母不同者差异显著 ($P<0.05$)。

2.6 丁香精油对苹果链格孢和曲霉病斑直径的影响

由图 6、表 5 可以看出, 在活体试验中各含量的丁香精油均不能完全抑制致病菌在采后苹果上的生长。接种后对照组的病斑直径一直大于处理组, 经显

著性分析发现, 各处理组与对照组均存在显著性差异 ($P<0.05$), 说明丁香精油具有抑制苹果致病菌的作用, 与李鹏霞^[28]等的研究结果一致。在一定范围内, 含量越大抑菌效果越好。在第 6 d 时, 12 $\mu\text{L/L}$ 的丁香精油处理对链格孢的抑菌率可达 79.63%。

由图 7、表 5 可知, 随着接种后时间的延长, 寒

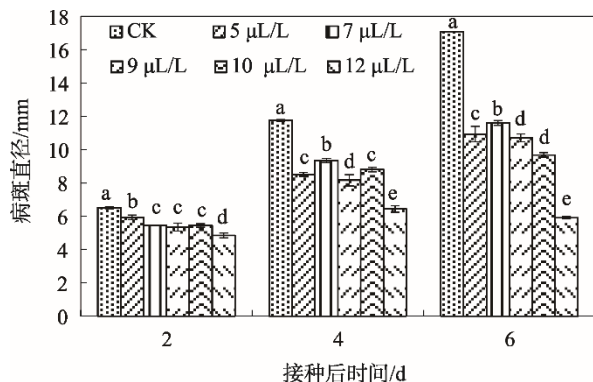


图 6 丁香精油对寒富苹果采后链格孢病斑直径的影响
Fig.6 Effects of clove oil on diameter of *Alternaria* in postharvest Hanfu apple

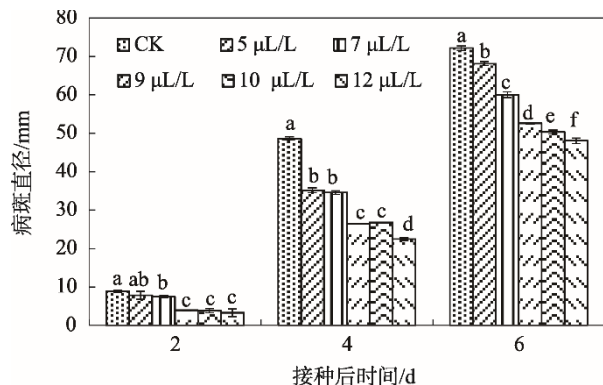


图 7 丁香精油对寒富苹果采后曲霉病斑直径的影响
Fig.7 Effects of clove oil on diameter of *Aspergillus* in postharvest Hanfu apple

表 5 不同含量丁香精油对链格孢、曲霉抑菌率的影响
Tab.5 Effects of different concentrations of clove essential oil on antibacterial rate of *Alternaria* and *Aspergillus*

菌种	丁香精油含量/($\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$)	抑菌率/%		
		2 d	4 d	6 d
链格孢	5	15.95±0.13 ^e	36.97±12 ^c	43.68±0.45 ^d
	7	29.79±0.02 ^d	27.45±12 ^e	38.97±0.15 ^e
	9	33.07±0.24 ^b	40.99±0.34 ^b	45.28±0.24 ^c
	10	312±0.11 ^c	33.64±0.13 ^d	52.58±0.14 ^b
	12	47.17±0.14 ^a	60.63±0.19 ^a	79.36±7 ^a
曲霉	5	18.01±1.01 ^e	29.48±0.61 ^e	5.82±0.50 ^e
	7	23.51±0.26 ^d	30.78±0.50 ^d	17.59±0.73 ^d
	9	83.61±0.16 ^c	48.63±8 ^b	28.32±0.13 ^c
	10	85.66±0.53 ^b	47.87±0.04 ^c	31.55±0.49 ^b
	12	94.73±1.03 ^a	57.32±0.35 ^a	34.82±0.70 ^a

注：同一列数据后小写字母不同者差异显著 ($P<0.05$)

富苹果的病斑直径呈直线上升趋势，而抑菌率总体呈现下降趋势。在接种后 2 d 时，丁香精油的抑菌率随着使用含量的增加而上升，12 $\mu\text{L/L}$ 处理组的抑菌率达到 94.73%。在第 6 d 时，12 $\mu\text{L/L}$ 处理组对曲霉的抑菌率仅为 34.82%，但仍高于其他处理组，经显著性分析可知，各处理组间差异性显著。证明丁香精油对寒富苹果曲霉具有抑制作用，且在一定范围内含量越大对曲霉的抑制效果越显著。

3 讨论

因为苹果营养丰富，因此在较长货架期间或贮藏条件不适当的情况下，易受病原微生物侵染，从而引起果实腐烂。其中，引起病害的常见致病菌是霉菌^[29]，所以防止苹果腐烂变质已成为苹果贮藏和货架过程中的重要问题。在鲜切苹果中，霉菌是主要致病微生物^[30]。霉菌通常可以分为田间菌和贮藏菌两大类，其中链格孢属于在果实采收前侵染的田间菌，曲霉和青霉属于在贮藏期间侵染的贮藏菌^[31]。

1-MCP 可以增强香梨对由链格孢引起的黑斑病的抗病性^[32]。在对甜柿的研究中发现，1-MCP 和仲丁胺组合熏蒸处理时病原菌染菌率最低^[33]。在对番茄的研究中也证明，1-MCP 可降低贮藏期内的腐烂率^[34]。文中 1-MCP 处理对苹果链格孢的最低抑制含量为 8 $\mu\text{L/L}$ ，对苹果曲霉的最低抑制含量为 9 $\mu\text{L/L}$ 。李江阔等研究 1-MCP 对苹果中青霉作用的结果表明，5 $\mu\text{L/L}$ 1-MCP 处理显著控制了苹果果实的腐烂率和病害的扩展^[16]，证明 1-MCP 处理对致腐霉菌有一定的抑制作用。

有研究表明，500 mg/L 的丁香酚处理可以完全抑制革兰氏阳性和革兰氏阴性细菌的生长^[35]。文中结果表明，丁香精油不能完全抑制果实的腐烂，与李鹏霞等^[28]的研究结果相同。对不同霉菌而言，丁香精油

的 MIC 不完全相同，这可能与丁香精油除了含有丁香酚外，还含有青叶醇、香兰素、愈创木酚和苯甲醇等其它防腐及抑菌作用很强的物质有关^[36]。

4 结语

实验中在腐烂寒富苹果中分离纯化得到曲霉属和链格孢属等 2 种霉菌。通过活体实验，证明 2 种霉菌使寒富苹果病斑直径变化均大于 2 mm，认定为腐败菌。致腐能力由大到小为曲霉、链格孢。活体实验中 5 $\mu\text{L/L}$ 1-MCP 处理对苹果果实链格孢、曲霉的病斑直径扩展具有显著的控制作用。在一定含量范围内，1-MCP 处理的效果随其含量的增加而加强，但是过高含量的 1-MCP 处理反而会导致腐烂加剧。文中实验表明，丁香精油对苹果曲霉的最低抑制含量（MIC）为 7 $\mu\text{L/L}$ ，对苹果链格孢的最低抑制含量为 5 $\mu\text{L/L}$ ，但在活体实验中效果不理想，不能完全抑制果实的腐烂，12 $\mu\text{L/L}$ 丁香精油处理在第 6 d 时对链格孢的抑菌率可达 79.36%，对曲霉的抑菌率达到 34.82%，说明在一定范围内含量越大对链格孢和曲霉的抑制效果越显著。

实验证明，使用 5 $\mu\text{L/L}$ 的 1-MCP 或 12 $\mu\text{L/L}$ 丁香精油对寒富苹果进行处理可以在一定程度上减少链格孢和曲霉引起的苹果腐烂病害，但均不能完全抑制致腐菌在寒富苹果上的生长。说明 1-MCP 和丁香精油在实践应用时，还需通过控制施药时间、次数等变量或与其他保鲜措施的结合应用，以达到更好的贮藏保鲜效果。

参考文献：

[1] 高月菊, 佟海恩, 宣景宏. 对我省发展寒富苹果的建议[J]. 北方果树, 2002, 23(3): 34.

- GAO Yue-ju, TONG Hai-en, XUAN Jing-hong. Suggestions on the Development of Hanfu Apples in our Province[J]. Northern Fruit Tree, 2002, 23(3): 34.
- [2] 王宏, 徐贵轩, 宋哲, 等. 康平县寒富苹果生产现状、存在的问题及解决对策[J]. 辽宁农业科学, 2008, 41(1): 44—45.
- WANG Hong, XU Gui-xuan, SONG Zhe, et al. Current Status, Existing Problems and Solutions of Hanfu Apple Production in Kangping County[J]. Liaoning Agricultural Sciences, 2008, 41(1): 44—45.
- [3] XU L, DU Y. Effects of Yeast Antagonist in Combination with UV-C treatment on Postharvest Diseases of Pear fruit[J]. Biological Control, 2012, 57(3): 451—461.
- [4] 李保华, 王彩霞, 董向丽. 我国苹果主要病害研究进展与病害防治中的问题[J]. 植物保护, 2013, 39(5): 46—54.
- LI Bao-hua, WANG Cai-xia, DONG Xiang-li. Research Progress of Main Diseases of Apples in China and Problems in Disease Control[J]. Plant Protection, 2013, 39(5): 46—54.
- [5] 刘程惠, 吴伟男, 胡文忠, 等. 苹果腐败霉菌的拮抗酵母菌筛选鉴定及拮抗机理初探[J]. 食品工业科技, 2018, 39(12): 132—163.
- LIU Cheng-hui, WU Yi-nan, HU Wen-zhong, et al. Screening and Identification of Antagonistic Yeast Against Apple Spoilage Mold and Its Antagonistic Mechanism[J]. Food Science and Technology, 2018, 39(12): 132—163.
- [6] BARAD S, SELA N, KUMAR D, et al. Fungal and Host Transcriptome Analysis of pH-regulated Genes During Colonization of Apple Fruits by *Penicillium expansum*[J]. BMC Genomics, 2016, 17: 330—356.
- [7] AKIMITSU K, TSUGE T, KODAMA M, et al. Alternaria Host-selective Toxins: Determinant Factors of Plant Disease[J]. Journal of General Plant Pathology, 2014, 80(2): 109—122.
- [8] MOSCETTI R, CARLETTI L, MONARCA D, et al. Effect of Alternative Postharvest Control Treatments on the Storability of 'Golden Delicious' Apples[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2013, 93(11): 2691—2697.
- [9] CAFFIERA V, CAM B L, EXPERT P, et al. A New Scab-like Disease on Apple Caused by the Formerly Saprotrophic Fungus *Venturia asperata*[J]. Plant Pathology, 2012, 61(5): 915—924.
- [10] LI J, LEI H, SONG H, et al. 1-Methylcyclopropene (1-MCP) Suppressed Postharvest Blue Mold of Apple Fruit by Inhibiting the Growth of *Penicillium expansum*[J]. Postharvest Biology & Technology, 2017, 125: 59—64.
- [11] 魏琦. 竹醋液对苹果防腐保鲜的研究[D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2010.
- WEI Qi. Study on Anti-corrosion and Preservation of Apple by Bamboo Vinegar[D]. Beijing: Chinese Academy of Forestry, 2010.
- [12] 周晓婉, 唐永萍, 石亚莉, 等. 1-MCP 对低温贮藏苹果灰霉病抗性的诱导作用[J]. 食品科学, 2016, 37(12): 254—260.
- ZHOU Xiao-wan, TANG Yong-ping, SHI Ya-li, et al. Induction of 1-MCP Resistance to Low Temperature Storage of Apple Gray Mold[J]. Food Science, 2016, 37(12): 254—260.
- [13] 朱金薇, 冯江涛, 延卫, 等. 1-甲基环丙烯在苹果贮藏保鲜中的应用研究进展[J]. 北方园艺, 2010(20): 195—198.
- ZHU Jin-wei, FENG Jiang-tao, YAN Wei, et al. Advances in the Application of 1-Methylcyclopropene in Apple Storage and Preservation[J]. Northern Horticulture, 2010(20): 195—198.
- [14] WATKINS C B. The Use of 1-Methylcyclopropene (1-MCP) on Fruits and Vegetables [J]. Biotechnology Advances, 2006, 24(4): 389—409.
- [15] 王晓飞, 杨艳青, 任小林, 等. 1-MCP 对‘粉红女士’苹果果实采后生理及其品质的影响[J]. 食品科学, 2014, 35(18): 219—223.
- WANG Xiao-fei, YANG Yan-qing, REN Xiao-lin, et al. Effects of 1-MCP on Postharvest Physiology and Quality of 'Pink Lady' Apple Fruit[J]. Food Science, 2014, 35(18): 219—223.
- [16] LI J, LEI H, SONG H, et al. 1-Methylcyclopropene (1-MCP) Suppressed Postharvest Blue Mold of Applefruit by Inhibiting the Growth of *Penicillium expansum*[J]. Postharvest Biology & Technology, 2017, 125: 59—64.
- [17] 周建新. 丁香油抑菌效果与抑菌成分的研究[J]. 食品工业, 2000(3): 24—25.
- ZHOU Jian-xin. Study on Antibacterial and Antibacterial Ingredients of Clove Oil[J]. Food Industry, 2000(3): 24—25.
- [18] 吴传茂, 陈雄, 吴小刚. 丁香油树脂抑菌实验[J]. 湖北农业科学, 2001(6): 78.
- WU Chuan-mao, CHEN Xiong, WU Xiao-gang. Antibacterial Experiment of Clove Oil Resin[J]. Hubei Agricultural Sciences, 2001(6): 78.
- [19] 关文强, 李淑芬. 丁香精油对果蔬采后病原菌抑制效应研究[J]. 食品科学, 2005, 26(12): 227—230.
- GUAN Wen-qiang, LI Shu-fen. Study on the Inhibition Effect of Clove Oil on Postharvest Pathogenic Bacteria of Fruits and Vegetables[J]. Food Science, 2005, 26(12): 227—230.
- [20] 夏洪梅, 陈珊, 刘东波, 等. 最低抑制浓度法实验技术的改进与探析 [J]. 实验室科学, 2010, 13(5): 73—75.
- XIA Hong-mei, CHEN Shan, LIU Dong-bo, et al. Improvement and Analysis of Experimental Techniques of Minimum Inhibition Concentration Method[J]. Laboratory Science, 2010, 13(5): 73—75.
- [21] 孔华忠. 中国真菌志 第五卷 (曲霉属及其相关有性

- 型属) [M]. 北京: 科学出版社, 2007.
- KONG Hua-zhong. Chinese Fungi Volume 5 (*Aspergillus* and Related Sexual Genus) [M]. Beijing: Science Press, 2007.
- [22] 孔华忠. 中国真菌志 第十六卷 (链格孢属) [M]. 北京: 科学出版社, 2007.
- KONG Hua-zhong. Chinese Fungi Volume 16 (*Alternaria*) [M]. Beijing: Science Press, 2007.
- [23] 魏景超. 真菌鉴定手册 [M]. 上海: 科学技术出版社, 1986.
- WEI Jing-chao. Handbook of Fungal Identification [M]. Shanghai: Science and Technology Press, 1986.
- [24] 中国科学院微生物研究室. 常见与常用真菌 [M]. 北京: 科学出版社, 1978.
- Department of Microbiology, Chinese Academy of Sciences. Common and Commonly Used Fungi [M]. Beijing: Science Press, 1978.
- [25] PITT J I. A Laboratory Guide Common *Penicillium* Species [M]. North Ryde: Division of Food Processing, 1988.
- [26] 刘程惠, 马涛, 胡文忠, 等. 鲜切苹果腐败霉菌的分离鉴定及致病力的研究 [J]. 食品工业科技, 2016(7): 131—136.
- LIU Cheng-hui, MA Tao, HU Wen-zhong, et al. Isolation and Identification of Spoilage Mold of Fresh-cut Apple and Research on Its Causativeness [J]. Food Science and Technology, 2016(7): 131—136.
- [27] 徐小宁, 马丽红. 1-甲基环丙烯在红富士苹果贮藏中的应用 [J]. 西北园艺 (果树专刊), 2009(1): 39—40.
- XU Xiao-ning, MA Li-hong. Application of 1-Methylcyclopropene in Red Fuji Apple Storage [J]. Northwest Horticulture (Fruit Tree Special Issue), 2009(1): 39—40.
- [28] 李鹏霞, 邵世达, 冯俊涛, 等. 丁香精油和丁香酚对苹果贮藏期病害及果实品质的影响 [J]. 农业工程学报, 2006, 22(6): 173—176.
- LI Peng-xia, SHAO Shi-da, FENG Jun-tao, et al. Effects of Clove Oil and Eugenol on Apple Disease and Fruit Quality During Storage [J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2006, 22(6): 173—176.
- [29] 王雅, 樊明涛, 赵萍, 等. 苹果中霉菌的分离及初步鉴定 [J]. 食品工业科技, 2009(10): 165—166.
- WANG Ya, FAN Ming-tao, ZHAO Ping, et al. Isolation and Preliminary Identification of Mold in Apples [J]. Science and Technology of Food Industry, 2009(10): 165—166.
- [30] OMSOLIU G, ROJASGRAÜ M A, ALANDES González L, et al. Recent Approaches Using Chemical Treatments to Preserve Quality of Fresh-cut Fruit: a Review [J]. Postharvest Biology & Technology, 2010, 57(3): 139—148.
- [31] HERCEG Z, REEK JAMBRAK A, VUKUT, et al. The Effect of High-power Ultrasound and Gas Phase Plasma Treatment on *Aspergillus* spp and *Penicillium* spp Count in pure culture [J]. Journal of Applied Microbiology, 2015, 118(1): 132—141.
- [32] 陈维维. 库尔勒香梨萼端黑斑病病原学、发生规律和防治技术研究 [D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2014.
- CHEN Wei-wei. Study on Etiology, Regularity, Prevention and Control Technology of the Calyx Black Spot Disease of Korla Fragrant Pear [D]. Urumqi: Xinjiang Agricultural University, 2014.
- [33] 李锐. 甜柿储运病害与调控技术研究 [D]. 天津: 天津科技大学, 2009.
- LI Rui. Research on Disease and Regulation Technology of Sweet Persimmon Storage and Transportation [D]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2009.
- [34] HAI S, GUBLER W D. Effect of 1-Methylcyclopropene (1-MCP) on Reducing Postharvest Decay in Tomatoes (*Solanum Lycopersicum* L) [J]. Postharvest Biology & Technology, 2012, 64(1): 133—137.
- [35] BLASZYK M, HOLLEY R A. Interaction of Monolaurin, Eugenol and Sodium Citrate on Growth of Common Meat Spoilage and Pathogenic Organisms [J]. International Journal of Food Microbiology, 1998, 39: 175—183.
- [36] 回瑞华, 李铁纯. GC/MS 分析紫丁香花与叶中的挥发性化学成分 [J]. 质谱学报, 2002, 23(4): 210—210.
- HUI Rui-hua, LI Tie-chun. GC/MS Analysis of Volatile Chemical Components in Lilac Flowers and Leaves [J]. Journal of Chinese Mass Spectrometry Society, 2002, 23(4): 210—210.