

# 葡萄灰霉病的抑制方法研究

王向阳, 吕 丽, 施青红, 项 链

(浙江工商大学 食品与生物工程学院, 浙江 杭州 310035)

**摘 要:**以红提葡萄为试验材料, 分离出葡萄灰霉病菌种, 选择酒精、桂醛、戊二醛、稳定态二氧化氯、山梨酸钾、对羟基苯甲酸乙酯、酸性电位水、臭氧等方法进行处理。食品添加剂均在国家允许的最大浓度范围内使用, 研究其对葡萄灰霉病菌的抑制效果, 以获取采后安全、有效的葡萄保鲜方法。结果表明: 3  $\mu\text{L/L}$  的桂醛对培养基中和菌液中的葡萄灰霉病菌抑制效果最好, 抑菌率分别为 99.09% 和 99.10%; 其次是臭氧, 抑菌率分别为 72.73% 和 97.91%。桂醛处理最佳时间为 15 min 以上, 臭氧杀菌最佳时间为 10 min 以上。与对照相比, 2 种处理在新鲜葡萄上使用均能有效抑制葡萄灰霉病的发病率和病斑直径。其中臭氧抑菌效果好于桂醛。

**关键词:**葡萄; 灰霉菌; 防腐

中图分类号: S 436.631.1<sup>+</sup>9 文献标识码: A 文章编号: 1001-0009(2011)15-0185-04

近年来, 因灰霉病造成的葡萄产后损失依然很高<sup>[1]</sup>。目前对灰霉病菌的防治主要以化学防治为主, 辅以生物防治等<sup>[2]</sup>。张娜等<sup>[3]</sup>发现, 多抗霉素 B 800~2 000 倍液、50% 多菌灵 800 倍液等均能完全抑制灰霉病菌的生长; Qin 等<sup>[4]</sup>发现, 硼可以有效地抑制灰霉病菌孢子的萌发和菌丝体的延长。Stuardo 等<sup>[5]</sup>研究碱化的皂荚苷也具有类似的效果; 李自强等<sup>[6]</sup>发现, 10% 和 20% 乙醇加 0.5% 和 1.0% 山梨酸钾协同处理能显著

提高对灰霉病菌的抑制效果, 可使葡萄腐烂率降到 10% 以下; 陈廷平<sup>[7]</sup>用百可得 WP 防治葡萄灰霉病菌的田间药效试验结果表明, 1 000、1 500、2 000 和 2 500 倍液 4 种浓度的 WP 防效间差异均可达显著水平; 也有文献表明, 乳油对葡萄灰霉病菌有一定的防治效果<sup>[8-9]</sup>。Canamas 等<sup>[10]</sup>研究中涉及到的用假丝酵母 CPA-1 可以有效抑制葡萄灰霉病菌; 康萍芝等<sup>[11]</sup>用木霉菌拮抗葡萄灰霉病菌, 发现绿色木霉等 11 种木霉菌种对葡萄灰霉病菌均有不同程度的拮抗作用, 部分抑菌率高达 61.8%~77.6%; 李永刚等<sup>[12]</sup>证明了枯草芽孢杆菌 BS2 对葡萄灰霉病菌具有抑菌作用, BS2 的菌液成分及胞外蛋白对灰霉病菌的产孢、萌发和菌丝的生长等

第一作者简介: 王向阳(1966-), 男, 博士, 博士生导师, 现从事农产品保鲜与加工研究工作。E-mail: wxy200228@yahoo.com.cn.

收稿日期: 2011-05-05

之间差异不显著; 但 64% 杀毒矾可湿性粉剂 400 倍液与克毒雷夫 1 500 倍液防效低于 80%, 与前 3 种药剂差异极显著, 二者间差异也达到极显著水平。

## 2.2 药剂喷雾防治试验

从表 2 可看出, 5 种药剂的防治效果均在 70% 以上, 最好的为抑快净和百菌清防治效果均在 85% 左右, 其次为普力克。在试验中, 喷洒药剂的防治效果受天气、灌溉情况的影响较大, 生长后期、喷洒防治效果明显下降。从结果上看, 防治效果不如灌根理想。

表 2 药液叶面喷雾防治试验结果

药剂种类	病情指数	发病株率	防治效果	显著性测定	
		/%	/%	5%	1%
52.5% 抑快净 2 000 倍液	3.8	9	85.4	a	A
66.5% 普力克水剂 400 倍液	5.0	11	80.8	b	B
75% 百菌清 600 倍	3.9	10	85.0	a	A
64% 杀毒矾 500 倍	6.9	13	73.5	c	C
克毒雷夫 1 500 倍	7.8	15	70.0	c	C
清水(CK)	26	31			

## 2.3 药剂涂抹防治试验

从表 3 可看出, 高浓度药剂涂抹黄瓜茎秆对疫病的治疗效果好, 其中百菌清、抑快净、普力克的治愈率

94% 以上。以上 3 种药液涂抹 2 次后, 茎病斑复发率均低于 15%。试验中未发现药害病状, 说明此项措施完全可行, 以便推广。

表 3 药液涂抹防治试验结果

药剂种类	治愈率/%	复发率/%
52.5% 抑快净 2 000 倍液	95.3	12
66.5% 普力克水剂 400 倍液	96.2	14
75% 百菌清 600 倍	94.3	12
64% 杀毒矾 500 倍	87.3	23
克毒雷夫 1 500 倍	87.1	28

## 3 小结

该试验结果表明, 防治黄瓜疫病的理想药剂为 52.5% 抑快净、66.5% 普力克水剂、75% 百菌清。预防黄瓜疫病的方法, 药液涂抹效果最好, 药液灌根其次, 喷雾防治效果最差。在试验观察中发现, 药液灌根 3 次的植株发病后, 病情发展缓慢; 黄瓜植株遇到适温、高湿条件, 疫病病情发展较快, 采用喷洒药剂的防治效果受天气、灌溉情况的影响较大, 效果不如灌根。病情发展较重时, 可以采取涂抹 2 次高浓度药液的方法作为补救措施, 效果比较明显。

方面均具有较好的抑制作用; 缙继斌等<sup>[13]</sup>发现, 拮抗菌 *P<sub>1</sub>* (*Bacillus subtilis*) 和 *P<sub>5</sub>* (*Bacillus* sp) 能够明显推迟葡萄贮藏期葡萄灰霉菌发病率。Zoffoli 等<sup>[14]</sup>认为, 氯气修正性气体包装法是一种取代  $\text{SO}_2$  的安全有效的保鲜方法。其它方法有热蒸汽处理法<sup>[15]</sup>, 紫外线照射法<sup>[16]</sup>等。以上抑制方法中, 化学防治采用的药剂抑菌率高, 但一般会对葡萄的食用安全产生影响; 生物防治等方法的抑制效果需要进一步提高, 并且其在低温条件下抑制效果不太理想。该试验对食品消毒处理和食品添加剂对葡萄灰霉病的抑制效果进行初步的试验研究, 试图找出一种安全、经济的防治方法, 更大程度地增加葡萄产业的经济效益。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

红提葡萄购自杭州物美超市, 产地来自烟台海阳, 葡萄黑霉病菌种从红提中提取。

### 1.2 鉴定方法

1.2.1 灰霉菌的分离和鉴定 挑取即将腐烂的葡萄在室温下放置, 使其充分发病 (2~3 d)。用无菌水清洗葡萄表面, 将所得菌悬液倒 1 滴在 PDA 培养基上, 在 28℃ 恒温培养箱中培养 72 h。在无菌台操作, 用接种环挑取葡萄上的病菌于装有无菌水的试管中制成菌悬液, 将菌悬液倒入锥形瓶中, 用无菌水稀释。用移液管移取 0.5 mL 于 PDA 培养基上, 摇晃铺平, 在 28℃ 恒温培养箱中培养 48 h 后, 观察菌落数。如此重复稀释、培养、观察菌落数, 直至生长出单菌落。在显微镜下镜检, 确定所生长出的菌是否为灰霉病菌<sup>[17]</sup>。鉴定结束后, 用接种环挑取灰霉病菌于装有无菌水的试管中制成菌悬液, 倒 1 滴在 PDA 培养基上, 在 28℃ 恒温培养箱中培养 48 h。

1.2.2 灰霉菌柯赫氏反接种鉴定<sup>[18]</sup> 用无菌水清洗葡萄表面, 用无菌针在葡萄上刺洞, 然后涂上菌液, 自然风干后, 在 28℃ 恒温培养箱中培养 48 h。对葡萄上所生长出的灰霉病菌进行再次鉴定<sup>[2]</sup>。

1.2.3 抑菌效果的判断方法 菌落总数法: 该方法参照《中华人民共和国国家标准食品微生物检验标准》的 GB4789-2003<sup>[19]</sup>。

### 1.3 试验方法

1.3.1 对培养基进行处理的抑制葡萄灰霉菌生长试验 培养基少加一半水, 灭菌后, 用各处理溶液配置, 达到普通培养基含水量。最终浓度为: 0.02% 的山梨酸, 12 mg/L 的对羟基苯甲酸乙酯, 3  $\mu\text{L/L}$  的桂醛, 50  $\mu\text{L/L}$  的戊二醛, 10  $\mu\text{L/L}$  的稳定态二氧化氯, 1%、2%、3% 的酒精, 10%、20%、30%、40%、50% 的酸性电位水。对照和臭氧处理加无菌水, 达到普通培养基含水量。再用移液管移取 0.5 mL 菌液于 PDA 培养基上, 摇晃铺平;  $\text{O}_3$  处理则是将培养基通  $\text{O}_3$  15 min ( $\text{O}_3$  浓度为 10 mL/h, 由实验室臭氧发生器制备)。将培养皿在 28℃ 恒温培养箱中培养 48 h。设置空白对照。记

录每个平板的菌落数, 重复试验 3 次。

### 1.3.2 对菌液进行处理的抑制葡萄灰霉菌生长试验

用无菌水配置使添加菌液后最终浓度为: 3  $\mu\text{L/L}$  的桂醛, 50  $\mu\text{L/L}$  的戊二醛, 10  $\mu\text{L/L}$  的稳定态二氧化氯。10%、20%、30%、40%、50% 的酸性电位水;  $\text{O}_3$  浓度为 10 mL/h。添加 0.5 mL 菌液 15 min, 然后倒入平板, 摇晃铺平;  $\text{O}_3$  处理是通  $\text{O}_3$  15 min。将培养皿在 28℃ 恒温培养箱中培养 48 h。空白对照: 将未经任何处理的 0.5 mL 菌液置于 PDA 培养基上培养。记录每个平板的菌落数, 重复试验 3 次。

1.3.3 桂醛和臭氧对菌液进行系列时间处理 桂醛和臭氧是筛选出来最好的处理, 用以上 2 种处理方法分别将 0.5 mL 菌液处理 1、5、10、15 和 30 min, 桂醛浓度为 3  $\mu\text{L/L}$ ,  $\text{O}_3$  处理是通  $\text{O}_3$  15 min。然后倒入平板, 摇晃铺平, 在 28℃ 恒温培养箱中培养。设置空白对照。记录每个平板的菌落数, 重复试验 3 次。

1.3.4 桂醛和臭氧对新鲜葡萄进行保鲜处理 买来新鲜葡萄, 用剪刀逐个剪下, 分成 10 颗 1 组。用桂醛和  $\text{O}_3$  处理葡萄, 每种方法分别处理 7 组: 一是用桂醛和  $\text{O}_3$  进行单独处理, 桂醛处理是将葡萄在桂醛溶液中浸泡 15 min 后自然风干 30 min,  $\text{O}_3$  处理是将装有葡萄的薄膜袋通  $\text{O}_3$  10 min, 然后二者都扎紧袋口常温放置; 二是用接种环在葡萄上刺洞, 每颗葡萄刺 6 个洞, 然后将葡萄用桂醛和  $\text{O}_3$  进行单独处理; 三是用接种环在葡萄上刺洞, 每颗葡萄刺 6 个洞, 然后用刷子在葡萄表面刷上菌液, 自然风干 15 min 后, 再用桂醛和  $\text{O}_3$  进行单独处理。设置空白对照 (未经任何处理的葡萄)。将处理后的各组葡萄在室温下 ( $27 \pm 3$ )℃ 放置 5 d, 每天测定各组葡萄的发病率。5 d 后用游标卡尺测定各组部分病变葡萄的病变最大直径<sup>[20]</sup>。发病率即发病的葡萄在总葡萄中所占的百分比, 试验重复 2 次。

## 2 结果与分析

### 2.1 培养基中添加剂处理和消毒处理的抑菌效果

从图 1 可知, 对培养基进行处理的最好效果为桂醛, 其对灰霉菌的抑制率可以达到 99.09%。其次为  $\text{O}_3$ , 它的抑制率为 72.73%。戊二醛和稳定态二氧化氯的抑制率分别为 71.21%、69.70%, 也有比较好的效果。酒精和酸性电位水的抑菌效果均随着浓度增加而逐渐明显。山梨酸钾和对羟基苯甲酸乙酯的效果不明显, 抑制率分别为 22.42% 和 30.30%。因此, 抑菌效果最好的 2 种处理方法为桂醛和  $\text{O}_3$ 。

### 2.2 处理对灰霉病菌的杀菌效果

从图 2 可知, 3  $\mu\text{L/L}$  的桂醛的抑菌效果最佳, 对灰霉菌的抑制率可达到 99.10%; 其次为  $\text{O}_3$ , 抑制率为 97.91%; 戊二醛和稳定态二氧化氯的此时的抑制率分别是 55.82%、44.78%, 效果不是很明显; 50% 和 40% 的酸性电位水也有一定抑菌效果, 其它浓度效果更差<sup>[21]</sup>。这是桂醛本身有较强的抑制霉菌活性的缘故。臭氧的抑菌作用, 通常是物理的、化学的以及生物学等

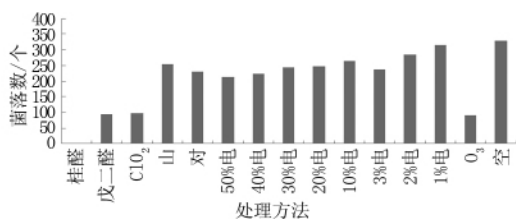


图1 处理对培养基中灰霉菌的抑菌效果  
Fig.1 Inhibitory effect of treatments on *Botrytis cinerea* in substrate

注：“空”为空白对照；“桂”为3  $\mu\text{L/L}$  的桂醛；“戊”为50  $\mu\text{L/L}$  的戊二醛；“ClO<sub>2</sub>”为10  $\mu\text{L/L}$  的稳定态二氧化氯；“山”为0.02%的山梨酸钾；“对”为12 mg/L 的对羟基苯甲酸乙酯；“50%电”、“40%电”、“30%电”、“20%电”、“10%电”分别为50%、40%、30%、20%、10%的酸性电位水；“3%酒”、“2%酒”、“1%酒”分别为3%、2%、1%的酒精；“O<sub>3</sub>”为10 mL/h 的O<sub>3</sub>处理15 min。以下同。

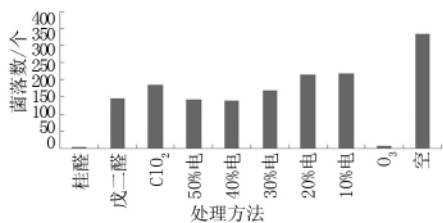


图2 菌液中添加剂处理的抑菌效果  
Fig.2 Inhibitory effect of treatments on *Botrytis cinerea* in water

表3 桂醛和臭氧处理对葡萄的发病率影响

Table 3 The effect of treatments with cinnamaldehyde or O<sub>3</sub> on morbidity of grapes

贮藏天数/d	空白对照/%	桂醛/%	O <sub>3</sub> /%
2	15	0	0
3	25	0	0
4	55	20	10
5	75	25	25

表4 桂醛和臭氧处理对刺伤及涂灰霉菌葡萄发病率的影响

Table 4 The effect of treatments with cinnamaldehyde or O<sub>3</sub> on morbidity of punctured and inoculated grapes

贮藏天数/d	空白对照/%	刺伤+桂醛/%	刺伤+菌液+桂醛/%	刺伤+O <sub>3</sub> /%	刺伤+菌液+O <sub>3</sub> /%
1	0	0	0	0	0
2	15	0	0	0	0
3	25	10	20	0	10
4	55	25	35	15	25
5	75	30	40	20	35

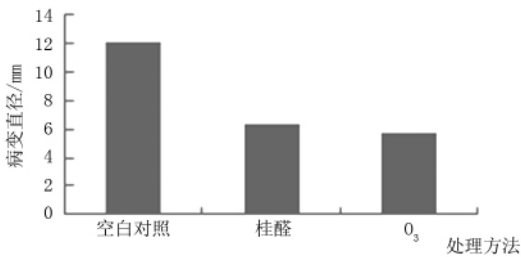


图5 桂醛和臭氧处理对未刺伤葡萄5 d后病变直径的影响

Fig.5 The effect of cinnamaldehyde or O<sub>3</sub> on diameters of lesions of non-punctured grapes after 5 days storage

多方面的综合结果<sup>[22]</sup>。

2.3 桂醛和臭氧对菌液不同时间处理的抑菌效果

从图3可知,随着对菌液处理时间的增加,抑菌效果迅速体现,在臭氧处理10 min开始,灰霉菌的生长即得到有效地控制。因此在保鲜处理中臭氧杀菌的最佳处理时间为10 min。从图4可知,随着处理时间的增加,抑菌效果迅速体现,在桂醛处理15 min开始,灰

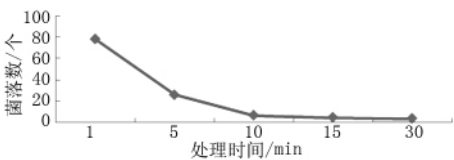


图3 O<sub>3</sub>不同处理时间对灰霉菌的影响  
Fig.3 The effect of O<sub>3</sub> on *Botrytis cinerea* for different treatment time

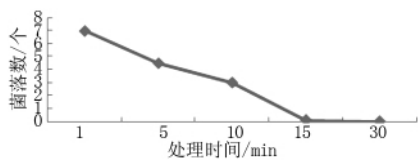


图4 桂醛不同处理时间对灰霉菌的影响  
Fig.4 The effect of cinnamaldehyde on *Botrytis cinerea* for different treatment time

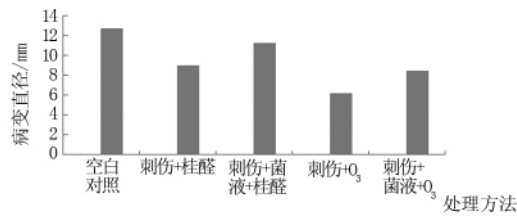


图6 桂醛和臭氧处理对刺伤葡萄5 d后病变直径的影响

Fig.6 The effect of cinnamaldehyde or O<sub>3</sub> on diameters of lesions of punctured and inoculated grapes after 5 days storage

霉菌的生长得到了有效的抑制,甚至不再生长。因此在保鲜处理中桂醛灭菌的最佳处理时间为 15 min。

#### 2.4 桂醛和臭氧对葡萄进行保鲜处理

由表 3、4 可知,无论是否刺伤或涂上菌液,2 种处理方法中臭氧效果更好,桂醛的抑菌效果稍差。但是相对于未处理的葡萄发病结果表明,2 种处理方法均可以有效地抑制果实的发病。由图 5、6 可知,用  $O_3$  处理 15 min 的葡萄病变直径最小。 $O_3$  对未处理的和作刺伤处理的葡萄的病变直径抑制率分别可达到 52.46% 和 51.56%。桂醛处理后的葡萄病变直径相对于未处理的葡萄效果也比较明显。

#### 3 结论

无论对菌液或培养基处理,桂醛的抑菌效果最好,都高达 99% 以上。相对于培养基, $O_3$  对菌液的处理效果更好;而戊二醛和稳定态二氧化氯对培养基的处理效果更好一些。对菌液不同时间的处理过程中,臭氧处理 10 min 开始,灰霉菌的生长即得到有效地控制,而桂醛则需 15 min。说明菌液利用臭氧处理更加及时、有效。在对葡萄进行保鲜处理时,无论是否刺伤或涂上菌液,臭氧的抑菌效果更好,桂醛稍差。而且  $O_3$  处理过的葡萄病变直径最小,所以  $O_3$  在葡萄的保鲜处理中更加实用、有效。

#### 参考文献

- [1] 翟建军,翟衡. 济宁地区葡萄花期灰霉病的发生及防治调查[J]. 中外葡萄与葡萄酒,2010(7):48-49.
- [2] 陈宇飞,文景芝,李立军. 葡萄灰霉病研究进展[J]. 东北农业大学学报,2006,37(5):693-699.
- [3] 张娜,田淑芬. 几种杀菌剂对葡萄灰霉病的抑制效果研究[J]. 北方园艺,2010(13):184-186.
- [4] Qin G Z, Zong Y Y, Chen Q L, et al. Inhibitory effect of boron against *Botrytis cinerea* on table grapes and its possible mechanisms of action[J]. International Journal of Food Microbiology,2010,138:145-150.
- [5] Stuardo M, Martin R S. Antifungal properties of quinoa (*Chenopodium*

*quinoa* Willd) alkali treated saponins against *Botrytis cinerea* [J]. Industrial Crops and Products,2008,27(3):296-302.

- [6] 李自强,林洪君,孙鸿举. 乙醇和山梨酸钾对鲜食葡萄采后灰霉菌的抑制作用[J]. 食品研究与开发,2006,27(9):130-132.
- [7] 陈廷平. 40% 百可得 WP 防治葡萄灰霉菌田间药效试验[J]. 福建农业科技,2004(5):37.
- [8] 陈凯,王加宁,李纪顺. 10% PhI 乳油对葡萄灰霉病的防治效果[J]. 山东农业科技,2004(4):46-47.
- [9] 吴家强. 爱苗 30% 乳油防治葡萄灰霉病[J]. 中外葡萄与葡萄酒,2002(3):39.
- [10] Canamas T P, Vinas I, Torres R, et al. Field applications of improved formulations of Candida sake CPA-1 for control of *Botrytis cinerea* in grapes[J]. Biological Control,2010,56(2):150-158.
- [11] 康萍芝,张丽荣,沈瑞清. 11 种木霉菌对葡萄灰霉病菌的拮抗作用[J]. 中国农学通报,2007,23(8):392-394.
- [12] 李永刚,郭晓慧. 枯草芽孢杆菌 BS2 对葡萄灰霉病菌抑菌机制的初步探索[J]. 微生物学通报,2010,37(5):721-725.
- [13] 缙继斌,常永义,靳小刚. 拮抗菌  $P_1$ 、 $P_5$  对采后红地球葡萄灰霉病的抑制及贮藏品质的影响[J]. 西北农业学报,2010,19(5):131-135.
- [14] Zoffoli J P, Latorre B A, Rodriguez E J, et al. Modified atmosphere packaging using chlorine gas generators to prevent *Botrytis cinerea* on table grapes[J]. Postharvest Biology and Technology,1999,15:135-142.
- [15] Lydakis D, Aked J. Vapour heat treatment of Sultanina table grapes. I: control of *Botrytis cinerea* [J]. Postharvest Biology and Technology,2003,27:109-116.
- [16] Marquenie D, Lammertyn J, Geeraerd A H, et al. Inactivation of conidia of *Botrytis cinerea* and *Monilinia fructigena* using UV-C and heat treatment[J]. International Journal of Food Microbiology,2002,74:27-35.
- [17] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1979:781.
- [18] 卢剑,饶锐,刘模发. 微生物以菌克菌在葡萄上的应用[J]. 湖北植保,2006(3):30-31.
- [19] GB/T 4789.1-2003. 中华人民共和国国家标准食品微生物检验标准[S]. 中国:中国标准出版社,2004:9-11,63,193-206.
- [20] 李方远. 葡萄贮藏过程中几个生理参数动态变化的研究[J]. 商丘师范学院学报,2001,17(4):97-99.
- [21] 武龙,肖卫华,李里特,等. 酸性电解水用于葡萄杀菌保鲜的试验研究[J]. 食品科技,2004(9):81-83.
- [22] 杨虎清. 化学保鲜剂和臭氧对巨峰葡萄贮藏保鲜的比较研究[J]. 食品科学,2001,22(10):91-93.

### Study on *Botrytis cinerea* Inhibition Method for Grapes

WANG Xiang-yang, LV Li, SHI Qing-hong, XIANG Lian

(College of Food Science and Biotechnology Engineering, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou, Zhejiang 310035)

**Abstract:** Using 'Red globe' grapes as experimental material and *Botrytis cinerea* was separated from them. Some food additive and sterilizer treatments including alcohol, cinnamaldehyde, glutaraldehyde, stable chlorine dioxide, potassium sorbate, ethyl-para-hydroxybenzoate, electrolyzed oxidizing water and  $O_3$  were chosen and their effects on *Botrytis cinerea* were investigated at the maximum allowable concentration. In order to get a healthy and effective preservation method for postharvest grapes, The results showed that 3  $\mu\text{L/L}$  cinnamaldehyde was optimum sterilization for inhibiting growth ratio of *Botrytis cinerea* in substrate and in water, its inhibiting growth ratio were 99.09% and 99.10%, respectively. Followed by  $O_3$  with inhibiting growth ratio of 72.73% and 97.91%, respectively. The optimal treatment time of cinnamaldehyde and  $O_3$  were more than 15 min and 10 min, respectively. Compared with control group, the two treatments could effectively inhibit morbidity and diameters of lesions of fresh grapes non or inoculated with *Botrytis cinerea*. The sterilization ability of  $O_3$  was better than that of cinnamaldehyde for fresh grapes.

**Key words:** grape; *Botrytis cinerea*; preservation