

# 柑橘绿霉病中草药高效抑菌剂的 筛选及抑菌机理研究

周梦娇, 万春鹏, 陈金印

(果蔬保鲜与无损检测重点实验室, 江西农业大学农学院, 江西南昌 330045)

**摘要:** 利用牛津杯法筛选出对柑橘绿霉菌(指状青霉)有最佳抑制作用的中草药提取物, 并通过测定培养液电导率变化等对其抑菌机理作进一步研究。结果表明: 桂枝、桂皮、香薷等乙醇提取物对指状青霉均有较好的抑制效果, 抑制圈均在 20 mm 以上, 其中以桂枝的抑菌活性最佳, 对指状青霉的抑制圈大小达  $31.56 \pm 0.66$  mm, 最小抑菌浓度(MIC)和最小杀菌浓度(MFC)分别为 6.25 mg/mL、12.5 mg/mL, 且其抑菌效果显著优于化学杀菌剂百可得。同时桂枝提取物对指状青霉菌的孢子萌发及菌丝生长发育也有较强的抑制作用, 在提取液处理浓度为 50 mg/mL 时, 孢子萌发抑制率高达 99.007%, 菌丝体细胞膜通透性增强, 菌丝体可溶性蛋白及总糖含量分别只有 1187.18  $\mu\text{g/g}$  及 0.307%, 菌丝形态呈现畸形甚至断裂, 因而桂枝提取物对柑橘绿霉菌有明显的抑菌活性, 其抑菌作用主要是通过破坏细胞膜结构, 扰乱菌丝物质代谢活动来实现的。

**关键词:** 中草药提取物; 指状青霉; 抑菌活性; 抑菌机理

文章编号: 1673-9078(2014)3-144-149

## Screening and Antifungal Mechanism of Chinese Herb Extracts against Green Mold of Citrus

ZHOU Meng-jiao, WAN Chun-peng, CHEN Jin-yin

(Jiangxi Key Laboratory for Postharvest Technology and Nondestructive Testing of Fruits & Vegetables, College of Agronomy, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China)

**Abstract:** The antifungal activity of some Chinese herb extracts on citrus green mold (*Penicillium Digitatum*) were screened by Cylinder-plate method, the potential antifungal mechanism of the optimum extracts were investigated by determining the changes of electrical conductivity of culture media. The results showed that the ethanol extracts of *Cinnamomi Ramulus*, *Cinnamomi Cortex* and *Mosla Chinensis* had better inhibition effect on the green mold, the inhibition zones were all over 20 mm. Moreover, *Cinnamomi Ramulus* displayed remarkable inhibition effect, which was even better than Bellkute. The inhibition zone, minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentrations (MFC) were  $31.56 \pm 0.66$  mm, 6.25 mg/mL and 12.5 mg/mL, respectively. In addition, the research also showed that *Cinnamomi Ramulus* extracts effectively inhibited spore germination and mycelial growth and development. When the concentration of *Cinnamomi Ramulus* extracts was 50 mg/mL, the conidia germination inhibition rate were up to 99.007%; the permeability of cell plasma membrane and cellular components exosmosis were increased; the total soluble protein and sugar contents of mycelium were 1187.18  $\mu\text{g/g}$  and 0.307%, respectively; and the morphology of mycelium were malformed and fractured. Thus, *Cinnamomi Ramulus* ethanol extracts have good antifungal activity through disturbing the structure of cellular membrane and mycelium metabolism.

**Key words:** Chinese herbs extracts; *Penicillium Digitatum*; antifungal activity; antifungal mechanism

收稿日期: 2013-09-05

基金项目: “十二五”科技支撑计划项目(2012BAD38B03-2); 国家自然科学基金项目(31160343); 江西省教育厅科技落地计划项目(111); 江西省“赣博英才 555 工程”(2012), 江西省博士后科研择优资助项目(2013KY31); 留学人员科技活动项目(人社厅函[2013]277 号)资助, 中国博士后科学基金项目(2013M541870)

作者简介: 周梦娇(1990-), 女, 硕士研究生

通讯作者: 陈金印(1962-), 男, 博士, 教授

柑橘是全球第一大水果, 在其采后贮运期间, 易遭受多种病原菌的侵染产生采后病害, 导致果实腐烂变质, 经济损失严重<sup>[1]</sup>。由指状青霉(*Penicillium Digitatum*)和意大利青霉(*Penicillium Italicum*)引起的柑橘绿霉病和青霉病是柑橘采后的两大主要病害<sup>[2]</sup>, 其中以指状青霉引起的腐烂尤为严重<sup>[3]</sup>。目前控制柑橘采后病害及贮藏保鲜的方法主要是采用化学杀菌剂(如苯基苯酚、抑霉唑、噻菌灵等)结合物理贮藏

技术(如低温、热处理等)处理果实,但由于化学杀菌剂容易导致病原菌产生抗药性,且果实残留量大,使消费者的健康及人类赖以生存的环境面临巨大威胁<sup>[4]</sup>,因而筛选具有抑制柑橘病原菌活性的植物提取物并有效地将其应用于柑橘的采后防腐保鲜中,对柑橘的贮藏保鲜及保持果实的品质具有重要的意义。

自古以来民间就有利用植物驱虫防害的经验,中草药提取物源于天然植物,有来源广泛、成本低廉、低残留、安全性高等特点,此外它们大多具有清热解毒、抑菌抗菌等作用,能有效地阻止病原微生物的生长,属于理想的天然抑菌防腐材料<sup>[5]</sup>。筛选具有抑菌活性的中草药或植物提取物,并应用于食品防腐保鲜已成为当今研究的热点。近年来国内外学者利用中草药或植物提取物对柑橘采后病原菌离体抑制及活体贮藏保鲜效果也进行了许多的探索,但对病原菌抑菌作用机理方面的研究还较少。本实验选用10种具有抑菌作用的中草药对指状青霉进行抑菌活性筛选,并进一步选择抑菌活性最佳的桂枝提取物进行抑菌机理的探讨,旨在为研究和开发新型高效、低毒、安全的柑橘防腐保鲜剂提供一定的理论基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株

供试菌株为指状青霉(*Penicillium Digitatum*)由中国农业微生物菌种保藏管理中心(ACCA)提供。

#### 1.1.2 培养基

PDA培养基为马铃薯葡萄糖琼脂培养基,PDB培养液为不含琼脂的PDA。

#### 1.1.3 中草药

桂枝(*Ramulus Cinnamomi*)、桂皮(*Cinnamomum Japonicum*)、黄柏(*Cortex Phellodendri*)、五加皮(*Acanthopanax Gracilistylus*)、香薷(*Mosla Chinensis*)、藁本(*Ligusticum Sinense*)、黄芩(*Scutellaria Baicalensis*)、黄连(*Coptis Chinensis*)、草果(*Hedygium Spicatum*)、大黄(*Rheum Palmatum*)均购于江西省樟树市华丰药业公司。

#### 1.1.4 主要试剂和仪器

考马斯亮蓝G-250、牛血清蛋白(BSA)、葡萄糖、磷酸、琼脂粉、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、葱酮、浓硫酸、乙醇等试剂均为分析纯。5804R冷冻离心机,德国Eppendorf;电导率仪,上海精密科学仪器有限公司;R-3旋转蒸发器,瑞士BUCHI;KQ-500B超声波清洗机,昆山超声仪器有限公司;723B可见分光光度

计,天津普瑞斯仪器有限公司;ZHWHY-200B恒温培养振荡箱,上海智诚分析仪器制造有限公司;YXQ-LS-70A立式压力蒸汽灭菌器,上海博迅实业有限公司;E200数码显微镜系统,日本尼康。

### 1.2 中草药醇提取液的制备

参照课题组前期提取方法<sup>[6]</sup>,得到1g/mL的中草药提取液,离心(4℃,10000r/min)15min后取上清液,4℃保存,备用。

### 1.3 菌液的制备

#### 1.3.1 菌种的活化

将供试菌种接种到斜面PDA培养基上,于28℃恒温培养箱中培养一周,4℃保存,备用。

#### 1.3.2 菌液A-X曲线及回归方程的建立

将供试菌种用无菌水洗入三角瓶中,玻璃珠打散,过滤菌丝,将过滤后的孢子悬浮液用无菌水稀释成各种不同浓度梯度,在560nm波长处测定其吸光值(A),同时用血球计数板计数,得出各浓度梯度下的孢子数,记为X(cfu/mL),以A为横坐标,X为纵坐标,绘制出各菌悬液的A-X曲线,并得出相应的回归方程及相关系数( $y=1717.4x-5.3734$ ,  $R^2=0.992$ ),经F检验,A-X极显著。

#### 1.3.3 菌悬液的制备

将供试病原菌种用无菌水稀释,分光光度计比色,根据A-X曲线计算各菌悬液浓度,使其浓度控制在 $10^8$ cfu/mL。

### 1.4 中草药醇提液的抑菌活性测定

抑菌活性采用牛津杯法<sup>[6]</sup>测定,菌液孢子终浓度为 $10^6$ cfu/mL<sup>[6]</sup>。每个样品重复测定三次,并以蒸馏水、95%的乙醇、1000倍稀释液可得分别作为空白对照、溶剂对照和阳性对照,48h后采用十字交叉法测量抑菌圈直径。

### 1.5 最低抑菌浓度(MIC)及最小杀菌浓度(MFC)的测定

采用二倍稀释法稀释提取液,并制得含药培养基,使培养基中提取物终浓度为0.195~100mg/mL,用平板涂布法将供试菌液均匀涂于培养基上,设置空白对照组(培养基不接种菌)、菌液对照组(培养基接种菌),每个处理重复三次。并将其置于28℃的培养箱中培养2d,以无菌生长的培养皿的含药浓度为其MIC,将无菌生长的培养皿继续培养7d后观察,以无菌生

长的培养皿的含药浓度为其 MFC<sup>[7]</sup>。

## 1.6 中草药提取液(桂枝)对指状青霉孢子萌发率的测定

参考 Yang<sup>[8]</sup>的方法, 无菌条件下, 取一支 28 ℃ 培养一周的指状青霉菌种, 用 PDB 培养液将孢子洗下, 血球计数板计数, 使菌液孢子浓度为 10<sup>7</sup> cfu/mL。取凹玻片, 依次滴入菌孢子悬浮液和不同浓度的桂枝醇提液, 使提取液的终浓度分别为 50 mg/mL、25 mg/mL、12.5 mg/mL、6.25 mg/mL、3.125 mg/mL, 对照组加入等量 95%乙醇, 每个处理重复 3 次, 将玻片置于 28 ℃ 培养箱中, 12 h 后镜检, 观察孢子萌发情况, 在显微镜下统计 100~200 个孢子萌发数, 计算孢子萌发率和抑制率。

孢子萌发率=(萌发孢子数/总孢子数)×100%

孢子萌发抑制率=(对照组萌发率-处理组萌发率)/对照组萌发率×100%

## 1.7 中草药提取液(桂枝)对指状青霉细胞膜渗透性的测定

参考 Lee<sup>[9]</sup>的方法, 无菌条件下, 将指状青霉菌悬浮液接种于 PDB 培养液中, 摇床振荡 (160 r/min, 28 ℃) 培养数天后, 分别加入不同浓度梯度的桂枝醇提液, 使其终浓度分别为 50 mg/mL、25 mg/mL、12.5 mg/mL、6.25 mg/mL、3.125 mg/mL, 对照加入等量 95%的乙醇, 并分别在培养 0 h、1 h、2 h、3 h、4 h 和 5 h 后, 各取 5 mL 离心 (10000 r/min, 15 min), 测定上清液的电导率, 每个处理重复 3 次。

## 1.8 中草药提取液(桂枝)对指状青霉菌丝生长的影响

参考 1.6 制备菌孢子悬浮液及凹玻片, 并使凹玻片中的提取液最终浓度分别为其对指状青霉的 MFC 浓度 (12.5 mg/mL) 及 50 mg/mL, 对照组加入等量 95%乙醇, 每个处理重复 3 次。将玻片置于 28 ℃ 培养箱中, 3 d 后在显微镜 10×40 倍下镜检, 观察菌丝的生长情况。

## 1.9 中草药提取液(桂枝)对指状青霉菌丝可溶性蛋白质含量的影响

参考方法<sup>[10]</sup>, 制作标准曲线为:  $y=0.0073x +$

$0.027$ ,  $R^2=0.9907$ 。无菌条件下, 将指状青霉菌孢子悬浮液接种于 PDB 培养液中, 摇床振荡培养 5 d 后 (160 r/min, 28 ℃), 分别加入不同浓度梯度的桂枝提取液, 使其终浓度分别为 50 mg/mL、25 mg/mL、12.5 mg/mL、6.25 mg/mL、3.125 mg/mL, 对照加入等量 95%的乙醇, 继续振荡培养 2~3 d, 过滤, 无菌水及磷酸盐缓冲液冲洗菌丝体, 滤纸吸干, 称取 0.5 g 菌丝, 冰浴中研磨至糊状, 加缓冲液补足 10 mL, 冷冻离心 (4 ℃, 10000 r/min) 15 min, 取 0.1 mL 各处理上清液, 按照标准曲线制作的方法测定其蛋白含量, 每个处理重复 3 次, 按如下公式计算可溶性蛋白含量 ( $\mu\text{g/g}$ )。

可溶性蛋白含量= $X/[(C/A)B]$

注: A 为提取液总体积 (mL), B 为测定时取样体积 (mL), C 为样品鲜重 (g), X 为在标准曲线上查得的蛋白质含量 ( $\mu\text{g}$ )。

## 1.10 中草药提取液(桂枝)对指状青霉菌丝总糖含量的影响

参考方法<sup>[10]</sup>, 绘制葡萄糖标准曲线为:  $y=0.009x + 0.0031$ ,  $R^2=0.9979$ 。参考 1.9.1 制备菌丝并称取 0.5 g 菌丝, 用蒸馏水研磨至糊状, 加水至 50 mL, 于沸水浴中提取 15 min, 快速冷却至室温后定容至 250 mL, 再向其中加入 2.5 mL 10%醋酸铅溶液, 待反应完全后, 加入 0.5 g 草酸结晶, 摇匀后过滤, 取各处理滤液 2 mL 按照标准曲线加样方式测定总糖含量, 每个处理重复 3 次, 按如下公式计算总糖含量:

总糖含量= $(A \times V)/(V_s \times W \times 10^6) \times 100\%$

注: A 为在标准曲线上查得的含糖量 ( $\mu\text{g}$ ), V 为总体积 (mL),  $V_s$  为测定取样体积 (mL), W 为样品重量 (g)。

## 1.11 数据分析

采用 Excel 2003 进行数据处理, 所有数据为 3 次重复的平均值和标准差, 用 Duncan's 法进行显著性分析 ( $p < 0.01$ ), DPS7.05 软件绘制标准曲线, 求得毒力回归方程与相关系数,  $EC_{50}$ 、 $EC_{95}$  值, 95%置信限。

## 2 结果与分析

### 2.1 中草药提取液对指状青霉的抑制效果

由表 1 可知, 10 种中草药醇提液对指状青霉有不同程度的抑菌活性。其中, 桂枝对指状青霉的抑菌效果显著, 平均抑菌圈达  $31.56 \pm 0.66$  mm, 其次是桂皮、香薷醇提取液抑菌圈大小分别达  $26.54 \pm 0.48$  mm 和  $21.06 \pm 1.05$  mm, 并且它们对指状青霉的抑菌效果也均

优于百可得 17.03±0.21 mm 的抑菌效果, 经 Duncan 差异显著性分析显示, 它们与百可得处理间的差异均达到极显著水平 (p<0.01)。此外, 95%乙醇对指状青霉表现出一定的延缓生长效果, 其处理组菌丝颜色较蒸馏水处理组白些, 但均无明显抑菌圈。综上可知, 桂枝, 桂皮和香薷醇提取液对指状青霉均有较好的抑制效果。

### 2.2 中草药提取液对指状青霉的 MIC 及 MFC

通过对各种中草药醇提取液抑菌活性的测定后, 采用二倍稀释法测定了它们的最小抑菌浓度 (MIC) 及最小杀菌浓度 (MFC)。结果表明: 供试菌对不同的中草药敏感性不同, 对桂枝、桂皮、香薷醇提液较敏感, 它们对指状青霉的最小抑菌浓度分别为 6.25 mg/mL、12.5 mg/mL 和 12.5 mg/mL, 最小杀菌浓度分别是 12.5 mg/mL、25 mg/mL 和 25 mg/mL。另外, 黄芩、五加皮等七种中草药醇提取液对指状青霉的敏感性较差, 它们的最小抑菌浓度均在 50 mg/mL 及以上, 最小杀菌浓度均在 100 mg/mL 及以上。由此可见, 桂枝、桂皮、香薷醇提液对指状青霉敏感度好, 并且桂枝在相对较低浓度时就能有效地抑制供试菌的生长。

### 2.3 桂枝提取液对指状青霉孢子萌发的影响

通过上述对 10 种中草药提取液抑菌活性的筛选可知, 桂枝提取液的抑菌效果最好, 因而选用其来对指状青霉抑菌机理进行进一步的研究。由表 2 可知, 桂枝提取液对指状青霉孢子萌发抑制作用显著, 且随着提取液浓度的升高, 孢子萌发数逐渐减少, 抑制效果增强, 呈现出明显的量效关系。使用最小抑菌浓度

及最小杀菌浓度处理, 孢子萌发抑制率分别达到了 54.70% 和 82.62%, 与对照处理组间的差异极显著 (P<0.01)。另外, 用最大供试浓度 50 mg/mL 处理时, 孢子萌发抑制率高达 99.01%, 具有显著抑制病原菌孢子萌发的效果, 其孢子萌发率仅为 0.95%。桂枝提取液浓度对数与指状青霉菌孢子萌发抑制率几率值之间表现为线性关系, 线性方程为  $Y=3.5401 + 2.1282x$ , 且提取液其半数抑菌浓度  $EC_{50}$  及  $EC_{95}$  分别为 4.96 mg/mL 和 29.40 mg/mL。

表 1 中草药提取液对指状青霉的 MIC 及 MFC

Table 1 MIC and MFC of Chinese herbs ethanol extracts on *P. Digitatum*

中草药醇提取液	指状青霉( <i>P. Digitatum</i> )		
	抑菌圈直径/mm	MIC/(mg/mL)	MFC/(mg/mL)
桂枝	31.56 ± 0.66 <sup>A</sup>	6.25	12.5
桂皮	26.54 ± 0.48 <sup>B</sup>	12.5	25
香薷	21.06 ± 1.05 <sup>C</sup>	12.5	25
黄芩	18.57 ± 0.55 <sup>D</sup>	50	>100
五加皮	16.90 ± 0.66 <sup>E</sup>	50	100
蒙本	14.63 ± 0.45 <sup>F</sup>	50	>100
大黄	13.03 ± 0.25 <sup>G</sup>	100	>100
黄柏	12.53 ± 0.50 <sup>H</sup>	100	>100
草果	12.10 ± 0.10 <sup>HI</sup>	100	>100
黄连	11.05 ± 0.44 <sup>J</sup>	100	>100
95%乙醇	-		
蒸馏水	-		
百可得 1000 倍	16.07 ± 0.21 <sup>E</sup>		

注: 牛津杯直径为 8 mm, “-”代表无抑菌效果, 同列有相同字母的表示经邓肯氏多重检验分别在 0.01 水平上显著, 后同。

表 2 桂枝提取液对指状青霉孢子萌发的抑制作用

Table 2 Inhibitory effect of ethanol extract of *C. Ramulus* on spore germination of *P. Digitatum*

提取液浓度/(mg/mL)	萌发率/%	抑制率/%	毒力回归方程	有效浓度/(mg/mL)	95%置信限/(mg/mL)
50	0.95	99.01 <sup>A</sup>	$Y=3.5401+2.1282x$ $r=0.9851$	$EC_{50}=4.96$ $EC_{95}=29.40$	3.761-6.997
25	5.39	94.38 <sup>B</sup>			
12.5	16.67	82.62 <sup>C</sup>			
6.25	43.44	54.70 <sup>D</sup>			
3.125	58.82	38.66 <sup>E</sup>			
0(95%乙醇)	95.90	0.00 <sup>F</sup>			

### 2.4 桂枝提取液对指状青霉细胞膜渗透性的影响

培养液电导率的变化反映菌丝体细胞膜渗透性的改变。由图 1 可知, 指状青霉菌丝培养液电导率随着

桂枝浓度的升高及处理时间的延长而增大, 呈现明显的量效关系, 这表明菌丝体内电解质外渗。作用 1 h 后, 各处理培养液电导率均表现出显著变化, 且在提取液的处理浓度为 12.5 mg/mL 及以上浓度时, 电导率显著增加, 并在作用 3 h 后培养液电导率变化均趋于稳定, 而对照及低于 3.125 mg/mL 浓度的桂枝提取液

处理在整个作用阶段电导率变化不大, 说明其作用菌丝体的膜透性变化很小。

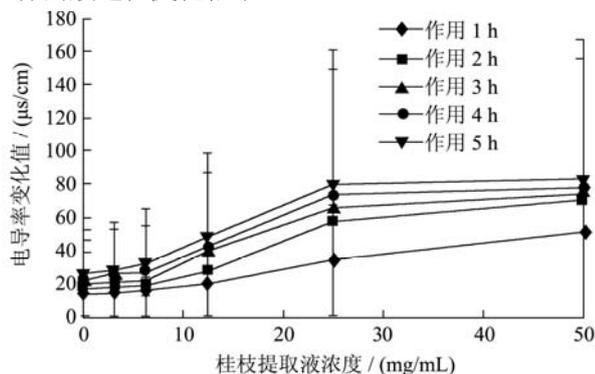


图1 桂枝提取液作用指状青霉菌后培养液电导率的变化  
Fig.1 Changes of electric conductivity of the *P. Digitatum* culture media affected by *C. Ramulus*

### 2.5 桂枝提取液对指状青霉菌丝生长的影响

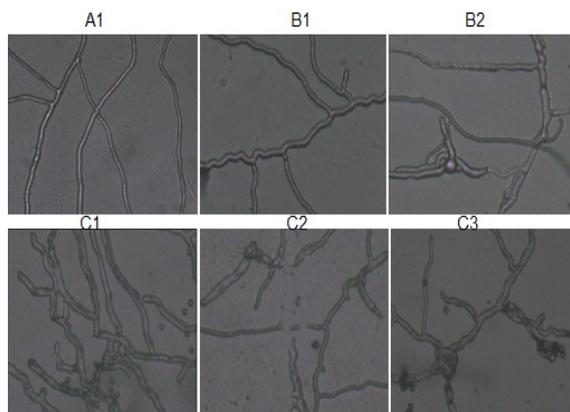


图2 桂枝提取液对指状青霉菌丝形态的影响

Fig.2 Effect of ethanol extracts of *C. Ramulus* on hyphal morphology of *P. Digitatum*

注: A<sub>1</sub>: 对照菌丝形态; B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>: 12.5 mg/mL 桂枝提取液处理后的菌丝形态; C<sub>1</sub>、C<sub>2</sub>、C<sub>3</sub>: 50 mg/mL 桂枝提取液处理后的菌丝形态。

由图2可知, 经桂枝提取液处理的指状青霉病菌丝形态与对照组有显著差异。用 50 mg/mL 桂枝提取液处理 3 d 后的病菌分生孢子含量较多, 孢子萌发的芽管膨大, 菌丝顶端膨大、皱缩、分枝增多, 甚至出现菌丝断裂, 内容物外渗的现象(如图2中 C<sub>1</sub>、C<sub>2</sub>、C<sub>3</sub>)。在桂枝提取液处理浓度为 12.5 mg/mL 时菌丝分生孢子呈椭圆形, 甚至畸形, 菌丝生长顶端及末端膨大, 皱缩(如图2中 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>)。而对照组菌丝表面较光滑、平整、细长(如图2中 A<sub>1</sub>)。这表明较高浓度的桂枝提取液对指状青霉菌丝的生长代谢有明显的抑制作用。

### 2.6 桂枝提取液对指状青霉菌丝可溶性蛋白

### 及总糖的影响

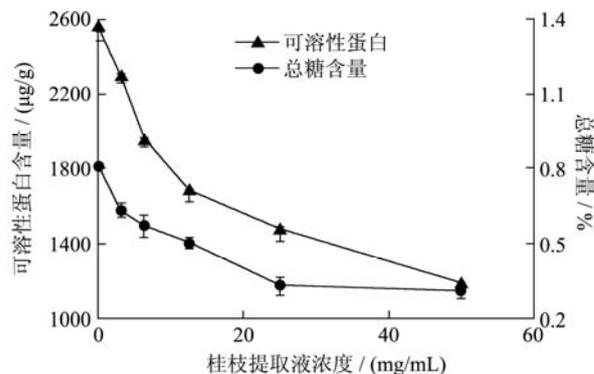


图3 桂枝提取液对指状青霉菌丝体可溶性蛋白和总糖含量影响

Fig.3 Effect of ethanol extracts of *C. Ramulus* on total soluble protein and sugar level of *P. Digitatum*

由图3可知, 对照菌丝体可溶性蛋白及总糖含量分别为 2558.79 μg/g、0.807%, 而经 3.125 mg/mL 的桂枝提取液处理后, 菌丝体内可溶性蛋白含量为 2302.56 μg/g、总糖的含量为 0.633%, 且随着处理的提取液浓度的升高, 菌丝体内可溶性蛋白及总糖含量均降低, 在提取液作用浓度为 50 mg/mL 时, 菌丝体内可溶性蛋白和总糖的含量分别只有 1187.18 μg/g、0.307%, 且经 Duncan 方差分析, 各处理菌丝体内蛋白质及葡萄糖含量与对照差异均达极显著水平 (P<0.01), 这说明经桂枝提取液作用后, 指状青霉菌丝内可溶性蛋白质、葡萄糖外渗, 且处理的提取液浓度越高, 外渗量越大, 菌丝体内含量越低。

### 3 讨论

本次试验以指状青霉为指示菌, 在离体条件下对 10 种中草药提取液进行抑菌活性的筛选, 结果表明桂枝、桂皮等 10 种中草药醇提液由于其有效抑菌活性物质不同, 而表现出对指状青霉不同程度的抑制活性, 其中桂枝提取液的抑菌活性最佳, 对指状青霉的抑制圈大小为 31.56±0.66 mm, 抑菌作用显著优于化学杀菌剂百可得, 桂枝提取液的 MIC 和 MFC 分别为 6.25 mg/mL、12.5 mg/mL, 并在此浓度下对供试菌孢子萌发抑制率分别达 54.701%和 82.621%, 且随提取液浓度的升高, 抑制效果增强。

真菌细胞膜有保护菌丝体细胞, 与周围环境进行物质交换、细胞识别、分泌、排泄、免疫等生理功能, 与菌丝体生长代谢有着密切的关系, 大量研究表明 [11~13], 真菌细胞膜是植物活性物质的重要作用靶位, 植物抑菌活性物质能改变菌体细胞膜的稳定性, 导致细胞膜结构受损, 内含物外渗, 从而达到杀菌或抑菌

的效果。本次试验中,经桂枝提取液作用后菌丝体培养液电导率均有显著变化,且变化与提取液浓度呈现明显的数量关系,这说明较高浓度的桂枝提取液能显著增强菌体细胞膜通透性,破坏细胞膜结构,导致菌丝体电解质外渗,培养液电导率升高,另外桂枝提取液在作用3 h后培养液电导率变化值均趋于稳定,这说明提取液在处理前3 h就发挥了抑菌作用。

抑制病原菌的物质代谢是杀菌剂发挥杀菌或抑菌作用的途径之一,本实验研究发现,经桂枝提取液处理后的菌丝体内可溶性蛋白及总糖含量均显著低于对照,且菌丝生长呈现畸形形态甚至断裂,这表明桂枝提取液能通过干扰菌丝体的物质代谢,阻碍其正常的生长发育,这与张彬等<sup>[13]</sup>关于八角茴香精油及其主要单体成分能破坏大肠杆菌细胞结构,导致菌丝体中还原糖及可溶性蛋白含量下降,从而达到抑菌效果的结论一致。

目前植物提取物对柑橘绿霉病菌的抑菌机理研究较少,且研究多采用植物粗提液,有效抑菌活性成分尚不明确,因而将活性物质分离纯化,并综合从物质代谢,能量代谢、信息代谢等多方面对病原菌抑制机理的研究还有待完成。

#### 4 结论

桂枝提取液对指状青霉菌丝生长及孢子萌发均有较强的抑制作用,且随提取液浓度的升高,抑制效果增强,其抑制作用主要是通过破坏菌体细胞膜结构,扰乱其生长代谢活动来实现的。桂枝是一种运用极其普遍的中药,且其来源广泛,价格低廉,因此可考虑作为柑橘天然抑菌剂的来源,采用提取液浸果或与多糖、淀粉、蛋白质等复配制成可食性涂膜处理果实,并结合物理贮藏保鲜技术,这将有利于减少果实腐烂及风味品质的维持,同时对于桂枝的开发及推广应用也具有重要意义。

#### 参考文献

[1] Brown G E, Chambers M. In Evaluation of Biological Products for the Control of Postharvest Diseases of Florida Citrus [J]. Proc. Fla. State Hort. Soc., 1996, 109: 278-282

[2] Demirci F. Effects of *Pseudomonas Fluorescens* and *Candida Famata* on Blue Mould of Citrus Caused by *Penicillium Italicum* [J]. Australian Journal of Crop Science, 2011, 5(3): 344-349

[3] Macarisin D, Cohen L, Eick A, et al. *Penicillium Digitatum* Suppresses Production of Hydrogen Peroxide in Host Tissue during Infection of Citrus Fruit [J]. Phytopathology, 2007,

97(11): 1491-1500

[4] Sayago J E, Ordoñez R M, Kovacevich L N, et al. Antifungal Activity of Extracts of Extremophile Plants from the Argentine Puna to Control Citrus Postharvest Pathogens and Green Mold [J]. Postharvest Biology and Technology, 2012, 22(67): 19-24

[5] 钟振声,黄景怡.蒲公英等五种常见中草药的抑菌研究[J].现代食品科技,2007,23(6):14-16

Zhong Zhen-sheng, Huang Jing-yi. Study on the Bacteriostatic Action of Five Common Chinese Herbs [J]. Modern Food Science and Technology, 2007, 23(6): 14-16

[6] 曾荣,陈金印,张阿珊.植物提取液对柑桔采后青霉,绿霉抑菌活性的研究[J].江西农业大学学报,2010,32(6):1142-1145

Zeng Rong, Chen Jin-yin, Zhang A-shan. Screening of Plant Extracts for Fungitoxicity against *Penicillium Digitatum* and *P.Italicum* of Citrus Fruits [J]. Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis, 2010, 32(6), 1142-1145

[7] Yazdani D, Rezazadeh Sh, Amin Gh, et al. Antifungal Activity of Dried Extracts of Anise(*Pimpinella Anisum* L.) and Star Anise (*Illicium Verum* Hook. f.) against Dermatophyte and Saprophyte Fungi [J]. Journal of Medicinal Plants, 2009, 8(5): 24-29

[8] Yang S, Peng L, Cheng Y, et al. Control of Citrus Green and Blue Molds by Chinese Propolis [J]. Food Science and Biotechnology, 2010, 19(5): 1303-1308

[9] Lee H J, Chio G J, Cho K Y. Correlation of Lipid Peroxidation in *Botrytis Cinerea* Caused by Dicarboximide Fungicides with Their Fungicidal Activity [J]. Journal of Agricultural Food Chemistry, 1998, 46(2): 737-741

[10] 韩亚珊.食品化学实验指导[M].北京:中国农业出版社,1996

Han Ya-shan. Experimental Guide for Food Chemistry [M]. Peking: China Agriculture Press, 1996

[12] Gatto M A, Ippolito A, Linsalata V, et al. Activity of Extracts from Wild Edible Herbs against Postharvest Fungal Diseases of Fruit and Vegetables [J]. Postharvest Biology and Technology, 2011, 21(61): 72-82

[13] 张贇彬,郭媛,江娟,等.八角茴香精油及其主要单体成分抑菌机理的研究[J].中国调味品,2011,36(2):28-33

Zhang Yun-bin, Guo Yuan, Jiang Juan, et al. Research on Antibacterial Mechanism of Essential Oils and Dominant Monomer Components of Star Anise [J]. China Condiment, 2011, 36(2): 28-33

[14] 汪金莲,邱业先,扶教龙,等.茶多酚对稻瘟病菌的抑制作用及抑菌机理[J].天然产物研究与开发,2011,23(5): 918-922

Wang Jin-lian, Qiu Ye-xian, Fu Jiao-long, et al. Inhibitive Effect of Tea-polyphenols on Pyricularia Oryzae and Its

Mechanism [J]. Natural Product Research and Development, 2011, 23(5): 918-922

