

温度、保湿时间及菌龄对扩展青霉 H1 侵染柑橘能力的影响

赵利娜, 李慧芳, 张晓云, 张红印*

(江苏大学 食品与生物工程学院, 江苏镇江 212013)

摘要: 近年来, 由扩展青霉(*Penicillium expansum*)引起的柑橘病害日益严重, 目前对于柑橘采后病原菌侵染的研究主要以指状青霉(*P. digitatum*)和意大利青霉(*P. italicum*)为主, 而对*P. expansum*侵染柑橘条件的研究还未见相关文献报道。作者以实验室前期筛选鉴定的*P. expansum* H1 为研究对象, 研究了不同温度、保湿时间和菌龄对*P. expansum* H1 侵染柑橘的影响, 结果表明,*P. expansum* H1 在 25 ℃时潜育期最短, 侵染能力最强, 4 ℃时*P. expansum* H1 侵染能力受到抑制; 保湿时间越长, 越有利于*P. expansum* H1 侵染柑橘; 菌龄也会影响*P. expansum* H1 侵染柑橘, 不同菌龄的*P. expansum* H1 侵染能力高低排序为: 培养 7 d>培养 11 d>培养 15 d>培养 9 d>培养 3 d。

关键词: 扩展青霉; 侵染; 腐烂率; 腐烂直径

中图分类号: TS 20 文章编号: 1673-1689(2020)05-0038-05 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2020.05.006

Effects of Different Temperatures, Wetness Duration and Fungus Age on *Penicillium expansum* H1 Infection of Citrus

ZHAO Lina, LI Huifang, ZHANG Xiaoyun, ZHANG Hongyin*

(School of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

Abstract: Citrus disease caused by *Penicillium expansum* has become increasingly serious, which is responsible for economic loss to citrus producing areas. The research on the infection of citrus with postharvest pathogens was mainly focused on *P. digitatum* and *P. italicum*, whereas the studies on the conditions of *P. expansum* infecting citrus have not been reported. In this study, the effects of different temperatures, wetness duration and fungus age on *P. expansum* H1 infection of citrus were investigated. The results showed that *P. expansum* H1 had the shortest incubation period and the strongest infectivity at 25 ℃, while at 4 ℃ the infectivity was inhibited. Longer wetness duration was beneficial to *P. expansum* H1 infection. The fungus age also affected the infection of citrus with *P. expansum* H1 with the order of infectivity: cultured for 7 d>11 d>15 d>9 d>3 d.

Keywords: *Penicillium expansum*, infection, disease incidence, rot diameter

收稿日期: 2018-04-24

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(31701971); 江苏省“333 高层次人才培养工程”科研项目(BRA2017442); 江苏高校青蓝工程项目。

作者简介: 赵利娜(1986—), 女, 博士, 讲师, 硕士研究生导师, 主要从事果蔬采后病害生物防治方面的研究。E-mail: linazhao@ujs.edu.cn

* 通信作者: 张红印(1972—), 男, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事果蔬采后病害生物防治方面的研究。

E-mail: zhanghongyin126@126.com

柑橘在采后运输贮藏期间的腐烂大多是由真菌侵染造成的^[1-2],黑腐病(Black rot)、褐腐病(Brown rot)、炭疽病(Anthracnose)^[3]等通常是采前已经开始侵染柑橘,采后才发病。酸腐病(Sour rot)^[1]、青霉病(Green mold)、绿霉病(Blue mold)^[4-5]等则是在采摘过程中及采后发生侵染。柑橘采后由扩展青霉(*Penicillium expansum*)^[6]、意大利青霉(*Penicillium italicum*)、指状青霉(*Penicillium digitatum*)等青霉属引起的青霉病和绿霉病造成的腐烂最为严重^[7]。柑橘的青霉病和绿霉病在柑橘果实上发病症状较为相似,侵入柑橘后伤口附近变软,接着长出白色菌丝体,最后中间部位变为青色或绿色,腐烂范围逐渐扩大,直至全果腐烂^[8]。

病原菌成功侵染宿主不是一个简单的过程。自然界中寄生能力较强的真菌可直接侵染宿主,或通过自然孔口进行侵染,如茄链格孢菌(*Alternaria solani*)可通过直接侵入的方式引起马铃薯的早疫病^[9]。引起柑橘腐烂的 *P. digitatum*、*P. italicum* 等分布范围较广,但它们寄生能力较弱,多数情况下会潜伏在水果表面,不会对水果品质造成影响,只有宿主表面出现伤口组织时才可以完成侵入^[10]。因此,在柑橘采后运输贮藏过程中要尽量避免果实出现伤口,以减少病原菌侵染的概率。当病原菌成功侵入到宿主体内后,必须有适宜的温度、湿度才能生长繁殖。*P. italicum* 的发病温度为 23 ℃, *P. digitatum* 发病温度较 *P. italicum* 高,在储藏初期柑橘的腐烂大都由 *P. italicum* 引起^[11]。储藏后期温度逐渐升高,各种病原菌进入繁殖的活跃期,协同发挥作用。除此之外,病原菌的菌龄也会影响其侵染宿主的能力,菌株生长达到成熟期侵入到宿主体内造成的危害远大于其它时期。

P. expansum 的寄生能力较弱,通过宿主的伤口组织侵入后,自身的菌龄以及外界环境条件如温度和湿度等都会影响后续的侵染速度和发病程度。Mersha 等人研究发现假尾孢叶斑病(*Pseudocercospora fuligena*)侵染番茄时菌龄为 7 d 的发病率比 21 d 的高出 50%,在 28 ℃ 的潮湿环境中潜育期最短^[12]。王翠翠等发现套袋苹果黑点病病原菌(*Alternaria tenuissima*)在 29.4 ℃ 时侵染速度最快^[13]。陆宁海等人的研究结果表明,温度和湿度持续时间对 *P. italicum* 侵染柑橘具有较大的影响^[14]。目前对于柑橘采后病原菌侵染的研究主要以指状青霉

(*P. digitatum*)^[15]和意大利青霉(*P. italicum*)为主,而对 *P. expansum* 侵染柑橘条件的研究还未见相关文献报道。作者所在实验室前期从腐烂柑橘伤口处筛选得到一株致病菌 H1,经鉴定,确定为扩展青霉,命名为 *P. expansum* H1^[16]。目前还没有菌龄、温度和湿度等条件影响 *P. expansum* 侵染柑橘的报道,因此,作者对 *P. expansum* H1 侵染柑橘能力的影响因素进行了研究,以期防治 *P. expansum* 的侵染提供必要的理论基础。

1 材料与方法

1.1 主要仪器和试剂

电子显微镜:购于江南光学仪器厂;LRH-250 生化培养箱:购于上海恒一科技有限公司;GR85DR 型全自动高压灭菌锅:购于致微(厦门)仪器有限公司;SW-CJ-2FD 超净工作台:购于苏州净化设备有限公司;血球计数板:购于丹阳市健陵医疗器械公司。试验所用试剂:均购于镇江华东化玻有限公司。

1.2 菌悬液的制备

试验所用菌种 *P. expansum* H1 系从江苏省镇江市江心洲生态果园收集的腐烂柑橘伤口处分离纯化得到。将 *P. expansum* H1 接种于 PDA 培养基(马铃薯 200 g,加水煮沸 20 min,过滤后往滤液中加入 20 g 葡萄糖,20 g 琼脂,蒸馏水定容至 1 L,121 ℃ 高压灭菌 20 min)上活化,25 ℃ 培养 7 d,用接种环挑取孢子至无菌生理盐水中,振荡混匀,用无菌枪头吸取菌悬液从盖玻片侧边滴于血球计数板上,吸掉盖玻片外多余液体,在 10×40 倍显微镜下计算菌悬液的孢子浓度,调整孢子浓度至 1×10⁶ 个/mL 备用。

1.3 柑橘果实

柑橘(广西蜜桔)选用果园中成熟度一致,外观色泽大小均一旦表面无机械损伤的果实,先用清水将柑橘表面尘土等冲掉,再浸入到 0.3% 的 NaClO 中杀菌消毒 2 min,最后用清水冲洗干净,室温下自然晾干。在柑橘赤道位置用灭菌打孔器打 3 个相同均匀分布的伤口(5 mm×3 mm)备用。

1.4 温度对 *P. expansum* H1 侵染柑橘能力的影响

在柑橘伤口处加入 30 μL 浓度为 1×10⁶ 个/mL 的 *P. expansum* H1 的菌悬液,2 h 后用保鲜膜密封装有柑橘的筐子,分别置于 4、10、15、20、25、30、35 ℃,95%RH 恒温恒湿培养箱中。每个筐中放 12 个柑橘,每个处理 3 个平行,整个试验重复 3 次,逐日观

察统计潜育期和柑橘腐烂情况。

1.5 保湿时间对 *P. expansum* H1 侵染柑橘能力的影响

在柑橘伤口处加入 30 μL 浓度为 1×10^6 个/mL 的 *P. expansum* H1 的菌悬液, 2 h 后将浸有 5 mL 无菌水的加湿棉球放入装有柑橘的筐子中。密封后置于 25 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中。保湿时间设置为 8、16、24、32、40、48 h, 完毕后移去加湿棉球。每个筐中放 12 个柑橘, 每个处理 3 个平行, 整个试验重复 3 次。逐日统计腐烂情况和潜育期, 每隔 24 小时记录柑橘腐烂情况。

1.6 菌龄对 *P. expansum* H1 侵染柑橘能力的影响

在柑橘伤口处加入 30 μL 不同菌龄 (3、7、11、15、19 d) 浓度为 1×10^6 个/mL 的 *P. expansum* H1 的菌悬液, 密封后放置于 25 $^{\circ}\text{C}$ 、95% RH 恒温恒湿培养箱中。每个筐中放 12 个柑橘, 每个处理 3 个平行, 整个试验重复 3 次, 分别在第 4、7、10 天观察统计柑橘腐烂情况。

1.7 数据统计与分析

实验进行 3 次生物学重复, 以实验数据平均值 $\pm$ 均值标准误差 (mean $\pm$ SEM) 表示。数据统计学分析采用 SPSS 16.0 软件的 Student's *t* 检验或 One-Way ANOVA 的 Tukey's 检验。P 值小于 0.05 被认定为数据具有显著性差异。

2 结果与分析

2.1 温度对 *P. expansum* H1 侵染柑橘能力的影响

温度对 *P. expansum* H1 侵染柑橘能力的影响见表 1 和图 1-2。由表 1 可知, 温度对于 *P. expansum* H1 侵染的速度有较大影响。柑橘在 25 $^{\circ}\text{C}$ 时 35~40 h 已经开始发病; 其次是 20 $^{\circ}\text{C}$, 潜育期为 43~48 h; 15 $^{\circ}\text{C}$ 时潜育期是 67~72 h; 10 $^{\circ}\text{C}$ 和 35 $^{\circ}\text{C}$ 潜育期最长, 为 72~77 h (除 4 $^{\circ}\text{C}$ 外)。图 1-2 的结果显示, 25 $^{\circ}\text{C}$ 时柑橘的腐烂率和腐烂直径在 48、72、96 h 始终高于其他温度, 处于 4 $^{\circ}\text{C}$ 的柑橘在试验期间并未腐烂。48 h 时 20、25、30 $^{\circ}\text{C}$ 柑橘已经开始腐烂, 其它温度的柑橘并未腐烂。72 h 时所有温度的柑橘都已腐烂, 25 $^{\circ}\text{C}$ 的柑橘腐烂率达到 90.3%, 是 35 $^{\circ}\text{C}$ 的 10.8 倍, 腐烂直径为 12.7 mm (伤口直径是 3 mm), 其次是 20 $^{\circ}\text{C}$ 和 30 $^{\circ}\text{C}$, 腐烂率为 80.6% 和 72.2%, 腐烂直径为 10.9 mm 和 9.7 mm。96 h 时 25 $^{\circ}\text{C}$ 的柑橘腐烂率高达 98%, 几乎已经全部腐烂, 腐烂直径为 19.9 mm。以上结果表明, *P. expansum* H1 在

25 $^{\circ}\text{C}$ 时潜育期最短, 侵染柑橘的能力最强, 4 $^{\circ}\text{C}$ 时 *P. expansum* H1 侵染柑橘的能力受到抑制。

表 1 温度对柑橘发病潜育期的影响

Table 1 Effects of temperature on infection incubation period of citrus

温度/ $^{\circ}\text{C}$	潜育期/h
4	—
10	72~77
15	67~72
20	43~48
25	35~40
30	43~48
35	72~77

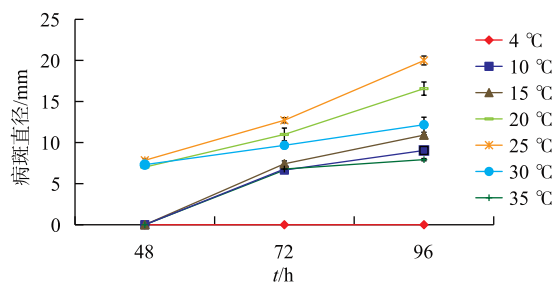


图 1 温度对 *P. expansum* H1 侵染柑橘腐烂直径的影响

Fig. 1 Effects of temperature on the rot diameter of citrus infected by *P. expansum* H1

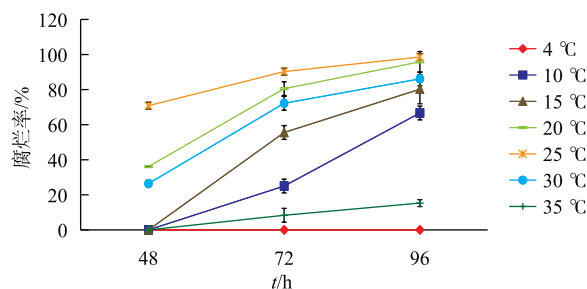


图 2 温度对 *P. expansum* H1 侵染柑橘腐烂率的影响

Fig. 2 Effects of temperature on the disease incidence of *P. expansum* H1 infecting citrus

2.2 保湿时间对 *P. expansum* H1 侵染柑橘能力的影响

不同保湿时间对 *P. expansum* H1 侵染柑橘能力的影响见图 3-4。可以看出, 湿度对于 *P. expansum* H1 的侵染能力也有很大影响。在第 48 小时, 保湿时间为 8 h 的柑橘腐烂率为 12.5%; 保湿时间为 48 h 的腐烂率高达 86%, 腐烂直径为 11.2 mm, 是保湿 8 h 的 2 倍左右; 96 h 后保湿 8 h 的柑

橘腐烂率为 93%, 腐烂直径是 12.4 mm; 保湿时间 32 h 以上的柑橘腐烂率全部达到 100%, 腐烂直径在 16 mm 以上, 最高达 21.3 mm。从时间节点分析, 保湿 48 h 的柑橘腐烂直径扩展的速度较快。以上结果表明, 保湿时间越长, 越有利于 *P. expansum* H1 侵染柑橘, 柑橘腐烂率越高, 腐烂直径越大。

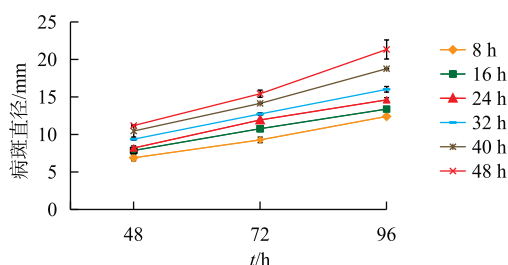
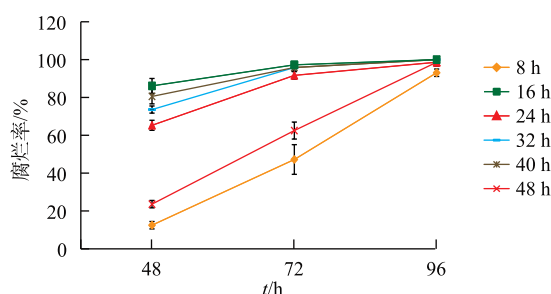


图 3 保湿时间对 *P. expansum* H1 侵染柑橘腐烂直径的影响
Fig. 3 Effects of wetness duration on the rot diameter of citrus infected by *P. expansum* H1



横坐标 48、72、96 分别表示在第 48、72、96 小时观察记录数据; 8、16、24、32、40、48 h 分别表示的是保湿时间。

图 4 保湿时间对 *P. expansum* H1 侵染柑橘腐烂率的影响
Fig. 4 Effects of wetness duration on the disease incidence of *P. expansum* H1 infecting citrus

2.3 菌龄对 *P. expansum* H1 侵染柑橘能力的影响

菌龄对 *P. expansum* H1 侵染柑橘能力的影响见图 5-6。不同菌龄的 *P. expansum* H1 侵染柑橘的能力有较大区别。培养 7 d 的 *P. expansum* H1 对柑橘的侵染能力最强, 在第 4、7、10 天的腐烂率和腐烂直径始终高于其它处理组。第 4 天时接种培养 7 d 的 *P. expansum* H1 的柑橘腐烂直径为 11.3 mm, 腐烂率已经达到 80%, 是培养 3 d 菌株的 5 倍; 第 10 天时柑橘腐烂率的大小依次为培养 7 d (99.3%) > 培养 11 d (88.6%) > 培养 15 d (71.6%) > 培养 19 d (63.7%) > 培养 3 d (59.3%), 且培养 7 d 的腐烂直径也最高, 为 30.2 mm。以上结果表明, 培养 7 d 的 *P. expansum* H1 侵染能力最强, 培养 11 d 的次之, 培养 3 d 的最弱。

值得注意的是, *P. expansum* H1 在培养 19 d 后虽致病力下降, 但依然可以引起柑橘腐烂, 具有较强的侵染能力。

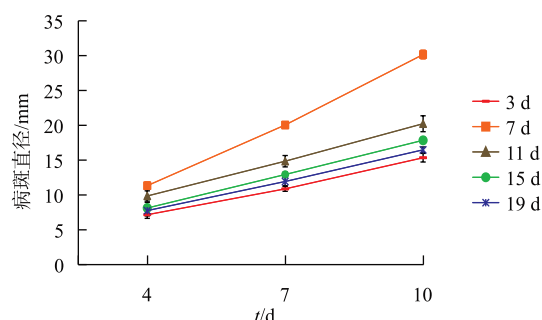
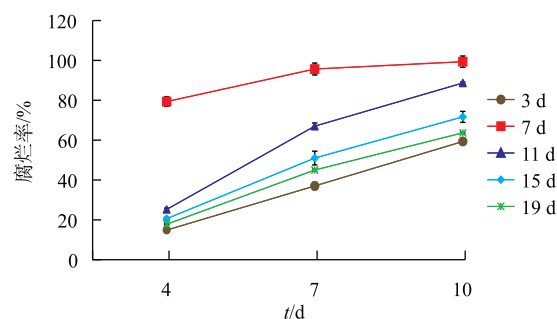


图 5 菌龄对 *P. expansum* H1 侵染柑橘腐烂直径的影响
Fig. 5 Effects of fungus age on the rot diameter of citrus infected by *P. expansum* H1



横坐标的 4、7、10 分别表示在第 4、7、10 天记录柑橘腐烂情况; 3、7、11、15、19 d 表示 *P. expansum* H1 在 25 °C, PDA 培养基上培养的时间。

图 6 菌龄对 *P. expansum* H1 侵染柑橘腐烂率的影响
Fig. 6 Effects of fungus age on the disease incidence of *P. expansum* H1 infecting citrus

3 结 语

P. expansum 可引起柑橘采后绿霉病的发生, 是除 *P. italicum* 和 *P. digitatum* 外造成柑橘腐烂的另一主要致病菌。作者研究了不同温度、保湿时间以及菌龄对 *P. expansum* H1 侵染柑橘能力的影响。实验结果表明, 温度、保湿时间和菌龄对 *P. expansum* H1 侵染柑橘的能力都有很大影响。通过腐烂率、腐烂直径及潜育期的测定结果发现, *P. expansum* H1 在 25 °C 时潜育期最短, 侵染柑橘的能力最强, 4 °C 时 *P. expansum* H1 侵染柑橘的能力受到抑制。同时, 保湿时间越长, 越有利于 *P. expansum* H1 侵染柑橘, 柑橘腐烂率越高, 腐烂直径越大。此外, 培养 7 d 的

P. expansum H1 侵染柑橘的能力最强。陆宁海等的研究发现, *P. italicum* 的菌龄和外界环境条件如温度、保湿时间都会影响柑橘青霉病 (*P. italicum*) 的发病^[14], 本研究结果与其基本一致。菌龄为 7 d 的 *P. expansum* H1 在 25 °C、保湿时间 48 h 时最适宜侵染柑橘发病, 说明该菌侵染需要较高的温度和较长的保湿时间。培养 3 d 的菌株致病性较弱, 可能是由

于培养时间较短, *P. expansum* H1 致病能力不足。柑橘在长时间的运输和贮藏过程中温度和湿度都会升高, 为 *P. expansum* 的侵染提供了有利的条件, 这可能是近年来 *P. expansum* 引起的柑橘采后病害日益严重的原因。因此在柑橘采后运输贮藏过程中应及时通风降温除湿, 以有效控制 *P. expansum* 的生长繁殖。

参考文献:

- [1] TALIBI I, BOUBAKER H, BOUDYACH EH, et al. Alternative methods for the control of postharvest citrus diseases[J]. **Journal of Applied Microbiology**, 2014, 117(1): 1-17.
- [2] MARINA MH, ANA-ROSA B, BEATRIZ DLF, et al. Genome sequence of the necrotrophic fungus *Penicillium digitatum*, the main postharvest pathogen of citrus[J]. **Bmc Genomics**, 2012, 13(1): 646-646.
- [3] ZACHOU K, GATSELIS N, GABETA S, et al. Effects of postharvest oligochitosan treatment on anthracnose disease in citrus (*Citrus sinensis* L. Osbeck) fruit[J]. **European Food Research & Technology**, 2015, 240(4): 795-804.
- [4] BARKAI-GOLAN R, BARKAI-GOLAN R. Postharvest diseases of fruits and vegetables: development and control[J]. **Postharvest Biology & Technology**, 2001, 31(2): 213-213.
- [5] ZHOU Y, DENG L, ZENG K. Enhancement of biocontrol efficacy of *Pichia membranaefaciens* by hot water treatment in postharvest diseases of citrus fruit[J]. **Crop Protection**, 2014, 63(5): 89-96.
- [6] VILANOVA L, ALMENAR I, TORRES R, et al. Infection capacities in the orange-pathogen relationship: compatible (*Penicillium digitatum*) and incompatible (*Penicillium expansum*) interactions[J]. **Food Microbiology**, 2012, 29(1): 56-66.
- [7] ZHANG Z, ZHU Z, MA Z, et al. A molecular mechanism of azoxystrobin resistance in *Penicillium digitatum* UV mutants and a PCR-based assay for detection of azoxystrobin-resistant strains in packing- or store-house isolates [J]. **International Journal of Food Microbiology**, 2009, 131(2): 157-161.
- [8] LOUW JP, KORSTEN L. Pathogenicity and host susceptibility of *Penicillium* spp. on citrus[J]. **Plant Disease**, 2015, 99(1): 21-30.
- [9] ODILBEKOV F, CARLSON NILSSON U, LILJEROTH E. Phenotyping early blight resistance in potato cultivars and breeding clones[J]. **Euphytica**, 2014, 197(1): 87-97.
- [10] YANG S, PENG L, CHENG Y, et al. Control of citrus green and blue molds by Chinese propolis[J]. **Food Science & Biotechnology**, 2010, 19(5): 1303-1308.
- [11] ERASMUS A, LENNOX C L, KORSTEN L, et al. Imazalil resistance in *Penicillium digitatum* and *P. italicum* causing citrus postharvest green and blue mould: impact and options[J]. **Postharvest Biology & Technology**, 2015, 107: 66-76.
- [12] MERSHA Z, ZHANG S, HAU B. Effects of temperature, wetness duration and leaf age on incubation and latent periods of black leaf mold (*Pseudocercospora fuligena*) on fresh market tomatoes[J]. **European Journal of Plant Pathology**, 2014, 138(1): 39-49.
- [13] 王翠翠, 金静, 李保华, 等. 苹果黑点病不同症状类型致病菌及侵染条件研究[J]. 华北农学报, 2014, 29(6): 136-144.
- [14] 陆宁海, 徐瑞富, 吴利民, 等. 柑桔青霉菌侵染条件及致病性研究[J]. 东南园艺, 2005(1): 6-8.
- [15] 韩青梅, 赵华, 成玉林, 等. 指状青霉 *Penicillium digitatum* 侵染柑橘果实的细胞学研究[J]. 菌物学报, 2013, 32(6): 967-977.
- [16] 李慧芳, 赵利娜, 郑香峰, 等. 一株产桔青霉素的扩展青霉及其产毒条件研究[J]. 食品科学, 2019, 40(16): 97-106.