

# 红肉火龙果采后病原菌分离鉴定与植物精油抑菌研究

刘瑞玲<sup>1,2</sup> 郜海燕<sup>1,2</sup> 陈杭君<sup>1,3</sup> 房祥军<sup>1,3</sup> 吴伟杰<sup>1,4</sup>

(1. 浙江省农业科学院食品科学研究所, 杭州 310021; 2. 农业部果品产后处理重点实验室, 杭州 310021; 3. 浙江省果蔬保鲜与加工技术研究重点实验室, 杭州 310021; 4. 中国轻工业果蔬保鲜与加工重点实验室, 杭州 310021)

**摘要:** 分离、纯化并鉴定了浙江产区红肉火龙果贮藏期病原菌, 筛选出对抑制病原菌效果较好的精油, 并验证了该精油抑菌效果。通过分离、纯化及致病性检测, 得到了病原菌菌株 HS3 和 HS6。以病原菌 18S rDNA 序列进行进化树分析, 确定两种病原菌为层生镰刀菌和平头炭疽菌。选择 6 种植物精油进行抑菌性试验, 结果发现香芹酚精油、肉桂精油及百里香精油在 2 000  $\mu\text{L}/\text{L}$  时对两种病原菌生长抑制率均为 100%。采用体外直接接触法和体外熏蒸法, 研究了香芹酚精油、肉桂精油和百里香精油对两种病原菌的抑制效果, 发现香芹酚精油表现出较强的抑菌性。无论直接接触还是熏蒸方式, 香芹酚精油对层生镰刀菌和平头炭疽菌的抑菌效果均优于肉桂精油和百里香精油。精油熏蒸处理使接种层生镰刀菌和平头炭疽菌火龙果腐烂率下降, 香芹酚精油的效果最优, 可作为火龙果贮藏前的熏蒸剂。研究结果可为浙江地区火龙果贮藏期腐烂病害的预防和控制提供一定的参考依据。

**关键词:** 红肉火龙果; 采后病害; 精油; 抑菌效果; 病原菌; 分离鉴定

中图分类号: S667; S432.4<sup>+</sup>4 文献标识码: A 文章编号: 1000-1298(2018)08-0338-08

## Isolation, Identification and Inhibition of Pathogens from Red Pitaya Fruit during Storage

LIU Ruiling<sup>1,2</sup> GAO Haiyan<sup>1,2</sup> CHEN Hangjun<sup>1,3</sup> FANG Xiangjun<sup>1,3</sup> WU Weijie<sup>1,4</sup>

(1. Food Science Institute, Zhejiang Academy of Agricultural Science, Hangzhou 310021, China

2. Key Laboratory of Post-harvest Handling of Fruits, Ministry of Agriculture, Hangzhou 310021, China

3. Key Laboratory of Fruits and Vegetables Postharvest and Processing Technology Research of Zhejiang Province, Hangzhou 310021, China

4. Key Laboratory of Postharvest Preservation and Processing of Fruits and Vegetables, China National Light Industry, Hangzhou 310021, China)

**Abstract:** Red pitaya fruit is highly susceptible to fungal infection during postharvest, causing quality deterioration and huge economic losses. This research was intended to isolate, purify and identify the pathogens which cause rotting of red pitaya during storage in Zhejiang Province, screen essential oils for controlling the pathogenic isolates, and test their effectiveness. HS3 and HS6 were identified as pathogens through isolation, purification and pathogenicity tests. These two strains were proved as *F. proliferatum* and *C. fruticola* by morphological identification and rDNA - ITS molecular identification. Six essential oils were investigated for their activity to control these pathogens. The result indicated that carvacrol, cinnamon and thyme oil showed complete inhibitory effect on all pathogens at a concentration of 2 000  $\mu\text{L}/\text{L}$ . Then, the inhibitory effects of carcanol, cinnamon and thyme oil on these two pathogens were studied by direct contact in vitro and in vitro fumigation. It was found that carcanol showed higher antifungal activity against *F. proliferatum* and *C. fruticola* than cinnamon and thyme in the drug sensitivity test. Moreover, essential oil fumigation inhibited the decay incidence of pitaya fruit inoculated with *F. proliferatum* and *C. fruticola* during storage at 4°C and carcanol showed the best effect. Carcanol oil seemed to be a promising potential fumigant. The results can provide reference for disease control during storage of red pitaya in Zhejiang Province.

**Key words:** red pitaya; postharvest decay; essential oil; antibacterial effect; pathogen; isolation and identification

收稿日期: 2018-05-01 修回日期: 2018-06-07

基金项目: 国家重点研发计划项目(2017YFD0401301, 2018YFD0401304)和国家自然科学基金项目(31701658)

作者简介: 刘瑞玲(1988—),女,助理研究员,主要从事果蔬品质保持与保鲜技术研究, E-mail: ruilingliu2005@163.com

通信作者: 郜海燕(1958—),女,研究员,博士生导师,主要从事食品物流保鲜与质量控制研究, E-mail: spsghy@163.com

## 0 引言

火龙果是仙人掌科量天尺属,属典型的热带植物。火龙果风味独特,含有丰富的维生素、甜菜苷以及水溶性膳食纤维<sup>[1]</sup>,具有降血脂、养颜减肥、抗氧化和抗衰老等功效<sup>[2-4]</sup>。按果皮和果肉颜色,火龙果可分为红皮白肉、红皮红肉、黄皮白肉3类<sup>[5]</sup>。近年来,随着温室技术的发展,浙江地区已有一定规模的种植面积,其中以红肉火龙果为主。红肉火龙果色泽鲜艳、肉质细嫩、鲜食品质较好,富含甜菜碱,营养价值高。但其含水率高、果皮较薄,采后极易失水皱缩或腐烂,使其耐贮藏性比白肉火龙果差。火龙果采后病害将造成巨大经济损失,已成为制约浙江种植区产业发展的主要问题。

研究表明,火龙果采后主要病害是炭疽病、黑斑病和软腐病等<sup>[6]</sup>。有关火龙果果实采后病原菌分离鉴定的研究已有一些报道,MA等<sup>[7]</sup>研究表明,镰刀菌(*Fusarium spp.*)和链格孢菌(*Alternaria spp.*)是上海市进口火龙果的主要采后病原菌。GUO等<sup>[8]</sup>鉴定,引起云南省火龙果果实炭疽病的主要病害为平头炭疽菌(*C. truncatum*)。姚昇华等<sup>[9]</sup>认为,仙人掌平脐蠕孢(*Bipolaris cactivora*)是引起越南红心火龙果黑腐病的主要致病菌。然而,浙江地区主栽火龙果品种的采后病原菌种类和防治方法未见相关报道。因此,分离和鉴定浙江红肉火龙果采后主要致病菌,对减少采后物流损失、增加经济效益具有重要意义。

目前,国内外火龙果保鲜的方法主要有低温贮藏、减压贮藏、热处理、辐照处理等物理保鲜技术,以及使用1-甲基环丙烯(1-methylcyclopropene, 1-MCP)、CaCl<sub>2</sub>、壳聚糖等防腐保鲜剂的化学保鲜技术<sup>[6, 10-13]</sup>。化学杀菌剂虽是防治果蔬采后病害的重要手段,但具有残留量高、污染环境、易使病原菌产生抗药性等负面效应,不宜长期使用。植物精油以其安全、低毒、高效、环境友好等特点作为化学保鲜剂的良好替代品,是一种极具潜力的天然杀菌剂<sup>[14-15]</sup>。植物精油(如香芹酚、肉桂醛、麝香草酚、AITC等)对多种果蔬采后病原菌有较强的抑制作用,能够减缓采后病害的发生<sup>[16-17]</sup>。植物精油对火龙果采后病原菌抑制效果研究,至今未见文献报道。

本文对浙江地区红肉火龙果果实采后低温贮藏过程中的病原菌进行分离纯化,并对其进行形态学和分子生物学鉴定。同时,采用体外直接接触和体外熏蒸试验,比较6种植物精油对火龙果采后主要病原菌的抑菌效果,以筛选出抑菌效果较好的精油,旨在为火龙果采后病害控制提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

果实:红肉火龙果,2017年7月21日采自浙江省杭州市火龙果基地,并用保鲜车24h内运至实验室。挑选颜色均匀、无病虫害、无机械损伤的果实于(7±1)℃冷库中贮藏,待自然发病后进行病原菌的分离鉴定。

试剂:肉桂精油、百里香精油、香芹酚精油、丁香精油、罗勒精油和芳樟醇均为单方精油,购自江西金源天然香料有限公司;无水乙醇、三氯甲烷、乙酸乙酯、葡萄糖、琼脂粉,均为分析纯,购于浙江常青化工厂;马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)、马铃薯葡萄糖肉汤培养基(PDB)购于上海盛思生物科技有限公司;DNA植物kit基因组织提取试剂盒购于TaKaRa Bio有限公司;SanPrep柱式DNA胶回收试剂盒购于上海生工生物工程有限公司。

仪器:MLS-3781L-PC型高压蒸汽灭菌器(松下健康医疗器械株式会社);台式高速低温冷冻离心机(美国Thermo公司);DYY-11型电泳仪电源和DYCP-31F型电泳仪(北京六一生物科技有限公司);Peltier Thermal Cycler MG48型普通PCR仪(美国BioRad公司);WD-9413C型凝胶成像分析系统(北京六一生物科技有限公司);MJX-160B-Z型霉菌培养箱(上海博讯实业有限公司医疗设备厂)。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 病原菌的分离纯化

将自然发病的火龙果果实按病症分组。首先用灭菌的手术刀在病健交界处切取约3mm的组织块,经75%酒精表面消毒30s,用无菌水清洗3次,置于PDA培养基平板上,每一病症组5个平板,于25℃恒温培养箱中暗培养。待菌落直径生长至1~3cm时,用灭菌的接种针挑取菌落边缘的菌丝,置于新的PDA培养基,于25℃恒温培养箱中暗培养,重复上述操作3~5次,直至获得纯培养物。观察记录菌落形态学特征,并对病原菌孢子和菌丝进行显微形态观察、拍照。将纯化后病原菌接种PDA培养基上,培养一段时间后,观察菌落培养性状,包括菌落的形状和颜色;挑取病原菌制作载玻片,镜检并观察分生孢子的类型、形状、大小和色泽等。

本试验分离的菌均为真菌,根据各致病菌株PDA培养基上的菌落形态、菌丝和孢子的特征,参照文献[18]进行鉴定。

#### 1.2.2 病原菌的致病性检测

按照柯赫法则进行致病性检测。采用无菌水洗脱纯化培养的菌株,收集孢子,利用血球计数板配制

成孢子浓度为  $10^5$  CFU/mL 的悬浮液。挑选健康火龙果果实,先用清水洗净,再用 75% 乙醇对果实表面进行消毒,然后用 2% 的次氯酸钠浸泡 2 min 后,再用无菌水冲洗 2 遍,晾干备用。接种时用消毒接种针在果实赤道部刺伤(直径约 3 mm,深度约 4 mm),分别接种 10  $\mu$ L 孢子悬浮液,以接种无菌水的果实作为对照。将以上处理果实放置于尺寸(长 $\times$ 宽 $\times$ 高)400 mm $\times$ 300 mm $\times$ 150 mm 的塑料筐中,贮藏于 25 $^{\circ}$ C,保持相对湿度约 95%。定期观察发病情况,显现病症后再次分离鉴定。将分离出的菌株与所接菌株的菌落形态及菌丝形态进行比较,以判断是否一致。

### 1.2.3 病原菌分子生物学鉴定

#### (1) 病原菌基因组 DNA 提取

以分离得到的病原菌为材料,挑取少量菌丝,转接到 50 mL 马铃薯葡萄糖液体培养基(PDB)培养液中,25 $^{\circ}$ C、150 r/min 培养 4~5 d 后,用无菌滤纸过滤获得菌丝体,再用无菌水冲洗 3~5 次,收集菌丝,采用改良的 CTAB 法提取病原菌基因组 DNA<sup>[19]</sup>。

#### (2) 病原菌 rDNA-ITS 序列扩增

采用真菌核糖体 rDNA 转录间隔区(ITS)的通用引物 ITS1 和 ITS4<sup>[20]</sup>,对提取的基因组 DNA 进行 PCR 扩增,序列如下:ITS1,5'-TCCGTAGGTGAACC TGCGC-3';ITS4,5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'。

PCR 反应体系(20  $\mu$ L):双蒸水 7.4  $\mu$ L、2 $\times$  ES Taq Master Mix 10  $\mu$ L、ITS1 (10  $\mu$ mol/L)0.8  $\mu$ L、ITS4 (10  $\mu$ mol/L)0.8  $\mu$ L、模板 DNA 1  $\mu$ L。PCR 反应程序:94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s、53 $^{\circ}$ C 退火 1 min、72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,35 个循环,72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。4 $^{\circ}$ C 下保存。

上述扩增产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测后,切下凝胶中的目的片段,用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(天根生化科技有限公司)进行目的片段回收。回收的 DNA 片段送生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。

#### (3) 病原菌 18S rDNA 序列分析及进化树构建

测序结果经 BLAST 与 NCBI 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)中已知序列进行同源性比较,根据同源性比较结果,结合形态学特征,鉴定出病原菌。同时,选取与病原菌 ITS 序列同源性高的序列,使用 MEGA 5.1 软件<sup>[21]</sup>中的 Neighbor-Joining (NJ)方法构建系统发育树,并用 Bootstrap 进行自举检验,500 次重复。

### 1.2.4 植物精油对病原菌的抑制效果

#### (1) 体外直接接触法

将精油分别溶于 10% 吐温-20 中充分乳化。待

融化的 PDA 培养基冷却到 50 $^{\circ}$ C 左右,加入一定体积的精油悬浮液,充分振荡混合后倒平板,使平板终浓度(体积比)为 125、250、500、1 000、2 000  $\mu$ L/L。以不添加植物精油的培养基平板为对照。用无菌打孔器在培养 7 d 的病原菌平板上打取直径为 6 mm 菌块放在 PDA 平板(直径 90 mm)中央。置于 28 $^{\circ}$ C 生化培养箱中培养 6 d,观察抑菌效果。采用十字交叉法测量菌落直径并计算抑制率。每个浓度梯度 3 个平板,试验重复 3 次。以抑制率 100% 的最低精油浓度为其最低抑菌浓度(MIC)。抑制率计算公式为

$$\varepsilon_{\text{IHB}} = \frac{d_c - d_e}{d_c - 6} \times 100\%$$

式中  $d_c$ ——对照菌落直径, mm

$d_e$ ——处理菌落直径, mm

#### (2) 体外滤纸熏蒸法

用无菌打孔器在培养 7 d 的病原菌平板上打取直径为 6 mm 菌块放在 PDA 平板(直径 90 mm)中央。将平板倒置,取一片直径为 6 mm 的无菌滤纸片置于皿盖中央。分别吸取 1、2、3、4、5  $\mu$ L 的精油滴于滤纸片上,以滤纸片上不添加精油的平板为对照。封口膜密封后,置于 28 $^{\circ}$ C 生化培养箱中培养 7 d,观察抑菌效果。采用十字交叉法测量菌落直径并计算抑制率。每个浓度梯度 3 个平板,试验重复 3 次。

#### (3) 活体抑菌试验

火龙果用 75% 酒精进行表面消毒,晾干后,分别喷洒配制好的镰刀菌和炭疽菌孢子悬浮液(孢子浓度  $10^5$  CFU/mL),分别采用精油(25  $\mu$ L/L)进行密闭熏蒸处理。置于 4 $^{\circ}$ C 贮藏,每隔 4 d 观察火龙果腐烂情况,并计算其腐烂率。每个处理重复 2 次。

### 1.3 数据分析

采用 SPSS 19.0 对数据统计分析,采用 Duncan's 多重比较进行显著性分析, $p < 0.05$  作为差异显著性判断标准。

## 2 结果与分析

### 2.1 病原菌分离纯化结果

根据分离获得的真菌形态特征和培养性状,在罹病红肉火龙果果实上分离到 6 个真菌菌株,将其标记为 HS1、HS2、HS3、HS4、HS5 和 HS6。将分离得到的菌株,依照柯赫氏法则进行回接验证,其中只有 HS3 和 HS6 两株菌株不同程度地导致果实发病。在 PDA 培养基上的菌落形态如图 1 所示:HS3 菌落圆形,气生菌丝初为白色后为橘黄色,高而疏松,绒状,棉絮状;HS6 菌落圆形,绒毛

状,初期灰白色,后期为深灰色。菌落表面分散黑色小颗粒即分生孢子,培养后期出现橘红色孢子堆。通过显微镜观察发现,HS3 大型分生孢子短,中等偏窄,两端稍尖,顶细胞弯曲,多数单个隔膜,小孢子呈椭圆形、新月形,无色透明;HS6 分生孢子呈长椭圆形或一端稍窄短棒状,无色,单胞,内含数个油球(图 1)。

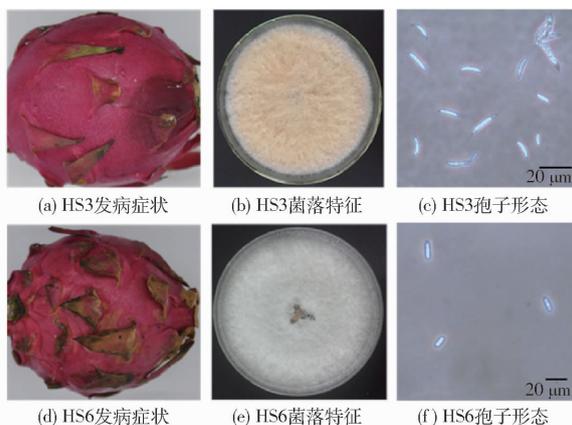


图 1 火龙果贮藏期发病果实病害症状、分离菌株菌落特征和孢子形态

Fig. 1 Diseases symptom on pitaya fruit and morphology characteristics of colonies and spores of isolated strains

根据菌落特征和孢子形态,通过与真菌鉴定手册所描述的形态比对,可将编号为 HS3 和 HS6 的真菌菌株初步鉴定为镰刀菌和炭疽菌。为了进一步鉴定这些分离到的真菌,利用 PCR 方法对病原菌基因组 DNA 进行 ITS 鉴定。

## 2.2 病原菌 18S rDNA-ITS 序列和系统发育树分析

以病原菌基因组 DNA 为模板,采用 rDNA 的 ITS 区段通用引物进行 PCR 扩增,两个病原菌菌株均获得 1 条 600 bp 左右的扩增条带(图 2)。经回收、纯化及序列测定,HS3 获得 1 条 545 bp 的单一一条带,HS6 获得 1 条 574 bp 的单一一条带。将获得的序列在 GeneBank 中进行 BLAST 比对,菌株 HS3 与层生镰刀菌 *Fusarium proliferatum* (登录号 KU984710) 同源性高达 100%,菌株 HS6 与平头炭疽菌 *Colletotrichum fructicola* (登录号 MF554835) 的菌株同源性高达 100%。选取同源性高低不同的菌株进行多重序列比较和系统发育分析,使用 MEGA 5.1 软件以 Neighbor - Joining 法构建进化树。进化树(图 3)显示,菌株 HS3 与 *Fusarium proliferatum* (登录号 KU984710)、*Fusarium equiseti* (登录号 MG020725) 具有很近的遗传关系,菌株 HS6 菌株与 *Colletotrichum fructicola* (登录号 MF554835) 具有很近的遗传关系。因此,通过病原菌的形态鉴定、rDNA-ITS 序列分析和系统发育树,确定引起浙江省红肉火龙果果实采后病害的主要病原菌为层生镰刀

菌和平头炭疽菌。

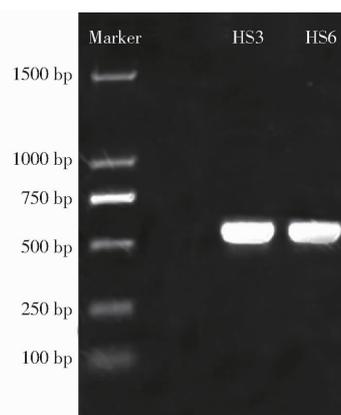


图 2 火龙果采后分离病原菌 rDNA-ITS 区 PCR 扩增产物的电泳结果

Fig. 2 Electrophoresis results on PCR products of rDNA-ITS from isolated strains

## 2.3 植物精油对层生镰刀菌和平头炭疽菌在体外直接接触抑制效果

选择已经报道的对果蔬病原真菌有较好抑制效果的 6 种精油,采用体外直接接触法,研究其对火龙果采后主要病原菌层生镰刀菌和平头炭疽菌的抑菌效果。结果如表 1 所示,香芹酚精油、肉桂精油、百里香精油在 2 000  $\mu\text{L/L}$  下对两种病原菌生长的抑制率为 100%,该用量下丁香精油对层生镰刀菌和平头炭疽菌的抑制率分别为 92.7% 和 83.1%,罗勒精油对层生镰刀菌和平头炭疽菌的抑制率分别为 65.3% 和 49.6%,芳樟醇对层生镰刀菌和平头炭疽菌的抑菌效果不明显,抑制率分别为 41.2% 和 43.9%。

选择抑菌效果较好的 3 种精油(香芹酚精油、肉桂精油、百里香精油),进一步研究其最低抑菌浓度(MIC)。由图 4 可知,3 种供试精油对 2 种病原菌菌丝生长均有不同程度的抑制作用,且随浓度升高(125 ~ 2 000  $\mu\text{L/L}$ ) 抑菌作用逐渐增强。肉桂精油和百里香精油在浓度达到 1 000  $\mu\text{L/L}$  时,完全抑制层生镰刀菌和平头炭疽菌菌丝的生长;香芹酚精油表现出较强的抑菌性,当浓度增加到 500  $\mu\text{L/L}$  时,完全抑制层生镰刀菌菌丝的生长,在浓度为 1 000  $\mu\text{L/L}$  时,完全抑制平头炭疽菌菌丝的生长。另外,结果表明,在添加等量精油时,对层生镰刀菌的抑制效果好于对平头炭疽菌的抑制效果(图 4)。因此,肉桂精油和百里香精油对层生镰刀菌和平头炭疽菌的 MIC 均为 1 000  $\mu\text{L/L}$ ;香芹酚精油对层生镰刀菌的 MIC 为 500  $\mu\text{L/L}$ ,对平头炭疽菌的 MIC 为 1 000  $\mu\text{L/L}$ 。因此,3 种精油对层生镰刀菌和平头炭疽菌的体外直接接触抑菌效果的优劣排序为:香芹酚、百里香、肉桂精油。

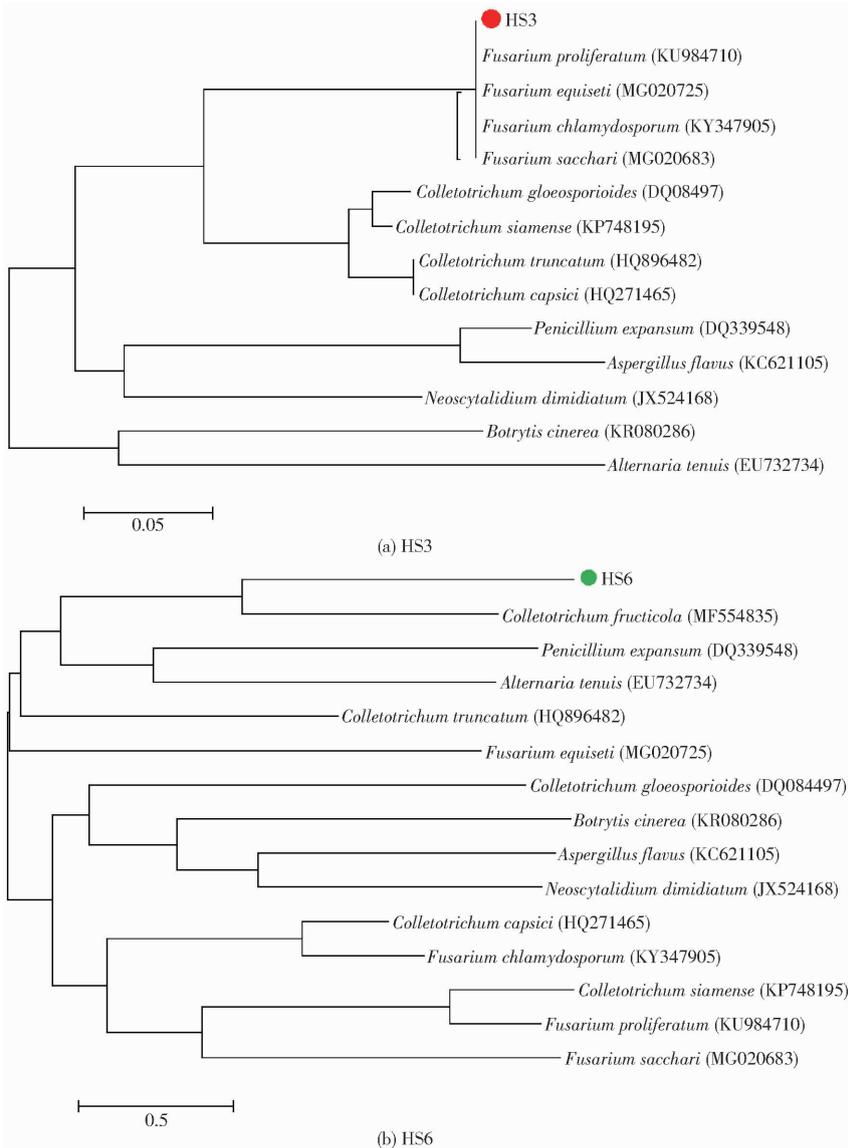


图3 基于ITS基因序列构建的病原菌HS3和HS6系统进化树

Fig. 3 Molecular phylogenetic tree based on ITS sequences of HS3 and HS6

表1 不同植物精油对火龙果采后主要病原菌的抑制效果  
 Tab.1 Inhibition effect of different plant essential oils on mycelial growth of pathogens isolated from pitaya fruit

精油种类	抑制率/%	
	层生镰刀菌	平头炭疽菌
香芹酚精油	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>
肉桂精油	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>
百里香精油	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>
丁香精油	92.7 <sup>b</sup>	83.1 <sup>c</sup>
罗勒精油	65.3 <sup>c</sup>	49.6 <sup>d</sup>
芳樟醇	41.2 <sup>c</sup>	43.9 <sup>e</sup>

注:所有数据在25℃培养4d后测得,培养基均为PDA培养基;不同字母表示差异显著( $p \leq 0.05$ ),下同。

#### 2.4 植物精油对层生镰刀菌和平头炭疽菌的体外熏蒸抑制效果

以体外熏蒸的抑菌试验观察香芹酚精油、肉桂精油、百里香精油对层生镰刀菌和平头炭疽菌的抑

制效果,其结果如图5所示,3种供试精油对层生镰刀菌和平头炭疽菌均有不同程度的抑制作用,且随每张滤纸片精油添加量的增加,抑菌能力逐渐增强。当精油添加量为4 $\mu\text{L}$ 时,香芹酚对层生镰刀菌和平头炭疽菌的抑制率均为100%,肉桂精油对层生镰刀菌的抑制率为95.6%,对平头炭疽菌的抑制率为72.6%,百里香精油对层生镰刀菌的抑制率为87.9%,对平头炭疽菌的抑制率为75.8%。当精油用量为5 $\mu\text{L}$ 时,香芹酚和百里香精油均能完全抑制层生镰刀菌和平头炭疽菌菌丝的生长,而肉桂精油对平头炭疽菌的抑制率均仅为89.4%。因此,3种精油对层生镰刀菌和平头炭疽菌的体外熏蒸抑菌效果的优劣排序为:香芹酚、肉桂精油、百里香。

#### 2.5 植物精油对火龙果采后病原菌的抑制效果

为了进一步研究3种植物精油的活体抑菌效果,采用人工接种的方法探讨供试精油对火龙果果

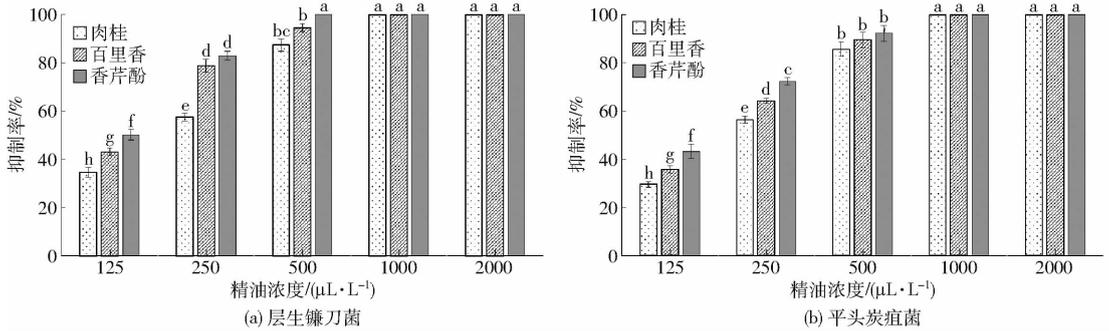


图 4 植物精油对层生镰刀菌和平头炭疽菌体外直接接触抑制效果

Fig. 4 Inhibition effect of essential oils on mycelia growth of *F. proliferatum* and *C. fruticulosa* in vitro

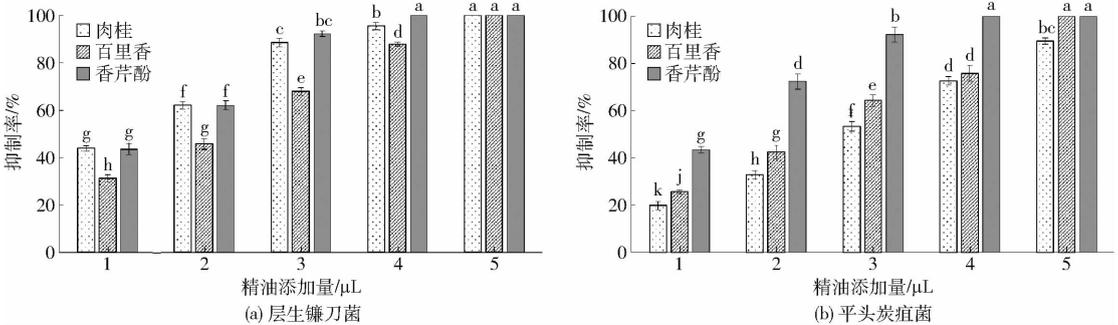


图 5 植物精油对层生镰刀菌和平头炭疽菌体外熏蒸抑制效果

Fig. 5 Inhibition effect of essential oils on mycelia growth of *F. proliferatum* and *C. fruticulosa* in vitro by fumigation

实致病菌的控制。由图 6 可知,供试精油熏蒸处理降低了接种层生镰刀菌和平头炭疽菌的火龙果低温贮藏过程中的腐烂率。接种层生镰刀菌的火龙果果实在贮藏 16 d 时,对照组腐烂率为 44.5%,肉桂精油处理组为 12.1%、百里香精油处理组为 13.4%,而香芹酚处理组仅为 6.7%。接种平头炭疽菌的火

龙果果实在贮藏 20 d 时,对照组腐烂率为 52.4%,肉桂精油处理组为 24.8%、百里香精油处理组为 35.1%,而香芹酚处理组仅为 18.6%。因此,综合体外直接接触、体外熏蒸以及活体抑菌试验的结果,香芹酚精油对火龙果采后主要致病菌层生镰刀菌和平头炭疽菌的抑制效果最好。

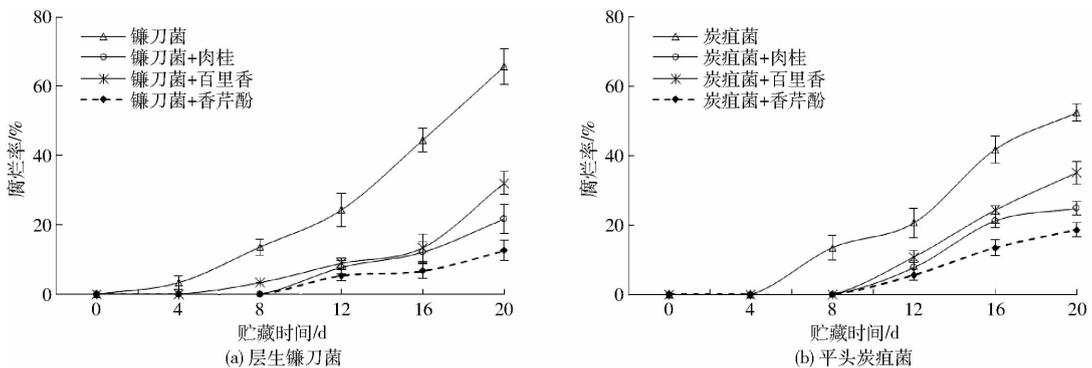


图 6 植物精油对接种层生镰刀菌和平头炭疽菌火龙果低温贮藏过程中腐烂率的影响

Fig. 6 Effect of essential oils on decay incidence of pitaya fruit inoculated with *F. proliferatum* and *C. fruticulosa* during storage at 4°C

### 3 讨论

通过形态学鉴定、分子鉴定和回接试验,将浙江产区红肉火龙果采后主要致病菌确定为层生镰刀菌和平头炭疽菌。层生镰刀菌是镰刀菌属的重要植物病原真菌,可侵染水稻、小麦、玉米、芦笋、大蒜、洋葱等作物<sup>[22]</sup>,引起枯萎病、腐烂病等,也有研究表明该菌是芒果畸形病的主要病原菌<sup>[23]</sup>。已有尖孢镰刀

菌 (*F. oxysporum*)<sup>[24]</sup> 和单隔镰刀菌 (*F. dimerum*)<sup>[25]</sup> 被报道为引起火龙果采后病害的致病菌。其中,层生镰刀菌引起红肉火龙果贮藏病害为国内的首次报道,平头炭疽菌与朱迎迎等<sup>[26]</sup> 有关海南进口火龙果的研究报道一致。

大量研究表明,植物精油大多具有杀菌、防腐等作用,能抑制果蔬采后病害的发生<sup>[12]</sup>。本文通过体外直接接触法、体外熏蒸法和活体抑菌试验,明确了

香芹酚精油、肉桂精油和百里香精油对火龙果采后主要致病菌层生镰刀菌和平头炭疽菌的抑制作用。周丹丹等<sup>[27]</sup>研究发现,丁香酚、柠檬醛和香芹酚能够抑制枇杷采后尖孢炭疽菌的菌丝生长,并抑制炭疽病的发生;李素清等<sup>[28]</sup>研究发现,肉桂精油、百里香精油、丁香精油对猕猴桃采后病原菌尖孢炭疽菌有较好抑制作用。刘继等<sup>[29]</sup>选择 6 种精油进行抑菌性试验,结果发现肉桂精油及百里香精油在 2 000  $\mu\text{L/L}$  时对生姜病原菌镰刀菌的生长抑制率均为 100%,同时,肉桂精油熏蒸处理使接种镰刀菌的生姜感病率下降了 59.33%。

香芹酚精油表现出较强的抑菌性,无论从直接接触还是熏蒸的方式,其对层生镰刀菌和平头炭疽菌的抑菌效果均好于肉桂精油和百里香精油。直接接触方式下百里香精油的抑菌效果优于肉桂精油,熏蒸方式下,则肉桂精油的抑菌效果更好。同时,精油熏蒸处理使接种层生镰刀菌和平头炭疽菌火龙果腐烂率下降,且香芹酚精油的效果最好,活体抑菌试验则进一步证实该结果(图 6)。分析其原因,是由于植物精油成分复杂,所以其抑菌机理也相对复杂,不同组分精油的抑菌作用及抑菌机制也不尽相同<sup>[30-31]</sup>。以熏蒸方式作用病原菌时,主要是精油的

挥发性组分接触到菌丝;而以直接接触方式作用病原菌时,植物精油中的所有成分均可直接接触到病原菌菌丝,而肉桂精油的挥发性成分的抑菌效果优于百里香精油的挥发性成分,这可能是不同的处理方式下两种精油抑菌效果不同的原因之一。综上所述,香芹酚精油作为火龙果贮藏前的熏蒸剂有较好的应用前景。

#### 4 结 束 语

经病原菌形态学和分子生物学鉴定,证实浙江省红肉火龙果采后贮藏期腐烂病害是由层生镰刀菌和平头炭疽菌两种病原真菌引起。研究结果可为研究红肉火龙果采后病害发生规律研究及进一步制定切实有效的综合防治措施提供参考依据。同时,比较了肉桂精油、百里香精油和香芹酚精油对火龙果采后主要病原菌层生镰刀菌和平头炭疽菌的抑制作用,发现香芹酚精油具有较好的抑菌效果。香芹酚精油作为火龙果贮藏前的熏蒸剂有较好的应用前景,但具体的抑菌机制仍需进一步研究。研究结果对提高火龙果贮藏品质、延长保鲜期提供了新的技术途径和理论指导。

#### 参 考 文 献

- 1 WICHENCHOT S, JATUPORNPIPAT M, RASTALL R A. Oligosaccharides of pitaya (dragon fruit) flesh and their prebiotic properties[J]. Food Chemistry, 2010, 120(3): 850-857.
- 2 WU L, HSU H, CHEN Y, et al. Antioxidant and antiproliferative activities of red pitaya[J]. Food Chemistry, 2006, 95(2): 319-327.
- 3 DEMBITSKY V M, POOVARODOM S, LEONTOWICZ H, et al. The multiple nutrition properties of some exotic fruits: biological activity and active metabolites[J]. Food Research International, 2011, 44(7): 1671-1701.
- 4 SONG H, CHU Q, YAN F, et al. Red pitaya betacyanins protects from diet-induced obesity, liver steatosis and insulin resistance in association with modulation of gut microbiota in mice[J]. Journal of Gastroenterology and Hepatology, 2016, 31(8): 1462-1469.
- 5 STINTZING F C, SCHIEBER A, CARLE R. Betacyanins in fruits from red-purple pitaya: *Hylocereus polyrhizus* (Weber) Britton & Rose[J]. Food Chemistry, 2002, 77: 101-106.
- 6 朱迎迎, 陈亮, 祝庆刚, 等. 火龙果采后病害与防控技术研究进展[J]. 中国热带农业, 2014(4): 55-58.  
ZHU Y Y, CHEN L, ZHU Q G, et al. Progress in post-harvest disease and preservative technology of pitaya[J]. China Tropical Agriculture, 2014(4): 55-58. (in Chinese)
- 7 MA T, YANG B, YU Y, et al. Market disease pathogens detection of imported fruits in Shanghai[J]. Agricultural Sciences in China, 2009(8): 1087-1096.
- 8 GUO L, WU Y, HO H, et al. First report of dragon fruit (*Hylocereus undatus*) anthracnose caused by *Colletotrichum truncatum* in China[J]. Journal of Phytopathology, 2014, 162(4): 272-275.
- 9 姚昇华, 范诗睿, 邢云莱, 等. 越南‘红心’火龙果黑腐病病原真菌鉴定及环境因素影响分析[J]. 植物生理学报, 2015, 51(9): 1419-1424.  
YAO S H, FAN S R, XING Y L, et al. Identification of black fungus black rot in red pitaya and effects of environmental factors [J]. Journal of Plant Physiology, 2015, 51(9): 1419-1424. (in Chinese)
- 10 王生有, 陈于陇, 徐玉娟, 等. 火龙果采后生理和保鲜技术的研究进展[J]. 食品工业科技, 2014, 35(13): 396-400.  
WANG S Y, CHEN Y L, XU Y J, et al. Progress in postharvest physiology and preservative technology of pitaya[J]. Science and Technology of Food Industry, 2014, 35(13): 396-400. (in Chinese)
- 11 王彬, 郑伟, 何绪晓, 等. 1-MCP 对火龙果果实采后生理特性的影响[J]. 西南农业学报, 2011, 24(6): 2127-2131.  
WANG B, ZHENG W, HE X X, et al. Effects of 1-Methylcyclopropene fumigation treatment on physiological characteristics of pitaya fruits during storage period[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2011, 24(6): 2127-2131. (in Chinese)
- 12 王彬, 郑伟, 何绪晓, 等.  $\text{CaCl}_2$  处理对火龙果低温贮藏期品质的影响[J]. 西南农业学报, 2010, 23(3): 836-840.

- WANG B, ZHENG W, HE X X, et al. Effect of  $\text{CaCl}_2$  on quality of pitaya fruits under cold storage[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2010, 23(3): 836–840. (in Chinese)
- 13 张绿萍, 金吉林, 邓仁菊. 保鲜剂及保鲜方式对火龙果贮藏时间的影响[J]. 贵州农业科学, 2011, 39(5): 215–217.  
ZHANG L P, JIN J L, DENG R J. Effect of antistaling agent and preservation method on pitaya during storage[J]. Guizhou Agricultural Sciences, 2011, 39(5): 215–217. (in Chinese)
- 14 冯武. 植物精油对果蔬采后病害的防治及其防治机理研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2006.  
FENG W. Study on prevention of postharvest diseases of fruits and vegetables with plant essential oil and its control mechanism [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2006. (in Chinese)
- 15 BURT S. Essential oils: their ant in foods—a review[J]. International Journal of Food Microbiology, 2004, 94: 223–253.
- 16 SIVAKUMAR D, BAUTISTA-BAÑOS S. A review on the use of essential oils for postharvest decay control and maintenance of fruit quality during storage[J]. Crop Protection, 2014, 64(3): 27–37.
- 17 吴新, 金鹏, 孔繁渊. 植物精油对草莓果实腐烂和品质的影响[J]. 食品科学, 2011, 32(14): 323–326.  
WU X, JIN P, KONG F Y. Effects of plant essential oils on strawberry rotting and quality[J]. Food Science, 2011, 32(14): 323–326. (in Chinese)
- 18 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979.
- 19 邵海燕, 肖尚月, 陈杭君, 等. 蓝莓采后主要病原真菌的分离鉴定与生物学特性研究[J/OL]. 农业机械学报, 2017, 48(5): 327–334. [http://www.j-csam.org/jcsam/ch/reader/view\\_abstract.aspx?file\\_no=20170541&flag=1](http://www.j-csam.org/jcsam/ch/reader/view_abstract.aspx?file_no=20170541&flag=1). DOI:10.6041/j.issn.1000-1298.2017.05.041.  
GAO H Y, XIAO S Y, CHEN H J, et al. Identification and biological characteristics of fungal pathogens in blueberry during storage[J/OL]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2017, 48(5): 327–334. (in Chinese)
- 20 LUO G, MITCHELL T G. Rapid identification of pathogenic fungi directly from cultures by using multiplex PCR[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2002, 40: 2860–2865.
- 21 TAMURA K, DUDLEY J, NEI M, et al. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0[J]. Molecular Biology and Evolution, 2007, 24: 1596–1599.
- 22 杨帅, 王健生, 马振川, 等. 引致大豆根腐病的层出镰孢菌分离鉴定及其特性[J]. 植物保护学报, 2012, 39(2): 187–188.  
YANG S, WANG J S, MA Z C, et al. Isolation and identification of *Fusarium proliferatum* causing soybean root rot and its biological characterization[J]. Acta Phytophylacica Sinica, 2012, 39(2): 187–188. (in Chinese)
- 23 吴婧波, 詹儒林, 柳凤, 等. 芒果畸形病病原菌 *Fusarium mangiferae* 的快速分子检测[J]. 菌物学报, 2016, 35(3): 298–308.  
WU J B, ZHAN R L, LIU F, et al. Rapid molecular detection of mango malformation *Fusarium mangiferae*[J]. Mycosystema, 2016, 35(3): 298–308. (in Chinese)
- 24 崔志婧, 王奕文, 于岳. 上海市进口火龙果软腐病病害分析[J]. 微生物学通报, 2011, 38(10): 1499–1506.  
CUI Z J, WANG Y W, YU Y. Pathogens analysis of soft rot disease of imported pitaya in Shanghai[J]. Microbiology, 2011, 38(10): 1499–1506. (in Chinese)
- 25 朱迎迎, 高兆银, 李敏, 等. 火龙果镰刀菌果腐病病原菌鉴定及生物学特性研究[J]. 热带作物学报, 2016, 37(1): 164–171.  
ZHU Y Y, GAO Z Y, LI M, et al. Identification and biological characteristics of dragon fruit (*Hylocereus undatus* Britt) fusarium rot pathogen[J]. Journal of Tropical Crops, 2016, 37(1): 164–171. (in Chinese)
- 26 朱迎迎, 李敏, 高兆银, 等. 火龙果炭疽病病原菌的鉴定及生物学特性研究[J]. 南方农业学报, 2016, 47(1): 59–66.  
ZHU Y Y, LI M, GAO Z Y, et al. Identification and biological characteristics of anthracnose pathogen from pitaya(*Hylocereus undulatus*)[J]. Journal of Southern Agriculture, 2016, 47(1): 59–66. (in Chinese)
- 27 周丹丹, 王卓, 邢梦珂, 等. 植物精油抑制炭疽菌及对枇杷采后炭疽病与品质的影响[J]. 食品科学, 2017, 38(19): 212–217.  
ZHOU D D, WANG Z, XING M K, et al. Inhibitory effect of plant essential oils on colletorichum acutatum and postharvest anthracnose and quality of loquat fruits[J]. Food Science, 2017, 38(19): 212–217. (in Chinese)
- 28 李素清, 何靖柳, 秦文. 几种植物精油对红阳猕猴桃中两种致病菌抑制效果的研究[J]. 四川农业大学学报, 2014, 32(3): 315–320.  
LI S Q, HE J L, QIN W. Inhibitory effects of several plant essential oils against two pathogens of ‘red sun’ kiwifruit[J]. Journal of Sichuan Agricultural University, 2014, 32(3): 315–320. (in Chinese)
- 29 刘继, 颜静, 何靖柳, 等. 生姜贮藏期病原菌分离鉴定及精油抑菌效果[J]. 食品科学, 2014, 35(18): 172–177.  
LIU J, YAN J, HE J L, et al. Isolation, identification and inhibition of pathogens from mature ginger during storage[J]. Food Science, 2014, 35(18): 172–177. (in Chinese)
- 30 TEPE B, DAFERERA D, SOKMEN A, et al. Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (*Lamiaceae*)[J]. Food Chemistry, 2005, 90(3): 333–340.
- 31 MIGUEL M G. Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: a short review[J]. Molecules, 2010, 15(12): 9252–9287.