

壳聚糖对纽荷尔脐橙果实采后青霉病菌的抑菌作用研究

刘 锋, 陈 明, 陈金印*

(江西农业大学 农学院, 江西 南昌 330045)

摘要:在离体和活体条件下,进行壳聚糖对纽荷尔脐橙果实青霉病菌的抑制作用研究。结果表明:在离体条件下,不同浓度壳聚糖对青霉病菌菌丝生长和形态结构均有一定影响,壳聚糖抑制了菌丝生长并使菌丝变粗、松散。同时,采后壳聚糖处理可明显降低损伤接种青霉病菌脐橙果实的发病率,以 15 g/L 壳聚糖处理 30 s 效果最好。

关键词:壳聚糖;纽荷尔脐橙;青霉病菌;抑菌作用

中图分类号: S436.661.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2286(2010)03-0489-04

Antifungal Activity of Chitosan on *Penicillium italicum* in Postharvest 'Newhall' Navel Orange Fruits

LU Feng, CHEN Ming, CHEN Jin-yin*

(College of Agronomy, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China)

Abstract: The antifungal activity of chitosan on *Penicillium italicum* in 'Newhall' navel orange fruits *in vitro* and *vivo* was studied. The results showed that different concentrations of chitosan had a direct effect on the growth and morphology of *Penicillium italicum in vitro*, chitosan inhibited the growth of hyphae and made hyphae become thicker and looser. In the meanwhile, postharvest chitosan treatment could reduce infection percentage of wound-inoculated navel oranges, and the best treatment was soaking 30 s with 1.5% chitosan.

Key words: chitosan (CTS); 'Newhall' navel orange; *Penicillium italicum*; antifungal activity

赣南是我国著名的脐橙生产基地,素有“中国脐橙之乡”之称。近年来赣南脐橙产业发展很快,但采后腐烂一直是脐橙生产和流通过程中的主要问题之一。柑橘青霉病是由意大利青霉(*Penicillium italicum*)侵染柑橘引起的重要采后病害,烂果率高达 10%~30%,造成严重的采后损失^[1]。虽然采用化学杀菌剂可对青霉菌引起的病害进行有效控制,但在果实的食用安全性方面仍存在诸多问题^[2]。因此人们迫切希望找到一种更加安全有效的控制柑橘采后病害的方法。

壳聚糖(Chitosan,简称 CTS)是一种 1,4-β-氨基葡萄糖的聚合物,又称几丁聚糖,化学名称为 (1,4)-2-乙酰氨基-2-脱氧-D-葡聚糖,广泛存在于真菌的细胞壁及虾、蟹等甲壳动物的外壳中^[3]。由于具有良好的成膜性和抗菌性,涂布于果蔬表面能有效地延缓后熟和衰老,减少腐烂,延长果

收稿日期:2010-03-03 修回日期:2010-05-04

基金项目:江西省自然科学基金项目(0630059)和江西省主要学科学术和技术带头人培养计划项目(050007)

作者简介:刘锋(1977-),男,硕士生,主要从事果实采后生理研究; *通讯作者:陈金印,教授,博士生导师, E-mail: jinyinchen@126.com。

蔬的贮藏时间^[4]。另一方面,壳聚糖还具有防治病害的作用,其抑菌活性已在多种真菌中得到证实,已有研究涉及壳聚糖防治桃^[5-6]、杏^[7]、芒果^[8]和甜瓜^[9]等果实的采后病害。本研究通过对壳聚糖在纽荷尔脐橙果实青霉菌的抑制作用进行了初步研究,以期壳聚糖控制脐橙果实采后青霉病提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 供试材料

1.1.1 纽荷尔脐橙 于 2007 年 11 月 26 日采于江西省脐橙研究所,并且当天用专门脐橙果箱装箱运回江西农业大学果树实验室。挑选大小均匀、无病虫害、成熟度一致和表面无机械损伤的果实进行试验。

1.1.2 青霉菌 分离自长有典型青霉的纽荷尔脐橙腐烂病果,用 2.5 g/L 氯酸钠表面消毒,无菌水冲洗后,切取病健交界处组织,移至 PDA 培养基上培养,等长出分生孢子后进行单孢分离,纯化后在 PDA 培养基上保存待用。

1.1.3 壳聚糖 市售,用 10 mL/L 醋酸分别配制成 10 g/L、15 g/L 和 20 g/L 的壳聚糖溶液,待用。

1.2 试验方法

1.2.1 离体抑菌试验 取 10、15、20 g/L 的壳聚糖溶液 1 mL 分别加入 12 mL 加热融化后约 60 的 PDA 培养基中,混匀后倒入培养皿中制成含不同体积分数壳聚糖的平板,以等量无菌水为对照。凝固后在平板中心接种直径为 0.8 cm 的青霉菌菌片,28 ℃ 恒温培养,逐日记录菌落直径,每处理重复 5 次。

1.2.2 菌丝形态学观察试验 参照李红叶等^[5]的方法,在含有 10、15、20 g/L 壳聚糖的 PDA 培养基表面,分别加入 0.5 mL 含 10^6 个/mL 病菌的孢子悬浮液,涂抹均匀,置 28 ℃ 培养 24 h 后,用吕氏美蓝染色在设定浓度下的菌落,用光学显微镜观察菌丝的形态变化。

1.2.3 损伤接种试验 先将经 PDA 纯化的病原菌孢子配成浓度为 1×10^6 个孢子/mL 的孢子悬浮液,然后用灭菌铁钉(直径为 2 mm)在经(乙醇)=70%表面消毒的脐橙果实中部分别刺(2 ± 1) mm 大小孔 3 个。将上述孢子悬浮液定量约(40 μL)滴入刺孔中,稍晾干后进行壳聚糖处理:(1)分别用 10、15、20 g/L 壳聚糖溶液浸果 30 s,对照用 10 mL/L 醋酸浸果 30 s,每处理 3 次重复,晾干后,置于室温无菌污染处,每 10 d 观察 1 次,记录发病情况;(2)用 15 g/L 的壳聚糖在 40 ℃ 下分别浸果 5、30、55 s,每处理 3 次重复,晾干后,置于室温无菌污染的地方,每 6 d 观察 1 次,记录发病情况。

1.3 数据统计与分析

采用 SPSS 12.0 统计分析软件进行数据整理与分析;用 Paired - samples T Test 方法进行显著差异性分析,显著性差异水平:显著($P < 0.05$)和极显著($P < 0.01$)。

2 结果与分析

2.1 壳聚糖对青霉菌菌丝生长的影响

由图 1 可知,不同浓度的壳聚糖对纽荷尔脐橙果实青霉菌均有一定的抑制作用,其中 15 g/L 的壳聚糖抑菌效果最好,与对照相比差异显著,在第 5 d 时抑菌圈直径 1.51 cm,而对照为 1.80 cm;20 g/L 的壳聚糖效果次之;10 g/L 的壳聚糖抑菌效果最差。说明壳聚糖浓度的高低对抑菌效果有较大影响,浓度低则溶液粘度不大,浓度高则液体与培养基混合不均匀,达不到理想的抑菌目的。

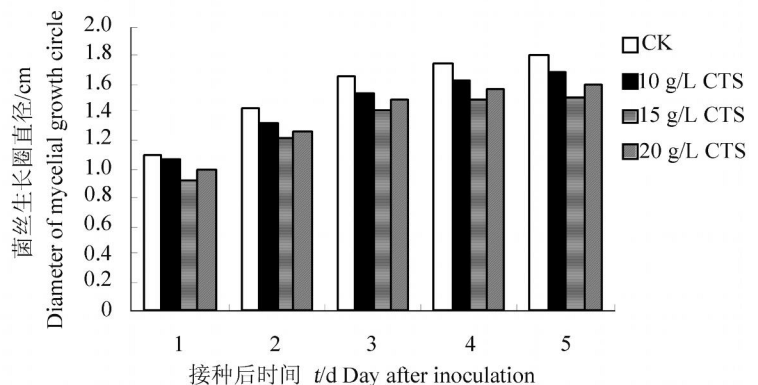


图 1 壳聚糖对青霉菌菌丝生长的影响

Fig 1 Effects of chitosan on mycelial growth of *Penicillium italicum* in vitro

2 2 壳聚糖对青霉菌菌丝生长形态的影响

表 1 不同浓度壳聚糖对青霉菌菌丝生长形态特征的影响

Tab 1 Effects of different concentration chitosan on morphologic characters of *Penicillium italicum* in vitro

观察时间 /h	菌丝形态特征 Morphologic characters of <i>Penicillium italicum</i>			
Observation time	CK	10 g/L CTS	15 g/L CTS	20 g/L CTS
24	纤细、紧密, 分枝角度大	较粗壮、松散, 分枝角度较小	最粗壮、松散, 分枝角度最小	粗壮、松散, 分枝角度小

试验表明:在离体培养条件下,不同浓度壳聚糖对病菌菌丝的生长都有一定抑制作用,并影响菌体的形态,使菌体变粗、扭曲,菌丝排列松散,分枝角度变小。其中 15 g/L 的壳聚糖影响最大,说明抑制效果最好。

2 3 不同浓度壳聚糖处理对损伤接种脐橙发病率的影响

由图 2 可知,在活体培养条件下,不同浓度壳聚糖对损伤接种纽荷尔脐橙果实的发病率都有一定抑制作用。对照果实在第 20 d 发病率就达到 20%;到第 70 d 迅速上升到 80%;而到第 100 d 果实已 100% 全部发病。壳聚糖处理中以 15 g/L 浓度的效果最好,直到第 60 d 才开始出现病果;20 g/L 的壳聚糖抑菌效果次之,在第 50 d 开始出现病果。而 10 g/L 的壳聚糖抑菌效果最差,与对照无显著差异。随着时间的延长,到最后第 110 d 也仅有 15 g/L 壳聚糖处理果实发病率最低,说明不仅不同浓度壳聚糖对损伤接种脐橙青霉病抑制效果存在差异,而且壳聚糖对青霉病的抑制效果也是有限的。

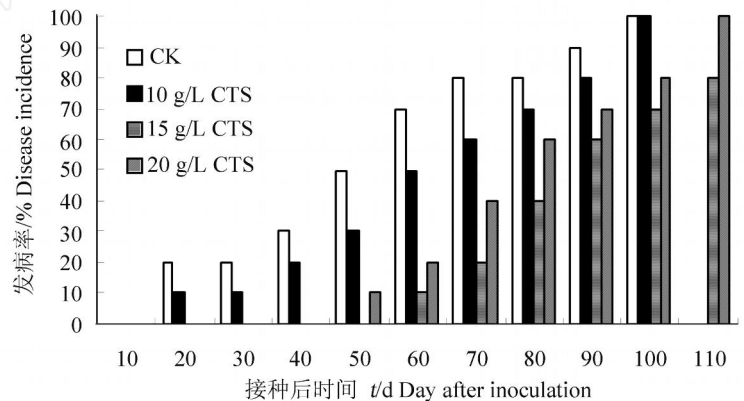


图 2 不同浓度壳聚糖处理对损伤接种脐橙果实发病率的影响

Fig 2 Effects of different concentration chitosan treatments on disease incidence of wound - inoculated navel oranges

2 4 壳聚糖处理时间对损伤接种脐橙发病率的影响

通过用 15 g/L 的壳聚糖对接种青霉菌的纽荷尔脐橙果实分别浸果 5, 30, 55 s, 研究不同时间壳聚糖处理对病菌的抑制效果。如图 3 所示:在 3 个处理中,30 s 的抑菌效果最好,在第 24 d 才出现病果,第 36 d 果实发病率达到 60%;浸果 55 s 的效果次之,在第 18 d 开始出现病果,到最后发病率达到 80%;浸果 5 s 的抑菌效果最差,第 36 d 全部发病。这可能是浸果的时间太短,壳聚糖不能均匀地涂布在果实上,青霉菌得不到较好的抑制;浸果的时间太长,大量水分会浸入果实,促使果实腐烂变质,也不能很好地起到抑制作用。

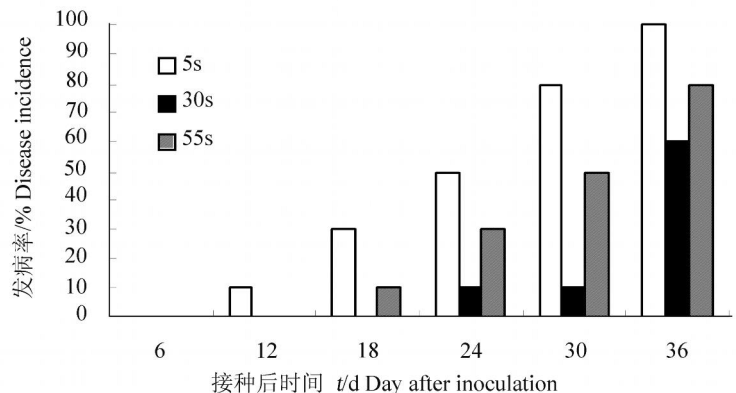


图 3 壳聚糖处理时间对损伤接种脐橙果实发病率的影响

Fig 3 Effects of chitosan treat time on disease incidence of wound - inoculated navel oranges

3 小结与讨论

壳聚糖的抑菌机理主要有 3 个方面:一是壳聚糖本身的成膜性阻碍了病原菌与寄主组织或细胞的

直接接触,减少了病原菌的有效侵入;二是壳聚糖对一些腐败真菌起到直接的抑制或杀灭作用;三是壳聚糖作为植物抗病性的激发子可调节植物体内与抗病有关的酶活性变化,从而提高抗病性。

据报道,壳聚糖处理能够控制多种果实上因灰葡萄孢,扩展青霉,指状青霉和意大利青霉引起的腐烂,对苹果和柑橘的一系列商品化处理证实,壳聚糖能有效地控制果实的自然腐烂^[10]。李红叶等^[5]以软腐病菌和褐腐病菌为试材,在离体培养条件下,壳聚糖对病菌孢子的萌发、菌丝的生长有抑制作用,并影响菌体的形态,使菌变粗、扭曲,甚至发生质壁分离。这与笔者所观察到的壳聚糖对青霉病菌菌丝形态的影响是一致的。邓雨艳等^[11]研究也发现,20 g/L壳聚糖对脐橙果实青霉病也有抑制作用,在第 18 d 后,经处理果实的接种发病率和病斑直径分别比对照果实低 72.72%和 90.19%。另外,经损伤接种细链格孢的兰州大接杏用壳聚糖涂膜处理后,可明显降低接种兰州大接杏黑斑病发病率,抑制病斑的扩展速度^[7]。

在离体和活体条件下壳聚糖对纽荷尔脐橙果实青霉病菌的抑制作用进行研究。结果表明:在离体条件下,壳聚糖抑制青霉病菌菌丝生长并影响了菌丝的形态结构;而在活体条件下,采后壳聚糖处理可明显降低损伤接种青霉病菌脐橙果实的发病率。总的来说,以 15 g/L壳聚糖处理 30 s 效果最好。

参考文献:

- [1] 龙超安,邓伯勋,何秀娟. 柑橘青、绿霉病高效拮抗菌 34-9 的筛选及其特性研究 [J]. 中国农业科学, 2005, 38 (12): 2434 - 2439.
- [2] 张维一,毕阳. 果蔬采后病害与控制 [M]. 北京:农业出版社, 1996: 3.
- [3] 马鹏鹏,何立千. 壳聚糖对植物病害的抑制作用研究进展 [J]. 天然产物研究与开发, 2001, 13 (6): 82 - 85.
- [4] 胡慧玲,宋建峰. 壳聚糖及其在果蔬保鲜中的应用研究进展 [J]. 河北农业科学, 2009, 13 (4): 78 - 79.
- [5] 李红叶,黎军英,曹若彬. 脱乙酰壳多糖对桃软腐、褐腐病菌的防治研究 [J]. 浙江农业学报, 1997, 9 (2): 87 - 92.
- [6] 黎军英,李红叶. 壳聚糖对桃褐腐病菌的抑制作用 [J]. 电子显微学报, 2002, 21 (2): 138 - 140.
- [7] 刁春英,毕阳. 采后壳聚糖涂膜处理对损伤接种杏黑斑病的影响 [J]. 甘肃农业大学学报, 2000, 35 (4): 445 - 449.
- [8] 钟秋平,夏文水. 壳聚糖对芒果炭疽病菌、蒂腐病菌的拮抗作用 [J]. 食品与机械, 2005, 21 (1): 25 - 27.
- [9] 谢东锋,毕阳,邓建军,等. 采前壳聚糖对厚皮甜瓜果实潜伏侵染及其采后主要病害的控制 [J]. 甘肃农业大学学报, 2008, 43 (2): 96 - 99.
- [10] El Ghaouth A, Smilanick J L, Brown G E, et al Application of *Candida saitoana* and glycolchitosan for the control of post-harvest diseases of apple and citrus fruit under semi-commercial conditions [J]. Plant Disease, 2000, 84 (3): 243 - 248.
- [11] 邓雨艳,明建,曾凯芳. 壳聚糖处理对脐橙果实抗病性及贮藏品质的影响 [J]. 食品科学, 2008, 29 (11): 656 - 661.