

植物精油抑制炭疽菌及对枇杷采后炭疽病与品质的影响

周丹丹, 王 卓, 邢梦珂, 屠 康*, 周程雁
(南京农业大学食品科技学院, 江苏 南京 210095)

摘 要:为探讨植物精油对枇杷采后炭疽菌抑制的效果及其机理, 分别用丁香酚、柠檬醛和香芹酚对尖孢炭疽菌进行体外处理, 筛选出丁香酚为最优抑制剂并研究了其对尖孢炭疽菌外渗率、核酸泄漏及蛋白质的影响。以枇杷为供试材料, 接种尖孢炭疽菌后分别用0.5、1.0、2.5、5.0 $\mu\text{L/L}$ 的丁香酚熏蒸处理, 统计病害发生率及病斑直径, 并研究了丁香酚对枇杷品质的影响。结果表明: 在体外实验中, 3种供试精油对尖孢炭疽菌均有明显的抑制作用, 48 $\mu\text{L/L}$ 丁香酚可以完全抑制尖孢炭疽菌的生长, 且在一定程度上造成了菌内细胞内容物的渗出。在丁香酚对枇杷果实采后炭疽病抑制效果实验中发现, 贮藏6 d时, 1 $\mu\text{L/L}$ 丁香酚处理组病斑直径及病害发生率显著低于对照组, 病斑直径仅为6.41 mm, 病害发生率为66.67%。丁香酚对枇杷品质影响方面, 其能够显著抑制采后枇杷质量损失率的上升及VC含量下降($P < 0.05$), 但对枇杷的颜色、硬度、可溶性固形物及可滴定酸等品质指标影响不显著($P > 0.05$)。

关键词: 植物精油; 丁香酚; 尖孢炭疽菌; 枇杷; 采后炭疽病

Inhibitory Effect of Plant Essential Oils on *Colletorichum acutatum* and Postharvest Anthracnose and Quality of Loquat Fruits

ZHOU Dandan, WANG Zhuo, XING Mengke, TU Kang*, ZHOU Chengyan
(College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: This experiment was conducted to study the inhibitory effect of three plant essential oils (eugenol, citral and carvacrol) on *Colletorichum acutatum* by means of *in vitro* fumigation and the effect of the strongest inhibitor, eugenol, on the ratio of exosmosis, intracellular nucleic acid and protein contents of *C. acutatum*. After wounding and artificial inoculation with *C. acutatum*, loquat fruits underwent eugenol fumigation at 0.5, 1.0, 2.5 and 5.0 $\mu\text{L/L}$. Disease incidence and lesion diameter were recorded and the effect of this treatment on the fruit quality was also studied. Results showed that all three essential oils demonstrates inhibitory activities *in vitro* against *C. acutatum*. Eugenol could inhibit the growth of *C. acutatum* completely at a concentration of 48 $\mu\text{L/L}$ and cause the leakage of cytoplasm. Compared with the control group, 1 $\mu\text{L/L}$ eugenol could significantly reduce anthracnose incidence to 66.67% and average lesion diameter to 6.41 mm after 6-day storage. Moreover, percentage water loss and vitamin C loss were significantly inhibited ($P < 0.05$), while no significant changes were observed in firmness, color, soluble solid content, titratable acid or ascorbic acid in loquat fruits ($P > 0.05$).

Key words: essential oil; eugenol; *Colletorichum acutatum*; loquat; postharvest anthracnose

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201719034

中图分类号: TS255.2

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2017) 19-0212-06

引文格式:

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. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201719034. <http://www.spkx.net.cn>

ZHOU Dandan, WANG Zhuo, XING Mengke, 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 with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-201719034. <http://www.spkx.net.cn>

收稿日期: 2016-09-08

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (31671925)

作者简介: 周丹丹 (1993—), 女, 硕士, 研究方向为农产品贮藏与加工。E-mail: 2015108052@njau.edu.cn

*通信作者: 屠康 (1968—), 男, 教授, 博士, 研究方向为农产品贮藏与加工。E-mail: kangtu@njau.edu.cn

炭疽菌属 (*Colletotrichum* Corda.) 是一种重要的植物病害真菌, 分布十分广泛, 可导致多种植物病害, 诸如侵染枇杷、辣椒、蓝莓、芒果等^[1-4], 引起较为严重的炭疽病, 严重威胁着我国农业经济的发展。枇杷是我国一种亚热带水果和重要的亚热带经济作物。枇杷采后病害主要包括炭疽病、疮痂病、褐斑病。近年来, 炭疽病已成为枇杷果实采后贮运期间腐烂的最主要侵染性病害之一, 炭疽菌具有潜伏侵染的特点, 在果实采后成熟期表现症状, 高温多湿的条件下尤为严重, 造成了果实的大量腐烂, 严重影响其品质及产量^[5]。生产上防治果实采后病害的有效方法是使用化学杀菌剂, 但具有残留性, 会对人体健康及环境造成不良影响, 因此开发安全、无毒且高效的病害抑制剂尤为重要。

植物精油作为一种安全无毒的天然抑菌剂, 具有较强的抑菌活性、低毒、环境友好等特点, 且能诱导寄主自身产生抗性, 成为代替化学杀菌剂的方法之一。近年来, 植物精油在抑菌研究方面得到了广泛的应用, 可用于果蔬的采后病害及保鲜^[6-8]。研究表明, 丁香酚、柠檬醛及香茅醛对黑曲霉、灰葡萄孢、链格孢菌及青霉等均有较强的抑制效果^[9-11]。植物精油在果蔬保鲜抗病等方面也取得了显著的效果, 可以有效控制草莓灰霉病、柑橘青霉病、桃褐腐病等采后病害^[12-14], 但是丁香酚、柠檬醛及香茅醛对尖孢炭疽菌 (*C. acutatum*) 抑制效应研究较少且不系统, 对枇杷采后炭疽病研究鲜少报道。

本实验通过系统比较丁香酚、柠檬醛及香茅醛对 *C. acutatum* 体外抑菌效果, 筛选出炭疽菌的最佳抑制剂, 探讨丁香酚对 *C. acutatum* 的抑制机理及对枇杷采后炭疽病的防治和品质的影响, 以期对丁香酚对 *C. acutatum* 抑制机理的深入研究及枇杷真菌性病害的防治机理的研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

C. acutatum 购于中国微生物菌种保藏中心。

丁香酚、柠檬醛、香茅醛 (纯度为98%) 上海源叶生物科技有限公司。

供试枇杷品种为‘解放钟’, 产自福建莆田, 在商业成熟期采摘1 000个运回实验室。

1.2 仪器与设备

DDS-11A型电导率仪 上海雷磁有限公司; GY-4型果实硬度计 浙江托普仪器有限公司; PAL-1型糖度计 日本Atago株式会社; 超净工作台 苏净安泰公司; CTHI-250B型恒温恒湿箱 施都凯设备公司; 恒温振荡培养箱 国华电器有限公司; CR-10型便携式色差计 日本柯尼卡美能达公司; UV1800型紫外分光光度计 日本岛津公司。

1.3 方法

1.3.1 3种植物精油对 *C. acutatum* 体外抑制效果测定

1.3.1.1 3种植物精油对 *C. acutatum* 菌丝生长的影响

采用生长速率法^[12]测定。每个培养皿加入15 mL马铃薯葡萄糖琼脂 (potato dextrose agar, PDA) 培养液, 凝固后将直径为6 mm菌块放入培养皿中央。将培养皿倒置, 取一片直径为6 mm的无菌滤纸放在培养皿盖子中央, 用移液枪分别移取1、2、3、4、5 μL 不稀释精油滴于滤纸片上, 使培养皿中精油含量达16、32、48、64、80 $\mu\text{L/L}$, 精油含量换算参考公式 (1), 以不添加精油的培养皿为对照组。将培养皿密封, 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养5 d后测量菌落直径, 并通过公式 (2) 计算出抑制率。每个含量3个培养皿, 实验重复3次。

$$\text{精油含量}/(\mu\text{L/L}) = \frac{\text{培养皿内精油体积}/\mu\text{L}}{\text{培养皿内空气体积}/\text{L}} \quad (1)$$

$$\text{抑制率}/\% = \frac{\text{对照菌落直径}/\text{mm} - \text{处理菌落直径}/\text{mm}}{\text{对照菌落直径}/\text{mm} - \text{菌块直径}/\text{mm}} \times 100 \quad (2)$$

式中: 培养皿内空气体积为62.5 mL。

1.3.1.2 3种植物精油对 *C. acutatum* 孢子萌发率的影响

5 mL的马铃薯葡萄糖肉汤 (potato dextrose broth, PDB) 接入100 μL 的病原菌孢子悬浮液, 使病原菌孢子的终浓度为 1×10^5 CFU/mL。加入用0.1%吐温20乳化的精油, 使体系内精油最终含量为1、5、10、25、50 $\mu\text{L/L}$, 以不加精油为对照组。28 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min摇床培养30 h。用普通光学显微镜测定孢子的萌发率。每处理3次重复, 每次重复观察100个孢子。

1.3.1.3 3种植物精油对 *C. acutatum* 的最低抑菌浓度

采用培养皿倒置的方法^[15]并稍作修改。每个培养皿15 mL PDA培养液, 待其凝固后在中央加入5 μL 的孢子悬浮液 (1×10^5 CFU/mL), 晾干10 min, 将培养皿倒置, 取一片直径为6 mm的无菌滤纸放在培养皿盖子中央, 移取1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12 μL 不稀释的精油滴于滤纸片上, 使培养皿中精油含量达16、32、48、64、80、96、112、128、144、160、176、192 $\mu\text{L/L}$, 精油含量换算参考公式 (1), 以不加精油的培养皿为对照组, 将培养皿用保鲜膜密封, 于生化培养箱在28 $^{\circ}\text{C}$ 温度条件下, 培养5 d后观察抑菌效果。以菌丝生长量为0的培养皿中精油的含量作为该精油的最低抑菌浓度 (minimum inhibitory concentration, MIC)。

1.3.2 丁香酚对 *C. acutatum* 抑制效果研究

1.3.2.1 *C. acutatum* 的培养

取一定量的丁香酚到少量0.1%吐温20中, 充分乳化, 然后用无菌水配制成不同的浓度梯度。将乳化好的丁香酚精油分别加入到含有50 mL PDB培养基的摇瓶中, 使体系内精油最终含量为1、5、10、25、50 $\mu\text{L/L}$, 以不加精油为对照组。然后分别加入100 μL 的 *C. acutatum*

孢子悬浮液（ 1×10^5 CFU/mL）。置于28℃、200 r/min的恒温回转摇床培养7 d。

1.3.2.2 丁香酚对*C. acutatum*细胞外渗率影响

采用陈爱葵等^[16]的方法并稍作修改。称取上述培养物1 g沉淀，加入20 mL的去离子水，浸没样品。将样品放入真空干燥箱中，减压渗透0.5 h，28℃条件下充分振荡2 h后测定电导率，然后将样品煮沸30 min，以蒸馏水组为空白组，测定其电导率。并通过公式（3）计算菌丝的细胞外渗率。

细胞外渗率/% = $\frac{\text{处理电导率/mS} - \text{空白电导率/mS}}{\text{煮沸电导率/mS} - \text{空白电导率/mS}} \times 100$ (3)

1.3.2.3 丁香酚对*C. acutatum*核酸泄漏影响

采用Chen Qianru等^[17]的方法测定。将上述培养物于4 000 r/min离心15 min取上清液，用紫外分光光度计测定其在260 nm波长处的吸光度。

1.3.2.4 丁香酚对*C. acutatum*蛋白质影响

取1 g菌丝，加入2 mL磷酸盐缓冲液（pH 7.0），在冰浴中研磨成糊状，定容至10 mL，于4℃、4 000 r/min离心5 min，取100 μL上清液，加入5 mL的考马斯亮蓝溶液，以蒸馏水为空白对照，2 min后于595 nm波长处测定吸光度。

1.3.3 丁香酚对枇杷炭疽病发病率及病斑直径的影响

选取大小一致、无机械损伤的枇杷510个，用70%酒精消毒晾干后，在赤道部位打取直径2 mm、深6 mm的洞，接入15 μL的 1×10^5 CFU/mL的孢子悬浮液，晾干。将处理后的枇杷果实置于10 L保鲜盒中，分别向盒底的无菌滤纸滴加5、10、25、50 μL的丁香酚，立即密封，使盒内挥发丁香酚含量分别为0.5、1.0、2.5、5.0 μL/L，以不加丁香酚为对照组，熏蒸24 h，每隔2 d取样。统计枇杷的发病率和病斑直径，其中发病率以发生病害的果实数量与总体果实数量之比求得，病斑直径用游标卡尺交叉测量两次取平均值。每处理3个重复，每重复10个枇杷。

1.3.4 丁香酚处理对采后枇杷品质的影响

挑选出成熟度一致、无病虫害和机械伤的果实300个，清洗果实表皮，晾干。将枇杷果实在20℃条件下经丁香酚熏蒸24 h后，取出放入保鲜盒内，每隔3 d取样。每处理3个重复，每重复10个枇杷。

质量损失率采用直接称量法；硬度采用GY-4型水果硬度计进行测定；可溶性固形物（soluble solid content, SSC）含量采用PAL-1型糖度计测定；颜色采用便携式色差计测定；可滴定酸（titratable acid, TA）含量参考Jiang Yueming等^[18]的方法测定；VC含量采用紫外分光光度法测定。

1.4 数据统计分析

实验数据采用SAS 9.2软件，Duncan多重比较法进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 3种植物精油对*C. acutatum*体外抑制作用

2.1.1 3种植物精油对*C. acutatum*体外熏蒸抑制效果

表1 不同植物精油对*C. acutatum*体外熏蒸抑菌效果的影响
Table 1 In vitro effect of three essential oils in vapor phase against *C. acutatum*

精油含量/ (μL/L)	菌落直径/mm			抑制率/%		
	丁香酚	柠檬醛	香茅醛	丁香酚	柠檬醛	香茅醛
0	22.30±0.50 ^a	22.30±0.50 ^a	22.30±0.50 ^a	—	—	—
16	8.30±1.89 ^b	16.80±1.42 ^b	16.70±1.52 ^b	85.71±11.56 ^b	36.52±8.72 ^a	34.68±8.72 ^a
32	6.90±0.22 ^b	14.50±0.50 ^b	15.10±1.28 ^b	94.56±1.35 ^b	48.02±3.06 ^b	44.38±7.83 ^a
48	6.00±0.00 ^b	12.10±1.36 ^b	12.90±0.84 ^b	100.00±0.00 ^b	62.58±8.31 ^b	58.02±5.12 ^a
64	6.00±0.00 ^b	10.90±1.16 ^b	11.40±1.18 ^b	100.00±0.00 ^b	70.05±7.13 ^b	67.20±7.21 ^a
80	6.00±0.00 ^b	6.80±1.00 ^b	7.20±0.85 ^b	100.00±0.00 ^b	95.07±6.12 ^b	92.65±5.21 ^a

注：同行肩标字母不同表示差异显著（ $P < 0.05$ ）；—未检出。下同。

从表1可以看出，3种植物精油对*C. acutatum*均有不同程度的抑制效果，且随着精油含量的增加，其抑制率也逐渐增加。当含量为48 μL/L时，丁香酚可以完全抑制*C. acutatum*的生长繁殖，抑制率高达100%，对*C. acutatum*有明显的抑菌作用，且与其他两种精油差异显著（ $P < 0.05$ ）；其次为柠檬醛，抑制率为62.58%；香茅醛效果最差，菌斑直径最大，抑制率仅为58.02%。

2.1.2 3种植物精油对*C. acutatum*孢子萌发率的抑制效果

表2 3种植物精油对*C. acutatum*孢子萌发率的影响
Table 2 Effect of three essential oils on spore germination of *C. acutatum*

精油含量/ (μL/L)	孢子萌发率/%		
	丁香酚	柠檬醛	香茅醛
0	100.00±0.00	100.00±0.00	100.00±0.00
1	39.67±3.87	58.00±1.69	75.50±1.46
5	29.29±1.10	35.67±0.56	50.83±1.05
10	13.12±1.05	23.17±1.45	25.17±3.31
25	—	4.33±0.79	12.67±2.34
50	—	—	3.67±0.53

从表2中可以看出，随着精油含量的升高，孢子萌发率逐渐降低，各处理的孢子萌发率均低于对照组。丁香酚处理效果最好，同等含量下，丁香酚处理的孢子萌发率低于其他组，其次为柠檬醛，香茅醛的抑制作用最弱。当精油含量 ≥ 5 μL/L时，不同处理的孢子萌发率均低于50%，说明丁香酚、柠檬醛及香茅醛都可以有效抑制*C. acutatum*孢子的萌发率，进而抑制*C. acutatum*的生长。

2.1.3 3种植物精油对*C. acutatum*的MIC

对植物精油抑制*C. acutatum*的MIC进行检测和分析，结果如表3所示。丁香酚对*C. acutatum*的抑制效果最好，当含量 ≥ 96 μL/L，未见菌丝生长，可以完全抑制*C. acutatum*的生长，其MIC为96 μL/L；柠檬醛的效果次之，MIC为144 μL/L；香茅醛的效果最差，MIC为192 μL/L。

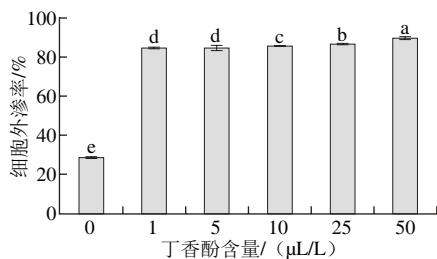
表3 熏蒸条件下不同植物精油对*C. acutatum*的MIC
Table 3 *In vitro* MIC of three essential oils against *C. acutatum*

精油含量/ ($\mu\text{L/L}$)	菌斑直径/mm		
	丁香酚	柠檬醛	香茅醛
0	33.91 $\pm$ 3.26 ^a	33.91 $\pm$ 3.26 ^a	33.91 $\pm$ 3.26 ^a
16	17.45 $\pm$ 1.07 ^c	22.99 $\pm$ 3.02 ^b	26.19 $\pm$ 3.61 ^a
32	5.24 $\pm$ 1.11 ^c	16.06 $\pm$ 1.00 ^b	25.74 $\pm$ 3.75 ^a
48	4.39 $\pm$ 2.45 ^c	14.45 $\pm$ 0.43 ^b	23.47 $\pm$ 1.90 ^a
64	3.94 $\pm$ 1.78 ^c	11.85 $\pm$ 1.29 ^b	22.85 $\pm$ 2.08 ^a
80	1.35 $\pm$ 0.97 ^c	8.55 $\pm$ 1.01 ^b	21.89 $\pm$ 2.55 ^a
96	—	6.01 $\pm$ 0.97 ^b	16.93 $\pm$ 1.19 ^a
112	—	4.23 $\pm$ 1.10 ^b	17.54 $\pm$ 1.68 ^a
128	—	2.71 $\pm$ 0.43 ^b	13.77 $\pm$ 0.29 ^a
144	—	—	13.64 $\pm$ 0.86 ^a
160	—	—	11.52 $\pm$ 0.40 ^a
176	—	—	6.30 $\pm$ 1.64 ^a
192	—	—	—
208	—	—	—

由表1~3可知,所选用的3种植物精油均有良好的抑菌效果,其中丁香酚抑制菌丝生长及孢子萌发率效果最好,48 $\mu\text{L/L}$ 的精油熏蒸处理时,丁香酚可完全抑制*C. acutatum*的生长。因丁香酚的良好抑菌效果,后续实验采用丁香酚对枇杷采后炭疽病害和品质进行研究。

2.2 丁香酚对*C. acutatum*抑制机理实验

2.2.1 丁香酚对*C. acutatum*细胞外渗率的影响



字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$)。下同。

图1 丁香酚对*C. acutatum*细胞外渗率的影响

Fig. 1 Effect of eugenol on exosmosis ratio of *C. acutatum*

电导率的变化可反映精油对*C. acutatum*细胞外渗率的影响。加入丁香酚后,*C. acutatum*细胞膜发生破坏,其选择透过性的丧失,细胞内容物的渗出增加了相对电导率。丁香酚对*C. acutatum*细胞外渗率的影响如图1所示,细胞外渗率随丁香酚含量的增大而增大。处理组细胞外渗率均显著高于对照组 ($P < 0.05$),对照组的细胞外渗率仅为25%,各处理组的细胞外渗率均高于80%,这说明丁香酚处理可以破坏*C. acutatum*的细胞膜,导致细胞内容物渗出,从而降低*C. acutatum*的活力。

2.2.2 丁香酚对*C. acutatum*核酸泄漏的影响

$A_{260\text{ nm}}$ 特征吸收值的物质主要是一些与核酸有关的物质,它们的泄漏会导致细胞活力下降甚至死亡。如图2所示,用不同含量丁香酚处理*C. acutatum*后,紫

外分光光度计测得上清液的 $A_{260\text{ nm}}$ 分别为1.35 $\pm$ 0.14、1.89 $\pm$ 0.03、1.92 $\pm$ 0.05、1.96 $\pm$ 0.04、2.04 $\pm$ 0.09、2.07 $\pm$ 0.03。可见,*C. acutatum*的 $A_{260\text{ nm}}$ 特征吸收值的物质随丁香酚含量增大而增大。处理组与对照组之间存在显著性差异 ($P < 0.05$),这说明一定量的丁香酚处理可以导致*C. acutatum*核酸泄漏,遗传物质的泄漏会导致*C. acutatum*活力下降甚至死亡。

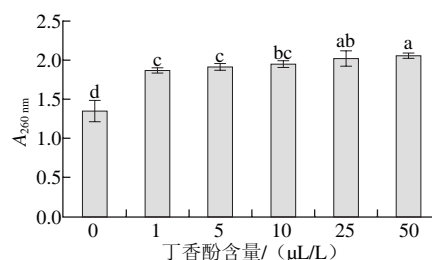


图2 丁香酚对*C. acutatum*核酸泄漏的影响

Fig. 2 Effect of eugenol on nucleic acid leakage of *C. acutatum*

2.2.3 丁香酚对*C. acutatum*蛋白质的影响

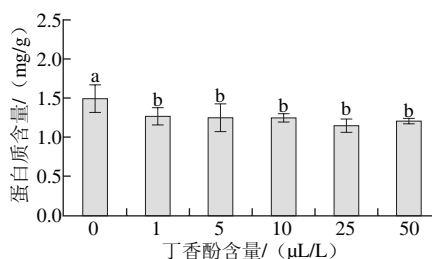


图3 丁香酚对*C. acutatum*蛋白质的影响

Fig. 3 Effect of eugenol on protein content of *C. acutatum*

由图3可知,随着丁香酚含量的增大,菌内蛋白质含量减少。对照组与处理组之间存在显著性差异 ($P < 0.05$),当丁香酚含量升至25 $\mu\text{L/L}$ 和50 $\mu\text{L/L}$ 时,菌内蛋白质平均含量分别为1.16 mg/g和1.21 mg/g,与对照组相比,蛋白质含量分别下降了0.34 mg/g和0.29 mg/g,说明一定量的丁香酚处理导致*C. acutatum*蛋白质流失。

2.3 丁香酚对枇杷采后炭疽病抑制效果

表4 丁香酚对枇杷炭疽病病斑直径及病害发生率的影响

Table 4 Effect of eugenol on lesion diameter and disease incidence of loquat fruits

丁香酚含量/ ($\mu\text{L/L}$)	2 d		4 d		6 d	
	病斑直径/mm	病害发生率/%	病斑直径/mm	病害发生率/%	病斑直径/mm	病害发生率/%
0.0	4.22 $\pm$ 0.72 ^a	87.50 $\pm$ 0.00 ^a	6.92 $\pm$ 1.24 ^a	100.00 $\pm$ 0.00 ^a	12.45 $\pm$ 1.46 ^a	100.00 $\pm$ 0.00 ^a
0.5	3.77 $\pm$ 0.65 ^{ab}	25.00 $\pm$ 12.50 ^b	4.47 $\pm$ 0.47 ^b	95.83 $\pm$ 7.20 ^a	9.26 $\pm$ 1.26 ^{bc}	100.00 $\pm$ 0.00 ^a
1.0	3.08 $\pm$ 0.45 ^b	29.17 $\pm$ 7.20 ^b	3.96 $\pm$ 0.77 ^b	58.33 $\pm$ 7.20 ^b	6.41 $\pm$ 1.75 ^c	66.67 $\pm$ 12.10 ^b
2.5	4.02 $\pm$ 0.64 ^{ab}	37.50 $\pm$ 12.50 ^b	4.48 $\pm$ 1.05 ^b	87.50 $\pm$ 0.00 ^a	8.64 $\pm$ 1.56 ^d	100.00 $\pm$ 0.00 ^a
5.0	3.26 $\pm$ 0.74 ^b	70.83 $\pm$ 12.50 ^b	4.90 $\pm$ 1.13 ^b	87.50 $\pm$ 12.50 ^b	9.75 $\pm$ 1.27 ^b	100.00 $\pm$ 0.00 ^a

注:同列肩标字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$)。

在确定丁香酚体外熏蒸抑菌效果的基础上,对其在枇杷体内的抑菌性进行了验证,结果如表4所示。接种了*C. acutatum*的枇杷果实在贮藏期间,病斑直径不断扩

大,不同含量的丁香酚对枇杷炭疽菌均有不同程度的抑制作用。2 d时,1.0 $\mu\text{L/L}$ 处理组和5.0 $\mu\text{L/L}$ 处理组病斑直径与对照组有显著性差异($P<0.05$);4 d时,与对照组相比,各处理均能显著抑制病斑直径扩展($P<0.05$);6 d时,各处理均能显著抑制枇杷炭疽病病斑直径($P<0.05$),其中1.0 $\mu\text{L/L}$ 丁香酚处理效果最好,病斑直径仅为6.41 mm,病害发生率为66.67%,其他组的病害发生率均达到100%,有显著性差异($P<0.05$)。由此可知,1.0 $\mu\text{L/L}$ 丁香酚的处理效果最好,可有效抑制病害直径扩展及病害发生率。

综合丁香酚对枇杷炭疽病病斑直径及病害发生率的影响,初步筛选出1 $\mu\text{L/L}$ 丁香酚为最适处理含量,并将其应用于枇杷品质实验。

2.4 丁香酚对枇杷品质的影响

表5 丁香酚对枇杷品质影响
Table 5 Effects of eugenol treatment on the basic physicochemical indices of loquat

贮藏时间/d	组别	指标							
		质量损失率/%	L^*	a^*	b^*	硬度/N	SSC含量/%	TA含量/%	VC含量/(mg/100 g)
0		60.00±2.55	19.70±2.91	19.70±2.91	2.99±0.45	7.10±0.67	2.24±0.12	18.13±1.32	
3	对照组	0.30±0.09 ^a	60.20±1.83 ^a	17.49±1.52 ^a	38.10±2.33 ^a	7.41±1.81 ^a	6.55±0.72 ^a	2.07±0.12 ^a	15.75±0.87 ^a
	处理组	0.21±0.06 ^a	60.30±2.32 ^a	18.36±1.76 ^a	39.29±2.05 ^a	7.87±0.88 ^a	6.75±0.97 ^a	2.02±0.26 ^a	16.70±0.46 ^a
6	对照组	0.55±0.02 ^a	60.53±1.33 ^a	19.65±2.24 ^a	38.56±2.77 ^a	8.20±1.23 ^a	6.48±0.53 ^a	1.74±0.12 ^a	14.40±0.83 ^a
	处理组	0.45±0.05 ^b	60.37±1.79 ^a	18.33±1.81 ^a	37.30±2.50 ^a	8.89±1.65 ^a	6.54±0.66 ^a	1.85±0.22 ^a	16.89±1.05 ^b
9	对照组	0.65±0.09 ^a	61.59±1.74 ^a	17.24±1.26 ^a	39.23±1.79 ^a	8.28±0.67 ^a	6.23±0.79 ^a	1.66±0.23 ^a	14.27±0.36 ^a
	处理组	0.49±0.04 ^b	61.69±1.95 ^a	17.64±1.25 ^a	39.18±1.65 ^a	8.89±1.29 ^a	6.37±1.01 ^a	1.82±0.32 ^a	17.37±1.48 ^b
12	对照组	0.90±0.06 ^a	54.56±1.87 ^a	18.43±1.39 ^a	37.00±1.66 ^a	9.76±0.51 ^a	6.07±1.04 ^a	1.16±0.23 ^a	12.33±1.79 ^a
	处理组	0.77±0.07 ^b	56.58±2.32 ^a	18.24±1.74 ^a	38.08±2.90 ^a	11.24±1.56 ^a	6.16±0.87 ^a	1.35±0.12 ^a	19.73±1.57 ^b

注:同一贮藏时间同行肩标字母不同表示差异显著($P<0.05$)。

由表5可知,随着贮藏时间的延长,各组的质量损失率均逐渐增大,贮藏6 d开始,处理组的质量损失率显著低于对照组($P<0.05$);果实颜色变化用 L^* 、 a^* 、 b^* 值表示, L^* 值表示果实表面的明亮程度, a^* 值为果实红绿值, b^* 值为果实蓝黄值,丁香酚对 L^* 、 a^* 值和 b^* 值无显著影响($P>0.05$);硬度呈现逐渐上升的趋势,这与枇杷组织发生木质化有关,贮藏前9 d,各组枇杷硬度无显著差异($P>0.05$),12 d处理组硬度显著高于对照组($P<0.05$);SSC和TA含量均呈现下降的趋势,SSC含量保持在6.0%~7.1%间,TA含量在1.1%~2.3%间,各组之间均无显著性差异($P>0.05$);对照组的VC含量呈下降趋势,这是果蔬贮藏期间自身生理代谢消耗及衰老的结果,贮藏结束时,对照组VC含量下降了约32.0%,处理组VC含量在贮藏期间先下降后略微上升,6 d开始,与对照组相比,差异显著($P<0.05$)。因此,1 $\mu\text{L/L}$ 丁香酚在一定程度上对枇杷果实具有增效作用,有利于枇杷品质的提高。

3 讨论与结论

植物精油分子较小易挥发,在气态时具有较强的生物活性。钟业俊等^[11]发现,丁香酚及柠檬醛对荔枝黑曲霉具有良好的抑制作用,0.3 $\mu\text{L/mL}$ 的丁香酚可以完全抑制黑曲霉的生长。贺红宇等^[19]用10种植物精油对圣女果采后3种致病菌进行了体外抑菌研究,结果表明10种精油均能有效地抑制圣女果采后真菌的生长。王宏年等^[20]系统测试了香茅油、柠檬草油、樟油、黄樟油、天然冬青油、山苍子油、肉桂油7种植物精油对番茄灰霉病抑菌效果,结果表明黄樟油和肉桂油对灰霉菌抑制效果最好。本实验首先研究了丁香酚、柠檬醛及香茅醛对*C. acutatum*体外抑制作用,发现3种精油对*C. acutatum*均有良好的抑制性,抑制效果为丁香酚>柠檬醛>香茅醛,揭示了丁香酚用于枇杷采后抗炭疽病的潜力。

植物精油的抑菌机理与其主要成分、立体结构及作用方式有关,抑菌机理方面的实验结果主要是通过对细菌的研究而获得的,但对于真菌的抑菌机理目前尚未阐明^[21]。丁香酚为有机酚类,具有较强的挥发性,可作用于微生物细胞膜的蛋白质和脂质^[15,22-23]。本实验对细胞外渗率及内容物泄漏进行了初步探究,研究表明,随着丁香酚含量的升高,*C. acutatum*的细胞外渗率、核酸泄漏量均增大,菌内蛋白质的含量逐渐降低,细胞外渗率的增大导致细胞膜的通透性增高,细胞内物质流出,易导致*C. acutatum*活性下降甚至死亡。

丁香酚是丁香精油中主要成分,对子囊菌、卵菌、丝核菌和半知菌等不同种类真菌均有抑制作用,表明其抑菌谱较广并广泛应用于果蔬采后保鲜抗病等方面^[24]。潘磊庆等^[25]发现丁香精油可有效抑制根霉、灰霉的生长,降低果实的腐烂指数,并可诱导樱桃番茄防御性酶;李鹏霞等^[26]发现丁香酚能够抑制采后苹果主要病害,延缓采后苹果的衰老,有利于保持苹果的品质和风味;关文强等^[27]发现丁香精油对葡萄、冬枣、桃、蒜薹等果蔬采后主要病原菌具有良好的抑制效果。本实验结果表明1 $\mu\text{L/L}$ 丁香酚对枇杷采后炭疽病具有良好的抑制效果且对枇杷保鲜具有一定的增效作用。丁香酚能够抑制采后枇杷质量损失率的上升,SSC、TA及VC含量的下降,维持采后枇杷果实的硬度及颜色,有利于保持枇杷果实的品质。关于其对枇杷炭疽病抑菌机理及对果实气味的的影响尚需进一步深入研究。

综上所述,丁香酚对*C. acutatum*具有良好的抑制作用,能够作为杀菌剂运用于枇杷采后贮藏中。目前,精油复合型果蔬抑菌剂、可食性膜、微胶囊及与热处理、电离辐射、生物防治、紫外线照射等^[28-30]保鲜技术的结合,对果蔬保鲜具有重要的应用价值。

参考文献:

- [1] 张荣意, 谭志琼, 简日明. 芒果炭疽病菌生防细菌的筛选、鉴定及生防潜能的初步研究[J]. 热带作物学报, 1998(3): 21-27.
- [2] 陶金华, 胡瑞兰, 陈发河, 等. 枇杷炭疽病菌的生物学特性的研究[J]. 新疆农业科学, 2006, 43(6): 472-476. DOI:10.3969/j.issn.1001-4330.2006.06.006.
- [3] 秦刚, 吴庆丽. 辣椒炭疽病生防菌筛选及抗菌活性初步研究[J]. 北方园艺, 2012(6): 124-128.
- [4] 徐成楠, 王亚南, 胡同乐, 等. 蓝莓炭疽病病原菌鉴定及致病性测定[J]. 中国农业科学, 2014, 47(20): 3992-3998. DOI:10.3864/j.issn.0578-1752.2014.20.007.
- [5] 陶金华. 枇杷采后炭疽病的病理生理学及病害控制的研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2006: 2-4.
- [6] 王勇. 植物精油抑菌分析及应用研究[J]. 现代园艺, 2016(6): 19. DOI:10.3969/j.issn.1006-4958.2016.06.011.
- [7] BAKKALI F, AVERBECK S, AVERBECK D, et al. Biological effects of essential oils: a review[J]. Food and Chemical Toxicology, 2008, 46(2): 446-475. DOI:10.1016/j.fct.2007.09.106.
- [8] SHAKERI A, KHAKDAN F, SOHEILI V, et al. Volatile composition, antimicrobial, cytotoxic and antioxidant evaluation of the essential oil from *Nepeta sintenisii* Bornm[J]. Industrial Crops and Products, 2016, 84: 224-229.
- [9] 陈倩茹. 植物精油对樱桃番茄主要病原菌抑制效果的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2014: 37-42.
- [10] 王桂芳. 半夏有效部位提取物对常见细菌及酵母样真菌的体外抑菌实验的研究[J]. 临床医药实践, 2009(11): 1588-1589.
- [11] 钟业俊, 徐欣源, 刘成梅, 等. 茶树油、丁香酚和柠檬醛对荔枝黑曲霉的抑制作用[J]. 食品科学, 2012, 33(11): 21-24.
- [12] AGUILAR-GONZÁLEZ A E, PALOU E, LÓPEZ-MALO A. Antifungal activity of essential oils of clove (*Syzygium aromaticum*) and/or mustard (*Brassica nigra*) in vapor phase against gray mold (*Botrytis cinerea*) in strawberries[J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2015, 32: 181-185. DOI:10.1016/j.ifset.2015.09.003.
- [13] CINDI M D, SHITTU T, SIVAKUMAR D, et al. Chitosan boehmite-alumina nanocomposite films and thyme oil vapour control brown rot in peaches (*Prunus persica* L.) during postharvest storage[J]. Crop Protection, 2015, 72: 127-131. DOI:10.1016/j.cropro.2015.03.011.
- [14] BOUBAKER H, KARIM H, EL HAMDIOUI E A, et al. Chemical characterization and antifungal activities of four *Thymus* species essential oils against postharvest fungal pathogens of citrus[J]. Industrial Crops and Products, 2016, 86: 95-101. DOI:10.1016/j.indcrop.2016.03.036.
- [15] 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: 31-33.
- [16] 陈爱葵, 韩瑞宏, 李东洋, 等. 植物叶片相对电导率测定方法比较研究[J]. 广东教育学院学报, 2010, 30(5): 88-91. DOI:10.3969/j.issn.1007-8754.2010.05.016.
- [17] CHEN Qianru, XU Shixiang, WU Tao, et al. Effect of citronella essential oil on the inhibition of postharvest *Alternaria alternata* in cherry tomato[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2014, 94(12): 2441-2447.
- [18] JIANG Yueming, LI Yuebiao. Effects of chitosan coating on postharvest life and quality of longan fruit[J]. Food Chemistry, 2001, 73(2): 139-143. DOI:10.1016/S0308-8146(00)00246-6.
- [19] 贺红宇, 朱永清, 王自鹏, 等. 10 种植物精油对圣女果中三种致病菌抑制效果的研究[J]. 食品工业科技, 2016, 37(18): 153-157. DOI:10.3969/j.issn.0529-1542.2007.05.028.
- [20] 王宏年, 江志利, 冯俊涛, 等. 7 种植物精油对番茄灰霉病的抑制效果[J]. 植物保护, 2007, 33(5): 111-115.
- [21] TIAN J, BAN X Q, ZENG H, et al. The Mechanism of Antifungal action of essential oil from dill (*Anethum graveolens* L.) on *Aspergillus flavus*[J]. PLoS ONE, 2012, 7(1): 1-10. DOI:10.1371/journal.pone.0030147.
- [22] XIE Y, YANG Z, CAO D, et al. Antitermitic and antifungal activities of eugenol and its congeners from the flower buds of *Syzygium aromaticum* (clove)[J]. Industrial Crops and Products, 2015, 77: 780-786. DOI:10.1016/j.indcrop.2015.09.044.
- [23] 王春梅, 张杰, 陈浩, 等. 天然化合物丁香酚对灰葡萄孢菌丝脂质过氧化和膜损伤的影响[J]. 农药学报, 2009, 11(1): 104-108.
- [24] VIUDA-MARTONS M, RUIZ-NAVAJAS Y, FERNÁNDEZ-LÓPEZ J, et al. Antifungal activities of thyme, clove and oregano essential oils[J]. Journal of Food Safety, 2007, 27: 91-101. DOI:10.1111/j.1745-4565.2007.00063.x.
- [25] 潘磊庆, 朱娜, 邵兴锋, 等. 丁香精油对樱桃番茄保鲜作用的研究[J]. 食品工业科技, 2012, 33(23): 335-338.
- [26] 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): 173-177. DOI:10.3321/j.issn:1002-6819.2006.06.037.
- [27] 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. DOI:10.3321/j.issn:1002-6630.2005.12.056.
- [28] NOSTRO A, SCAFFARO R, D'ARRIGO M, et al. Study on carvacrol and cinnamaldehyde polymeric films: mechanical properties, release kinetics and antibacterial and antibiofilm activities[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 96(4): 1029-1038. DOI:10.1007/s00253-012-4091-3.
- [29] ARREBOLA E, SIVAKUMAR D, BACIGALUPO R, et al. Combined application of antagonist *Bacillus amyloliquefaciens* and essential oils for the control of peach postharvest diseases[J]. Crop Protection, 2010, 29(4): 369-377. DOI:10.1016/j.cropro.2009.08.001.
- [30] FRANKOVA A, SMID J, BERNARDOS A, et al. The antifungal activity of essential oils in combination with warm air flow against postharvest phytopathogenic fungi in apples[J]. Food Control, 2016, 68: 62-68. DOI:10.1016/j.foodcont.2016.03.024.