

茶树精油对灰葡萄胞霉生理功能的干扰研究

王近近, 邵兴锋, 刘淑敏, 许凤, 王鸿飞

(宁波大学食品科学与工程系, 浙江宁波 315211)

摘要: 为探寻新型生物防治方法, 揭示茶树精油(TTO)对果蔬采后病原真菌灰葡萄胞霉 (*Botrytis Cinerea*) 的抑菌作用机理, 以液体培养后收集的 *B. Cinerea* 菌丝体为研究对象, 进行 2 倍 MIC (最小抑菌浓度) 的 TTO 处理, 采用荧光显微镜 (FEM)、扫描电镜 (SEM) 和透射电镜 (TEM) 研究了处理对细胞膜通透性、菌体形态和超微结构的影响, 以及处理过程中菌丝体内活性氧 (ROS) 积累及相关抗氧化酶类和物质的变化。结果表明: TTO 处理后菌丝荧光强度增强, 说明其细胞膜通透性明显上升, 细胞膜完整性受到破坏; 同时菌丝发生严重的皱缩、干瘪, 胞浆消化呈碎渣样; TTO 导致了菌丝内过氧化氢(H₂O₂)的大量积累, 诱导提高了超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT) 和抗坏血酸-谷胱甘肽 (AsA-GSH) 循环的活性, 说明 TTO 是通过提高 *B. Cinerea* 细胞膜通透性、破坏菌体结构和诱导 ROS 爆发来发挥抑菌作用。

关键词: 茶树精油; 灰葡萄胞霉; 细胞膜; 过氧化氢

文章编号: 1673-9078(2016)6-56-62

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.6.010

Effect of Tea Tree Oil on the Physiological Function of *Botrytis cinerea*

WANG Jin-jin, SHAO Xing-feng, LIU Shu-min, XU Feng, WANG Hong-fei

(Department of Food Science and Engineering, Ningbo University, Ningbo315211, China)

Abstract: To investigate a new biological control method and reveal the anti-microbial mechanism of tea tree oil (TTO) against *Botrytis cinerea* in postharvest fruits and vegetables, the fungal mycelium grown in liquid medium was collected as test material, and then treated with twice MIC (minimum inhibitory concentration) of TTO. Fluorescence electron microscopy (FEM), scanning electron microscopy (SEM), and transmission electron microscopy (TEM) were used to study the effects of the treatment on the membrane permeability, mycelial morphology, and ultrastructure, respectively. Additionally, the accumulation of reactive oxygen species (ROS), changes in enzyme activity, and contents of the substances in mycelia during TTO treatment were explored. The results indicated that after TTO treatment, the fluorescence intensity of the treated group was higher than that of the control, indicating that TTO can increase the cell membrane permeability by destroying its integrity. Additionally, several hyphae were shriveled and dry; their cytoplasm was disintegrated and contained debris-like material. TTO led to the accumulation of hydrogen peroxide (H₂O₂) in the mycelium and induced higher superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activities, as well as ascorbate-glutathione (AsA-GSH) cycle metabolism, in the treatment group than in the control, suggesting that the anti-bacterial activity of TTO is achieved by increasing cell membrane permeability, destroying cell structures, and inducing high ROS production.

Key words: tea tree oil; *Botrytis cinerea*; cell membrane; hydrogen peroxide

灰葡萄胞霉 (*Botrytis Cinerea*) 引发的灰霉病是造成葡萄、草莓、猕猴桃、番茄、茄子等果蔬采后损失的主要原因。化学杀真菌剂是防治真菌病害的主要手段, 但是其副作用日益严重, 导致真菌产生耐药性, 影响环境和食品安全等, 这些因素迫使研究人员寻找对人类健康和环境安全的方法来替代或部分替代化学杀菌剂。近年来, 植物精油作为一种天然的绿色农药,

收稿日期: 2015-08-15

基金项目: 国家自然科学基金 (31371860); 浙江省科技厅公益性应用研究项目 (2013C32094); 宁波市农业和社会发展攻关项目 (2014C50084); 宁波大学“水产”浙江省重中之重开放基金 (xkzsc1527)

作者简介: 王近近 (1989-), 女, 硕士研究生, 主要研究农产品贮藏与加工

通讯作者: 邵兴锋 (1980-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 食品贮藏保鲜

环境友好型的生防试剂用于多种果蔬的采后病害防控, 在樱桃番茄^[1]、甜桔^[2]、胡萝卜^[3]等果蔬上的应用表明其具有显著的防腐保鲜效果。

茶树精油(Tea Tree Oil, TTO)是由澳洲桃金娘科 (*Myrtaceae*) 白千层属 (*Melaleuca*) 灌木树种互叶白千层 (*Melaleuca alternifolia*) 的新鲜枝叶经水蒸气蒸馏得到的芳香精油, 具有较好的应用价值和发展潜力。Szczerbanik^[4]等研究发现 TTO 对 *B. Cinerea* 等多种采后病原菌的抑制效果明显好于松木精油和肉桂精油; 它能抑制芭蕉炭疽菌菌丝生长和孢子萌发, 也可用于香蕉炭疽病的防治^[5], 可见, TTO 所具备的商业化应用前景不容置疑。但是由于 TTO 成分复杂, 其抗真菌机理的研究尚处于起步阶段, 明确的系统性说法还有

待进一步阐明。目前主要的观点认为它是通过破坏膜结构使霉菌细胞内物质泄漏刺激细胞自溶导致细胞形态发生变化^[6]。本实验以 *B. Cinerea* 菌丝体为研究对象,采用荧光显微镜(FEM)和电镜(SEM、TEM)技术研究 TTO 对菌丝细胞膜通透性、菌丝形态和超微结构的影响,并研究菌体内主要的 ROS—过氧化氢(H_2O_2)的积累情况、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、抗坏血酸-谷胱甘肽(AsA-GSH)循环的活性变化,以期能更好的揭示 TTO 对 *B. Cinerea* 生理功能的干扰,为 TTO 在果蔬采后领域的商业化应用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

TTO 由福州美乐莲生物科技有限公司提供,符合 ISO 4730 规定(松油烯-4-醇>30%;1,8-桉叶素<5%),是一种 GRAS (generally recognized as safe) 物质,可用于食品行业;灰葡萄孢霉(*B. Cinerea*)购自中国林业菌种保藏中心;马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基、无水葡萄糖、氯化钠、吐温-80、正庚烷等其他试剂均为分析纯,购自国药集团化学试剂有限公司;碘化丙啶(PI)购自 Sigma;2.5%戊二醛固定液购自自行知生物科技有限公司;

AL204 电子天平,梅特勒-托利多仪器有限公司;HWS-328 恒温恒湿培养箱,宁波江南仪器厂;LDZX-30KBS 型立式压力蒸汽灭菌锅,上海申安医疗器械厂;XMTD-8222 烘箱上海精宏实验设备有限公司;SW-CJ-1F 洁净工作台,苏州安泰空气技术有限公司;JB-3 磁力搅拌器,上海雷磁仪器厂新泾分厂;UV-1600 型紫外可见分光光度计,上海美谱达仪器有限公司;QHZ-12A 型组合式恒温振荡培养箱,江苏省太仓市华美生化仪器厂;H2500R-2 型高速冷冻离心机,长沙湘仪离心机仪器有限公司;荧光显微镜,日本奥林巴斯公司;HCP-2 临界点干燥机,日本日立;20 nm E-1010 真空离子溅射镀金膜机,日本日立;S-3400N 扫描电子显微镜,日本日立;JEM-1230 透射电镜,日本日立。

1.2 实验方法

1.2.1 样品处理

B. cinerea 菌种经活化后,转接于 PDA 培养基上 25℃ 培养 3 d,用无菌生理盐水洗下孢子,借助血球计数板调节至 2.5×10^7 个/mL。移取 1 mL 孢子悬浮液,加入到含有 150 mL PDB (马铃薯葡萄糖液体)培养

基的锥形瓶中,25℃ 150 r/min 摇床培养 72 h,再 4000 r/min 离心 10 min,并用 4℃ 磷酸缓冲溶液(PBS, 0.1 M, pH=7.4)清洗三遍后收集得到菌体备用。

根据前期的实验研究,在含培养基培养过程中,加入 2 MIC 的 TTO 处理 2 h,对 *B. cinerea* 产生明显的影响。实验中,适量菌体加入 150 mL 含 2MIC 浓度(5 μ L/mL)TTO 的 1% 无菌吐温-80 水中,以 1% 无菌吐温水为对照组,每个处理(TTO)和对照(CK)组均设置三个重复,25℃ 150 r/min 摇床培养 2 h 后,同上收集菌体,用于荧光显微镜和电镜观察。

另按照上述方法培养得到 *B. cinerea* 菌体后,把每个锥形瓶收集得到的菌体分别加入 150 mL 已配好的含 2 MIC 浓度 TTO 的 1% 无菌吐温水中,以 1% 无菌吐温水为对照组,每个处理和对照均设置三个重复,25℃ 150 r/min 摇床培养 2 h、4 h、6 h 和 8 h 后,同上分别收集菌体,液氮中研磨,-40℃ 下保存,用于 H_2O_2 及其代谢相关酶类和物质的测定。

1.2.2 样品制备及 FEM 观察

菌丝体经 2 MIC 的 TTO 处理 2 h 后,挑取对照组、处理组少量菌丝于 PBS (0.1 M, pH=7.2) 中漂洗 2 次,每次 5 min。离心去 PBS,加入冰预冷的 70% 乙醇 4℃ 下固定 1 h,再用 PBS 洗 2 次,每次 5 min。除去 PBS 后,加入 1 mL 50 μ g/mL 的 PI 染液,4℃ 避光 30 min。吸去染液后,用 PBS 洗 2 次除去多余的染液。挑取微量菌丝于载玻片上,盖上盖玻片,荧光显微镜下(激发波长 BP 546/12 nm,发射波长 LP 590 nm)观察并拍照。每个重复实验中取两个平行进行观察。

1.2.3 样品制备及 SEM 观察

菌丝体经 2 MIC 的 TTO 处理 2 h 后,挑取对照组、处理组少量菌丝于 2.5% 的戊二醛固定液中,在 4℃ 固定 2 h 以上。然后用 0.1 M 的磷酸缓冲液冲洗 3 次,每次 15 min,后经系列乙醇(体积分数为 30%、50%、70%、80%、90%、100%)逐级洗脱样品,每次间隔 10 min。叔丁醇与无水乙醇按 1:3、1:1、3:1 逐级洗脱样品,每次 10 min,再纯叔丁醇洗脱 1 次。再经过干燥、粘样、镀膜于 S-3400N 扫描电子显微镜下观察、拍照,每个重复实验中取两个平行进行观察。

1.2.4 样品制备及 TEM 观察

参照 Zhou 等的方法^[7],菌丝体经 2 MIC 的 TTO 处理 2 h 后,挑取对照组、处理组少量菌丝于 2.5% 的戊二醛固定液中,低温下固定 2 h 以上。用 0.1 M PBS(pH=7.4)洗 3 次,每次 15 min,再用 1% 钨酸后固定 2 h,用 0.1 M 的磷酸缓冲液冲洗 3 次,每次 15 min,后经系列乙醇(体积分数为 30%、50%、70%、90%)逐级脱水。然后用现配 90% 丙酮洗脱 1 次,无水丙酮

洗脱3次,每次15 min。以环氧丙烷和环氧树脂为浸透剂按1:1混合后浸透样品1 h,再用纯环氧树脂包埋,置37 ℃ 24 h后,转入45 ℃ 聚合24 h。最后转入60 ℃ 温箱过夜。待样品块凝固后取出,用修块机修块,半薄切片定位后做超薄切片。经铀、铅双染后,于JEM-1230型透射电镜下观察、拍照,每个重复实验中取两个平行进行观察。

1.2.5 H₂O₂ 及其代谢相关物质和酶类的测定

H₂O₂ 含量测定:称取1g冷冻的菌丝样品,加5 mL 0.05 M PBS (pH=7.0, 含3% PVP), 超声破碎15 min后4 ℃、1500 r/min离心10 min, 上清即为粗酶液。用南京建成生物工程研究所 H₂O₂ 试剂盒测定。

SOD 活性测定:粗酶液的提取同 H₂O₂ 测定, 用南京建成生物工程研究所 SOD 试剂盒测定。

CAT 活性测定:称取1g样品,加5 mL 0.05 M PBS(pH=7.5, 含1 mmol/L Na₂EDTA), 超声破碎15 min后4 ℃、1500 r/min离心10 min。3 mL 反应液中依次加入2.6 mL 0.05 M PBS(pH=7.5, 含1 mmol/L Na₂EDTA)、0.2 mL 0.75% H₂O₂、0.2 mL 酶液, 240 nm 下测定吸光值30 s 内的变化。以每分钟 OD₂₄₀ 值变化0.01 为一个酶活性单位 U。

AsA 含量测定:称取1g样品,加5 mL 5%的 TCA 溶液, 超声破碎15 min后4 ℃、1500 r/min离心10 min, 取上清为粗酶液。5 mL 反应液中先加入1 mL 的粗酶液、1 mL 5% TCA 和1 mL 无水乙醇 (CH₃CH₂OH), 摇匀后, 再依次加入0.5 mL 0.4% H₃PO₄-CH₃CH₂OH、1 mL 0.5% BP-CH₃CH₂OH 和0.5 mL 0.03% FeCl₃-CH₃CH₂OH, 30 ℃ 反应90 min后测定 OD₅₃₄ 值。配制浓度为0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mg/L AsA 标准溶液, 按上述方法测定吸光值, 以 AsA 含量作横坐标, 绘制标准曲线。

GSH (谷胱甘肽) 含量测定:称取3g样品,加5 mL 5%的 TCA (含5 mM Na₂EDTA), 超声破碎15 min后4 ℃、1500 r/min离心10 min, 取上清为粗酶液。1.5 mL 反应液包括100 μL 粗酶液、1.3 mL 150 mM PBS(pH=7.7)、0.1 mL 5 mM DTNB, 室温反应30 min, 测定 OD₄₁₂。

APX 活性测定:粗酶液的提取如上。3.4 mL 反应体系中含有0.05 M PBS (pH=7.0), 3 Mm 抗坏血酸, 0.1 mL 酶液, 以0.5 Mm H₂O₂ 启动反应。扫描2 min内 OD₂₉₀ 的变化, 以 OD₂₉₀ 变化0.01 为1个酶活性单位 U。

GR (谷胱甘肽还原酶) 活性测定:粗酶液的提取同 H₂O₂ 测定。用南京建成生物工程研究所 GR 试剂盒测定。

1.2.6 数据统计与分析

所有试验重复三次, 采用 excel 处理数据 (微软, 美国), 计算标准偏差。数据图片用 Origin Pro 8.0 绘制 (Microcal 软件公司, 美国)。采用 SPSS 17 软件 (美国) one-way ANOVA 中的邓肯多重比较 (Duncan's multiple range tests) ($p=0.05$) 进行差异性分析。

2 结果与讨论

2.1 TTO 处理对细胞膜透性的影响

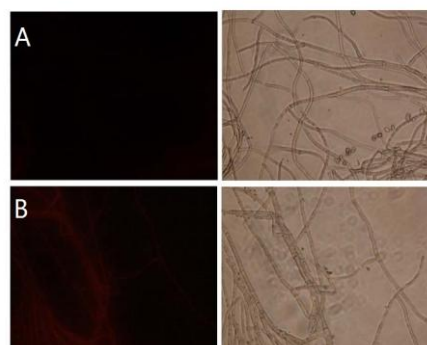


图1 荧光显微镜下菌丝荧光

Fig.1 Visualization of hyphae under FEM

注: A:对照菌丝; B:处理菌丝 (A: Controlled hyphae; B: treated hyphae)

TTO 处理2 h后的菌丝体, 经PI染色、FEM观察如图1所示。荧光染料PI是一种可对DNA染色的细胞核染色剂, PI不能通过活细胞膜, 但却能穿过破损的细胞膜而对核染色, 通过与死亡或者正在死亡的 (膜通透性改变) 细胞的核酸结合, 发出红色荧光^[8]。细胞膜在维持微生物的正常生命活动中具有非常重要的地位, 图1A可见对照组菌丝有很轻微的红色荧光, 表明有极少量的菌丝呈现荧光, 是一种正常的生理现象。但图1B中菌丝荧光性很强, 多数菌丝体都呈现出荧光现象。这一结果说明, TTO处理破坏了 *B. Cinerea* 的细胞膜, 引起细胞膜通透性增加, PI染料进入细胞膜对核酸染色; 细胞膜透性的增加造成了菌体内容物外泄, 引起细胞的死亡。Shao等^[6]发现TTO改变 *B. Cinerea* 脂肪酸的组成, 导致菌体培养体系的260 nm吸光值和电导率上升; Carson等^[9]用TTO处理导致金黄色葡萄球菌细胞悬浮液在260 nm处的吸光值增大。这些结果都表明, 精油能够直接作用于微生物细胞膜, 破坏细胞膜结构、增加细胞膜的通透性, 使细胞内部的重要离子和溶物会渗出, 最终导致细胞死亡。

2.2 TTO 处理对菌丝形态变化

对照组 *B. Cinerea* 的形态如图 2A, 菌丝形态饱满, 表面均匀, 光滑致密, 隔膜清晰, 菌丝密集成网状; *B. Cinerea* 受 TTO 处理 2 h 后, 菌丝表面出现严重塌陷皱缩、菌丝体畸形干瘪皱缩、粗糙不平、隔膜变模糊等现象 (图 2B)。这表明, TTO 处理对 *B. Cinerea* 产生严重影响, 导致菌丝发生了类似脱水、皱缩等现象。Shao 等^[6]先前的研究也发现了类似结果, 区别在于此前的研究是在菌体液体培养过程中加入精油进行相关研究。Soylu 等^[10]研究牛至精油对 *B. Cinerea* 的抑菌活性时也发现处理组菌丝出现空泡化、皱缩、溶解等现象。陶能国等^[11]也发现柠檬醛+辛醛混合物 (V/V, 4:1) 能破坏指状青霉细胞结构的完整性, 增加细胞膜通透性。如前所述, 植物油杀死微生物是以一种膜破坏剂的形式发挥作用, 通过破坏膜结构, 溶酶体中大量水解酶漏出, 刺激细胞自溶, 导致细胞内大量内容物损失, 从而改变细胞形态学。

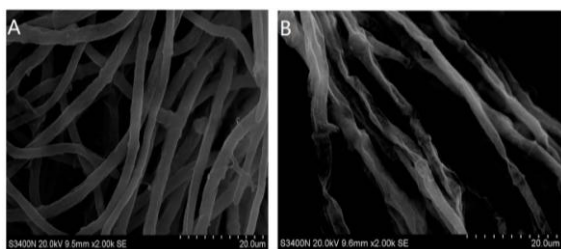


图 2 扫描电镜下菌丝形态变化

Fig.2 Change of mycelial morphologies under SEM

注: A:对照菌丝 (×2000); B:处理菌丝 (×2000)。

2.3 TTO 处理对菌体超微结构变化

图 3 是利用 TEM 对 *B. Cinerea* 细胞超微结构进行的观察。*B. Cinerea* 对照组菌丝细胞饱满, 层次清楚, 结构清晰, 胞外无外渗物; 细胞壁质地致密、厚薄均匀、规则完整; 细胞膜完整; 细胞基质均匀, 细胞器丰富完整, 细胞核、核仁及线粒体和内质网等清晰可见 (图 3A)。经 TTO 处理后的菌丝, 细胞壁出现变形, 发生严重的质壁分离, 细胞膜出现皱缩, 细胞内细胞质聚集, 细胞器组成混乱, 胞浆消化呈空腔或碎渣样 (3B)。综合 SEM 的结果发现, TTO 对 *B. Cinerea* 的抑制作用首先是作用于细胞膜, 使细胞膜通透性增加, TTO 进入细胞膜引起内容物外泄, 并对内部细胞器造成损伤, 从而影响细胞的生理功能。Carson 等^[9]用 TTO 中的主要组分萜品-4-醇 (纯度 97%) 处理金黄色葡萄球菌细胞, 电镜观察到被处理的菌细胞膜内褶形成层状结构, 且细胞内容物耗尽和无定形, 细胞膜外形成小泡。丁月等^[12]研究加拿大一枝黄花精油对 *B. Cinerea* 抑制作用的结果也表明精油处理能使细胞壁受损且质地疏松, 亚细胞结构及界限模糊, 细胞质外渗。

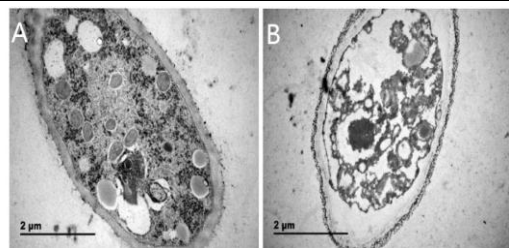


图 3 透射电镜下菌丝细胞超微结构变化

Fig.3 Change of cell ultrastructure under TEM

注: A:对照菌丝 (×25000); B:处理菌丝。

2.4 TTO 处理对 H₂O₂ 含量的影响

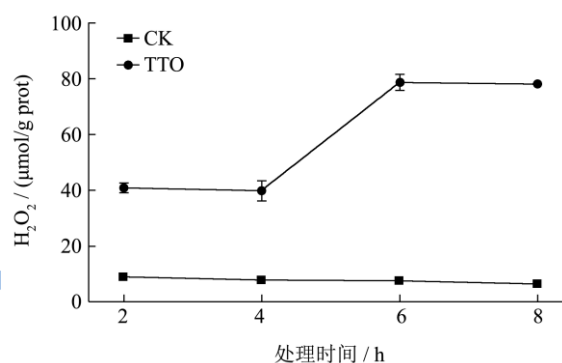


图 4 TTO 对 *B. Cinerea* H₂O₂ 含量的影响

Fig.4 Effect of TTO on the H₂O₂ content of *B. cinerea*

ROS 是生物体内一类氧的单电子还原产物, 包括超氧阴离子 (O₂⁻)、H₂O₂、单线态氧 (O₂¹)、羟基自由基 (OH)。在正常条件下, 细胞内的 ROS 与其清除系统是保持平衡的, 在受到逆境伤害、机体损伤等外界环境胁迫时, 产生的 ROS 超过清除系统的能力, 就会导致 ROS 水平升高, 引起细胞内 DNA、蛋白质、脂质等生物大分子损伤, 即氧化应激。在逆境胁迫下线粒体是产生活性氧的主要来源^[13]。H₂O₂ 作为一种 ROS, 氧化性很强, 在诱导细胞的损伤和死亡中起了关键作用, 它可以氧化蛋白的半胱氨酸 (cysteine, -SH) 或蛋氨酸 (methionine residues, -SCH₃) 残基, 是造成细胞氧化损伤的重要原因之一。而且, H₂O₂ 可以参与和生成氧自由基的很多反应, 是通过 Fenton 反应和 Weiss 反应生成更活跃、毒性更强的 OH 的主要来源。图 4 反映了 TTO 处理对 *B. cinerea* 菌丝体中 H₂O₂ 含量的影响。经 TTO 处理 2 h 后 H₂O₂ 含量是对照组的 4 倍, 显著的高于对照组 ($p < 0.05$), 而且随着时间的增加其含量持续上升。处理 6 h 时, H₂O₂ 含量是对照组的 9.7 倍, 这可能是由于 TTO 作为胁迫环境使细胞线粒体呼吸异常, 产生了更多的 ROS, 从而使 H₂O₂ 含量升高。高浓度的 H₂O₂ 会触发细胞内的氧化应激去激发诱导抗氧化酶类的活性增加试图清除 H₂O₂, 还可造成膜脂过氧化和蛋白的羰基化等氧化损伤, 更进一

步的导致线粒体功能丧失,并最终引发细胞凋亡。Tian等^[14]研究也发现蒟萝油能引起黄曲霉线粒体功能受损提高 ROS 的积累,引起生物大分子的氧化损伤和细胞凋亡。

2.5 TTO 处理对 SOD、CAT 活性的影响

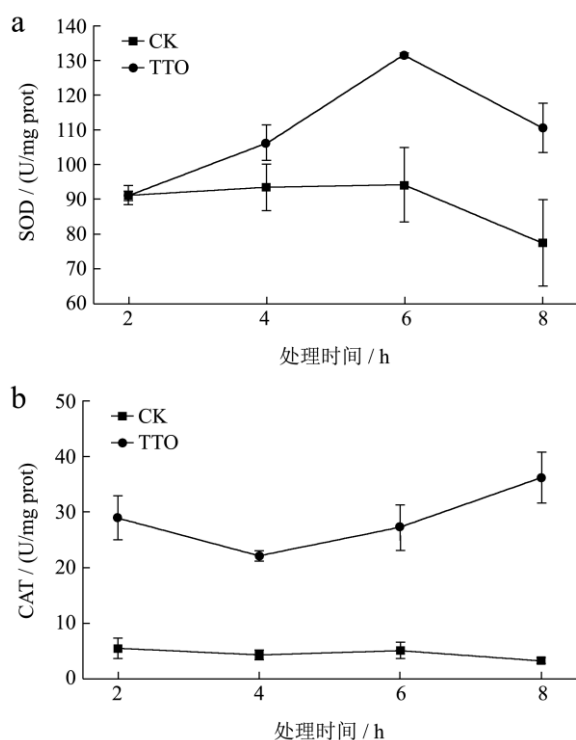


图5 TTO 对 *B. cinerea* SOD 活性(A)和 CAT 活性(B)的影响

Fig.5 Effect of TTO on the activities of SOD (A) and CAT(B) of

B. cinerea

图5反映TTO处理对*B. cinerea* SOD活性(a)和CAT活性(b)的影响。SOD是ROS清除反应中第一个发挥作用的抗氧化酶,存在于所有的亚细胞定位中。它能催化超氧阴离子发生歧化反应生成H₂O₂和分子氧,从而用于减轻O₂⁻造成的氧化损伤。它在清除O₂⁻的同时产生H₂O₂,这可能也是图4中H₂O₂含量升高的原因之一。SOD的活性强弱决定了细胞的受损程度,在保护酶系统中处于核心地位。从图5A可以看出TTO处理后,随着时间的增加SOD活性是先升高后降低,在2h时处理组和对照组没有差异,这是由于TTO在2h时SOD的活性尚未被激发使得细胞受损;随后细胞受损作为一个氧化胁迫激发了SOD活性的升高,至6h达到峰值。6h后SOD活性下降,可能是由于TTO的作用,使得自身细胞结构完整受损,致使胞内物质丧失了细胞膜的屏障而外泄,酶含量也相应的下降。

由图5B可见,H₂O₂处理直接诱导了CAT的升高,在处理结束时已经是对照组的10倍。CAT是一种含

铁卟啉的酶,广泛存在于动植物和微生物细胞中。逆境下,机体CAT活性增强,用于催化H₂O₂分解为氧和水,减轻H₂O₂所造成的损伤。刘淑宇等^[15]在研究绿色木霉菌发酵液对炭疽病菌的抑制作用时也发现,短时的发酵液处理,炭疽病菌胞内CAT酶的活力会呈上升趋势。

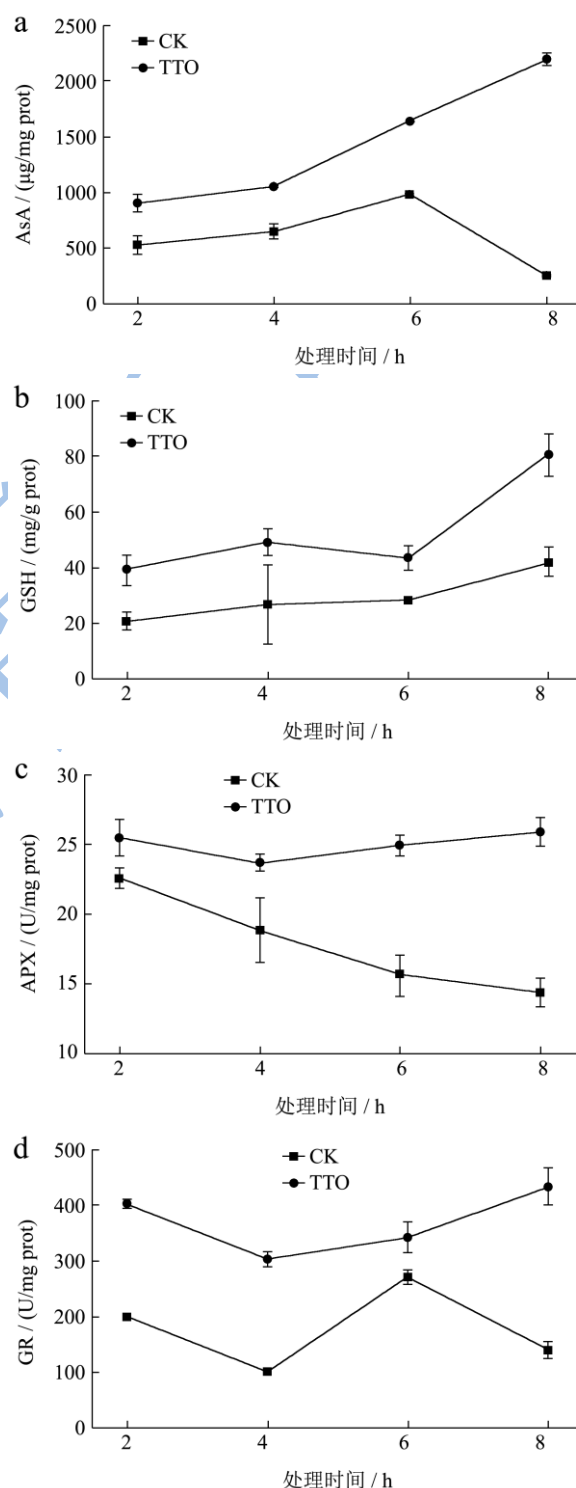


图6 TTO 对 *B. cinerea* AsA-GSH 循环代谢的影响

Fig.6 Effect of TTO on the AsA-GSH cycle metabolism of *B.*

cinerea

2.6 TTO 处理对 AsA-GSH 的影响

图 6 (a、b、c、d) 分别反映的是 TTO 处理对 *B. cinerea* AsA 含量、GSH 含量、APX 活性、GR 活性的影响。由它们所构成的 AsA-GSH 循环系统是机体抵御逆境胁迫的重要防御系统,在对胁迫应答过程中,能主动或被动地调动抗氧化酶类和抗氧化物质减缓或抵御细胞的伤害。如在 ROS 爆发时,就会诱导 AsA-GSH 循环去清除 H_2O_2 。AsA 是植物体内普遍存在的抗氧化剂,可直接清除超氧阴离子,但是 AsA 在丝状真菌中的研究却极少。TTO 处理组 H_2O_2 积累,诱发处理组 AsA 的含量在 2h 时就已经比对照组高 71%,随着时间的增加,AsA 含量持续增加(图 6a)。GSH 也是 AsA-GSH 循环中最重要的抗氧化物质之一,在抵御机体内的活性氧损伤方面具有重要作用,TTO 处理组的 GSH 活性也在持续升高(图 6b),这也使得脱氢抗坏血酸以 GSH 为底物生成的 AsA 含量也升高。APX 对环境的变化非常敏感,具有较强的氧化 AsA 的能力,是清除 H_2O_2 的重要酶^[16]。如图 6c 所示,APX 在 TTO 的胁迫环境下,活性增强。而对照组 APX 的活性是降低的。GR 是 AsA-GSH 系统的重要组成部分,其活性限制着 AsA-GSH 循环系统的运行速率。从图 6d 可知,整体上 TTO 处理增加了 GR 活性,一方面提高了 AsA-GSH 循环系统的运行速率,另一方面还可以保持较高的 GSH/GSSG(氧化型谷胱甘肽),有利于 AsA 的再生,用于抵御 ROS 造成的损伤。

3 结论

TTO 对真菌的抑菌机理研究尚处于起步阶段,目前主要集中在精油对病原菌细胞膜的影响。通过本实验的研究结果表明,TTO 处理 *B. cinerea* 菌丝体后,菌体表现出细胞膜通透性的增加,菌丝细胞形态的畸形和超微结构发生变化。同时, H_2O_2 的大量积累形成氧化胁迫,使得与其抗氧化代谢相关物质含量和酶类的活性升高。但是, H_2O_2 积累量已经超过细胞抗氧化系统的清除能力,造成生物大分子损伤,进而引起细胞凋亡。即 TTO 通过提高 *B. Cinerea* 细胞膜通透性、破坏菌体结构和诱导 ROS 爆发等导致细胞死亡从而达到抑制真菌的目的。这些生理功能干扰是否有先后顺序或关联性,还有待今后进一步研究明确。

参考文献

[1] Feng W, Zheng X. Essential oils to control *Alternaria alternata* in vitro and in vivo [J]. Food Control, 2007, 18 (9): 1126-1130

- [2] 曾晓房,高苏娟,林衍宗,等.肉桂精油对紫金春甜桔贮藏保鲜的影响[J].现代食品科技,2012,10:1281-1284
ZENG Xiao-fang, GAO Su-jian, LIN Yan-zong, et al. Preservation effect of cinnamon essential oil on Zijin sweet orange [J]. Modern Food Science and Technology, 2012, 10: 1281-1284
- [3] Gutierrez J, Bourke P, Lonchamp J, et al. Impact of plant essential oils on microbiological, organoleptic and quality markers of minimally processed vegetables [J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2009, 10 (2): 195-202
- [4] Szczerbanik M, Jobling J, Morris S, et al. Essential oil vapours control some common postharvest fungal pathogens [J]. Australian Journal of Experimental Agriculture, 2007, 47 (1): 103-109
- [5] 钟业俊,刘伟,刘成梅,等.自然条件下乳化茶树油在香蕉保鲜中的应用[J].农业工程学报,2009,25(06):280-284
ZHONG Ye-jun, LIU Wei, LIU Cheng-mei, et al. Application of emulsify tea tree oil on banana fresh-keeping under natural conditions [J]. Transactions of the CSAE, 2009, 25(06): 280-284
- [6] Shao X F, Chen S, Wang H F, et al. The possible mechanism of antifungal action of tea tree oil on *Botrytis cinerea* [J]. Journal of Applied Microbiology, 2013, 114(6): 1642-1649
- [7] Zhou H, Tao N, Jia L. Antifungal activity of citral, octanal and α -terpineol against *Geotrichum citri-aurantii* [J]. Food Control, 2014, 37: 277-283
- [8] Pinto E, Gonçaves M J, Hrimpeng K, et al. Antifungal activity of the essential oil of *Thymus villosus* subsp. lusitanicus against *Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus* and *Dermatophyte* species [J]. Industrial Crops and Products, 2013, 51: 93-99
- [9] Carson C F, Mee B J, Riley T V. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2002, 46(6): 1914-1920
- [10] Soylu E M, Kurt Ş, Soylu S. In vitro and in vivo antifungal activities of the essential oils of various plants against tomato grey mould disease agent *Botrytis cinerea* [J]. International Journal of Food Microbiology, 2010, 143(3): 183-189
- [11] 陶能国,段小芳,凡凤,等.柠檬醛和辛醛混合物对指状青霉的抑制作用[J].现代食品科技,2015,31(6):73-77
TAO Neng-guo, DUAN Xiao-fang, FAN Feng, et al. Inhibitory effects of citral and octanal mixture on *Penicillium*

- digitatum* [J]. Modern Food Science and Technology, 2015, 31(6): 73-77
- [12] 丁月,叶仁凤,欧昌荣,等.加拿大一枝黄花精油的提取及对灰霉菌抑制作用的研究[J].食品工业科技,2015, 30(6): 153-156
DING Yue, YE Ren-feng, OU Chang-rong, et al. Study on extraction of essential oil from *Solidago Canadensis* L. and its antifungal activity on *Botrytis cinerea* [J]. Science and Technology of Food Industry, 2015, 30(6): 153-156
- [13] Young T A, Cunningham C C, Bailey S M. Reactive oxygen species production by the mitochondrial respiratory chain in isolated rat hepatocytes and liver mitochondria: studies using myxothiazol [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2002, 405(1): 65-72
- [14] Tian J, Ban X, 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): e30147
- [15] 刘淑宇.绿色木霉菌发酵液对芒果炭疽菌抑制作用及采后保鲜效果研究[D].福建:集美大学,2013
LIU Shu-yu. Effect of *Trichoderma viride* fermentation broth on inhibition against *Colletotrichum gloeosporioides* and preservation of mango fruit [D]. Fujian: Jimei University, 2013
- [16] Wu X, He J, Ding H, et al. Modulation of zinc-induced oxidative damage in *Solanum melongena* by 6-benzylaminopurine involves ascorbate-glutathione cycle metabolism [J]. Environmental and Experimental Botany, 2015, 116: 1-11