

# 反式-2-己烯醛对梨果黑斑病菌 *Alternaria alternata* 的抑菌作用及其机理

董玉鹏, 孙萍, 李永才\*, 毕阳, 张苗, 黄怡, 张婷婷  
(甘肃农业大学食品科学与工程学院, 甘肃 兰州 730070)

**摘要:** 本实验以梨果黑斑病菌 *Alternaria alternata* 为研究对象, 采用滤纸片扩散法研究植物源挥发性物质反式-2-己烯醛对 *A. alternata* 生长的抑制作用和对黑斑病的控制作用, 通过检测膜完整性进一步探讨其抑菌作用的机理。结果表明: 反式-2-己烯醛能显著抑制 *A. alternata* 的孢子萌发和菌丝生长, 且其抑制作用存在剂量效应, 其中 2.0  $\mu\text{L}/\text{mL}$  处理后 *A. alternata* 的孢子萌发率和菌落直径仅为对照的 13.9% 和 36.67%, 同时反式-2-己烯醛熏蒸处理能有效控制梨果黑斑病的扩展。进一步研究表明反式-2-己烯醛处理严重破坏了 *A. alternata* 细胞膜完整性, 膜电导率和核酸渗出率显著增加 ( $P < 0.05$ )。此外, 反式-2-己烯醛均不同程度上降低了 *A. alternata* 交链格孢酚单甲醚、链格孢酚、交链格烯和赭毒素 4 种毒素的产生量。上述结果表明反式-2-己烯醛能够通过破坏 *A. alternata* 细胞膜完整性和抑制其毒素的产生而降低 *A. alternata* 生长和致病性。

**关键词:** 梨黑斑病; *Alternaria alternata*; 反式-2-己烯醛; 抑菌活性; 细胞膜; 真菌毒素

Inhibitory Effect and Mechanism of *trans*-2-Hexenal against Inoculated *Alternaria alternata* on Pear Fruit

DONG Yupeng, SUN Ping, LI Yongcai\*, BI Yang, ZHANG Miao, HUANG Yi, ZHANG Tingting  
(College of Food Science and Engineering, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China)

**Abstract:** The inhibitory effects of *trans*-2-hexenal, a plant-derived volatile substance, on the growth of *Alternaria alternata* and black spot development in pear fruit inoculated with this fungal pathogen were studied, and its underlying mechanism was also evaluated by examining cell membrane integrity. Results showed that *trans*-2-hexenal significantly inhibited the spore germination and mycelium growth of *A. alternata* in a concentration-dependent manner. The spore germination rate and colony diameter of *A. alternata* after treatment with 2.0  $\mu\text{L}/\text{mL}$  were only 13.9% and 36.67% when compared with the control. At the same time, *trans*-2-hexenal fumigation treatment effectively reduced the development of pear black spot. Further research showed that the *trans*-2-hexenal treatment severely destroyed *A. alternata* cell integrity and significantly increased membrane conductivity and nucleic acid leakage rate ( $P < 0.05$ ). Additionally, *trans*-2-hexenal treatment reduced the production of four mycotoxins in *A. alternata* including monomethyl ether, alternariol, altenuene and tentoxin to different extents. These findings suggested that the *trans*-2-hexenal might effectively reduce the growth and pathogenicity of *A. alternata* through damaging cell membrane integrity and decreasing mycotoxin production.

**Keywords:** pear black spot; *Alternaria alternata*; *trans*-2-hexenal; antifungal activity; cell membrane; mycotoxin

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20190326-328

中图分类号: TS255.36

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2020) 07-0191-07

引文格式:

董玉鹏, 孙萍, 李永才, 等. 反式-2-己烯醛对梨果黑斑病菌 *Alternaria alternata* 的抑菌作用及其机理[J]. 食品科学, 2020, 41(7): 191-197. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20190326-328. <http://www.spkx.net.cn>

DONG Yupeng, SUN Ping, LI Yongcai, et al. Inhibitory effect and mechanism of *trans*-2-hexenal against inoculated *Alternaria alternata* on pear fruit[J]. Food Science, 2020, 41(7): 191-197. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20190326-328. <http://www.spkx.net.cn>

收稿日期: 2019-03-26

基金项目: “十三五”国家重点研发计划重点专项 (2018YFD0401302)

第一作者简介: 董玉鹏 (1994—) (ORCID: 0000-0002-7835-6723), 男, 硕士研究生, 研究方向为采后生物技术。

E-mail: 1138533852@qq.com

\*通信作者简介: 李永才 (1972—) (ORCID: 0000-0002-5878-0383), 男, 教授, 博士, 研究方向为采后果蔬贮藏病害控制。

E-mail: lyc@gsau.edu.cn

早酥梨 (*Pyrus bretschneideri* cv. Zaosu) 是中国西北地区主栽的梨品种, 其果大核小、果皮翠绿, 质细酥脆、汁多味甜, 深受消费者青睐<sup>[1]</sup>。然而早酥梨通常采收于夏季高温时节, 快速的品质劣变及腐败致使采后果实损失严重, 制约了早酥梨产业的健康发展<sup>[2]</sup>。其中由互隔交链孢 (*Alternaria alternata*) 引起的黑斑病是早酥梨采后主要的病害之一<sup>[3]</sup>, *A. alternata*能在室温或低温环境下快速生长而使果实腐败变质, 并在生长过程中产生多种真菌毒素, 对人类和动物健康造成潜在安全风险<sup>[4]</sup>。目前主要采用抑霉唑和噻苯达唑<sup>[5]</sup>等化学杀菌剂控制梨果采后病害, 但长期使用化学杀菌剂会导致病原菌产生抗药性和环境污染, 并危害人体健康<sup>[6]</sup>。因此, 寻求和开发更加安全、高效的植物源杀菌剂来防治*A. alternata*引起的早酥梨黑斑病迫在眉睫<sup>[7]</sup>。

绿叶挥发物是植物不饱和脂肪酸经过催化而形成的一类含有6个碳的小分子醛、醇和酯类化合物<sup>[8]</sup>。其主要参与植物特殊气味形成, 在植物直接和间接防御应答中发挥重要作用<sup>[9]</sup>, 其中很多挥发物具有抑菌、杀菌作用。孟雪等<sup>[10]</sup>发现, 绿萝和常春藤的3种主要挥发物 $\alpha$ -蒎烯、蒎烯和桉树脑对枝孢霉 (*Cladosporium* sp.)、链格孢 (*Alternaria* sp.)、附球菌 (*Epicoccum* sp.)、青霉 (*Penicillium* sp.) 和黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 具有较强的抑菌作用。梁海燕等<sup>[11]</sup>研究发现(Z)-3-己烯醛、(Z)-3-己烯醇、(E)-2-己烯-1-醇等7种绿叶挥发物均对黄曲霉的菌丝生长有明显抑制作用; 同时研究发现芳樟醇、柠檬烯、(E)-2-己烯醛等12种挥发物对哈茨木霉 (*Trichoderma harzianum*) 的生长和产孢量均有抑制作用<sup>[12]</sup>。其中反式-2-己烯醛 ( $C_6H_{10}O$ ) 属于绿叶挥发物的一种, 是大多数绿色植物受损伤后都能快速合成并释放的挥发性物质。已有研究表明反式-2-己烯醛能显著抑制黄曲霉菌 (*Aspergillus flavus*)<sup>[13]</sup>和草莓炭疽病菌 (*Colletotrichum acutatum*)<sup>[14]</sup>的菌丝生长。Menniti等<sup>[15]</sup>还发现反式-2-己烯醛对玉米粒储藏期病原菌串珠镰刀菌 (*Fusarium verticillioides*) 有显著的抑制作用。目前有关反式-2-己烯醛对梨果黑斑病菌 (*A. alternata*) 的抑菌作用及其机理鲜见报道。因此本实验以梨果黑斑病菌 *A. alternata* 为对象, 研究植物源挥发性物质反式-2-己烯醛对 *A. alternata* 生长的抑制和对黑斑病的控制作用, 并进一步探讨其抑菌作用的机理, 以期反式-2-己烯醛作为天然防腐杀菌剂在果蔬采后病害控制中的应用提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株、材料与试剂

供试链格孢 *Alternaria alternata* 分离于贮藏中自然发

病的梨果实, 纯化、鉴定后用马铃薯葡萄糖琼脂 (potato dextrose agar, PDA) 培养基保存待用。

供试早酥梨采摘于甘肃省景泰县条山农场, 挑选大小一致、无机械损伤、无病虫害的果实, 纸箱包装后运达实验室, 冷库低温贮藏待用。

反式-2-己烯醛 (纯度 $\geq 98\%$ ) 上海麦克林生化科技有限公司; 毒素标准品 上海源叶生物科技有限公司; 氯化钠、硫酸镁和乙醇等试剂均为国产分析纯。

### 1.2 仪器与设备

LDZX-30KBS立式压力蒸汽灭菌锅 上海申安医疗器械厂; SW-CJ-2FD超净工作台 苏州安泰空气技术有限公司; DHP-9272B型恒温培养箱 上海一恒科技有限公司; CX21FSIC光学显微镜、DDS-370型微型电导仪 日本奥林巴斯工业有限公司; UV2450型紫外分光光度计 日本岛津公司; H-1850R型台式高速冷冻离心机 长沙湘仪离心机有限公司; AWL-1002-M超纯水仪 美国艾科浦国际有限公司; U-LH100-3型荧光显微镜 上海永科光学仪器公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 *A. alternata* 孢子悬浮液的配制

参照高春丽等<sup>[16]</sup>的方法并略作修改, 向在无菌操作条件下向培养5 d的*A. alternata*培养皿中倒入少量无菌水, 并加入少量质量分数0.01% Tween-80, 用灭菌的涂布器轻刮, 将所得溶液通过4层纱布过滤到灭菌三角瓶中, 用无菌水稀释, 在混合器上振荡15 s, 用血球计数板计数, 配制成 $1 \times 10^6$ 个/mL孢子悬浮液。

#### 1.3.2 *A. alternata* 生长及致病性分析

##### 1.3.2.1 *A. alternata* 孢子萌发率的测定

采用纸片扩散法测定*A. alternata*孢子萌发率, 无菌条件下, 用打孔器制取直径为9 mm的质量分数2%琼脂培养基, 置于灭过菌的载玻片上, 滴加上述孢子悬浮液20  $\mu$ L, 再用无菌镊子取一滤纸片 (直径15 mm) 置于皿盖中央, 在滤纸片上加入0.5、1.0、1.5  $\mu$ L/mL和2.0  $\mu$ L/mL的反式-2-己烯醛溶液各20  $\mu$ L, 以无菌水作对照, 于27  $^{\circ}$ C孵育, 6 h后镜检观察孢子萌发情况。每次镜检100个真菌孢子, 每次实验重复3次。孢子萌发率计算如下式所示。

$$\text{孢子萌发率}/\% = \frac{\text{萌发孢子数}}{\text{孢子总数}} \times 100$$

##### 1.3.2.2 *A. alternata* 菌丝生长情况分析

采用滤纸片扩散法测定菌落直径, 使用直径为90 mm的培养皿培养, 每皿加入PDA培养基20 mL, 待培养基凝固后, 分别接种27  $^{\circ}$ C下培养7 d的直径为8 mm的菌饼, 再用无菌镊子取一滤纸片 (直径15 mm) 置于皿盖中央, 在滤纸片上加入0.5、1、1.5  $\mu$ L/mL和2  $\mu$ L/mL的反式-2-己烯醛溶液各20  $\mu$ L, 以无菌水作对照, 然后

27 °C条件下恒温培养5 d, 采用十字交叉法测量菌落直径。每个处理重复3次。

### 1.3.2.3 早酥梨果实黑斑病病斑直径的测定

参照Moscoso-Ramírez<sup>[17]</sup>和张智毅<sup>[18]</sup>的方法略作修改, 选择贮藏于5~10 °C下的外观整齐、无病虫害的早酥梨, 先用自来水冲洗后, 再用体积分数2%的次氯酸钠溶液浸泡3 min进行表面消毒, 然后再用无菌水冲洗后在实验台上自然晾干, 随后再用体积分数75%乙醇溶液进行表面消毒, 最后用高压灭菌的打孔器(直径3 mm)在果实赤道部位均匀打出3 mm×3 mm的伤口3个, 1 h后用移液枪接种25 μL孢子悬浮液, 室温下晾干, 2 h后放于塑料托盘中, 快速放入盛有0.5、1、1.5 μL/mL和2 μL/mL反式-2-己烯醛溶液烧杯的塑料密封盒(38 cm×25 cm×14 cm)内, 立即密封, 熏蒸12 h。无菌水作对照, 熏蒸结束后用市售聚乙烯保鲜袋(40 cm×25 cm, 厚度0.02 mm)包装, 在室温((26±2) °C)下进行贮藏, 每隔1 d观察并测定病斑直径。每个处理用果实10个, 重复3次。

### 1.3.3 *A. alternata*细胞膜完整性分析

#### 1.3.3.1 *A. alternata*细胞膜完整率测定

向1.3.1节中得到的孢子悬浮液(1×10<sup>6</sup>个/mL)中分别加入等量的剂量为1、2 μL/mL的反式-2-己烯醛溶液, 以无菌水作为对照, 混合均匀, (26±2) °C避光静置30 min后, 用0.5 mL磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)(pH 7.0)冲洗后, 离心后所得孢子沉淀再重悬于含有20 ng/mL碘化丙啶(propidium iodide, PI)的PBS(pH 7.0)中, 在U-LH100-3型荧光显微镜下(激发波长为620 nm)观察拍照。每次实验重复3次。

#### 1.3.3.2 *A. alternata*细胞膜电导率测定

采用微型电导仪测定反式-2-己烯醛对*A. alternata*电导率的影响。将*A. alternata*接种于PDA培养基中, 27 °C培养4 d后, 取菌丝体3 g在PBS(pH 7.0)中混和均匀。加入剂量为1、2 μL/mL反式-2-己烯醛溶液中分别处理0、30、60、120、150、180 min后, 测定其细胞膜电导率, 用PBS(pH 7.0)作对照。每个处理重复3次。

#### 1.3.3.3 *A. alternata*核酸渗漏量测定

参照Paul等<sup>[19]</sup>的方法略作修改, *A. alternata*培养及处理方法同1.3.3.2节, 加入剂量为1、2 μL/mL反式-2-己烯醛溶液中分别处理1、2、3、4、5 h取样, 12 000 r/min离心2 min收集上清液, 在260 nm波长处测定吸光度, 对照组用PBS(pH 7.0)进行校正。每个处理重复3次。

### 1.3.4 *A. alternata*毒素提取与分析

#### 1.3.4.1 *A. alternata*毒素标准溶液的配制

标准贮备液: 用甲醇准确定容1 mg标准品至1 mL, 配成1 mg/mL的标准贮备液, 密封冷冻储存于-20 °C冰箱。

标准工作液: 分别配制10、20、50、100、200 μg/mL和1 000 μg/mL的交链格孢单甲醚(alternariol monomethyl ether, AME)、链格孢酚(alternariol, AOH)的标准溶液, 5、50、100、200、500 μg/mL和1 000 μg/mL的交链格烯(altenuene, ALT)和腾毒素(tentoxin, TEN)的混合标准溶液, 密封保存于-20 °C冰箱。

#### 1.3.4.2 真菌毒素的提取与测定

准确称取用2 μL/mL反式-2-己烯醛处理后培养4 d的*A. alternata*菌丝0.50 g(精确至0.01 g), 冰浴研磨均匀, 置于10 mL无菌离心管中, 加入2.5 mL含体积分数0.3%甲酸的乙腈-水(80:20, V/V)的提取液, 漩涡混匀, 150 r/min常温提取30 min, 再加入0.25 g无水MgSO<sub>4</sub>和0.04 g NaCl, 剧烈振荡1 min后, 以10 000 r/min离心10 min, 取上清液过0.22 μm有机滤膜, 准确定容至1.2 mL, 采用高效液相色谱-串联质谱测定。

色谱条件: 色谱柱为C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 柱温为35 °C; 进样量为5 μL; 流动相A为去离子水, 流动相B为甲醇; 梯度洗脱条件为70% A保持1 min后, 2 min内降至50%后在1 min内继续降至10%, 保持2 min, 之后在0.1 min内升至90%, 保持2 min; 流速0.3 mL/min; 总运行时间7.1 min。

质谱条件: 离子源模式: 正离子模式, 电喷雾离子源(ESI<sup>+</sup>); 质谱扫描方式: 多重反应监测; 鞘气温度: 350 °C; 雾化器压力: 35 psi; 鞘气流量: 11.0 L/min; 毛细管电压: 4 000 V, 其他参数通过仪器调至最优。

4种链格孢霉毒素的监测离子、锥孔电压和碰撞电压等质谱参数如表1所示。

表1 4种真菌毒素的串联质谱检测参数  
Table 1 Optimized tandem mass parameters for 4 mycotoxins

成分	电离模式	母离子(m/z)	定性离子(m/z)	保留时间/min	定量离子(m/z)	锥孔电压/V	碰撞电压/V
AOH	ESI <sup>+</sup>	257.0	213.0	2.37	147.2	40	32
AME	ESI <sup>+</sup>	271.0	256.0	2.85	228.0	32	20
ALT	ESI <sup>+</sup>	293.1	257.2	3.33	239.1	85	15
TEN	ESI <sup>+</sup>	415.2	312.3	3.66	189.0	110	30

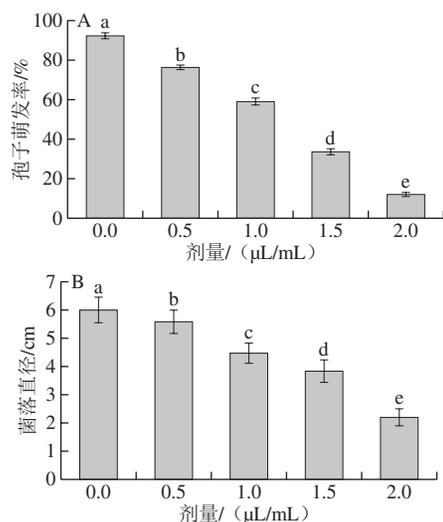
### 1.4 数据处理与分析

所有实验数据采用Microsoft Excel 2007软件计算标准偏差, 并用Origin 8.0软件作图, 用SPSS 20.0软件对得到的数据进行方差分析, 采用Duncan's多重差异显著分析, 以P<0.05表示差异显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 反式-2-己烯醛处理对*A. alternata*生长及致病性的影响

#### 2.1.1 反式-2-己烯醛处理对*A. alternata*孢子萌发和菌丝生长的影响



小写字母不同代表差异显著 ( $P < 0.05$ )。图2、6同。

图1 反式-2-己烯醛处理对*A. alternata*孢子萌发 (6 h) (A) 和菌丝生长 (5 d) (B) 的影响

Fig. 1 Effect of *trans*-2-hexenal treatment on spore germination (6 h) (A) and mycelial growth (5 d) (B) of *A. alternata*

从图1A可知, 反式-2-己烯醛处理显著抑制了*A. alternata*孢子的萌发 ( $P < 0.05$ ), 且其抑制效果随处理剂量的增加而增强, 当处理剂量为2 μL/mL时, 孢子的萌发率仅为对照的13.90%。同时反式-2-己烯醛熏蒸处理也显著地抑制了*A. alternata*菌丝生长 ( $P < 0.05$ ), 且其抑制作用也存在显著的剂量依赖性, 当剂量为2 μL/mL时, 其菌落直径仅为对照组的36.67% (图1B)。

#### 2.1.2 反式-2-己烯醛处理对损伤接种早酥梨黑斑病扩展的影响

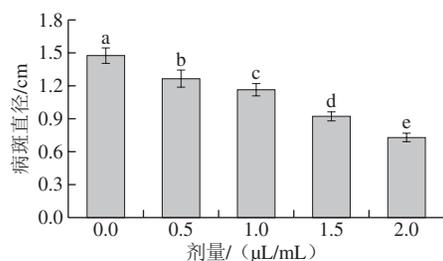


图2 反式-2-己烯醛处理对早酥梨黑斑病扩展的影响 (26 ± 2) °C、7 d)

Fig. 2 Effect of *trans*-2-hexenal treatment on lesion diameter of black spot in pear fruit (after storage at 26 ± 2) °C for 7 d)

反式-2-己烯醛熏蒸处理显著抑制了损伤接种*A. alternata*早酥梨果实黑斑病的扩展 (图2), 且

病斑直径与反式-2-己烯醛的处理剂量呈显著负相关 ( $P < 0.05$ ), 贮藏7 d时, 2 μL/mL反式-2-己烯醛处理组果实病斑直径仅为对照组的50%。

### 2.2 反式-2-己烯醛处理对*A. alternata*细胞膜完整性的影响

#### 2.2.1 反式-2-己烯醛处理后PI染色检测细胞膜完整率

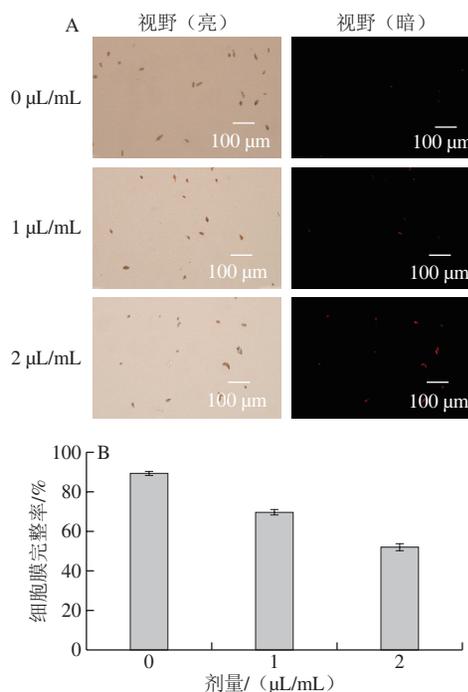
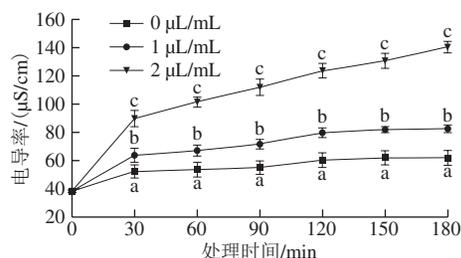


图3 反式-2-己烯醛处理后PI染色检测细胞膜完整率 (A) 和PI染色细胞比例 (B)

Fig. 3 Examination of cell membrane integrity after *trans*-2-hexenal treatment by propidium iodide (PI) staining (A) and PI staining percentage (B)

PI染色结果表明, 对照组*A. alternata*的荧光强度极其微弱, 而反式-2-己烯醛处理的*A. alternata*荧光强度随处理剂量的增加明显增强 (图3A), 表明*A. alternata*的细胞膜遭到了严重的破坏。进一步统计分析表明, 对照组的细胞膜完整率为89.33%, 1 μL/mL反式-2-己烯醛处理的*A. alternata*细胞膜完整率较对照下降20%, 当反式-2-己烯醛剂量达到2 μL/mL时, 细胞膜的完整率仅为52% (图3B)。

#### 2.2.2 反式-2-己烯醛处理对*A. alternata*电导率的影响



相同处理时间不同处理组小写字母不同表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。图5同。

图4 反式-2-己烯醛处理对*A. alternata*细胞膜电导率的影响

Fig. 4 Effect of the *trans*-2-hexenal on treatment on cell membrane electrical conductivity of *A. alternata*

*A. alternata*对照组的菌丝体电导率随处理时间的延长稍有增大, 120 min后基本保持不变, 而反式-2-己烯醛处理的*A. alternata*菌丝体电导率显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ), 且随处理时间延长和处理剂量的增加而逐渐增大(图4), 其中2  $\mu\text{L/mL}$ 反式-2-己烯醛处理的*A. alternata*菌丝体的电导率在处理后的180 min时高达对照组的2.31倍。

### 2.2.3 反式-2-己烯醛处理对*A. alternata*核酸渗漏的影响

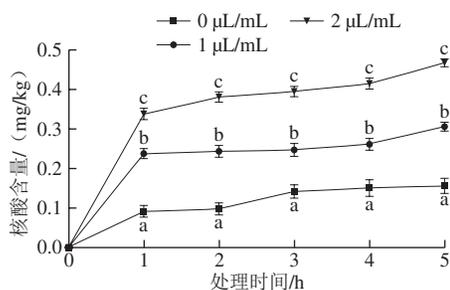
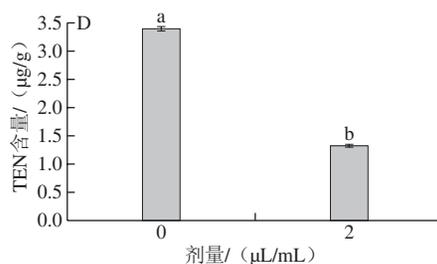
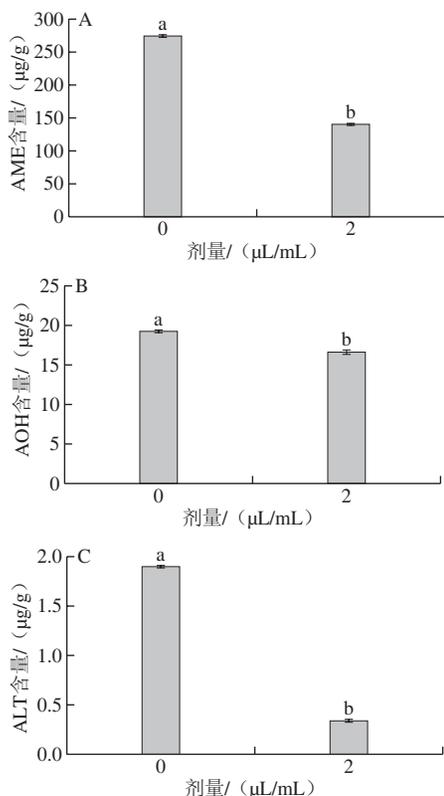


图5 反式-2-己烯醛处理对*A. alternata*核酸渗漏的影响

Fig. 5 Effect of the *trans*-2-hexenal treatment on leakage of nuclear acid from *A. alternata*

反式-2-己烯醛处理加速了*A. alternata*核酸外渗(图5), 且随着反式-2-己烯醛处理剂量的增加, 培养液中核酸含量显著提高 ( $P < 0.05$ )。处理后5 h时, 2  $\mu\text{L/mL}$ 反式-2-己烯醛处理*A. alternata*后培养液中核酸含量为对照组的2.98倍。

### 2.4 反式-2-己烯醛处理对*A. alternata*毒素产生的影响



A. AME; B. AOH; C. ALT; D. TEN。

图6 反式-2-己烯醛处理对*A. alternata*毒素产生的影响 (4 d)

Fig. 6 Effect of *trans*-2-hexenal treatment on mycotoxin production of *A. alternata* (4 d)

对离体条件下*A. alternata*生长过程中毒素的产生进行分析比较。结果表明, *A. alternata*生长过程中, 菌丝体中会有大量的AME、AOH、ALT和TEN生成, 而反式-2-己烯醛处理显著抑制了*A. alternata*菌丝体中AME、AOH、ALT和TEN 4种主要毒素的产生(图6), 虽然反式-2-己烯醛处理对不同毒素产生的抑制作用存在差异, 但反式-2-己烯醛处理后, *A. alternata*菌丝体中4种毒素产生量均显著低于对照 ( $P < 0.05$ )。其中, 2  $\mu\text{L/mL}$ 反式-2-己烯醛处理后*A. alternata*中AME、AOH、ALT和TEN毒素含量分别为对照的51.09%、86.16%、16.67%和38.85%。

## 3 讨论

已有研究表明, 作为绿叶挥发物的反式-2-己烯醛具有显著的抑菌活性和防腐作用。本研究结果表明: 2  $\mu\text{L/mL}$ 反式-2-己烯醛熏蒸处理能显著抑制*A. alternata*孢子萌发和菌丝生长(图1), 且能够有效控制梨果黑斑病的扩展(图2)。这一结果与赵璐玲等<sup>[20]</sup>在玉米黄曲霉控制中的研究相似, 其发现0.05  $\mu\text{L/mL}$ 反式-2-己烯醛熏蒸12 h能完全抑制储藏玉米中黄曲霉的生长, 而当剂量达到0.1  $\mu\text{L/mL}$ 时, 反式-2-己烯醛对猕猴桃贮藏过程中扩展青霉(*Penicillium expansum*)菌丝生长具有显著的抑制作用<sup>[21]</sup>。另外Archbold等<sup>[22]</sup>研究发现用1.71 mmol/L的反式-2-己烯醛熏蒸处理可以降低无籽葡萄贮藏期间霉菌的发生率。可见反式-2-己烯醛具有广谱的抗菌活性, 但不同病原菌及寄主对反式-2-己烯醛的敏感性存在差异。

完整的细胞膜是菌体正常生长代谢的结构基础<sup>[23]</sup>, 大多数抑菌活性物质通过影响细胞膜完整性而发挥作用。已有研究发现1.08 mg/mL的柠檬醛使阪崎肠杆菌细胞膜完整率较对照降低15%<sup>[24]</sup>; 0.25 mg/mL的茴香精油能够破坏志贺氏菌细胞膜完整性<sup>[25]</sup>。本实验发现2  $\mu\text{L/mL}$ 的反式-2-己烯醛处理严重地破坏了*A. alternata*细胞膜完整性(图3)。病原物细胞膜被破坏后, 细胞膜流动性丧失, 细胞内电解质泄漏<sup>[26]</sup>, 致使溶液中的电导

率升高,并伴随一些重要细胞内含物如蛋白质、核酸和糖类物质流出,严重影响菌体的正常生长。本实验进一步研究发现反式-2-己烯醛处理显著提高了*A. alternata*膜电导率(图4)和核酸渗出率(图5)。同样地,陶能国等<sup>[27]</sup>发现柠檬醛+辛醛混合物能破坏指状青霉的细胞膜完整性,增大细胞膜电导率,导致核酸等细胞内含物泄漏。Li Wusun等<sup>[28]</sup>研究还发现242.5 mg/L的对香豆酸甲酯处理能够引起*A. alternata*细胞间电解质、可溶性蛋白、糖和核苷酸大量渗漏。有研究认为反式-2-己烯醛之所以有较强的抑菌活性,可能因为其结构中的 $\alpha$ -、 $\beta$ -不饱和羰基能与病原菌细胞膜上的亲电基团(如巯基或氨基)发生加合反应,形成加合物,而使病原菌“失活”<sup>[29]</sup>。还有研究发现反式-2-己烯醛是通过抑制己糖或氨基己糖等真菌细胞壁特有成分的生物合成路径而破坏细胞壁达到抑菌作用<sup>[30]</sup>。关于反式-2-己烯醛的作用靶点及具体抑菌机理,尚需进一步研究。

*A. alternata*作为果蔬采后主要致病病原物,其不仅能导致果蔬腐烂,而且侵染过程中还会产生多种链格孢毒素,部分毒素污染后会造成人和动物急性或慢性中毒,甚至具有致畸、致癌、致突变作用;因此,抑制真菌毒素产生或加速其降解对保障果蔬安全具有十分重要的意义<sup>[31-32]</sup>。本研究发现绿叶挥发物质反式-2-己烯醛处理,能有效地抑制*A. alternata* 4种真菌毒素的合成,且抑制作用因毒素种类而不同(图6)。Yun等<sup>[33]</sup>报道肉桂醛可以使肉汤培养中黄曲霉毒素的产量降低60%,同样有大量研究表明精油中的挥发性化合物能抑制真菌毒素的合成<sup>[34-35]</sup>。但Xu Lingchun等<sup>[36]</sup>还发现0.2  $\mu$ L/mL的肉桂醛处理对*A. alternata* AOH和AME毒素具有体内降解作用。但有关反式-2-己烯醛对*A. alternata*毒素合成的调控机理仍需进一步研究阐明。

#### 4 结 论

绿叶挥发物质反式-2-己烯醛能够显著抑制*A. alternata*孢子萌发和菌丝生长,并有效控制梨果黑斑病的扩展,且其作用效果存在剂量依赖性。反式-2-己烯醛处理严重地破坏了*A. alternata*细胞膜完整性,增加了细胞膜透性,导致核酸外渗。反式-2-己烯醛处理能显著抑制*A. alternata* AME、AOH、ALT和TEN 4种毒素的合成。

#### 参考文献:

- [1] LI Y C, YIN Y, BI Y, et al. Effect of riboflavin on postharvest disease of Asia pear and the possible mechanisms involved[J]. *Phytoparasitica*, 2012, 40: 261-268. DOI:10.1007/s12600-011-0216-y.
- [2] ZHANG H X, BI Y, LI Y C, et al. Effect of 1-MCP on postharvest yellowing and quality of Asia pear (*Pyrus bretschneideri* Rehd. 'Early crisp') during ambient storage[C]// X International Controlled & Modified Atmosphere Research Conference, Turkey, 2010. DOI:10.17660/ActaHortic.2010.876.32.
- [3] 刁春英, 毕阳, 李永才. 壳聚糖对互隔交链孢菌(*Alternaria alternata*)的离体抑制作用[J]. 中国农学通报, 2010, 26(10): 91-94.
- [4] ANDERSEN B, NIELSEN K F, PINTO V F, et al. Characterization of *Alternaria* strains from Argentinean blueberry, tomato, walnut and wheat[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2015, 196: 1-10. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2014.11.02.
- [5] SOYLU E M, KOSE F. Antifungal activities of essential oils against citrus black rot disease agent *Alternaria alternata*[J]. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 2015, 18: 894-903. DOI:10.1080/0972060X.2014.895158.
- [6] MARI A, GATTO, IPPOLITO A, et al. Activity of extracts from wild edible herbs against postharvest fungal diseases of fruit and vegetables[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2011, 61(1): 72-82. DOI:10.1016/j.postharvbio.2011.02.005.
- [7] 周梦娇, 万春鹏, 陈金印. 植物提取物对柑橘采后病害抑制及保鲜效果的研究进展[J]. 北方园艺, 2014(2): 186-190.
- [8] 陈书霞, 陈巧, 王聪颖, 等. 绿叶挥发物代谢调控及分子机理研究进展[J]. 中国农业科学, 2012, 45(8): 1545-1557. DOI:10.3864/j.issn.0578-1752.2012.08.010.
- [9] UL HASSAN M N, ZAINAL Z, ISMAIL I. Green leaf volatiles: biosynthesis, biological functions and their applications in biotechnology[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2015, 13(6): 727-739. DOI:10.1111/pbi.12368.
- [10] 孟雪, 王志英, 吕慧. 绿萝和常春藤主要挥发性成分及其对5种真菌的抑制活性[J]. 园艺学报, 2010, 37(6): 971-976. DOI:10.16420/j.issn.0513-353x.2010.06.017.
- [11] 梁海燕, 王国昌, 郎剑锋, 等. 7种绿叶挥发物对黄曲霉的抑菌作用[J]. 环境与健康杂志, 2012, 29(1): 59-61. DOI:10.16241/j.cnki.1001-5914.2012.01.031.
- [12] 梁海燕, 秦雪峰, 吴卫东. 12种植物挥发物对哈茨木霉的抑制效应[J]. 西北农业学报, 2015, 24(8): 165-169. DOI:10.7606/j.issn.1004-1389.2015.08.025.
- [13] BOUÉS M, SHIH B Y, CARTER-WIENTJES C H, et al. Effect of soybean lipoxygenase on volatile generation and inhibition of *Aspergillus flavus* mycelial growth[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, 53(12): 4778-4783. DOI:10.1021/jf058038o.
- [14] ARROYO F T, MORENO J, DAZA P, et al. Antifungal activity of strawberry fruit volatile compounds against *Colletotrichum acutatum*[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, 55(14): 5701-5707. DOI:10.1021/jf0703957.
- [15] MENNITI A M, GREGORI R, NERI F. Activity of natural compounds on *Fusarium verticillioides* and fumonisin production in stored maize kernels[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2010, 136(3): 304-309. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2009.10.008.
- [16] 高春丽, 李永才, 毕阳, 等. 采后亚硒酸钠处理对杏果黑斑病的控制及贮藏品质的影响[J]. 食品科学, 2016, 37(14): 258-263. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201614047.
- [17] MOSCOSO-RAMÍREZ P A, MONTESINOS-HERRERO C, PALOU L. Characterization of postharvest treatments with sodium methylparaben to control citrus green and blue molds[J]. *Postharvest Biology & Technology*, 2013, 77(2): 128-137. DOI:10.1016/j.postharvbio.2012.10.007.
- [18] 张智毅. 正己醛结合反-2-己烯醛熏蒸鲜切菠萝蜜保鲜技术研究[D]. 海口: 海南大学, 2014: 8-9.
- [19] PAUL S, DUBEY R C, MAHESWARI D K, et al. *Trachyspermum ammi* (L.) fruit essential oil influencing on membrane permeability and surface characteristics in inhibiting food-borne pathogens[J]. *Food Control*, 2011, 22(5): 725-731. DOI:10.1016/j.foodcont.2010.11.003.

- [20] 赵璐玲, 马卫宾, 谢岩黎. 绿叶挥发物反式-2-己烯醛对储藏玉米中黄曲霉生长的抑制作用[J]. 河南工业大学学报(自然科学版), 2018, 39(2): 64-71. DOI:10.3969/j.issn.1673-2383.2018.02.011.
- [21] 段腾飞, 李昭, 岳田利, 等. 反式-2-己烯醛对猕猴桃贮藏过程扩展青霉生长的抑制作用[J]. 农业工程学报, 2019, 35(2): 293-301. DOI:10.11975/j.issn.1002-6819.2019.02.037.
- [22] ARCHBOLD D D, THOMAS R, ANN M, et al. Fumigating 'Crimson seedless' table grapes with (*E*)-2-hexenal reduces mold during long-term postharvest storage[J]. Hortscience, 1999, 34(4): 705-707.
- [23] 王辉, 曾晓房, 冯卫华, 等. 柠檬皮中柠檬苦素对黑曲霉的抑菌特性和机理[J]. 现代食品科技, 2019, 35(1): 97-102; 244. DOI:10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.1.014.
- [24] CHAO S, SONG K, ZHANG X, et al. Antimicrobial activity and possible mechanism of action of citral against *Cronobacter sakazakii*[J]. PLoS ONE, 2016, 11(7): e0159006. DOI:10.1371/journal.pone.0159006.
- [25] DIAO W R, HU Q P, ZHANG H, et al. Chemical composition, antibacterial activity and mechanism of action of essential oil from seeds of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.)[J]. Food Control, 2014, 35(1): 109-116. DOI:10.1016/j.foodcont.2013.06.056.
- [26] 多甜甜, 何静, 陈伟, 等. 马铃薯糖苷生物碱的抑菌活性及其对菌体细胞膜透性的影响[J]. 甘肃农业大学学报, 2017, 52(5): 50-54. DOI:10.13432/j.cnki.jgsau.2017.05.008.
- [27] 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. DOI:10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.6.012.
- [28] LI Wusun, YUAN Shuzhi, LI Qianqian, et al. Methyl *p*-coumarate inhibits black spot rot on jujube fruit through membrane damage and oxidative stress against *Alternaria alternata*[J]. Postharvest Biology and Technology, 2018, 145: 230-238. DOI:10.1016/j.postharvbio.2018.07.016.
- [29] 李素霞. 反式-2-己烯醛对南方根结线虫的作用方式及应用技术研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2014: 6-7.
- [30] 戴向荣. 肉桂油抑制黄曲霉作用研究[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2007: 38-39.
- [31] VENEMA D, DE RIJK T, DE KOK A, et al. Occurrence of *Alternaria alternata* toxins in food products in the Netherlands[J]. Food Control, 2016, 60: 196-204. DOI:10.1016/j.foodcont.2015.07.032.
- [32] SIVAGNANAM K, KOMATSU E, RAMPITSC C, et al. Rapid screening of *Alternaria* mycotoxins using MALDI-TOF mass spectrometry[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2016, 97(1): 357-361. DOI:10.1002/jfsfa.7703.
- [33] YUN C S, MOTOYAM T, OSADA H. Biosynthesis of the mycotoxin tenuazonic acid by a fungal NRPS-PKS hybrid enzyme[J]. Nature Communications, 2015, 6: 8758. DOI:10.1038/ncomms9758.
- [34] KAZEMI M. Effect of *Carum copticum* essential oil on growth and aflatoxin formation by *Aspergillus* strains[J]. Natural Product Research, 2014, 29(11): 1-4. DOI:10.1080/14786419.2014.971796.
- [35] SUN Q, WANG L, LU Z, et al. *In vitro* anti-aflatoxigenic effect and mode of action of cinnamaldehyde against aflatoxin B<sub>1</sub>[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2015, 104: 419-425. DOI:10.1016/j.ibiod.2015.07.009.
- [36] XU Lingchun, TAO Nengguo, YANG Wenhao, et al. Cinnamaldehyde damaged the cell membrane of *Alternaria alternata* and induced the degradation of mycotoxins *in vivo*[J]. Industrial Crops & Products, 2018, 112: 427-433. DOI:10.1016/j.indcrop.2017.12.038.