

DOI:10.13652/j.spjx.1003.5788.2022.90127

四川产区蓝莓病原真菌的分离鉴定及精油成分对其的抑菌作用

Isolation and identification of pathogenic fungi from postharvest blueberry in Sichuan province and the inhibition effect on them by using essential oil

刘春燕^{1,2} 丁捷^{2,3} 邓尚贵¹ 秦文² 刘艳³LIU Chun-yan^{1,2} DING Jie^{2,3} DENG Shang-gui¹ QIN Wen² LIU Yan³

(1. 浙江海洋大学食品与药学学院, 浙江 舟山 316000; 2. 四川农业大学食品学院,

四川 雅安 625000; 3. 四川旅游学院食品学院, 四川 成都 610100)

(1. College of Food and Pharmacy, Zhejiang Ocean University, Zhoushan, Zhejiang 316000, China;

2. College of Food Science, Sichuan Agricultural University, Ya'an, Sichuan 625000, China;

3. College of Food Science, Sichuan Tourism University, Chengdu, Sichuan 610100, China)

摘要:目的:控制四川产区蓝莓采后的真菌性病害。方法:以四川省 14 个种植基地的蓝莓果实为试材,进行病原真菌分离鉴定、致病性测定;针对蓝莓采后优势和亚优势菌株,研究温度和光照对菌丝生长的影响,及有效天然抑菌成分筛选。结果:引起蓝莓采后腐烂的病原真菌有 Q1W1 (*Aspergillus niger*)、Q1W11 (*Aspergillus tubingenensis*)、Q2W13 (*Neofusicoccum parvum*)、Q2W19 (*Neopestalotiopsis* sp.)、Q2W20 (*Fusarium graminearum*)、Q2W22 (*Alternaria alternata*)、Q2W26 (*Mucor fragilis*)、Q3W7 (*Penicillium* sp.)、Q3W25 (*Cladosporium xylophilum*) 9 种。其中 Q1W1 是优势菌株,分离频率最高,致病性最强;Q2W19、Q2W22、Q3W7 和 Q3W25 是亚优势菌株,分离频率大于 10%。Q1W1、Q2W19、Q2W22、Q3W7 和 Q3W25 的最适生长温度范围为 20~35 °C。光照对 Q1W1、Q2W19、Q2W22 和 Q3W25 的菌丝生长有显著影响,对 Q3W7 的无影响。15 种精油组分中以麝香草酚的广谱抑菌活性最好,其对蓝莓采后优势和亚优势菌株的 EC₅₀ 范围为 30~50 mg/L,而麝香草酚水溶液直接用于蓝莓采后真菌防治的实际施用浓度不应高于 50 mg/L。结论:麝香草酚对四川产区蓝莓采

后病害的抑制效果较好。

关键词:蓝莓;采后病害;病原真菌;抑菌活性;精油成分

Abstract: **Objective:** This study aimed to provide strategy for controlling the fungal diseases of postharvest blueberry in Sichuan province. **Methods:** The pathogenic bacteria from 14 planting bases in Sichuan Province were isolate, identified, pathogenicity determination. Moreover, the effects of temperature and light on mycelia growth of the dominant and subdominant strains of blueberry after harvest were studied, and the effective natural antibacterial components against them were screened. **Results:** The blueberry postharvest rot diseases were caused by the following nine kinds of fungi: *Aspergillus niger*, *Aspergillus tubingenensis*, *Neofusicoccum parvum*, *Neopestalotiopsis* sp., *Fusarium graminearum*, *Alternaria alternata*, *Mucor fragilis*, *Penicillium* sp., *Cladosporium xylophilum*. *Aspergillus niger* was the dominant species with the highest isolation frequency and the most pathogenic, and *Neopestalotiopsis* sp., *Alternaria alternata*, *Penicillium* sp., *Cladosporium xylophilum* were the subdominant species with isolation frequencies greater than 10%. The optimum growth temperature ranged from 20 °C to 35 °C of dominant and subdominant strains of blueberry postharvest. The effects of light on the mycelia growth of *A. niger*, *Neopestalotiopsis* sp., *A. alternata*, and *C. xylophilum* were significant, but that was insignificant on the growth of *Penicillium* sp. strains. Thymol showed good broad-spectrum antibacterial activity, the EC₅₀ values of dominant and subdominant strains of blueberry postharvest was 30~50 mg/L, while the thymol applied directly to blueberry postharvest fungal control in aqueous solution should not be higher than 50 mg/L. **Conclusion:** Thymol is more effective on postharvest diseases of blueberry in Sichuan province.

基金项目:四川省科技计划(编号:2021JDRC0030, 2021YJ0262); 干热河谷特色生物资源开发(编号:GR-2020-E-01); 四川省大学生创新创业训练计划(编号:S202111552110)

作者简介:刘春燕,女,浙江海洋大学在读硕士研究生。

通信作者:邓尚贵(1966—),男,浙江海洋大学教授,博士。

E-mail: dengshanggui@163.com

秦文(1967—),女,四川农业大学教授,博士。

E-mail: qinwen@sicau.edu.cn

收稿日期:2021-11-07

Keywords: blueberry; post-harvest diseases; pathogenic fungus; antifungal activity; essential oil composition

四川省是中国主要的蓝莓鲜果供应地,2020年的总产量为5.0万t,位居全国第二^[1]。蓝莓采后极易被病原真菌侵入造成腐烂发霉,分离鉴定蓝莓采后致腐的主要病原真菌是防治的关键,但侵染蓝莓致腐的病原真菌地域差异性较大。辽宁地区的病原真菌主要是灰葡萄孢、链格孢、青霉、粉红单端孢菌和产黄青霉^[2-3];浙江杭州的主要致腐病原真菌为灰葡萄孢、木霉和青霉^[4];贵州麻江县的采后腐烂病原真菌为间座壳属、链孢霉、球黑孢霉、内生真菌和灰霉菌^[5]。目前尚未见四川产区蓝莓采后病原真菌的研究报道。

化学试剂杀菌是防治果实采后真菌性病害的主要途径,但频繁和高浓度的使用会造成环境和食品污染,还易诱导病原菌产生抗药性^[6],因此寻找安全高效的天然抗菌剂成为当务之急。王丹等^[7-8]发现植物精油对果实采后病原菌的抑制效果较好。但植物精油中有效成分含量及生理活性受多种因素影响,其抑菌稳定性较差^[9]。因此,精油成分对常见采后病原真菌的抑制逐渐成为研究热点^[10-12]。目前已有香茅醇、丁香酚及麝香草酚等多种精油组分的相关报道^[9,13]。研究拟以四川产区蓝莓在低温贮藏期的病果为试材,分离纯化病原真菌,并以优势病原真菌为目标菌株,筛选具有广谱抑菌效果的精油成分,以期对蓝莓采后病害防治和新型抑菌药剂研发提供理论依据。

1 材料与试剂

1.1 原料及处理

蓝莓(*Vaccinium* Spp.):采自四川省的14个商业种植基地,采摘后当日冷链运回实验室,剔除残次、病虫害及机械损伤的果实,挑选成熟度、颜色、大小基本一致的蓝莓为试材,于(2.0±0.5)℃,RH 85%机械冷库中贮藏备用。

1.2 仪器设备及试剂

万分之一电子天平:FA2204B型,上海佑科仪器仪表有限公司;

高压灭菌锅:GI54DS型,厦门致微仪器有限公司;

生化培养箱:LRH-250F型,上海一恒科学仪器有限公司;

智能恒温恒湿培养箱:LHS-250型,郑州生元有限公司;

超净工作台:SW-CJ-2D型,武汉一恒苏净科学仪器有限公司;

显微镜:E100型,日本Nikon公司;

乙醇:分析纯,成都科隆化学试剂公司;

姜酮(97%)、香茅醇(95%)、丁香酚(99%)、D-柠檬烯(95%)、桉叶素(80%)、香芹酮(95%)、蒎烯(75%)、月

桂烯(90%)、松油醇(98%)、松油烯(95%)、麝香草酚(98%)、 β -蒎烯(98%)、二烯丙基硫醚(98%)、肉桂醛(98%)、香芹酚(99%);分析纯,罗恩试剂上海易恩化学技术有限公司。

1.3 蓝莓贮藏病原真菌的分离与纯化

采用常规组织分离法分离病原真菌。取果实病原交界处的组织(5 mm×5 mm),分别用75%酒精和0.1%升汞处理30 s,无菌水冲洗后接种至PDA培养基上,于28℃培养48 h。挑取菌落边缘纯化3~5代,保存斜面备用。选择疑似病原真菌菌株,以有伤接种和无伤接种两种方式进行验证。以接种空白菌饼的为对照组,将培养皿置于25℃、RH 90%恒温恒湿培养箱中培养3~5 d。观察记录发病情况,按照柯赫氏法则,验证蓝莓贮藏疑似病原真菌的致病性。

1.4 病原真菌形态特征观察及分子鉴定

将病原真菌接种到PDA培养基上,28℃培养3~5 d,观察记录单菌落形态和菌丝孢子结构特征,参照真菌形态学鉴定手册进行分类鉴定。

采用真菌核糖体基因转录间隔区通用引物ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')和ITS4(5'-TCCTC-CGCTTATTGATATGC-3')对纯化病原真菌的基因组DNA进行PCR扩增后测序,利用SnapGene软件处理测序结果。将病原真菌序列和NCBI进行Blast比对,选取与病原真菌同源性高和形态相似的菌株序列构建系统发育树。

1.5 温度和光照对蓝莓采后优势及亚优势病原真菌菌丝生长的影响

采用点植法接种病原真菌,培养5 d后用十字交叉法测量菌落直径,分析环境温度(5, 10, 15, 20, 25, 28, 30, 32, 35, 38℃)和光照条件(24 h全光照、12 h光暗交替的半光照和24 h全黑暗)对菌丝生长的影响。

1.6 基于信息熵法初筛具有广谱抑菌活性的精油成分

以四川产区蓝莓采后主要病原真菌为目标菌株,将供试精油成分用无水乙醇配制有效质量浓度100 mg/L的含药PDA培养基,采用点植法接种病原真菌。在28℃下培养5 d后用十字交叉法测量菌落直径,根据相对抑制率,用信息熵法综合评判精油组分的抑菌率。按式(1)计算菌丝生长相对抑制率。

$$R = \frac{(A_1 - 5) - (A_2 - 5)}{(A_1 - 5)} \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

R——相对抑制率,%;

A₁——对照组直径,mm;

A₂——处理组直径,mm。

1.7 麝香草酚对蓝莓采后优势及亚优势病原真菌的体内外抑菌活性

分别设置麝香草酚不同质量浓度(0, 20, 40, 60, 80,

100,120,150 mg/L)的带药平板,采用点植法接种后置于 28 °C 避光倒置培养,5 d 后采用十字交叉法测量菌落直径,计算相对抑菌率。参考 Aspera-Werz 等^[14]的方法使用 AAT BioQuest 的 EC₅₀ 计算器工具(<https://www.aat-bio.com/tools/ec50-calculator>),计算麝香草酚对不同菌株的半数有效浓度(EC₅₀)。以无菌水处理为对照,每个浓度设置 4 个重复。

将 Q1W1、Q2W19、Q2W22、Q3W7 和 Q3W25 分别在 PDA 上培养 5 d 后制备 1×10⁷ CFU/mL 混合孢子悬浮液,喷洒到果子表面后晾干备用。以空白处理为对照,根据麝香草酚对不同菌株的半数有效浓度,将不同质量浓度(10,30,50,70 mg/L)的麝香草酚-1%吐温 80 水溶液喷洒于已接种的蓝莓果实表面,分别标记为 W10、W30、W50、W70。自然晾干后装入经 75%酒精灭菌的塑料盒 [(125±10) g/盒],置于(2.0±0.5) °C 条件下贮藏,间隔 2 d 监测蓝莓果实的发病情况。

$$I_r = n/N \times 100\%, \quad (2)$$

式中:

I_r ——发病率,%;

n ——发病果子数量;

N ——总的果子数量。

2 结果与分析

2.1 四川产区蓝莓采后发病情况调查

蓝莓果实在低温贮藏 14 d 后开始长霉腐烂,典型发病果实症状主要分为软溃腐烂(Q1 型)、果蒂长毛腐败(Q2 型)和青霉病(Q3 型)3 大类,其中 Q1 型软溃腐烂症状最为常见。Q1 型病果表现为果实表皮上密生黑色粒状霉层,后期形成水渍状塌陷腐败区,果皮明显变薄且组织崩溃,果肉全部变红或褐变。Q2 型病果主要是果蒂长毛腐烂,果蒂表层凸起絮状白色或灰色菌丝,与周围病果形成片状的霉层,后期菌丝滋生处果皮组织崩溃,果肉部分变红或褐变,伴有软糊状汁液渗出。Q3 型病果在初期果蒂周围形成白色霉层,后期产生大量孢子,在果实表面形成致密状的青色或灰绿色霉层,感染处扁平或塌陷,果肉发生一定程度褐变,靠近果皮部位的果肉变红。

2.2 蓝莓采后病原真菌的分离频率及致病性

由表 1 可知,Q1W1 是四川产区蓝莓采后病原真菌优势种,其分离频率为 32.63%;Q2W22、Q3W25、Q2W19 和 Q3W7 是亚优势种,分离频率 > 10%。Q1W11、Q2W13、Q2W20 和 Q2W26 是第三大优势种群,分离频率 < 5%。由致病返接试验可知,上述菌株均为蓝莓采后致病菌,其反接致病症状与自然发病症状相似,且有伤接种的病害程度强于无伤接种,而对照组未见发病。在有伤接种条件下,优势种和亚优势种的发病率无显著差异 ($P > 0.05$),Q1W1、Q2W19 和 Q2W22 返接 5 d 后果实发

表 1 四川产区采后病原真菌相对分离频率和致病性[†]

Table 1 Relative isolation frequency and pathogenicity of postharvest pathogens in Sichuan

编号	分离频率/%	发病率/%	
		有伤接种	无伤接种
Q1W1	32.63	100.00±0.00 ^a	62.96±6.42 ^a
Q1W11	2.11	81.48±6.42 ^b	48.15±6.42 ^{bc}
Q2W13	2.11	92.59±6.42 ^{ab}	22.22±11.11 ^d
Q2W19	13.68	100.00±0.00 ^a	59.26±6.42 ^{ab}
Q2W20	1.05	66.67±11.11 ^c	14.81±6.42 ^d
Q2W22	21.05	100.00±0.00 ^a	55.56±0.00 ^{ab}
Q2W26	1.05	92.59±6.42 ^{ab}	18.52±6.42 ^d
Q3W7	12.63	92.59±6.42 ^{ab}	37.04±6.42 ^c
Q3W25	13.68	88.89±11.11 ^{ab}	37.04±6.42 ^c

[†] 同列字母不同代表差异显著 ($P < 0.05$)。

病率为 100%,Q3W7 和 Q3W25 的发病率分别为 92.59% 和 88.89%;而在无伤接种条件下,Q1W1、Q2W19 和 Q2W22 的发病率均超过 50%,其中 Q1W1 最高(62.96%)。综上所述,Q1W1 是四川产区蓝莓低温贮藏期分离频率和发病率最高,且传染性最强的采后病原真菌,其发病症状同黑曲霉在枣果中的报道一致^[15],故暂将其在蓝莓上引发的症状称为蓝莓采后黑霉病。

2.3 蓝莓采后病原真菌的形态学特征

从发病果实病原交界处分离得到 95 株真菌,根据菌落形态和孢子形态初步分为 9 种,如图 1 所示。

Q1W1 和 Q1W11 菌落平坦而整齐,气生菌丝为白色短绒状,孢子在 48 h 后产生,但 Q1W11 的孢子更稠密;显微镜下两株菌株的分生孢子头均为球形且菌丝光滑,无隔膜和分支,可初步判定为曲霉属。

Q2W13、Q2W19、Q2W20、Q2W22 和 Q2W26 的菌落均呈绒毛状,菌丝为白色或者褐色,其中 Q2W13 需要在无菌松针(马尾松)的水琼脂培养基上才能产孢^[16];Q2W19 在培养 8 d 后开始产孢。显微镜下的菌丝均细长;Q2W19 的分生孢子呈烧瓶形,含 5 个细胞,具有 4 个分隔,顶端和基部各有附属丝 2,1 根;Q2W22 的分生孢子呈倒棒状,有横隔;Q2W26 的孢子梗顶端着生球形孢子囊,分生孢子为近球形或椭圆形。根据病原真菌的形态学特征结合参考文献^[17],将 Q2W13、Q2W19、Q2W20、Q2W22 和 Q2W26 初步鉴定为小新壳孢菌、类似盘多毛孢属、禾谷镰刀菌、链格孢属、毛霉属。其中链格孢在东北和华东地区的蓝莓采后病原真菌中有相关报道。

Q3W7 和 Q3W25 的菌落均呈地毯状,其中 Q3W7 菌落较平坦,而 Q3W25 菌落表面褶皱且营养菌丝深入培养基内部。在显微镜下 Q3W7 的分生孢子梗形如扫帚,分生孢子呈球形;而 Q3W25 的分子孢子顶生或侧生,形成短链,呈椭球型。根据病原真菌的形态学特征结合相关

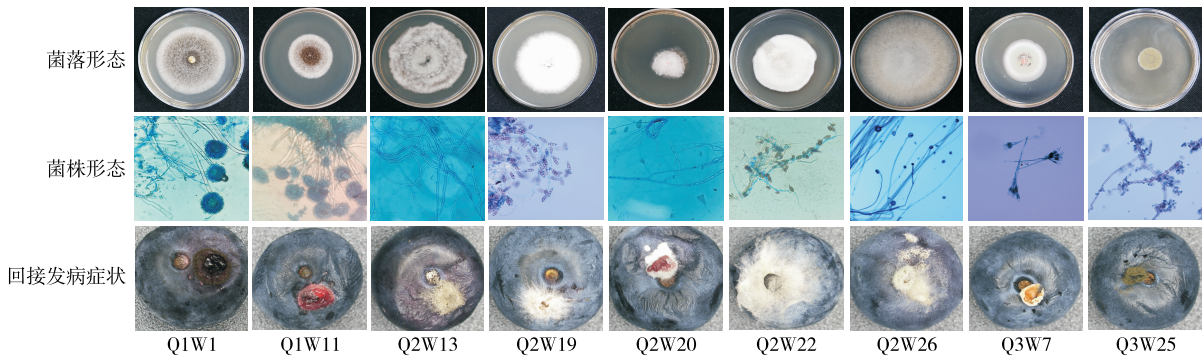


图1 蓝莓采后病原真菌的菌株形态、孢子形态和回接症状

Figure 1 Morphological characteristics of isolated strains and their symptoms after reconnection with blueberries

文献^[2,18], Q3W7 和 Q3W25 初步鉴定为青霉属、枝孢菌属。青霉和枝孢菌主要是中国西南产区蓝莓采后的病原真菌。

2.4 蓝莓采后病原真菌的分子生物学鉴定

由图2可知, Q1W1 和 Q1W11 分别与曲霉属中 *Aspergillus niger* ATCC16888, *Aspergillus tubingensis* NRRL 4875 的亲缘关系比较接近, 结合菌落形态分别鉴定为黑曲霉、塔宾曲霉菌。Q2W13、Q2W19、Q2W20、Q2W22、Q2W26 分别与 *Neofusicoccum parvum* strain WZ-92、*Neopestalotiopsis* sp. isolate 2177、*Fusarium graminearum* isolate NRRL28302、*Alternaria alternata* isolate UASB8、*Mucor fragilis* strain LMSA 1.09.161 的亲缘关系比较接近, 结合菌落形态分别鉴定为新小壳梭孢菌、类似盘多毛孢菌、禾谷镰刀菌、互生链格孢菌和毛霉。Q3W7、Q3W25 分别与 *Penicillium* sp. SAF6-EGY、*Cladosporium xylophilum* isolate FR1801 的亲缘关系接近, 结合菌落形态分别鉴定为噬木枝状枝孢菌、青霉菌。

2.5 温度和光照对蓝莓采后优势及亚优势病原真菌菌丝生长的影响

由图3可知, 温度和光照对不同病原真菌菌丝生长的影响存在较大区别。Q1W1、Q2W19、Q2W22、Q3W7 和 Q3W25 的菌落直径均随温度的升高呈先增加后降低的趋势; 其中 Q2W22 的生长温度范围最广, 在 10~38 °C 的范围内均能生长; Q3W25 的生长温度范围最小为 15~30 °C。根据菌落大小, Q1W1、Q2W19、Q2W22、Q3W7 和 Q3W25 的最适生长温度分别为 35, 20, 30, 30, 25 °C。Q1W1、Q2W19 和 Q3W25 最适宜光照条件为 12 h 光暗交替, Q2W22 的最适宜光照是 24 h 光照, 而 Q3W7 菌株的菌丝生长情况与培养期间光照时长无显著相关性。

2.6 基于信息熵法初筛具有广谱抑菌活性的植物精油成分

将 15 种精油成分对蓝莓采后优势菌株的 5 d 生长抑制率通过信息熵重新确定权重系数, Q1W1、Q2W19、Q2W22、Q3W7 和 Q3W25 的权重系数分别为 0.364 158,

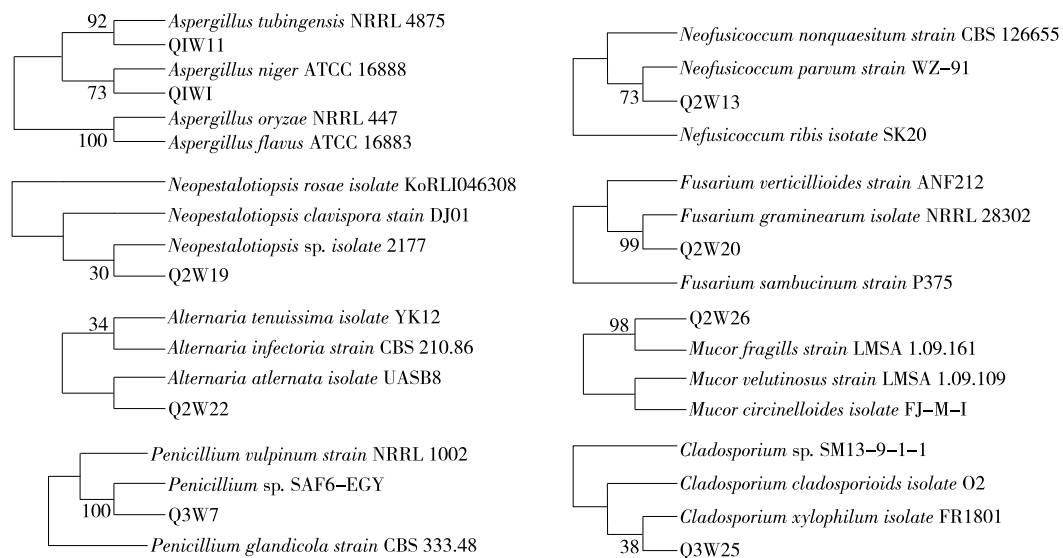
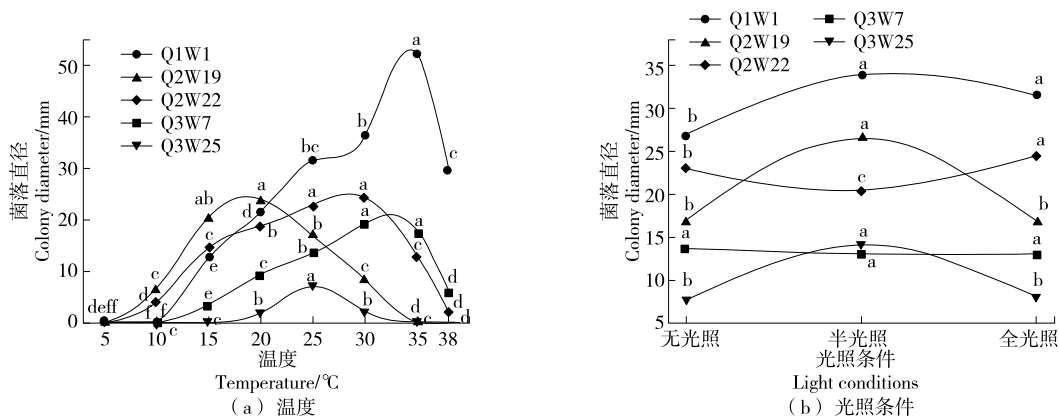


图2 蓝莓采后病原真菌的系统发育

Figure 2 Phylogenetic tree of postharvest pathogens of blueberry



字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$)
图 3 温度和光照对蓝莓采后病原真菌生长的影响

Figure 3 Temperature and light on the growth of postharvest pathogenic fungi of blueberry

-0.127 020, -0.009 360, 0.536 662, 0.235 562。根据式(3)计算综合抑制率,其值越大说明该精油成分的广谱抑菌效果越好。由表 2 可知,麝香草酚的综合抑制率最高为 100%,其次是香芹酚(63.77%)、二烯丙基硫醚(36.20%)、肉桂醛(30.75%)、 β -蒎烯(22.01%)和香茅醇(18.39%),其余 9 种精油成分的综合抑制率均小于 5%。

$$F = 0.364 158R_1 - 0.127 020R_2 - 0.009 360R_3 + 0.536 662R_4 + 0.235 562R_5, \quad (3)$$

式中:

F ——综合抑制率, %;

R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 ——Q1W1、Q3W7、Q2W19、

Q2W22 和 Q3W25 菌丝的相对抑制率, %。

2.7 麝香草酚对蓝莓采后优势和亚优势病原真菌体内外抑菌活性

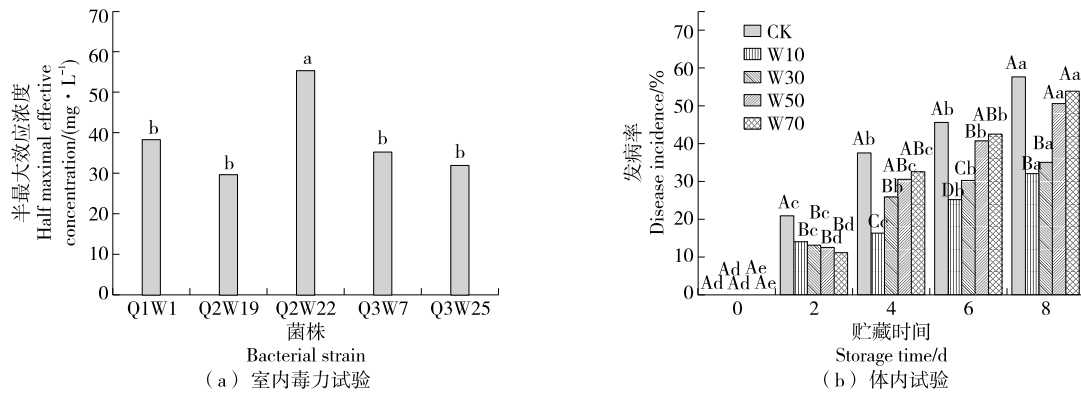
麝香草酚对蓝莓采后优势和亚优势病原真菌体内外抑菌活性见图 4。由图 4(a)可知, Thymol 对 Q2W22 的抑制活性最小, EC_{50} 为 (55.33 ± 8.03) mg/L, 显著高于其他菌株; 而 Q2W19、Q3W25、Q3W7 和 Q1W1 的室内毒力无显著差异, 其 EC_{50} 分别为 (29.80 ± 3.65) , (31.98 ± 2.07) , (35.35 ± 7.42) , (38.18 ± 7.56) mg/L。前人研究发现以麝香草酚为主要成分的百里香精油对链格孢的 EC_{50} 为 $18.456 \mu\text{L/L}$ ^[8], 肉桂-山苍子复合精油对黑曲霉的最

表 2 15 种植物精油成分对蓝莓采后病原真菌的抑制效果[†]

Table 2 Inhibitory effects of 15 plant essential oils on postharvest pathogenic fungi of blueberry

植物精油组分	相对抑制率/%					综合抑制率/%
	Q1W1	Q2W19	Q2W22	Q3W7	Q3W25	
姜酮	3.71±5.37 ^{BCgh}	32.55±7.52 ^{Aefg}	17.78±6.93 ^{ABe}	-5.51±7.31 ^{CDc}	-14.57±12.7 ^{Def}	-9.34
香茅醇	79.40±7.47 ^{Ab}	45.27±11.93 ^{Bde}	4.70±4.25 ^{Cf}	0.57±7.67 ^{Ce}	-21.38±11.16 ^{Df}	18.39
丁香酚	12.04±3.22 ^{Bf}	55.19±8.37 ^{Acd}	19.40±4.43 ^{Be}	-4.81±4.29 ^{Ce}	-25.13±12.31 ^{Df}	-11.31
D-柠檬烯	-0.36±0.53 ^{Chi}	41.04±2.86 ^{Aef}	-6.53±1.34 ^{Dg}	11.10±2.06 ^{Bd}	-15.03±8.32 ^{Cef}	-2.87
桉叶素	1.35±4.98 ^{Cghi}	33.17±7.60 ^{Aefg}	-10.44±4.62 ^{Dg}	14.09±2.02 ^{Bd}	-2.27±3.63 ^{CDde}	3.40
香芹酮	8.29±4.26 ^{Bfg}	44.67±13.53 ^{Adef}	-23.69±7.43 ^{Ch}	0.90±1.91 ^{Be}	4.33±9.19 ^{Bcd}	-0.93
茨烯	3.12±3.09 ^{Bgh}	30.24±9.16 ^{Afg}	-15.31±11.99 ^{Cgh}	8.94±1.95 ^{Bd}	-14.83±6.40 ^{Cef}	-1.26
月桂烯	4.15±3.32 ^{Bgh}	21.32±5.62 ^{Agh}	20.40±5.08 ^{Ae}	-4.38±2.74 ^{Ce}	-21.78±4.25 ^{Df}	-8.87
松油醇	3.52±7.10 ^{Bgh}	60.46±10.5 ^{Ac}	10.29±5.60 ^{Bef}	-2.89±4.37 ^{Be}	-1.64±6.36 ^{Bde}	-8.43
松油烯	-4.85±4.58 ^{Bi}	12.72±8.77 ^{Ab}	-10.34±4.36 ^{Bg}	-5.77±5.45 ^{Be}	15.86±6.87 ^{Ac}	-2.65
麝香草酚	100.00±0.00 ^{Aa}	100.00±0.00 ^{Aa}	100.00±0.00 ^{Aa}	100.00±0.00 ^{Aa}	100.00±0.00 ^{Aa}	100.00
β -蒎烯	30.26±2.60 ^{Be}	31.56±5.35 ^{Befg}	45.63±4.32 ^{Ad}	10.96±3.79 ^{Cd}	40.48±6.33 ^{Ab}	22.01
二烯丙基硫醚	49.49±5.04 ^{Ac}	33.59±5.74 ^{BCefg}	38.23±9.38 ^{ABd}	24.45±1.45 ^{Ce}	41.08±8.49 ^{ABb}	36.20
肉桂醛	40.87±3.66 ^{Dd}	86.09±0.00 ^{Ab}	58.86±4.10 ^{Bc}	28.94±1.43 ^{Ec}	50.15±0.00 ^{Cb}	30.75
香芹酚	74.85±3.26 ^{Bb}	83.53±1.10 ^{Ab}	85.19±0.00 ^{Ab}	67.27±5.45 ^{Cb}	50.15±0.00 ^{Db}	63.77

[†] 同行大写字母不同代表差异显著 ($P < 0.05$), 同列小写字母不同代表差异显著 ($P < 0.05$)。



大写字母不同表示组间差异显著($P < 0.05$),小写字母不同表示组内差异显著($P < 0.05$)

图4 麝香草酚对蓝莓采后优势菌株的体内外抑菌活性

Figure 4 In vitro and in vivo antibacterial activities of thymol against dominant strains of postharvest blueberry

小抑菌浓度为 $0.125 \mu\text{L}/\text{mL}$ ^[19],均小于麝香草酚对中黑曲霉的 EC_{50} ($38.18 \text{ mg}/\text{L}$)及链格孢的 EC_{50} ($55.33 \text{ mg}/\text{L}$)。这可能是由于精油是多种抑菌物质混合物,因此抑菌效果优于单一组分麝香草酚。但植物精油中的醇类、醛类和烯类物质因其原料来源和提取工艺差异性较大,对特定抑菌活性的贡献度是不确定、不稳定的^[20],因此极大限制了植物精油采后处理效果的稳定性。

由图4(b)可知,在整个常温贮藏期间,所有麝香草酚处理组的采后病害发病率均低于CK,均能有效控制真菌病害。W10组的发病率在4~8d内显著低于同期的其他组。而W50和W70的发病率在常温贮藏4d后急剧增加,分别为50.69%和53.90%,而W10仅从16.24%增加到31.92%。这可能是由于麝香草酚具有高植物毒性^[21],超过50mg/L的施用浓度可能导致果实严重药害。

3 结论

以低温贮藏下自然发病的四川产区蓝莓为试材,共分离得到95株真菌,其中*Aspergillus niger*、*Neopestalotiopsis* sp.、*Alternaria alternat*、*Penicillium* sp.和*Cladosporium xylophilum*是四川产区蓝莓采后的主要病原真菌。这5株菌的最适生长温度分别为35,20,30,30,25℃,其中*Penicillium* sp.对光照反应不敏感,而其他菌株敏感。麝香草酚对上述5株菌的抑制效果较好,其半数有效浓度范围为30~50mg/L。研究还发现麝香草酚水溶液的施用浓度和实际采后病害防治的应用效果不呈正比。因此较低浓度的麝香草酚水溶液具有防治蓝莓采后病害的潜力,可在未来作为广谱抑真菌成分研发高效安全的新型采后缓释抑菌剂。

参考文献

[1] 李亚东,裴嘉博,陈丽,等. 2020中国蓝莓产业年度报告[J]. 吉林农业大学学报, 2021, 43(1): 1-8.
LI Ya-dong, PEI Jia-bo, CHEN Li, et al. Annual report of blueberry industry in China 2020[J]. Journal of Jilin University, 2021, 43(1):

1-8.
[2] 周冯,冯肖,纪淑娟,等. 蓝莓果实常温贮藏过程中表面病原真菌的分离与鉴定[J]. 中国食品学报, 2020, 20(2): 271-278.
ZHOU Qian, FENG Xiao, JI Shu-juan, et al. Isolation and identification of surface pathogenic fungi of blueberry fruit during storage at room temperature[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2020, 20(2): 271-278.
[3] 戴启东,李广旭,杨华,等. 蓝莓采后病害的病原鉴定及发生规律研究[J]. 果树学报, 2016, 33(10): 1299-1306.
DAI Qi-dong, LI Guang-xu, YANG Hua, et al. Pathogen identification and occurrence regularity of postharvest diseases of blueberry[J]. Journal of Fruit Science, 2016, 33(10): 1299-1306.
[4] 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]. 农业机械学报, 2017, 48(5): 327-334.
GAO Hai-yan, XIAO Shang-yue, CHEN Hang-jun, et al. Identification and biological characteristics of fungal pathogens in blueberry during postharvest storage[J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2017, 48(5): 327-334.
[5] 吴文能,巴良杰,雷霖卿,等. 蓝莓花期病菌的分离鉴定及室内毒力测定[J]. 农药, 2019, 58(2): 150-153.
WU Wen-neng, BA Liang-jie, LEI Ji-qing, et al. Isolation, identification and pharmaceutical screening of pathogenic fungi for blueberry flowering disease[J]. Agrochemicals, 2019, 58(2): 150-153.
[6] CALVO Hector, REDONDO Diego, REMÓN Sara, et al. Efficacy of electrolyzed water, chlorine dioxide and photocatalysis for disinfection and removal of pesticide residues from stone fruit [J]. Postharvest Biology and Technology, 2019, 148: 22-31.
[7] 王丹,张静,翟浩,等. 蓝莓果实黑斑病的病原鉴定及植物精油抑菌研究[J]. 核农学报, 2019, 33(12): 2384-2391.
WANG Dan, ZHANG Jing, ZHAI Hao, et al. Pathogenic identification of black spot rot on postharvest blueberry and antifungal activity of plant essential oils [J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2019, 33(12): 2384-2391.
[8] 姜莉莉,孙守民,宗晓娟,等. 泰安市“香野”草莓采后主要病原菌的分离鉴定及精油抑菌效果评价[J]. 中国生物防治学报, 2022, 38(1): 275-282.

- JIANG Li-li, SUN Shou-min, ZONG Xiao-juan, et al. Isolation and identification of dominant pathogens of postharvest kantoseika strawberry in Tai'an and evaluation of antifungal effects of essential oil[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2022, 38(1): 275-282.
- [9] BAYDAR H, BAYDAR N G. The effects of harvest date, fermentation duration and Tween 20 treatment on essential oil content and composition of industrial oil rose (*Rosa damascena* Mill.) [J]. Industrial Crops & Products, 2004, 21(2): 251-255.
- [10] ELSHAFIE Hazem S, MANCINI Emilia, SAKR Shimaa, et al. Antifungal activity of some constituents of *Origanum vulgare* L. essential oil against postharvest disease of peach fruit[J]. Journal of Medicinal Food, 2015, 18(8): 929-934.
- [11] HYE Ji Sang, KWANG Kim Tae, SOO Keum Young, et al. The major postharvest disease of onion and its control with thymol fumigation during low-temperature storage[J]. Mycobiology, 2018, 46(3): 242-253.
- [12] HO Shin Mi, JIN-HEE Kim, HYO-WON Choi, et al. Effect of thymol and linalool fumigation on postharvest diseases of table grapes[J]. Mycobiology, 2014, 42(3): 262-268.
- [13] BILJANA Bozin, NEDA Mimica-Dukic, NATASA Simin, et al. Characterization of the volatile composition of essential oils of some lamiaceae spices and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006, 54(5): 1 822-1 828.
- [14] ASPERA-WERZ Romina H, EHNERT Sabrina, MÜLLER Monja, et al. Assessment of tobacco heating system 2.4 on osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells and primary human osteoblasts compared to conventional cigarettes [J]. World Journal of Stem Cells, 2020, 12(8): 841-856.
- [15] YUVAL Cohen, RAN Shulhani, YEHUDA Rot, et al. *Aspergillus niger*, the causal agent of black mould disease in date fruits, infects and colonizes flowers and young fruitlets[J]. Plant Pathology, 2021, 70(5): 1 195-1 208.
- [16] 李博勋, 刘先宝, 时涛, 等. 国内新发危险性橡胶树拟盘多毛孢叶斑病鉴定及其病原学研究[J]. 热带作物学报, 2020, 41(8): 1 616-1 624.
- LI Bo-xun, LIU Xian-bao, SHI Tao, et al. Identification and etiology of a new dangerous neopestalotiopsis leaf fall disease of rubber tree (*Hevea brasiliensis*) in China[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2020, 41(8): 1 616-1 624.
- [17] MA Tao, YANG Zi-xiang. First report of *Neofusicoccum parvum* causing brown spots on gallnuts of *Rhus potaninii* in China[J]. Plant Disease, 2021, 106(3): 1 071.
- [18] 周笑犁, 王瑞, 雷霁卿, 等. 蓝莓采后病原真菌分离及其生物学鉴定[J]. 食品科技, 2015, 40(9): 283-288, 293.
- ZHOU Xiao-li, WANG Rui, LEI Ji-qing, et al. Separation and biological identification of pathogenic fungi on postharvest blueberry[J]. Food Science and Technology, 2015, 40(9): 283-288, 293.
- [19] 吕好新, 赵玲丽, 霍珊珊, 等. 肉桂-山苍子复合植物精油对发霉花生黑曲霉 BQM 菌的抑菌效果[J]. 中国食品学报, 2021, 21(12): 222-229.
- LU Hao-xin, ZHAO Ling-li, HUO Shan-shan, et al. The antifungal effect of cinnamon-litsea cubeba compound essential oil on *Aspergillus niger* BQM of moldy peanuts[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2021, 21(12): 222-229.
- [20] 章斌, 侯小桢, 秦轶, 等. 柠檬果皮精油主要组分抑菌及抗氧化活性研究[J]. 食品与机械, 2017, 33(12): 138-142.
- ZHANG Bin, HOU Xiao-zhen, QIN Yi, et al. Research on antibacterial and antioxidant activities of major components of lemon peel essential oil[J]. Food & Machinery, 2017, 33(12): 138-142.
- [21] ALVES Thammyres de Assis, PINHEIRO Patrícia Fontes, PRA-CAFONTES Milene Miranda, et al. Toxicity of thymol, carvacrol and their respective phenoxyacetic acids in *Lactuca sativa* and *Sorghum bicolor*[J]. Industrial Crops and Products, 2018, 114: 59-67.

(上接第 57 页)

- [7] 张思颖, 李梓旋, 宋汶亭, 等. 囊荷中黄酮类化合物的抗氧化性研究[J]. 食品科技, 2020, 45(7): 230-234.
- ZHANG Si-jie, LI Zi-xuan, SOMG Wen-ting, et al. Study on antioxidant activity of flavonoids in Xianghe[J]. Food Science and Technology, 2020, 45(7): 230-234.
- [8] 张雪娇, 刘登勇, 王惠民. 羧脯氨酸小肽的体外抗氧化活性[J]. 食品科学, 2021, 42(5): 55-60.
- ZHANG Xue-jiao, LIU Deng-yong, WANG Hui-min. Antioxidant activity of hydroxyproline small peptides in vitro[J]. Food Science, 2021, 42(5): 55-60.
- [9] 任妍婧, 谢薇, 江帆, 等. 藜麦粉营养成分及抗氧化活性研究[J]. 中国粮油学报, 2019, 34(3): 13-18.
- REN Yan-jing, XIE Wei, JIANG Fan, et al. Study on nutritional components and antioxidant activity of quinoa flour [J]. Chinese Journal of Grain and Oil, 2019, 34(3): 13-18.
- [10] 韩荣欣, 张红印, 周光鑫, 等. 体外模拟消化对酸枣仁蛋白酶解产物抗氧化活性的影响[J]. 食品与机械, 2021, 37(7): 171-176.
- HAN Rong-xin, ZHANG Hong-yin, ZHOU Guang-xin, et al. Effects of simulated digestion in vitro on antioxidant activity of proteolytic products from Jujube seed[J]. Food & Machinery, 2021, 37(7): 171-176.
- [11] 何畅, 王景会, 李达, 等. 分蘖洋葱黄酮体外抗氧化活性研究[J]. 东北农业科学, 2020, 45(6): 135-139.
- HE Chang, WANG Jing-hui, LI Da, et al. Antioxidant activity of Flavonoids from tillering onion in vitro[J]. Northeast Agricultural Science, 2020, 45(6): 135-139.
- [12] 马飞跃, 张明, 李娅, 等. 人心果叶不同极性组分的抗氧化与抗菌活性[J]. 食品与机械, 2021, 37(5): 144-148.
- MA Fei-yue, ZHANG Ming, LI Ya, et al. Antioxidation and antibacterial activity of different polar components from the leaves of *carpus chinensis*[J]. Food & Machinery, 2021, 37(5): 144-148.