

# $\beta$ -蒎烯抑制柑橘意大利青霉作用机制初步研究

张美红<sup>1</sup> 王 萌<sup>1</sup> 杨书珍<sup>1</sup> 苏小军<sup>2</sup> 代 梅<sup>1</sup> 彭丽桃<sup>1</sup>

1. 华中农业大学食品科学技术学院, 武汉 430070; 2. 湖南农业大学生物质醇类燃料湖南省工程实验室, 长沙 410128

**摘要** 采用孢子萌发法和菌饼法评价  $\beta$ -蒎烯对意大利青霉菌的作用效果, 分析  $\beta$ -蒎烯对病菌菌丝几丁质分布、菌丝活性氧代谢、排酸能力和麦角固醇含量的影响, 并采用山梨醇、胆固醇或半胱氨酸作为保护剂探讨其对  $\beta$ -蒎烯抑制病菌孢子萌发的保护作用。结果显示,  $\beta$ -蒎烯对青霉菌表现出很强的抑菌活性, 0.087~0.696 mg/mL 的  $\beta$ -蒎烯能有效抑制孢子萌发与菌丝生长;  $\beta$ -蒎烯处理改变菌丝细胞壁几丁质分配, 促进活性氧积累, 降低菌丝排酸活性, 显著降低菌丝中麦角固醇含量; 添加麦角固醇替代物胆固醇、渗透调节剂山梨醇以及活性氧清除剂半胱氨酸均能有效促进受 0.348 mg/mL  $\beta$ -蒎烯抑制的青霉菌孢子萌发和芽管伸长。这些结果说明,  $\beta$ -蒎烯发挥对意大利青霉的抑菌作用与损伤真菌细胞壁结构、促进活性氧积累和抑制膜脂组分麦角固醇增加有密切关系。

**关键词**  $\beta$ -蒎烯; 意大利青霉; 抑制机制; 麦角固醇; 活性氧积累; 细胞壁

**中图分类号** TS 255.3 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2018)06-0091-07

由意大利青霉引起的青霉病是柑橘类果实采后的主要病害之一, 给生产造成损失达 10%~30%<sup>[1]</sup>。目前青霉病的控制主要是采用化学药剂如抑霉唑、苯并噻唑和邻苯基苯酚钠等处理, 由于长期广泛使用, 病原菌的抗药性显著增强, 生产上不断加大药剂使用剂量, 导致环境污染严重, 柑橘的食用安全风险变得更为突出, 迫切需要高效、低毒、环境污染小的替代控制方法<sup>[2]</sup>。从天然产物中分离鉴定高效抑菌活性成分, 已经成为当前保鲜研究的热点<sup>[3]</sup>。

前期研究结果表明, 柑橘传统松针保鲜法的保鲜机制在于松针中的挥发性组分, 尤其是其中含有的  $\beta$ -蒎烯, 对意大利青霉表现良好的抑制作用<sup>[4]</sup>。除意大利青霉外,  $\beta$ -蒎烯还能抑制白色念珠菌的生长, 且富含蒎烯的精油对大肠杆菌等细菌也表现强烈的抑菌活性<sup>[5-7]</sup>。这些结果表明,  $\beta$ -蒎烯在保鲜上有良好的应用前景。但  $\beta$ -蒎烯抑菌作用机制, 尤其是对柑橘意大利青霉抑菌作用机制尚不清楚。本文研究  $\beta$ -蒎烯对意大利青霉孢子萌发和菌丝生长的影响, 分析  $\beta$ -蒎烯处理对菌丝胞外排酸与麦角固醇的作用, 并评价 3 种保护剂对病菌孢子萌发的保护作用, 探究药物对意大利青霉的可能抑菌作用机制, 旨

在为新型抑菌剂开发和柑橘贮运保鲜提供理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 菌种与试剂

意大利青霉 (*Penicillium italicum*) 菌株 P-5, 从自然发病的柑橘果实中分离, 接种验证表现典型青霉病症状, 菌种低温保存在培养基中。 $\beta$ -蒎烯 ( $\beta$ -pinene): 购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 山梨醇、胆固醇、半胱氨酸和其他药品, 购自国药集团, 均为分析纯。马铃薯固体培养基 PDA 与马铃薯液体培养基 PDB, 自制。

### 1.2 $\beta$ -蒎烯抑制青霉菌孢子萌发的最小抑菌浓度测定

参考文献<sup>[4]</sup>的方法稍有修改, 采用固体培养基进行最小抑菌浓度测定, 灭菌载玻片上倒入 PDA 培养基, 冷却凝固后滴加 50  $\mu$ L 青霉菌孢子悬浮液 ( $10^7$  个/mL), 放入平皿, 再加入  $\beta$ -蒎烯使其终质量浓度为 0、0.087、0.174、0.348 或 0.696 mg/mL, 迅速用 parafilm 封口膜密封。26  $^{\circ}$ C 恒温培养 10 h 后, 显微镜观察, 统计孢子萌发率、测定芽管长度。

### 1.3 $\beta$ -蒎烯对菌丝生长的抑制作用

采用菌饼法<sup>[8]</sup>, 将涂布培养 12 h 的意大利青霉

收稿日期: 2018-05-18

基金项目: 国家自然科学基金项目(31471633); 中央高校自主创新基金项目(2013PY01)

张美红, 博士研究生. 研究方向: 农产品保鲜. E-mail: 1576848384@qq.com

通信作者: 彭丽桃, 博士, 教授. 研究方向: 农产品贮藏与加工. E-mail: penglt12@mail.hzau.edu.cn

菌株 P-5 用打孔器打出直径 5 mm 的菌饼,反贴在培养基上,每个培养皿贴 3 块菌饼,然后加入  $\beta$ -萜烯使终质量浓度分别为 43.5、87、174、348 mg/mL,迅速用 parafilm 封口膜密封,26 °C 恒温培养,每 24 h 测量菌斑直径。

#### 1.4 荧光增白剂 CFW 观察菌株 P-5 菌丝中几丁质分布

荧光增白剂(calcofluor white,CFW)能与真菌菌丝细胞壁中的几丁质特异结合发生荧光,从而反映细胞壁组分及结构变化,参考 Viragh 等<sup>[9]</sup>方法稍有修改。菌株 P-5 孢子菌悬液涂布在 PDA 平板上,斜插盖玻片,26 °C 培养 3 d 后,滴加 0.696 mg/mL  $\beta$ -萜烯后封口膜封口,继续培养 12 h。取长有菌丝的盖玻片,置于洁净载玻片上,滴加足量 CFW 染液和 10% KOH 溶液混合液充分浸润菌丝,室温染色 1 min,蒸馏水洗去多余染液后荧光显微镜(莱卡 DM3000)观察。

#### 1.5 细胞积累活性氧的染色观察

参考 Marschall 等<sup>[10]</sup>的方法,用 DCFH-DA 染色分析  $\beta$ -萜烯处理对意大利青霉菌株 P-5 孢子细胞内活性氧积累的影响。在 2 mL PDB 配制的孢子悬液的 10 mL 离心管中,加入终质量浓度为 0.696 mg/mL 的  $\beta$ -萜烯,26 °C 培养 10 h 后,加入 10 mmol/L DCFH-DA 染色液室温避光染色 20 min,7 000 r/min 离心 10 min,洗涤 2 次后孢子重悬于 PBS 溶液中,荧光显微镜观察。

#### 1.6 菌株 P-5 菌丝胞外介质酸化测定

参考 Ma 等<sup>[11]</sup>的方法,稍有改动。接种病菌孢子的 PDB 培养基在 26 °C、125 r/min 摇床培养 48 h,收集菌丝,称取 1.0 g 于 50 mL 离心管中,加入 20 mL 50 mmol/L KCl 溶液,4 °C 冷藏使菌丝饥饿 20 h。加入 2 mL 含  $\beta$ -萜烯无菌水(含 2% Tween-20)和 KCl 溶液至 40 mL,控制  $\beta$ -萜烯终质量浓度分别为 0.174、0.348、0.696、1.044、1.392 mg/mL。离心管 26 °C 水浴 1 h 使药物充分作用,7 000 r/min 离心 10 min,菌丝重悬于 20 mL 10% 葡萄糖溶液,测定 0、15、30、45、60、75 和 90 min 时溶液的 pH。

#### 1.7 菌株 P-5 菌丝中麦角固醇含量测定

参考 Zeng 等<sup>[12]</sup>和 Arthington-Skaggs 等<sup>[13]</sup>的方法,稍有修改。取 5 mL 同样浓度的孢子悬液接种于 250 mL PDB 培养基中,加入  $\beta$ -萜烯,使终质量

浓度分别达到 0、0.174、0.348、0.696、1.044 和 1.392 mg/mL,然后在 26 °C 125 r/min 摇床培养 48 h,过滤收集菌丝,蒸馏水冲洗 2 次后取 1.0 g 菌丝,加入 5 mL 含 25% KOH 乙醇溶液,混匀后 85 °C 下温育 2 h;加入 2 mL 无菌水和 5 mL 正庚烷萃取固醇类物质,收集上层正庚烷部分,扫描 230~300 nm 光吸收。麦角固醇含量计算如下:

$$\text{麦角固醇含量} = (A_{282}/290) /$$

$$\text{菌丝体湿质量} - 24,28\text{-脱氢麦角固醇含量,}$$

$$24,28\text{-脱氢麦角固醇含量} =$$

$$(A_{290}/518) / \text{菌丝体湿质量,}$$

$$290 \text{ 和 } 518 \text{ 分别是麦角固醇和 } 24,$$

$$28\text{-脱氢麦角固醇的消光系数。}$$

#### 1.8 山梨醇、胆固醇、半胱氨酸对菌株 P-5 的保护作用评价

无菌环境下,将灭菌 PDA 培养基趁热装入刻度试管中并加入山梨醇使其浓度分别为 0.8、1.0 或 1.2 mol/L,或加入胆固醇使其终浓度分别为 1.25、2.5、5.0 mmol/L,或加入半胱氨酸使其终浓度分别为 5、10、20 mmol/L,混匀,趁热均匀平铺在已灭菌载玻片上,不加 3 种物质的培养基为对照,载玻片置于培养皿中,按同样方式滴加孢子悬液,并添加  $\beta$ -萜烯使其终质量浓度为 0.348 mg/mL,并用封口胶密封。培养 12 h 后,显微镜观察统计孢子萌发率,并测量萌发孢子的芽管长度。

#### 1.9 数据统计与分析

所有试验均设 3 次重复,数据用 SPSS 9.0 进行统计分析,结果用平均值±标准误表示,各组间差异显著性采用邓肯氏多重比较法, $P < 0.05$  认为差异显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 $\beta$ -萜烯对意大利青霉的抑制作用

1)  $\beta$ -萜烯对意大利青霉菌株 P-5 孢子萌发与芽管伸长的抑制。 $\beta$ -萜烯质量浓度为 0.174 和 0.348 mg/mL 时,病菌孢子萌发率仅有 26.75% 和 9.8%,而对照孢子萌发率为 94%(图 1)。 $\beta$ -萜烯对病菌的芽管伸长有显著影响,对照芽管长度为 45.06  $\mu\text{m}$ ,0.174 mg/mL 处理芽管长度仅为 14.47  $\mu\text{m}$ ,在 0.348 和 0.696 mg/mL 剂量下芽管长度可忽略。这表明,0.348 mg/mL 的  $\beta$ -萜烯对意大利青霉菌株 P-5 孢子萌发有强烈抑制作用。

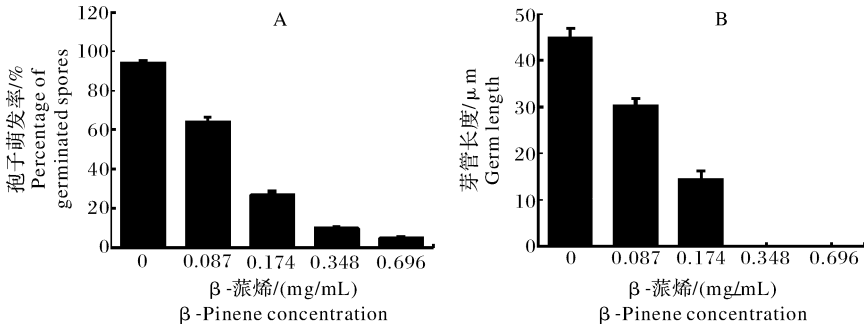


图 1 不同质量浓度  $\beta$ -蒎烯对意大利青霉菌株 P-5 孢子萌发 (A) 和芽管伸长 (B) 的影响  
Fig.1 Effects of  $\beta$ -pinene at different levels on spore germination (A) and germ tube growth (B) of *Penicillium italicum* strain P-5

2)  $\beta$ -蒎烯处理抑制菌株 P-5 菌丝生长。经  $\beta$ -蒎烯处理后, 菌株 P-5 菌丝生长情况如图 2 所示。培养 48 h, 对照菌丝生长迅速, 菌落直径达到了 18.4 mm, 0.043 5、0.087 和 0.174 mg/mL  $\beta$ -蒎烯处理的菌饼, 菌落直径分别是对照的 88.9%、66.1% 和 31.7%; 而 0.348 mg/mL  $\beta$ -蒎烯处理的菌饼, 恒温培养 5 d, 未见菌丝生长, 表明在该质量浓度下, 菌丝生长被完全抑制。

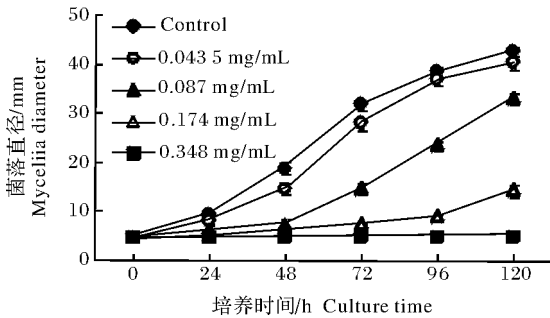


图 2 不同质量浓度  $\beta$ -蒎烯对意大利青霉菌株 P-5 菌落生长的抑制

Fig.2 Inhibitory effects of  $\beta$ -pinene at different levels on mycelial growth of *Penicillium italicum* strain P-5

2.2  $\beta$ -蒎烯处理对活性氧代谢、细胞功能、麦角固醇含量和细胞壁结构的影响

1)  $\beta$ -蒎烯处理对孢子活性氧积累的影响。经  $\beta$ -蒎烯处理后, 孢子活性氧积累情况如图 3 所示。对照孢子培养 10 h, 开始萌发, 但孢子仅有轻微绿色荧光, 而经过 0.348 mg/mL 的  $\beta$ -蒎烯处理的孢子, 荧光强度显著增强。这表明,  $\beta$ -蒎烯处理刺激了孢子活性氧积累。

葡萄糖加入后 15 min 内迅速酸化, 培养介质的 pH 由 5.34 下降至 4.26;  $\beta$ -蒎烯处理显著抑制菌丝胞外酸化能力, 其中 1.392 mg/mL  $\beta$ -蒎烯处理几乎完全抑制菌丝胞外酸化能力, 诱导培养 90 min 后细胞外液

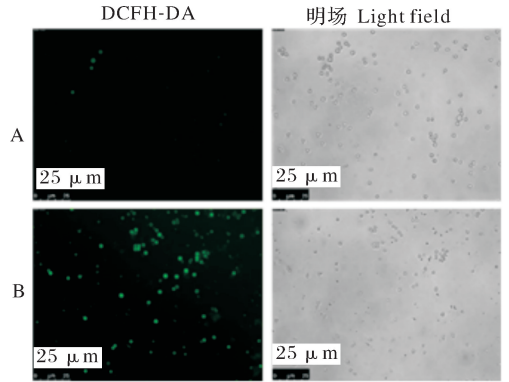


图 3 显微观察  $\beta$ -蒎烯处理对萌发孢子活性氧积累的影响  
Fig.3 Effects of  $\beta$ -pinene on accumulation of reactive oxygen species in germinating spores of *Penicillium italicum* strain P-5

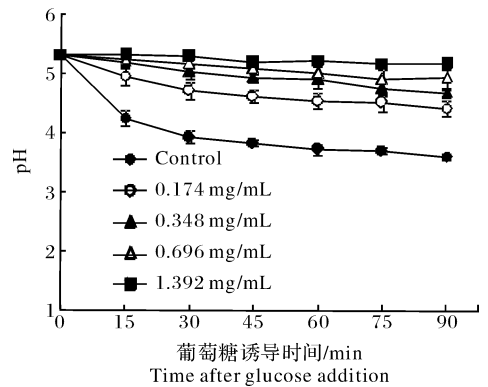


图 4 不同质量浓度  $\beta$ -蒎烯处理对意大利青霉菌株 P-5 菌丝排酸效应的影响

Fig.4 Influence of  $\beta$ -pinene at different levels on glucose induced acidification of medium by mycelia of *Penicillium italicum* strain P-5

2)  $\beta$ -蒎烯处理对菌丝胞外 pH 的影响。为了探究  $\beta$ -蒎烯对菌丝活性的影响, 我们测定了不同质量浓度  $\beta$ -蒎烯处理对菌丝胞外 pH 的影响。结果显示 (图 4): 对照组菌丝有很强的胞外酸化能力, 10% 葡

pH 仅下降 0.17 左右。这些结果说明  $\beta$ -蒎烯能显著抑制意大利青霉菌胞外排酸作用。

3)  $\beta$ -蒎烯处理对菌丝麦角固醇含量的影响。 $\beta$ -蒎烯对菌株 P-5 菌丝中麦角固醇含量有显著抑制作用,抑制效应随  $\beta$ -蒎烯浓度加大而增强(图 5);未处理菌丝麦角固醇含量为 2.17 mg/g;与对照相比,0.348、1.044 和 1.392 mg/mL  $\beta$ -蒎烯处理菌丝麦角固醇含量分别下降了 27.0%、84.0%和 93.1%。

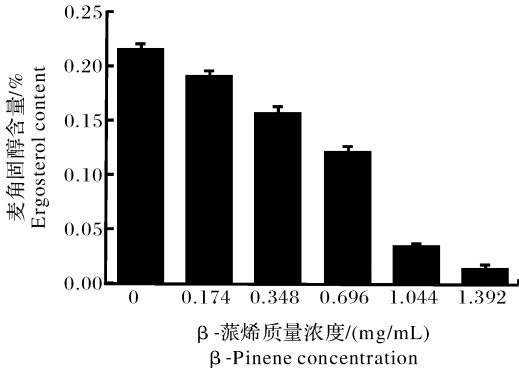
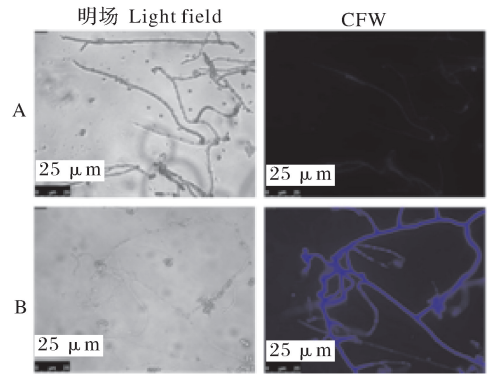


图 5 不同质量浓度  $\beta$ -蒎烯处理对意大利青霉菌株 P-5 菌丝麦角固醇含量的影响

Fig.5 Effects of  $\beta$ -pinene at different levels on ergosterol contents in mycelia of *Penicillium italicum* strain P-5

4)  $\beta$ -蒎烯处理对菌株 P-5 菌丝细胞壁几丁质分布的影响。如图 6 所示,未经  $\beta$ -蒎烯处理的菌丝,仅有轻微的蓝色荧光,而  $\beta$ -蒎烯处理的菌丝,荧光强度显著增加。表明在细胞壁结构完整时,CFW 难与几丁质结合,而蒎烯处理引起细胞壁结构发生显著改变,导致几丁质外露,使得 CFW 容易结合,故染色



A:对照; B: $\beta$ -蒎烯 A:Control; B: $\beta$ -Pinene at 0.696 mg/mL.

图 6 显微观察  $\beta$ -蒎烯处理对意大利青霉菌株 P-5 菌丝细胞壁几丁质分布的影响

Fig.6 Influence of  $\beta$ -pinene treatment on chitin distribution in cell wall of hyphae of *Penicillium italicum* strain P-5 加深。

### 2.3 保护添加剂对意大利青霉孢子萌发的保护作用

1) 添加胆固醇对孢子萌发的保护作用。试验结果表明(表 1),未添加胆固醇的青霉菌孢子,在 0.348 mg/mL 的  $\beta$ -蒎烯条件下,萌发率仅为 24.09%;添加 1.25 mmol/L 胆固醇后,萌发率达到了 71.64%,提高 2 倍以上。芽管伸长的测定结果也表明,1.25 mmol/L 胆固醇有效促进了芽管伸长,由对照的 13.7  $\mu$ m 提高到 40.37  $\mu$ m,表现出强烈的保护作用。其他 2 组高浓度胆固醇处理,也显著促进病菌孢子萌发和芽管伸长。这表明,胆固醇可以替代麦角固醇作用从而部分抵消了  $\beta$ -蒎烯的抑菌作用。

表 1 添加胆固醇对  $\beta$ -蒎烯抑制意大利青霉菌株 P-5 孢子萌发的保护作用

Table 1 Effects of cholesterol addition on spore germination and germ tube growth of *Penicillium italicum* strain P-5 with  $\beta$ -pinene at 0.348 mg/mL

项目 Items	胆固醇浓度/(mmol/L) Cholesterol			
	0	1.25	2.5	5
孢子萌发率/% Spore germination rate	24.09 $\pm$ 0.50a	71.64 $\pm$ 0.25b	51.13 $\pm$ 0.42c	54.64 $\pm$ 0.20d
孢子萌发抑制率/% Spore germination inhibition	75.91 $\pm$ 0.50a	28.36 $\pm$ 0.28b	48.87 $\pm$ 0.37c	45.36 $\pm$ 0.21d
芽管长度/ $\mu$ m Germ length	13.70 $\pm$ 1.15c	40.37 $\pm$ 2.55a	27.93 $\pm$ 2.90b	9.68 $\pm$ 1.96d

注:同一行字母不同表示在 0.05 水平下差异显著。下同。Note: The different letter in the same arrow means significantly different at  $\alpha=0.05$  level. The same as below.

2) 添加半胱氨酸的保护作用。试验结果表明,未添加 Cys 的孢子萌发率仅为 24.45%,添加 5 mmol/L Cys,孢子萌发率提高到 41.7%,在 20

mmol/L 时,孢子萌发率达到了 59.3%。同时,添加 Cys 显著促进了芽管伸长,在 20 mmol/L 浓度下,芽管长度由对照的 19.53  $\mu$ m 提高到了 44.7  $\mu$ m。

这些结果表明 Cys 对  $\beta$ -蒎烯处理的孢子有保护作用,促进孢子萌发与芽管伸长。

表 2 半胱氨酸对  $\beta$ -蒎烯抑制意大利青霉菌株 P-5 孢子萌发的保护作用

Table 2 Effects of cysteine addition on conidia germination and tube growth of *Penicillium italicum* strain P-5 with  $\beta$ -pinene at 0.348 mg/mL

项目 Items	半胱氨酸浓度/(mmol/L) Cysteine			
	0	5	10	20
孢子萌发率/% Spore germination rate	24.09±0.50a	41.74±1.87b	48.99±3.56c	59.30±3.56d
孢子萌发抑制率/% Spore germination inhibition	75.91±0.50a	58.26±3.09b	51.01±3.49c	40.70±3.42d
芽管长度/ $\mu$ m Germ length	13.70±1.15c	25.15±1.40b	27.16±2.08b	44.70±2.05c

3)山梨醇对  $\beta$ -蒎烯抑制孢子萌发的保护作用。山梨醇添加也显著促进芽管伸长,由对照芽管 9.63  $\mu$ m,提高到 14.67  $\mu$ m。1.0、1.2 mol/L 的山梨醇添加也有良好促进孢子萌发和芽管伸长作用。这表  
明, $\beta$ -蒎烯影响了细胞壁的膨压维护功能,添加渗透

表 3 山梨醇对  $\beta$ -蒎烯抑制意大利青霉菌株 P-5 孢子萌发的保护作用

Table 3 Effects of sorbitol addition on spore germination and tube growth of *Penicillium italicum* strain P-5 with  $\beta$ -pinene at 0.348 mg/mL

项目 Items	山梨醇浓度/(mol/L) Sorbitol			
	0	0.8	1.0	1.2
孢子萌发率/% Spore germination rate	24.09±2.34a	80.13±3.56b	73.73±2.89c	73.81±1.53c
孢子萌发抑制率/% Spore germination inhibition	75.91±2.19a	19.87±3.39b	26.27±2.63c	26.19±1.42c
芽管长度/ $\mu$ m Germ length	9.63±1.20a	14.67±2.38b	15.16±2.42b	15.22±1.53b

调节剂则部分抵消了  $\beta$ -蒎烯的抑制作用。

### 3 讨论

本研究结果表明, $\beta$ -蒎烯不仅能有效抑制意大利青霉孢子萌发与芽管伸长,抑制菌丝生长,同时还影响菌丝形态结构,抑制菌丝的正常代谢;而且  $\beta$ -蒎烯的抑菌浓度与目前报道的其他活性精油成分对腐败菌的抑菌浓度和抑制真菌毒素产生的浓度一致<sup>[14-16]</sup>。这些结果再次印证了蒎烯能有效抑制意大利青霉孢子萌发和生长,值得作为天然柑橘保鲜剂深入研究和开发。

作为天然精油的挥发性成分,其抗菌作用机制引人关注。一些研究认为,由于精油的疏水性,精油的主要作用位点可能是细胞膜<sup>[11,14]</sup>。未受胁迫的菌丝,在葡萄糖诱导下活化质体膜上的质子泵,向培养介质分泌酸,维持细胞内的稳态和渗透压稳定<sup>[17]</sup>。我们发现, $\beta$ -蒎烯处理的菌丝,排酸能力显著下降,暗示  $\beta$ -蒎烯处理引起了细胞内质子渗漏或者是抑制了质子泵的活性,导致菌丝的能量产生和膜完整性受损。相似的结果在柠檬醛处理的指状青

霉、紫苏醛处理的黑曲霉、茛苳子挥发油处理的黄曲霉和核盘菌中也观察到<sup>[11,14,18]</sup>,说明影响膜完整性和抑制能量供应是  $\beta$ -蒎烯发挥抑菌作用的重要机制。

很多研究表明,药物处理后,病原菌活性氧累积加剧,膜通透性改变<sup>[19-20]</sup>,这种破坏效应可以通过添加活性氧清除剂得以解除或缓解<sup>[12,19,21]</sup>。 $\beta$ -蒎烯处理后,萌发孢子显著积累大量活性氧,在培养基中加入活性氧清除剂 Cys,能有效促进受  $\beta$ -蒎烯抑制的病菌青霉孢子萌发和芽管伸长,再次印证了药物引起的活性氧积累导致膜损伤是发挥抑菌作用的重要机制。

真菌细胞膜的特异组分麦角固醇,是真菌细胞膜完整性和流动性调节因子,也是很多药剂(如唑类抗真菌剂)可能作用位点<sup>[17,22]</sup>。Ouyang 等<sup>[23]</sup>证实柠檬醛对点状青霉的抑制作用,主要是影响了麦角固醇生物合成代谢途径中的关键酶基因表达,从而改变了膜脂组分,导致了膜功能改变。Wang 等<sup>[24]</sup>的研究也表明,橙花醇通过减少麦角固醇积累从而有效抑制葡萄黑曲霉病菌。 $\beta$ -蒎烯处理能显著降低

意大利青霉麦角固醇的含量且呈现剂量效应,推测抑制麦角固醇积累可能是  $\beta$ -蒎烯的重要作用位点。培养基中添加类似物胆固醇,能显著抵消  $\beta$ -蒎烯对病菌孢子萌发的抑制作用,表明  $\beta$ -蒎烯干扰麦角固醇的合成也是其重要的抑菌作用机制。

真菌重要支撑结构细胞壁也是一些抗真菌药剂如棘球白素、卡泊芬净的作用位点<sup>[25]</sup>。最近研究表明,姜黄素作为抗真菌剂促进 *Sporothrix schenckii* 细胞壁外层几丁质积累<sup>[26]</sup>,从植物细胞壁水解液中分离的抗酿酒酵母的主要活性成分 poacic acid 能与真菌细胞壁葡聚糖层作用,导致细胞渗漏而死亡<sup>[27]</sup>,白色念珠菌经过精油处理后出现了细胞壁重构现象<sup>[28]</sup>。我们的结果表明, $\beta$ -蒎烯处理能影响细胞壁中几丁质的暴露与分布,表明其对细胞壁的保护功能造成很大影响;而渗透保护剂能有效保护在  $\beta$ -蒎烯存在条件下病菌孢子萌发和芽管伸长,再次证明对细胞壁结构改变、导致细胞壁的膨压维护能力下降是  $\beta$ -蒎烯发挥抑菌作用的重要作用机制。其具体作用机制还有待深入探讨。

综上所述, $\beta$ -蒎烯通过抑制菌丝排酸、促进活性氧增加和抑制麦角固醇的积累,并且干扰了细胞壁的保护功能等诸多机制的协同作用,有效抑制了意大利青霉菌孢子萌发和生长。

## 参 考 文 献

- [1] 刘浩强,李鸿筠,向可海,等.保鲜剂对柑橘贮藏病菌的敏感性及其贮藏保鲜效果[J].食品科学,2014,35(4):210-214.
- [2] 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 and technology, 2015, 107: 66-76.
- [3] NICOSIA M G L, PANGALLO S, RAPHAEL G, et al. Control of postharvest fungal rots on citrus fruit and sweet cherries using a pomegranate peel extract[J]. Postharvest biology and technology, 2016, 114: 54-61.
- [4] 杨书珍,蒋丹丹,范刚,等.松针提取物对柑橘青霉病菌的抑制作用及活性成分分析[J].现代食品科技,2016,32(1):65-69.
- [5] KARAPANDZOVA M, STEFKOV G, CVETKOVIKJ I, et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Pinus peuce* (pinaceae) growing wild in R. Macedonia [J]. Natural product communications, 2014, 9(11): 1623-1628.
- [6] YANG V W, CLAUSEN C A. Antifungal effect of essential oils on southern yellow pine [J]. International biodeterioration and biodegradation, 2007, 59(4): 302-306.
- [7] ZENG W C, HE Q, SUN Q, et al. Antibacterial activity of water-soluble extract from pine needles of *Cedrus deodara* [J]. International journal of food microbiology, 2012, 153 (1/2): 78-84.
- [8] YANG S Z, PENG L T, CHENG Y J, et al. Control of citrus green and blue molds by Chinese propolis [J]. Food science and biotechnology, 2010, 19 (5): 1303-1308.
- [9] VIRAGH M, MARTON A, VIZLER C, et al. Insight into the antifungal mechanism of *Neosartorya fischeri* antifungal protein [J]. Protein & cell, 2015, 6(7): 518-528.
- [10] MARSCHALL R, TUDZYNSKI P. A new and reliable method for live imaging and quantification of reactive oxygen species in *Botrytis cinerea*: technological advancement [J]. Fungal genetics and biology, 2014, 71: 68-75.
- [11] MA B, BAN X, HUANG B, et al. Interference and mechanism of dill seed essential oil and contribution of carvone and limonene in preventing *Sclerotinia* rot of rapeseed [J]. PLoS One, 2015, 10 (7): e0131733.
- [12] ZENG H, CHEN X P, LIANG J N. *In vitro* antifungal activity and mechanism of essential oil from fennel (*Foeniculum vulgare* L.) on dermatophyte species [J]. Journal of medical microbiology, 2015, 64 (1): 93-103.
- [13] ARTHINGTON-SKAGGS B A, JRADI H, DESAI T, et al. Quantitation of ergosterol content: novel method for determination of fluconazole susceptibility of *Candida albicans* [J]. Journal of clinical microbiology, 1999, 37(10): 3332-3337.
- [14] TIAN J, WANG Y Z, ZENG H, et al. Efficacy and possible mechanisms of perillaldehyde in control of *Aspergillus niger* causing grape decay [J]. International journal of food microbiology, 2015, 202: 27-34.
- [15] VILAPLANA R, PAZMINO L, VALENCIA-CHAMORRO S. Control of anthracnose, caused by *Colletotrichum musae*, on postharvest organic banana by thyme oil [J]. Postharvest biology and technology, 2018, 138: 56-63.
- [16] MOON Y S, LEE H S, LEE S E. Inhibitory effects of three monoterpenes from ginger essential oil on growth and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* and their gene regulation in aflatoxin biosynthesis [J]. Applied biological chemistry, 2018, 61 (2): 243-250.
- [17] TIAN J, BAN X Q, 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.
- [18] OUYANG Q L, TAO N G, ZHANG M L. A damaged oxidative phosphorylation mechanism is involved in the antifungal activity of citral against *Penicillium digitatum* [J]. Frontiers in microbiology, 2018, 9: 239.
- [19] BLATZER M, JUKIC E, POSCH W, et al. Amphotericin B resistance in *Aspergillus terreus* is overpowered by coapplication of pro-oxidants [J]. Antioxidants & redox signaling, 2015, 58 (18): 1424-1438.
- [20] CHEN Y, ZENG H, TIAN J, et al. Antifungal mechanism of essential oil from *Anethum graveolens* seeds against *Candida al-*

- bicans* [J]. Journal of medical microbiology, 2013, 62: 1175-1183.
- [21] YUN J E, WOO E R, LEE D G. Isoquercitrin, isolated from *Aster yomena* triggers ROS-mediated apoptosis in *Candida albicans* [J]. Journal of functional foods, 2016, 22: 347-357.
- [22] LAURA A F, EMILIA M. Ergosterol biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*: its relevance as an antifungal target and role in antifungal drug resistance [J]. Frontiers in microbiology, 2013, 3: 439.
- [23] OUYANG Q, TAO N, JING G X. Transcriptional profiling analysis of *Penicillium digitatum*, the causal agent of citrus green mold, unravels an inhibited ergosterol biosynthesis pathway in response to citral [J]. BMC genomics, 2016, 17 (1): 599.
- [24] WANG Y Z, ZENG X B, ZHOU Z K, et al. Inhibitory effect of nerol against *Aspergillus niger* on grapes through a membrane lesion mechanism [J]. Food control, 2015, 55: 54-61.
- [25] BALASHOV S V, PARK S, PERLIN D S. Assessing resistance to the echinocandin antifungal drug caspofungin in *Candida albicans* by profiling mutations in FKS1 [J]. Antimicrob agents chemother, 2006, 50 (6): 2058-2063.
- [26] HUANG L L, ZHANG J, SONG T Z, et al. Curcumin promotes chitin accumulation associated with decreased virulence of *Sporothrix schenckii* [J]. International immunopharmacology, 2016, 34: 263-270.
- [27] PIOTROWSKI J S, OKADA H, LU F C, et al. Plant-derived antifungal agent poaic acid targets beta-1, 3-glucan [J]. Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america, 2015, 112 (12): E1490-E1497.
- [28] SHAHINA Z, EL-GANINY A M, MINION J, et al. Cinnamomum zeylanicum bark essential oil induces cell wall remodelling and spindle defects in *Candida albicans* [J]. Fungal biology and biotechnology, 2018, 5(1): 3.

## Possible action mode of beta-pinene against *Penicillium italicum*

ZHANG Meihong<sup>1</sup> WANG Meng<sup>1</sup> YANG Shuzhen<sup>1</sup> SU Xiaojun<sup>2</sup> DAI Mei<sup>1</sup> PENG Litao<sup>1</sup>

1. College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2. State Key Lab for Germplasm Innovation and Utilization of Crop, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China

**Abstract** In this study, the effects of  $\beta$ -pinene on spore germination, tube elongation and mycelial growth of *Penicillium italicum* were assessed, and the effects of  $\beta$ -pinene on cell wall chitin distribution, active oxygen metabolism, acid excretion capacity and ergosterol contents of mycelia were analyzed. The effects of sorbitol, cholesterol and cysteine as protective agents on spore germination of *P. italicum* incubated with  $\beta$ -pinene were further evaluated. The results showed that  $\beta$ -pinene had strong antifungal activity against *P. italicum* in a dose dependent manner, as exhibited by spore germination and mycelium growth inhibition at the concentration ranging from 0.087 to 0.696 mg/mL.  $\beta$ -Pinene incubation also altered the distribution of chitin in cell wall, promoted the accumulation of reactive oxygen species (ROS), and significantly inhibited glucose-induced reduction in external pH of the mycelia. Addition of cholesterol as alternative of ergosterol, sorbitol as osmotic regulator, or cysteine as active oxygen scavenger could effectively promote the spore germination and tube elongation of the pathogen incubated with  $\beta$ -pinene at 0.348 mg/mL. These results revealed that the antifungal activity of  $\beta$ -pinene against *P. italicum* was related to the damage of cell wall structure, promotion of ROS accumulation and the inhibition of ergosterol increase in membrane.

**Keywords**  $\beta$ -pinene; *penicillium italicum*; inhibition mechanism; ergosterol; ROS accumulation; cell wall