

茶树精油对扩展青霉线粒体功能的影响

陈雪昱¹ 邹秀容^{1, 2} 韦莹莹¹ 许凤¹ 王鸿飞¹ 邵兴锋^{1*}

(1. 宁波大学食品与药学学院, 浙江 宁波 315800;

2. 韶关学院英东食品科学与工程学院, 广东 韶关 512005)

摘要: 为了揭示茶树精油 (TTO) 对果蔬采后病原真菌扩展青霉 (*Penicillium expansum*) 的抑菌作用机制, 以 TTO 处理的 *P. expansum* 孢子、菌丝和线粒体为研究对象, 测定真菌活性氧 (ROS) 积累及 6 种线粒体功能相关酶类的活性变化, 并采用扫描电镜、透射电镜观察精油处理对线粒体形态和超微结构的影响。结果表明: TTO 处理导致 *P. expansum* 线粒体发生严重的皱缩, 干瘪, 胞内有空泡状结构, 线粒体基质流失, 严重破坏了 *P. expansum* 的线粒体结构。同时 TTO 处理诱导了 *P. expansum* 孢子内 ROS 的大量积累, 导致菌丝细胞内三磷酸腺苷 (ATP) 含量下降和三磷酸腺苷酶 (ATPase)、柠檬酸合酶 (CS)、异柠檬酸脱氢酶 (ICDH)、 α -酮戊二酸脱氢酶 (α -KGDH)、苹果酸脱氢酶 (MDH) 和琥珀酸脱氢酶 (SDH) 活性下降, 破坏了 *P. expansum* 的三羧酸循环 (TCA)。结果表明 TTO 处理引起 *P. expansum* 孢子内 ROS 的积累, 破坏菌丝体内的线粒体形态和超微结构, TCA 循环和能量代谢异常。可见, 线粒体功能的严重受损是 TTO 抑制 *P. expansum* 的重要机制。

关键词: 茶树精油; 扩展青霉; 活性氧; 线粒体

Effect of Tea Tree Oil on the Mitochondrial Function of *Penicillium expansum*

CHEN Xueyu¹, ZOU Xiurong², WEI Yingying¹, XU Feng¹, WANG Hongfei¹, SHAO Xingfeng^{1*}

(1 College of Food and Pharmaceutical Sciences, Ningbo University, Ningbo 315800, China; 2 Yingdong

College of Food Science and Engineering, Shaoguan University, Shaoguan 512005, China)

Abstract: In order to study the antifungal effect of tea tree oil (TTO) on the *Penicillium expansum* in postharvest fruits and vegetables, the mycelia and mitochondria of *P. expansum* were treated with TTO, and the accumulation level of reactive oxygen species (ROS) and the changes in activities of enzymes associated with mitochondrial function were then measured. Scanning electron microscope (SEM) and transmission electron microscope (TEM) were also used to observe the morphology and ultrastructure of mitochondria for evaluating TTO effect on mitochondria. The results showed that TTO treatment caused severe shrinking, drying, and vesicular mitochondria, along with loss of mitochondrial matrix. Meanwhile, TTO treatment induced a large amount of ROS accumulated in *P. expansum* spores, resulting in decreases in intracellular adenosine triphosphate (ATP) content and activities of several important enzymes, including citrate synthetase (CS), isocitrate dehydrogenase (ICDH), α -ketoglutarate dehydrogenase (α -KGDH), malic dehydrogenase (MDH), and succinodehydrogenase (SDH). Thus, the tricarboxylic acid cycle (TCA) of *P. expansum* was destroyed. This study showed that TTO treatment affected the structure and function of mitochondria in *P. expansum*, caused ROS highly accumulated, disrupted the TCA cycle of *P. expansum*, and eventually hinder the normal metabolism of mitochondria.

Keywords: Tea Tree Oil (TTO), *Penicillium expansum*, reactive oxygen species (ROS), Mitochondria

中图分类号: TS255.1 文学标志码: A

DOI: 10.7506/spkx1002-6630-20200131-297

扩展青霉 (*Penicillium expansum*) 引发的青霉病是造成苹果^[1]、西红柿^[2]、樱桃番茄^[3]等果蔬采

基金项目: 国家自然科学基金 (31371860)。

作者简介: 陈雪昱 (1994—), 女, 硕士研究生, 主要研究食品贮藏与保鲜。E-mail: 491544802@qq.com

通讯作者: 邵兴锋 (1980—) (ORCID: 0000-0002-0724-8186) 男, 博士, 教授, 博导, 主要研究食品贮藏与保鲜。E-mail: shaoxingfeng@nbu.edu.cn

后腐烂的主要原因。化学杀菌剂是目前防治此类真菌病害的主要手段，但其局限性明显，易导致真菌产生耐药性，对人体健康和农业生态产生危害，这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、环境友好型的生防试剂，广泛用于多种果蔬的采后真菌病害防控，不但抑菌谱广，且安全可靠^[4]。在樱桃番茄^[3]、甜桔^[5]、胡萝卜^[6]、蓝莓^[7]等果蔬上的应用都表明，植物精油具有显著的防腐保鲜效果。

茶树精油 (Tea Tree Oil, TTO) 是由桃金娘科 (*Myrtaceae*) 白千层属 (*Melaleuca*) 灌木树种互生叶白千层 (*Melaleuca alternifolia*) 的新鲜枝叶经水蒸气蒸馏得到的芳香精油，包含松油烯-4-醇， α -松油醇和 1, 8-桉叶油等挥发性物质^[8]。TTO 无毒，气味清新怡人，被认为是抗菌、抗氧化和抗癌药品的良好选择^[9]。Shi^[10]等研究发现 TTO 可以抑制金黄色葡萄球菌的生长和肠毒素的产生，而精油浓度越高，其抑制作用越明显。静玮等^[11]研究 TTO 对香蕉的影响时发现，TTO 能显著的抑制炭疽病菌菌丝的生长，有利于香蕉的保鲜。钟业俊等^[12]研究也表明，TTO 能延缓香蕉腐烂。程赛等^[13]用熏蒸法处理草莓，发现 TTO 可抑制灰葡萄孢霉(*Botrytis cinerea*)和根霉的孢子萌发以及菌丝生长，降低其发病率，延长草莓的货架期；TTO 也可以有效控制樱桃番茄上由 *B. cinerea* 和 *P. expansum* 导致的腐烂^[14]。因此，TTO 具备商业化应用前景。

课题组前期的研究发现，TTO 的特征组分松油烯-4-醇和 1,8-桉叶素可以作用于 *B. cinerea* 的不同亚细胞部位^[15]和不同靶基因^[16]，进而通过破坏 *B. cinerea* 的膜结构导致细胞内物质泄漏^[17]、影响 *B. cinerea* 线粒体功能^[18]来发挥抑菌作用。TTO 对 *P. expansum* 的抑制效果弱于对 *B. cinerea* 的抑制^[19]，这可能与 *P. expansum* 含有更高的细胞膜脂质和甾醇有关^[14]。当 TTO 浓度在 6.5 mL/L 时可完全抑制 *P. expansum* 的菌丝生长^[14]，造成 *P. expansum* 细胞膜中的脂质和甾醇含量的下降，进而破坏呼吸代谢和细胞膜透性，导致 *P. expansum* 菌丝体和超微结构的显著改变^[14]。本实验以 TTO 处理的 *P. expansum* 为研究对象，进一步深入研究活性氧 (ROS) 的积累及线粒体功能相关酶活性的变化，并采用扫描电镜 (SEM) 和透射电镜 (TEM) 观察线粒体自身形态和超微结构受 TTO 的影响，以期能更好地揭示 TTO 对 *P. expansum* 生理功能的干扰机制，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 实验材料

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；扩展青霉(*P. expansum*)购自中国农业微生物菌种保藏中心。

1.2 仪器与设备

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； Infinite M200 Pro 多功能荧光酶标仪 瑞士帝肯 (Tecan) 公司；HCP-2 临界点干燥机 日本日立 (Hitachi) 公司；20nm E-1010 真空离子溅射镀金膜机 日本日立 (Hitachi) 公司；S-3400N 扫描电子显微镜 日本日立 (Hitachi) 公司；JEM-1230 透射电镜 日本日立 (Hitachi) 公司；Agilent 1260 高效液相色谱 美国安捷伦 (Agilent) 公司。

1.3 方法

1.3.1 TTO 对 *P. expansum* 的处理

1.3.1.1 TTO 对 *P. expansum* 孢子的处理

根据 Tian^[20]的方法并略加修改，采用精油处理后的真菌孢子来反映精油处理对真菌 ROS 相对含量的影响。参考 Li^[14]报道的 TTO 对 *P. expansum* 的最小抑菌浓度 (minimum inhibition concentration, MIC)，设置处理浓度为 6.5 μ L/mL。*P. expansum* 菌种经活化后，转接到马铃薯葡萄糖 琼脂培养基 (PDA，去皮马铃薯200g，加水 1000mL 煮沸 30 分钟，过滤后加入20g 葡

葡萄糖和20g琼脂)上25℃培养3d,用无菌生理盐水洗下孢子,用血球计数板调节孢子浓度至 2×10^7 个/mL。孢子分别在1/4MIC,1/2MIC,MIC和2MIC的TTO中处理2h,处理后5000r/min离心5min,并用0.05mol/L磷酸缓盐冲液(PBS,pH=7.0)清洗3次,离心收集孢子。

1.3.1.2 TTO对*P. expansum*菌丝的处理

*P. expansum*菌种在PDA培养基上25℃培养3d后用无菌生理盐水冲洗孢子,用血球计数板调至 10^6 个孢子/mL。移取3mL浓度为 10^6 个/mL孢子悬浮液,加入到含有150mL马铃薯葡萄糖液体培养基(PDB,去皮马铃薯200g,加水1000mL煮沸30分钟,过滤后加入20g葡萄糖)的锥形瓶中,25℃下150r/min摇床培养3d。在收集菌体2h前,分别加入一定量的含TTO的6%无菌吐温-80液体培养基,配制成1/4MIC,1/2MIC,MIC和2MIC处理组;以加入6%无菌吐温液体培养基为对照组(即锥形瓶中仅含有1%的吐温-80)。每个处理组(TTO)和对照(CK)组均设置三个重复,所有的锥形瓶在25℃150r/min摇床继续培养2h,再4000r/min离心10min,并用4℃无菌的生理盐水清洗3遍后收集得到菌丝,用于后续的线粒体提取和线粒体功能相关代谢酶活性研究。

1.3.2 ROS相对含量的测定

ROS的相对含量按照南京建成生物工程研究所活性氧测试盒(E004)说明书步骤进行测定。按照1:1000的比例用0.05mol/LPBS(pH=7.0)稀释二氯荧光黄二乙酸脂(DCFH-DA),使其终浓度为 $10\mu\text{mol}/\text{L}$ 。用稀释好的DCFH-DA冲洗PDA平板上的*P. expansum*孢子,借助血球计数板调整浓度至 10^6 个/mL,室温培养60min,每隔8-10min颠倒混匀一次,使探针和孢子细胞充分接触。 $1000\times g$ 离心10min收集孢子细胞。用PBS洗涤3次,离心收集沉淀物。将收集好的沉淀加入PBS后涡旋振荡20s使其悬浮,使用多功能荧光酶标仪在激发波长为485nm,发射波长为525nm下进行检测并记录荧光值。以对照组的荧光值为100%,计算各处理组的相对百分比变化,记为ROS相对含量。

1.3.3 线粒体的提取

线粒体的提取参考Luo^[21]改进,所有过程均在4℃下操作完成。配制线粒体分离介质(0.01M Tris,1mM Na₂EDTA,10%蔗糖,pH=7.4)并预冷。按1.3.1.2收集到的菌丝,于研钵中加入液氮进行快速充分的研磨,将研磨后的样品与线粒体分离介质按照1:8的比例加入预冷的离心管中,4℃4000r/min离心10min。收集上清液再于4℃10000r/min离心15min后保留沉淀,沉淀物再加入线粒体分离介质后涡旋振荡20s使其悬浮,继续4℃10000r/min离心15min。重复上述步骤洗涤两次,最终的沉淀物中加入1mL的线粒体分离介质,用移液枪吹打均匀,即得到线粒体原液于-40℃保存备用。

1.3.4 SEM和TEM观察方法

SEM观察方法参照Yu^[15]等的方法。经MIC TTO处理2h后的菌丝和对照组所提取的线粒体样品,利用2.5%的戊二醛(SPIbio,法国)固定。样品经乙醇逐级洗脱,放入临界点干燥机中进行干燥,再在高真空离子溅射镀膜机进行金/钯涂层,于SEM下观察和拍照,每个重复组中取两个平行进行观察。

TEM观察方法参照Yu^[15]等的方法。经MIC TTO处理2h后的菌丝和对照组所提取的线粒体样品,于2.5%的戊二醛中固定,再用1%锇酸(Pelco,美国)固定,后经乙醇逐级脱水、环氧树脂(SPIbio,法国)包埋、聚合后修块,超薄切片。切片经醋酸双氧铀(Pelco,美国)、柠檬酸铅染液(Pelco,美国)进行铀、铅双染后,于TEM下观察和拍照,每个重复组中取两个平行进行观察。

1.3.5 细胞内部ATP含量和TCA循环相关酶活性的测定

1.3.5.1 细胞内部ATP含量测定

ATP 测定参考 Liu^[22]的方法。按 1.3.1.2 收集到的 MIC 浓度处理组和对照组 菌丝，称取 2 g 样品加入 10mL 0.6mol/L 高氯酸，冰水浴 1min, 8000×g 离心 10 min。吸取 6mL 上清液，用 1mol/L KOH 调节其 pH 至 6.5-6.8 之间，冰水浴 30min 使高氯酸钾大量沉淀，过滤除去沉淀。ATP 的含量采用配备 Agilent XDB C18 柱的高效液相色谱测定，柱温 25°C，缓冲液为 KH₂PO₄-K₂HPO₄ (pH=6.0, 50mmol/L, 含 1mmol/L EDTA)，流动相是缓冲液和甲醇 (比例为 97.5:2.5)，15min 等梯度洗脱，流速为 1.0mL/min。检测波长为 259nm，进样量为 10μL。以 ATP (Sigma, 美国) 为标准品，以保留时间定性，峰面积定量，每个进样重复三次。

1.3.5.2 三磷酸腺苷酶 (ATPase) 活性测定

称取 1 g 按 1.3.1.2 收集到的 MIC 浓度处理组和对照组的 菌丝样品，加 5mL 0.05mol/L PBS (pH=7.2)，超声破碎 15min 后 4°C、1500r/min 离心 10min 获得粗酶液。用南京建成生物工程研究所 ATPase 试剂盒进行测定，利用酶标仪测定吸光值，按说明书计算酶活性，记为 U/g。

1.3.5.3 柠檬酸合成酶 (CS)、异柠檬酸脱氢酶 (ICDH) 和 α-酮戊二酸脱氢酶 (α-KGDH) 酶活性测定

以 1/4MIC, 1/2MIC, MIC、2MIC 处理组和对照组菌丝为样品，加 5mL 0.05mol/L PBS (pH=7.2)，超声破碎 15min 后 4°C、1500r/min 离心 10min 获得粗酶液。用南京建成生物工程研究所 CS、ICDH 和 α-KGDH 试剂盒进行酶活性测定。利用酶标仪测定吸光值，按说明书计算酶活性，记为 U/g。

1.3.5.4 苹果酸脱氢酶 (MDH) 和琥珀酸脱氢酶 (SDH) 活性测定

称取 1/4MIC, 1/2MIC, MIC、2MIC 处理组和对照组 菌丝样品各 0.2 g，分部加入 1.8mL 生理盐水，冰水浴条件下机械匀浆，2500r/min 离心 10min 获得粗酶液。用南京建成生物工程研究所 MDH 和 SDA 试剂盒进行酶活性测定。利用酶标仪测定吸光值，按说明书计算酶活性，记为 U/g。

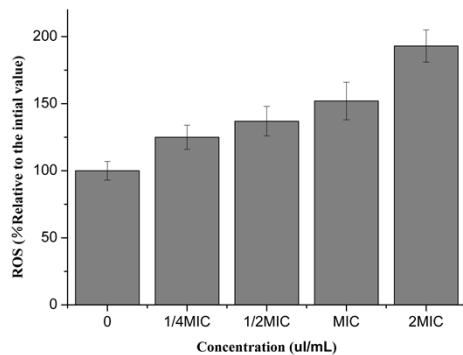
1.4 数据统计与分析

所有试验重复三次，数据图片用 Origin Pro 8.0 绘制 (Microcal 软件公司, 美国)。采用 SASS 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 结果与分析

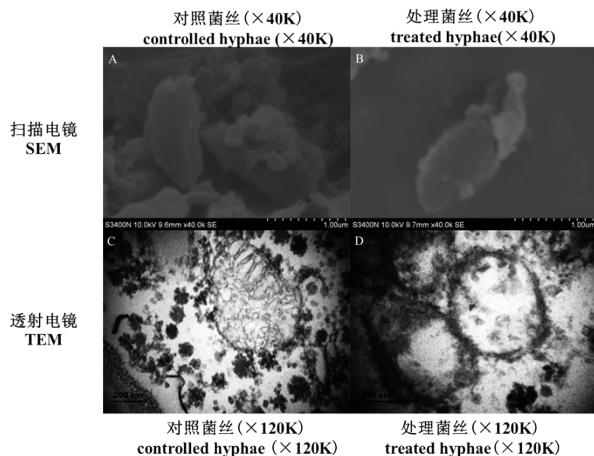
2.1 TTO 处理对 *P. expansum* 孢子 ROS 相对含量的影响

图 1 反映了不同浓度 TTO 处理对 *P. expansum* 孢子 ROS 相对含量的影响。随着精油浓度的增加，孢子体内的 ROS 含量也随之增加 (图 1)。各种浓度 TTO 处理组的 ROS 含量相对于对照组分别上升了 125%、137%、152% 和 193%。结果表明，不同浓度的 TTO 处理均能显著提高 *P. expansum* 孢子中 ROS 含量，导致氧化爆发。

图 1 TTO 对 *P. expansum* 孢子中 ROS 含量的影响Fig.1 Effect of TTO on ROS content of *P. expansum*

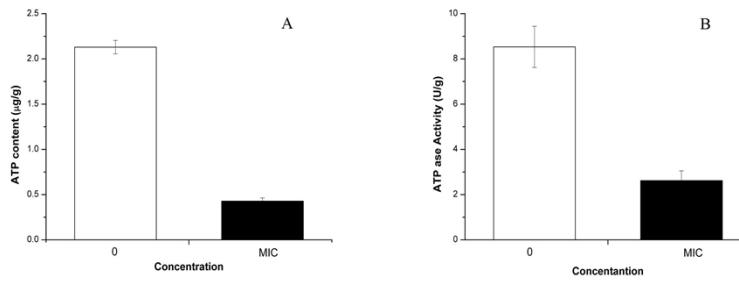
2.2 TTO 处理对 *P. expansum* 菌丝体内线粒体形态和超微结构的影响

SEM 观察发现对照组 *P. expansum* 线粒体呈正常均匀的段棒状，形态饱满，表面光滑、完整、有规则（图 2）；TTO 处理组 *P. expansum* 的线粒体则出现不规则凹陷，形状异常。TEM 观察发现对照组 *P. expansum* 内外线粒体膜清晰可见，线粒体脊排列规则有序，而 TTO 处理组 *P. expansum* 的线粒体则呈现出肿胀的形态，短脊断裂、消失，囊泡出现，说明 TTO 使 *P. expansum* 线粒体基质肿胀、透明化，原先的内部结构被破坏。

图 2 扫描电镜和透射电镜下 *P. expansum* 菌丝体内线粒体形态及超微结构变化Fig.2 The change of mitochondrial morphology and ultrastructure of *P. expansum* under transmission electron microscope and scanning electron microscope

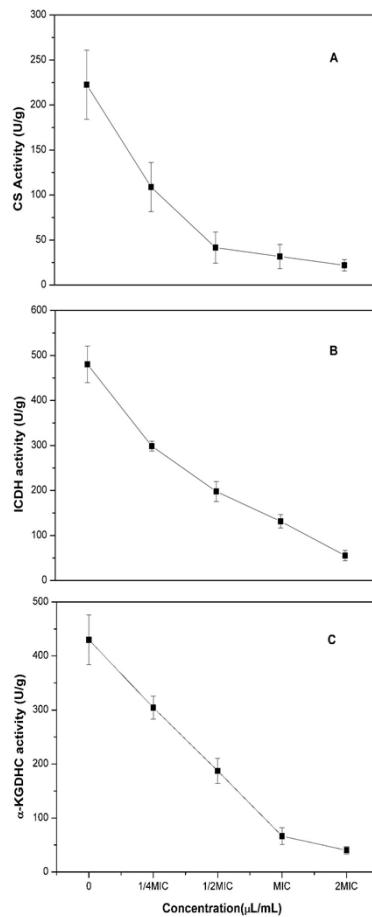
2.3 TTO 处理对 *P. expansum* 菌丝体内 ATP 含量和 ATPase 活性的影响

如图 3 所示，对照组 *P. expansum* 细胞内部 ATP 含量为 $2.13\mu\text{g/g}$ ，而 MIC 浓度的 TTO 处理后 *P. expansum* 细胞内部 ATP 含量为 $0.43\mu\text{g/g}$ 下降了 79.9%，表明 MIC 浓度的 TTO 处理极显著 ($P<0.01$) 的降低了 *P. expansum* 内部 ATP 的含量，导致了细胞内部 ATP 的流失。ATPase 的活性呈现出与 ATP 含量相同的变化趋势，对照组 ATPase 活性为 8.53U/g ，MIC 浓度的 TTO 处理组 ATPase 活性为 2.62U/g ，下降了 69.3% ($P<0.01$)。结果表明，MIC 浓度 TTO 处理导致细胞内部 ATP 泄露，并抑制了 ATPase 活性。

图 3 TTO 处理对 *P. expansum* 菌丝体内 ATP 含量(A)和ATPase(B)活性的影响Fig.3 Effect of TTO on the content of ATP content (A) and the activity of ATPase (B) of *P. expansum*.

2.4 TTO 处理对 *P. expansum* 菌丝体内 CS、ICDH、 α -KGDH 活性的影响

TTO 处理的 *P. expansum* 中 CS、ICDH、 α -KGDH 活性随着 TTO 处理浓度的增加均呈现出下降的趋势(图 4)。当 TTO 浓度为 1/2MIC 时, 相对于对照组, CS、ICDH、 α -KGDH 酶活性分别下降了 81.33%, 58.81% 和 56.41%。当 TTO 浓度增加 1MIC 时, 各酶的活性与对照组相比较分别下降了 85.8%, 72.6% 和 84.6%。而当 TTO 浓度增加到 2MIC 时, 各酶活性分别下降了 90.15%, 88.49% 和 90.68%, 酶活性基本被抑制, 说明 *P. expansum* TCA 受到显著的抑制。

图 4 TTO 对 *P. expansum* 菌丝体内 CS 活性(A)、ICDH 活性(B)和 α -KGDH (C)活性的影响Fig.4 Effect of TTO on the activities of CS (A), ICDH (B) and α -KGDH (C) of *P. expansum*.

2.5 TTO 处理对 *P. expansum* 菌丝体内 MDH 和 SDH 活性的影响

如图 5 所示，随着 TTO 浓度的增加，SDH 和 MDH 活性均明显下降。当 TTO 浓度为 1/4MIC 时，*P. expansum* 对应的酶活性分别为 27.5U/g 和 117.7U/g，同对照组相比分别下降了 36.5% 和 7.82%。当 TTO 浓度增加到 MIC 时，对应的酶活性分别下降了 59.6% 和 69.8%。而当 TTO 浓度增加到 2MIC 时，SDH 和 MDH 的活性同对照组相比分别下降了 82.7% 和 80.6%。结果表明，TTO 处理可通过降低线粒体功能关键酶活性，从而影响 *P. expansum* 中线粒体的正常功能，从而抑制菌体活性。

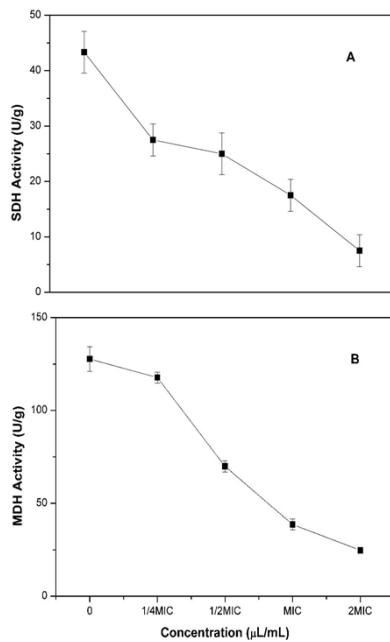


图 5 TTO 对 *P. expansum* 菌丝体内 SDH 活性(A)和 MDH(B)活性的影响

Fig.5 Effect of TTO on the activities of SDH (A) and MDH (B) of *P. expansum*.

3. 讨论

近年来，植物精油作为一种天然的绿色农药、环境友好型的生防试剂，广泛用于多种果蔬的采后真菌病害防控，不但抑菌谱广，且安全可靠^[4]。但植物精油潜在的抑菌机制还没有被完全了解，以前的研究认为植物精油对细胞膜有作用，包括对细胞膜的损伤，影响脂质、甾醇以及膜脂肪酸含量的变化^[20, 23, 24]，最终导致细胞物质的外泄和细胞的死亡。也有一些研究报道植物精油和它的主要成分，也可以通过影响线粒体的结构和功能产生抗菌活性^[20, 25]，如本课题组的前期研究发现 TTO 可以显著影响 *B. cinerea* 线粒体的形态和功能^[18]。

线粒体是真核生物细胞内提供能量产生和代谢的关键细胞器，除此外还起到维持 pH 稳定、调节膜电位、细胞代谢与凋亡的信号传递等作用^[26]。Zheng^[25]等人的研究表明柠檬醛可以通过影响线粒体来发挥其抑菌活性，而且随着柠檬醛浓度的增加，线粒体的凹陷越明显，内部结构被破坏越来越严重。原因是线粒体膜的通透性增加，膜内小分子物质的损失和细胞新陈代谢的差异导致了线粒体的损伤，从而影响线粒体的组织和功能^[20]。在我们的研究中，SEM 和 TEM 清晰地表明了 TTO 对线粒体的内外部结构产生作用，导致线粒体内部呈现出空腔和混乱，表面凹陷破损，内部成分被严重破坏，从而使线粒体无法正常发挥功能。在小分子物质中，细胞内外 ATP 含量的变化可以用来反应线粒体膜不可逆转的破坏^[25]。我们的结果表明，TTO 处理后细胞内部 ATP 含量明显下降，所以 TTO 处理确实使线粒体膜的通透性发生变化，造成线粒体表面缺陷导致细胞内部 ATP 的泄漏和细胞外部 ATP 含量的增加。ATP 的泄漏通常意味着能量产生途径的损伤。ATPase 是细胞内产生能量的

关键酶。在 ATPase 的分解作用下，ATP 中存储的能量被释放出来，用于生物的生命活动，例如细胞分裂，生物的生长和矿质元素的吸收等^[25]。我们的研究结果中，TTO 处理明显抑制了 ATPase 的活性，表明 TTO 处理不仅造成线粒体破损导致细胞内部 ATP 泄露，还对细胞内能量产生途径造成损伤，从而影响菌体活性，达到抑菌效果。

线粒体内部的 TCA 循环途径可以提供细胞所需要的能量和减少还原力^[27]，TCA 循环的破坏会导致细胞的死亡^[28]。CS、ICDH、 α -KGDH、MDH 和 SDH 都是 TCA 循环、线粒体功能中发挥重要作用的酶。CS 可以通过链接养分用来合成 TCA 的中间体和产品来调节能量通量和代谢速度。它可以促进乙酰辅酶 A 的缩合，形成柠檬酸盐，辅酶 A 和一个质子^[29]。ICDH 可以调节异柠檬酸转入 TCA 循环或者乙醛酸循环^[30]。 α -KGDH 减少了柠檬酸循环产生的 NADH 和随后细胞合成 ATP 的能力， α -酮戊二酸脱氢酶的失活会干扰柠檬酸循环^[31]。MDH 可以将内部的苹果酸盐转化为草酰乙酸盐，和苹果酸盐的穿梭运动有关^[32]。SDH 可以将氧化的琥珀酸盐转化为延胡索酸盐，还可以将电子从琥珀酸盐转移到泛醇^[33]。Zheng^[25]等报道称柠檬醛可以抑制青霉的 TCA 循环，而且随着柠檬醛浓度的增加，CS、ICDH、 α -KGDH 的活性随之下降。在我们的研究中，TTO 处理几乎完全抑制了 CS、ICDH、 α -KGDH 的活性。Wu^[34] 等研究表明羽苔素 E 能够通过降低假丝酵母线粒体脱氢酶的活性来发挥抗菌活性。Tian^[20]等报道称莳萝精油可以降低黄曲霉中脱氢酶的活性，表明莳萝精油可以通过破坏细胞膜的通透性来发挥抗菌活性。也有报道称肉桂精油可以通过减少琥珀酸脱氢酶和苹果酸脱氢酶来影响根霉菌的能量代谢^[35]，杨树芽活性提取物对青霉的处理也出现了同样的效果^[36]。在我们的研究中，SDH 和 MDH 的活性均随着 TTO 处理浓度的增加而降低。由上可见，在 TTO 处理下，线粒体内 TCA 循环和线粒体功能相关的几个重要酶的活性均被强烈抑制，TCA 循环和线粒体功能受到严重干扰，导致细胞无法正常代谢，菌体活性降低或丧失。说明 TTO 处理可破坏 *P. expansum* 线粒体相关代谢途径，有效抑菌。

同时，线粒体呼吸链是内生 ROS 的主要来源，尤其是在线粒体受到破坏后^[20]。ROS 对于细胞维持其活性有很重要的作用，比如导致酶的失活，膜的破坏和细胞的死亡^[37]。ROS 的积累也被认为是细胞凋亡的主要生物标记，与之而来的还有形态学的改变，细胞核的断裂，染色质的凝集，细胞肿胀和磷脂酰丝氨酸的具体化^[38]。莳萝油的处理会导致黄曲霉 ROS 的积累和氧化损伤^[20]。硼酸盐的处理也会使盘长孢状刺盘孢子内部 ROS 积累，导致线粒体的损伤^[39]。Wu^[34]等报道称羽苔素 E 可以导致白色念珠菌线粒体的超级化和内部 ROS 的产生。Zheng^[25]等研究发现柠檬醛处理导致一个和多个电子传递链组分的显著缺乏，损伤青霉的抗氧化系统和增加细胞内部的氧化压力。我们的研究结果表明 TTO 处理可以诱导 *P. expansum* 体内 ROS 的产生和积累，这也跟线粒体的功能紊乱对细胞的氧化损伤有关。

4. 结论

TTO 处理导致了 *P. expansum* 孢子体内 ROS 的大量积累，损坏了菌丝线粒体形态和超微结构，造成了菌丝体内 ATP 流失、降低了菌丝体内线粒体功能相关酶类的活性。因此，我们认为线粒体功能的严重受损是 TTO 对 *P. expansum* 发挥抑制的重要原因。

参考文献：

- [1] BHASKARA REDDY M. V., BELKACEMI KHALED, CORCUFF RONAN, et al. Effect of pre-harvest chitosan sprays on post-harvest infection by *Botrytis cinerea* and quality of strawberry fruit[J]. Postharvest Biology and Technology, 2000,20(1): 39-51. DOI: 10.1016/S0925-5214(00)00108-3.
- [2] YU TING, YU CHEN, LU HUANGPING, et al. Effect of *Cryptococcus laurentii* and calcium chloride on control of *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* infections in pear fruit[J]. Biological Control, 2012,61(2):169-175. DOI: 10.1016/j.bio-

- control.2012.01.012.
- [3] 陈倩茹.植物精油对樱桃番茄主要病原菌抑制效果的研究[D].浙江:浙江大学,2014:51-52.
- [4] 李殿鑫,江琳琳,朱娜,等.植物精油在食品保鲜中的研究进展[J].食品工业科技,2012,33(12):396-400. DOI: CNKI:11-1759/TS.20111230.1118.011.
- [5] FENG WU, ZHENG XIAODONG. Essential oils to control *Alternaria alternata* in vitro and in vivo[J]. Food Control, 2007,18(9):1126-1130. DOI: 10.1016/j.foodcont.2006.05.017.
- [6] 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,2012,28(10):1281-1284. DOI: CNKI:SUN:GZSP.0.2012-10-004.
- [7] 王丹,张静,贾晓曼,等.蓝莓采后主要病原菌的分离鉴定及肉桂精油抑菌效果[J].食品科学,2019,40(24):167-172. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20181029-338.
- [8] SWORDS GREG, HUNTER G. L. K. Composition of Australian tea tree oil (*Melaleuca alternifolia*) [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1978,26(3):734-737.DOI: 10.1021/jf60217a031
- [9] CARSON C. F., HAMMER K. A., RILEY T. V. *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil: a review of Antimicrobial and Other Medicinal Properties[J]. Clinical Microbiology Reviews, 2006,19(1):50-62. DOI: 10.1128/CMR.19.1.50-62.2006.
- [10] SHI CE, ZHAO XINGCHEN, YAN HAIYANG, et al. Effect of tea tree oil on *Staphylococcus aureus* growth and enterotoxin production[J]. Food Control, 2016,62:257-263. DOI: 10.1016/j.foodcont.2015.10.049.
- [11] 静玮,苏子鹏,朱德明,等.茶树油熏蒸处理对香蕉采后炭疽病害的影响[J].农业工程学报,2011,27(05):378-384. DOI: CNKI:SUN:NYGU.0.2011-05-067.
- [12] 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. DOI: 10.3969/j.issn.1002-6819.2009.06.052.
- [13] 程赛,邵兴锋,郭安南,等.茶树油熏蒸对草莓采后病害和品质的影响[J].农业工程学报,2011,27(04):383-388. DOI: CNKI: SUN:NYGU.0.2011-04-069.
- [14] LI YONGHUA, SHAO XINGFENG, XU JIAYU, et al. Effects and possible mechanism of tea tree oil against *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum* in vitro and in vivo test[J]. Canadian Journal of Microbiology, 2017,63(3):219-227. DOI:10.1139/ cjm-2016-0553.
- [15] YU D., WANG J., SHAO X., et al. Antifungal modes of action of tea tree oil and its two characteristic components against *Botrytis cinerea*[J]. Journal of Applied Microbiology, 2015,119(5):1253-1262. DOI: 10.1111/jam.12939.
- [16] ZHENBIAO LI, XINGFENG SHAO, YINGYING WEI, et al. Transcriptome analysis of *Botrytis cinerea* in response to tea tree oil and its two characteristic components [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2020,104:2163-2178
- [17] SHAO X., CHENG S., WANG H., 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. DOI: 10.1111/jam.12193.
- [18] LI YONGHUA, SHAO XINGFENG, XU JIAYU, et al. Tea tree oil exhibits antifungal activity against *Botrytis cinerea* by affecting mitochondria[J]. Food Chemistry, 2017,234:62-67. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.04.172.
- [19] CHENG SAI, SHAO XINGFENG. In vivo antifungal activities of the tea tree oil vapor against *Botrytis cinerea*[C]/International Conference on New Technology of Agricultural Engineering.Zibo,China: Scientific Research Publishing, May 27-29,2011: 949-951.DOI:10.1109/ICAE.2011.5943945
- [20] TIAN JUN, BAN XIAOQUAN, ZENG HONG, et al. The mechanism of antifungal ction of essential oil from dill (*Anethum graveolens L.*) on *Aspergillus flavus*[J]. PLoS ONE, 2012,7(1):e30147. DOI: 10.1371/journal.pone.0030147.
- [21] 罗曼,蒋立科.柠檬醛损伤黄曲霉线粒体生化机理的研究[J].微生物学报,2002(02):226-231. DOI: CNKI:SUN:WSXB.0.2002-02-014.
- [22] JIANG WEIBO, LUO YUNBO, LIU HAI, et al. A Simple and Rapid Determination of ATP, ADP and AMP Concentrations in Pericarp Tissue of Litchi Fruit by High Performance Liquid Chromatography[J]. Food Technology and Biotechnology, 2006,44(4):531-534. DOI: doi:10.1016/j.fmt.2005.11.001.
- [23] OUYANG QIULI, TAO NENGGUO, JING GUOXING. 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). DOI: 10.1186/s12864-016-2943-4.
- [24] TAO NENGGUO, JIA LEI, ZHOU HAIEN. Anti-fungal activity of *Citrus reticulata* Blanco essential oil against *Penicillium italicum* and *Penicillium digitatum*[J]. Food Chemistry, 2014,153:265-271. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.12.070.
- [25] ZHENG SHIJU, JING GUOXING, WANG XIAO, et al. Citral exerts its antifungal activity against *Penicillium digitatum* by affecting the mitochondrial morphology and function[J]. Food Chemistry, 2015,178:76-81. DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.01.077.
- [26] MCBRIDE HEIDI M., NEUSPIEL MARGARET, WASIAK SYLWIA. Mitochondria: More Than Just a Powerhouse[J]. Current Biology, 2006,16(14):R551-R560. DOI: 10.1016/j.cub.2006.06.054.
- [27] FERNIE ALISDAIR R., CARRARI FERNANDO, SWEETLOVE LEE J. Respiratory metabolism: glycolysis, the TCA cycle and mitochondrial electron transport[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2004,7(3):254-261. DOI: 10.1016/j.pbi.2004.03.007.
- [28] ZOU LAN, HU YUE-YING, CHEN WEN-XUE. Antibacterial mechanism and activities of black pepper chloroform extract[J]. Journal of Food Science and Technology, 2015,52(12):8196-8203. DOI: 10.1007/s13197-015-1914-0.
- [29] LIAO CHENG HENG, YAO LI LI, YE BANG CE. Three genes encoding citrate synthases in *Saccharopolyspora erythraea* are regulated by the global nutrient - sensing regulators GlnR,DasR, and CRP[J]. Molecular Microbiology, 2014,94(5):1065-1084. DOI: 10.1111/mmi.12818.
- [30] GARNAK M., REEVES H. C. Phosphorylation of Isocitrate dehydrogenase of *Escherichia coli*[J]. Science, 1979,203(4385):1111-1112. DOI: 10.1126/science.34215.
- [31] HUANG HSUEH-MEEI, ZHANG HUI, XU HUI, et al. Inhibition of the α -ketoglutarate dehydrogenase complex alters mitochondrial function and cellular calcium regulation[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease, 2003,1637(1):119-126. DOI: 10.1016/S0925-4439(02)00222-3.
- [32] YAO YU-XIN, LI MING, ZHAI HENG, et al. Isolation and characterization of an apple cytosolic malate dehydrogenase gene reveal its function in malate synthesis[J]. Journal of Plant Physiology, 2011,168(5):474-480. DOI: 10.1016/j.jplph.2010.08.008.
- [33] KOBAYASHI D., KONDO K., UEHARA N., et al. Endogenous Reactive Oxygen Species Is an Important Mediator of Miconazole Antifungal Effect[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2002,46(10):3113-3117. DOI: 10.1128/AAC.46.10.3113-3117.2002.
- [34] WU XIU-ZHEN, CHENG AI-XIA, SUN LING-MEI, et al. Plagiochin E, an antifungal bis(bibenzyl), exerts its antifungal activity through mitochondrial dysfunction-induced reactive oxygen species accumulation in *Candida albicans*[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, 2009,1790(8):770-777. DOI: 10.1016/j.bbagen.2009.05.002.
- [35] YARU LI YING NIE LINYAN ZHOU. The possible mechanism of antifungal activity of cinnamon oil against *Rhizopus nigricans* [J]. Journal of Chemical and Pharmaceutical Research, 2014,6(5):12-20
- [36] YANG SHUZHEN, LIU LIMEI, LI DONGMEI, et al. Use of active extracts of poplar buds against *Penicillium italicum* and possible modes of action[J]. Food Chemistry, 2016,196:610-618. DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.09.101.
- [37] KING A., SELAK M. A., GOTTLIEB E. Succinate dehydrogenase and fumarate hydratase: linking mitochondrial dysfunction and cancer[J]. Oncogene, 2006,25(34):4675-4682. DOI: 10.1038/sj.onc.1209594.
- [38] POZNIAKOVSKY ANDREI I., KNORRE DMITRY A., MARKOVA OLGA V., et al. Role of mitochondria in the pheromone- and amiodarone-induced programmed death of yeast[J]. The Journal of Cell Biology, 2005,168(2):257-269. DOI: 10.1083/jcb.200408145.
- [39] SHI XUEQUN, LI BOQIANG, QIN GUOZHENG, et al. Mechanism of antifungal action of borate against *Colletotrichum gloeosporioides* related to mitochondrial degradation in spores[J]. Postharvest Biology and Technology, 2012,67:138-143. DOI: 10.1016/j.postharvbio.2012.01.003.