



## 纳他霉素对芒果采后胶孢炭疽菌的抑菌效果及机理

刘佳怡<sup>1</sup>, 王嘉欣<sup>1</sup>, 宋海超<sup>2</sup>, 张正科<sup>1</sup>, 徐祥彬<sup>1</sup>, 吉训聪<sup>3\*</sup>, 史学群<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>海南大学食品学院, 海口 570228; <sup>2</sup>海南大学热带农林学院, 海口 570228

<sup>3</sup>海南省农业科学研究院植物保护研究所, 海口 571100

**摘要** 以纳他霉素为抑菌剂, 实验测定了离体条件下不同浓度纳他霉素对胶孢炭疽菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)的孢子萌发及菌丝生长的抑制效果, 以及活体损伤接种炭疽病菌后, 纳他霉素对芒果(*Mangifera indica*)果实炭疽病的防治效果。通过测定纳他霉素处理后胶孢炭疽菌的细胞膜相对渗透率、可溶性蛋白含量、细胞膜完整性、孢子内活性氧水平和线粒体分布情况, 初步阐明其抑菌机理。结果表明, 3 mg·L<sup>-1</sup>纳他霉素可显著抑制胶孢炭疽菌孢子萌发、芽管伸长和菌落生长, 80 mg·L<sup>-1</sup>纳他霉素可有效抑制芒果贮存过程中果实炭疽病斑的扩展。纳他霉素处理后胶孢炭疽菌细胞膜相对渗透率和可溶性蛋白含量增加; 2 mg·L<sup>-1</sup>纳他霉素处理8小时, 处理组胶孢炭疽菌孢子细胞膜损伤染色率为33.6%, 对照组染色率为13.9%; 处理组胞内活性氧产生染色率达46.9%, 比对照组高39.7%; 同时观察到纳他霉素使胞内线粒体分布不均且荧光信号微弱。以上结果表明, 纳他霉素可以破坏胶孢炭疽病菌细胞膜, 诱导活性氧大量积累, 并降低线粒体活性, 从而干扰菌体正常生理活性, 使其代谢活动受影响, 从而达到抑菌目的。

**关键词** 纳他霉素, 芒果, 胶孢炭疽病菌, 抑菌机理

刘佳怡, 王嘉欣, 宋海超, 张正科, 徐祥彬, 吉训聪, 史学群 (2019). 纳他霉素对芒果采后胶孢炭疽菌的抑菌效果及机理. 植物学报 54, 455–463.

芒果(*Mangifera indica*)是热带和亚热带地区重要的经济作物, 其口味醇香甘甜, 营养丰富, 深受消费者喜爱(Sivakumar et al., 2011)。但它作为一种呼吸跃变型果实, 后熟期间极易受到各种病原菌的侵染, 引起炭疽病和蒂腐病等采后病害, 使芒果在运输和贮藏期间发生组织腐烂, 造成果实品质下降, 常带来严重的经济损失(Jongsri et al., 2017; Perumal et al., 2017)。胶孢炭疽菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)是引起芒果炭疽病的主要病原菌, 可潜伏侵染果实多个部位, 常在果实成熟期引发症状(Kefialew and Ayalew, 2008)。目前, 我国采后病害的防治主要依赖化学杀菌剂, 如多菌灵、噻苯达唑和苯菌灵, 但化学杀菌剂的大量施用会使病原菌产生耐药性, 减弱杀菌效果(Hu et al., 2014)。随着人们对农药残留、食品安全及环境污染等问题的日渐关注, 开发低毒高效的环保型抑菌剂成为防治采后病害的重要途径。

纳他霉素是纳他链霉菌(*Streptomyces natalensis*)发酵过程中产生的天然多烯大环内酯类物质, 对霉菌和酵母有较强的抑制作用, 被公认为安全有效的食品防腐剂之一(Hondrodimou et al., 2011)。纳他霉素可与真菌细胞膜上的麦角甾醇或其它甾醇类物质结合, 阻遏麦角甾醇的生物合成, 使细胞膜畸变, 从而引起细胞死亡(Aparicio et al., 2016)。纳他霉素具有低毒高效、抑菌谱广、无污染和无抗药性等优点(Arroyo-López et al., 2012), 包括美国在内的许多国家已将纳他霉素纳入食品添加剂目录, 广泛用于肉类、乳制品防腐(Pipek et al., 2010; Mehryar et al., 2017)和果蔬采后保鲜(Fajardo et al., 2010)。在草莓(*Fragaria ananassa*) (呼玉侠等, 2006)、柑橘(*Citrus reticulata*) (孙远功等, 2006)和樱桃(*Prunus avium*) (姜爱丽等, 2009)等水果中添加不同浓度的纳他霉素, 对防止果实采后腐烂、提高贮藏品质有显著效果。研究表明, 纳他霉素可以有效抑制灰葡萄孢(*Botrytis*

收稿日期: 2019-03-08; 接受日期: 2019-05-06

基金项目: 国家重点研发计划(No.2016YFD0400904)

\* 通讯作者。E-mail: 757557113@qq.com; shixuequn@163.com

*cinerea*)、扩展青霉(*Penicillium expansum*)和尖孢炭疽菌(*Colletotrichum acutatum*)的孢子萌发和菌丝生长,从而控制采后病害的发生(郭萌萌等, 2013; Haack et al., 2018; He et al., 2019)。目前,纳他霉素对芒果采后胶孢炭疽菌的抑菌效果和作用机理研究较少。

本研究以纳他霉素为抑菌物质,检测其对胶孢炭疽菌和芒果炭疽病的抑制效果,并对抑菌机理进行初步探索,以期研发出能够代替传统农药的环保型杀菌剂,同时为揭示纳他霉素对胶孢炭疽菌的抑制机理奠定理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

实验所用病原菌胶孢炭疽菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)由本实验室从发病芒果(*Mangifera indica* L.)中分离纯化得到。水溶性纳他霉素(纯度为12.5%, Cat No.20171109N)由浙江新银象生物工程有限公司提供。供试八成熟台农芒果购于海南省昌江县芒果园,采摘当日运回实验室处理。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 纳他霉素抑制孢子萌发率测定

将孢子悬浮液、PDB液体培养基和不同浓度的纳他霉素加入1.5 mL无菌离心管中,使纳他霉素终浓度分别为1、2和3 mg·L<sup>-1</sup>。取100 μL混合液均匀涂于载玻片上,然后置于铺有湿润滤纸的培养皿中,(25±1)°C恒温培养。当孢子芽管长度超过孢子宽度时视作萌发,统计不同时间点各浓度纳他霉素处理后孢子萌发率和芽管伸长量。统计孢子萌发率时,随机观察视野内孢子总数不少于100个。以加入等量无菌水作为对照组,每个处理设2组平行,实验重复2次。

孢子萌发率(%)=(孢子萌发数/调查孢子总数)×100%

#### 1.2.2 纳他霉素抑制菌丝生长测定

采用菌丝生长速率法(岑春艺等, 2016)测定纳他霉素的抑菌效果。无菌条件下将不同浓度的纳他霉素加入100 mL PDA培养基中,使其终浓度分别为1、2和3 mg·L<sup>-1</sup>。用直径为5 mm的无菌打孔器在生长7天的菌

落边缘打孔,将菌饼转接于含药培养基中央,密封后于(25±1)°C恒温培养。分别在第1、3和5天通过十字交叉法测定菌落直径。以加入等量无菌水作为对照组,每个处理设3组平行,实验重复3次。

#### 1.2.3 纳他霉素抑制采后病斑扩展效果测定

挑选大小及颜色均一、无机械损伤和病虫害的芒果果实,用2%次氯酸钠浸泡2分钟,清水冲洗后自然晾干。用无菌打孔器在果实赤道部位刺孔(宽4 mm,深2 mm),取10 μL孢子悬浮液(10<sup>4</sup>个·mL<sup>-1</sup>)注入孔内,1小时后待菌液晾干再注入20 μL纳他霉素溶液(浓度分别为80和160 mg·L<sup>-1</sup>)。晾干后将芒果置于无菌保鲜盒中于(25±1)°C恒温贮藏。分别在第2、4、6和8天拍照记录果实发病情况,并用十字交叉法测量病斑直径。以孔内注入等量无菌水作为对照组,每处理20个果实,实验重复3次。

#### 1.2.4 细胞膜透性测定

将1 mL浓度为10<sup>6</sup>个·mL<sup>-1</sup>的孢子悬浮液加入到100 mL PDB培养基中,恒温振荡((25±1)°C,每分钟150转)培养36小时后过滤收集菌丝。各称取1 g菌丝,分别加入到2和3 mg·L<sup>-1</sup>纳他霉素溶液中测定初始电导率(ms),然后分别在处理30、60、90、120、150和180分钟时测定电导率,最后测定煮沸处理后的电导率。根据公式计算相对渗透率。

$$\text{相对渗透率(\%)} = \frac{\text{处理电导率} - \text{初始电导率}}{\text{煮沸电导率} - \text{初始电导率}} \times 100\%$$

以加入无菌水作为对照组,每处理设3组平行,实验重复3次。

#### 1.2.5 可溶性蛋白含量测定

可溶性蛋白含量测定方法参照石志琦等(2004)。将1 mL浓度为10<sup>6</sup>个·mL<sup>-1</sup>的孢子悬浮液加入100 mL PDB培养基中恒温振荡((25±1)°C,每分钟150转)培养36小时,然后向培养基中加入纳他霉素,使其终浓度分别为2和3 mg·L<sup>-1</sup>。继续振荡培养,分别在第2、4、6和8小时取样。用布氏漏斗抽干菌丝,取1 g菌丝加入2 mL 0.2 mmol·L<sup>-1</sup>磷酸盐缓冲液(pH7.5),冰浴研磨成糊状,将其全部转移至离心管中并定容至8 mL,4°C、10 000 ×g离心15分钟。取0.4 mL上清液加入5 mL考马斯亮蓝溶液,反应5分钟后于595 nm波长处测定吸光度,根据公式计算菌丝可溶性蛋

白含量。

$$\text{样品蛋白质含量}(\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}) = \frac{\text{提取液总体积}(\text{mL}) / \text{测定取样体积}(\text{mL})}{\text{样品鲜重}(\text{g})} \times X$$

式中,  $X$ 为从标准曲线上得到的样品中蛋白质含量( $\mu\text{g}$ )。以无菌水作为对照组, 每处理设3组平行, 实验重复3次。

### 1.2.6 细胞膜完整性测定

将1 mL浓度为 $10^7$ 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$ 的孢子悬浮液加入到3 mL含有 $2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 纳他霉素的PDB培养基中恒温振荡(( $25\pm 1$ ) $^{\circ}\text{C}$ , 每分钟150转)培养, 分别在第4、6和8小时取出,  $4^{\circ}\text{C}$ 、 $6\ 000\times g$ 离心5分钟, 用 $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液(pH7.0)漂洗3次, 加入质量浓度为 $10\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的碘化丙啶(PI)染液,  $30^{\circ}\text{C}$ 避光孵育15分钟, 用磷酸缓冲液漂洗2次后, 立即置于荧光显微镜下观察拍照并统计染色率。每处理设2组平行, 实验重复2次。

### 1.2.7 活性氧水平测定

孢子培养方法同1.2.6节。分别在第4、6和8小时取出样品 $4^{\circ}\text{C}$ 、 $6\ 000\times g$ 离心, 用磷酸缓冲液漂洗3次, 加入 $10\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ DCFH-DA染色液,  $30^{\circ}\text{C}$ 避光孵育15分钟, 用磷酸缓冲液漂洗2次后, 立即置于荧光显微镜下观察拍照并统计染色率。每处理设2组平行, 实验重复2次。

### 1.2.8 线粒体分布测定

线粒体分布测定方法参照Shi等(2012)。用DMSO溶解MitoTracker<sup>®</sup> Red CMTMRos (Cat No.M7512), 配成浓度为 $1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的母液, 置于 $-20^{\circ}\text{C}$ 避光保存。将1 mL浓度为 $10^7$ 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$ 的孢子悬浮液加入到3 mL含有 $2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 纳他霉素的PDB培养基中恒温振荡(( $25\pm 1$ ) $^{\circ}\text{C}$ , 每分钟150转)培养。分别在第4、6和8小时定时取出 $10\text{ }\mu\text{L}$ 孢子液, 加入 $0.1\text{ }\mu\text{L}$   $0.05\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  MitoTracker<sup>®</sup> Red CMTMRos染料工作液, 立即置于荧光显微镜下观察拍照。每处理设2组平行, 实验重复2次。

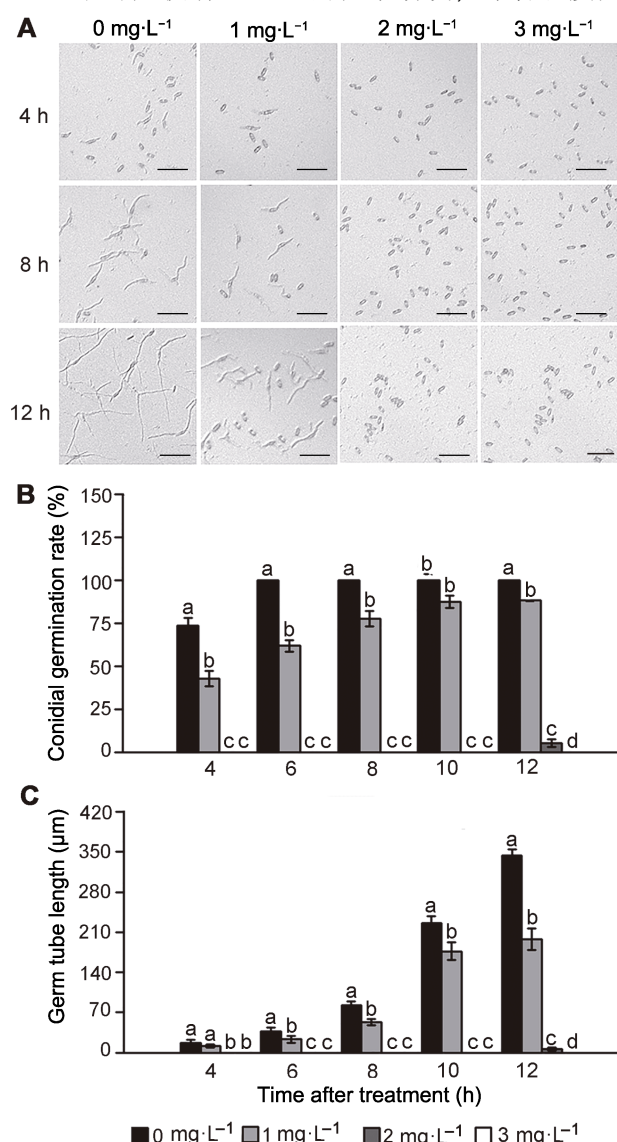
## 1.3 数据统计分析

实验数据均使用SPSS 19.0软件处理。采用Duncan多重比较法进行差异显著性分析( $P<0.05$ )。

## 2 结果与讨论

### 2.1 纳他霉素对胶孢炭疽菌孢子萌发的影响

如图1所示, 纳他霉素能有效抑制胶孢炭疽菌的孢子萌发和芽管伸长。培养6小时, 对照组孢子全部萌发, 12小时芽管长度已达 $343.33\text{ }\mu\text{m}$ 。而 $2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 纳他霉素处理12小时后仅有5.26%的孢子萌发, 芽管长度为



**图1** 纳他霉素对胶孢炭疽菌孢子萌发和芽管伸长的影响  
(A) 孢子萌发显微图(Bars=50  $\mu\text{m}$ ); (B) 孢子萌发率; (C) 芽管长度。不同小写字母表示各处理组间差异显著( $P<0.05$ )。  
**Figure 1** Effect of natamycin on conidial germination and germ tube elongation of *Colletotrichum gloeosporioides*  
(A) Micrograph of conidial germination (Bars=50  $\mu\text{m}$ ); (B) Conidial germination rate; (C) Germ tube length. Treatments followed by different lowercase letters are statistically different by the Duncan's multiple range test ( $P<0.05$ ).

6.67  $\mu\text{m}$ 。3  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  纳他霉素处理 12 小时后孢子仍未萌发。

## 2.2 纳他霉素对胶孢炭疽菌菌丝生长的影响

由图2可知, 纳他霉素对胶孢炭疽菌的菌丝生长有显著抑制作用, 各浓度间差异显著 ( $P<0.05$ ), 且抑菌效果随浓度的增加而增强。培养至第5天, 对照组菌落直径达67.17 mm, 1和2  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  纳他霉素处理后的菌落直径分别为52.5和38.33 mm, 3  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  处理组菌落直径仅为27.83 mm。

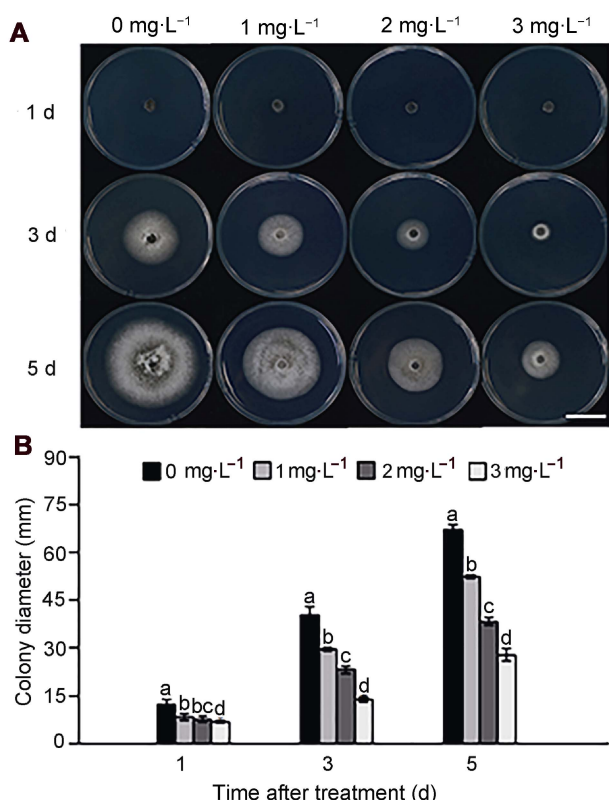


图2 纳他霉素对胶孢炭疽菌菌丝生长的影响

(A) 菌落生长图(Bar=15 mm); (B) 菌落直径。不同小写字母表示各处理组间差异显著 ( $P<0.05$ )。

Figure 2 Effect of natamycin on colony growth of *Colletotrichum gloeosporioides*

(A) Colony morphology (Bar=15 mm); (B) Colony diameter. Treatments followed by different lowercase letters are statistically different by the Duncan's multiple range test ( $P<0.05$ ).

## 2.3 纳他霉素对芒果炭疽病斑扩展的影响

由图3可知, 随着贮藏时间的延长, 各组芒果果实病斑直径均逐渐增大。但经80和160  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  纳他霉素处

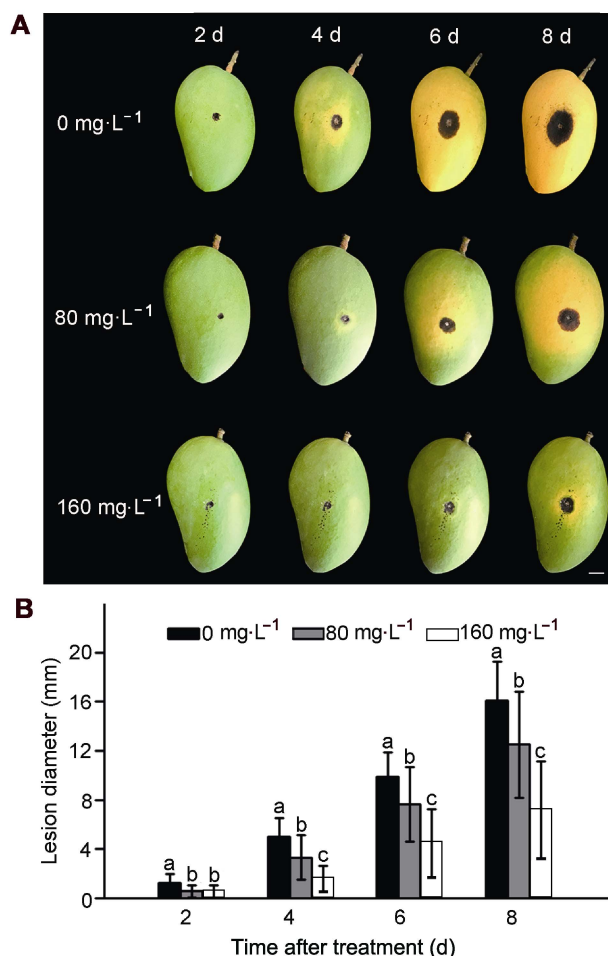


图3 纳他霉素对芒果采后炭疽病的影响

(A) 炭疽病发病情况(Bar=8 mm); (B) 炭疽病斑直径。不同小写字母表示各处理组间差异显著 ( $P<0.05$ )。

Figure 3 Effect of natamycin on anthracnose in mango fruit (A) Symptoms of anthracnose in fruit (Bar=8 mm); (B) Lesion diameter of anthracnose. Treatments followed by different lowercase letters are statistically different by the Duncan's multiple range test ( $P<0.05$ ).

理的果实, 炭疽病病斑直径明显小于对照组, 且各浓度之间差异显著 ( $P<0.05$ ), 抑菌效果随浓度增加而增强。贮存至第8天, 对照组病斑直径达16.10 mm, 而80和160  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  纳他霉素处理的果实病斑直径仅分别为12.5和7.18 mm, 病斑扩展分别减少22.36%和55.40%。

## 2.4 纳他霉素对胶孢炭疽菌细胞膜渗透性和可溶性蛋白含量的影响

相对渗透率的变化可以反映纳他霉素处理对菌丝膜渗透性的影响。如图4A所示, 经2和3  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  纳他霉素



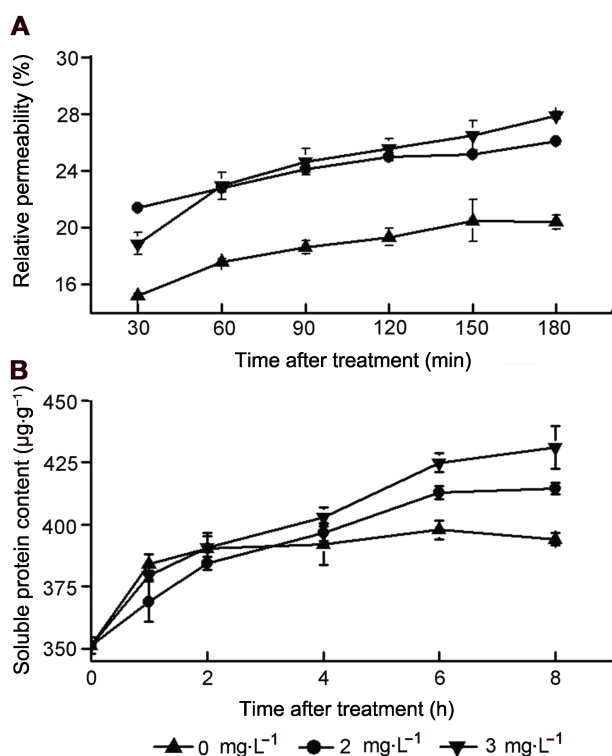


图4 纳他霉素对胶孢炭疽菌细胞膜透性和可溶性蛋白含量的影响

(A) 细胞膜相对透率; (B) 可溶性蛋白含量

Figure 4 Effect of natamycin on cell membrane permeability and soluble protein content of *Colletotrichum gloeosporioides* (A) Relative permeability of cell membrane; (B) Soluble protein content

处理的菌丝, 其细胞膜相对透率明显高于对照组。处理150分钟后, 对照组相对透率不再增加, 而处理组相对透率仍继续升高。处理180分钟, 2和3 mg·L<sup>-1</sup>纳他霉素处理的菌丝相对透率分别达到26.10%和27.92%, 而对照组仅为20.41%。由图4B可知, 对照组可溶性蛋白含量在处理2小时后趋于稳定, 处理组可溶性蛋白含量逐渐增加。随着处理时间的延长, 对照组和处理组菌丝可溶性蛋白含量差距变大, 对照组逐渐低于处理组。且随着纳他霉素浓度的增加, 菌丝可溶性蛋白含量也相应增加。以上说明纳他霉素对菌丝的细胞膜产生影响, 增加膜透性, 并影响菌丝正常代谢活动, 使蛋白含量增加。

## 2.5 纳他霉素对胶孢炭疽菌孢子细胞膜完整性的影响

由图5中的PI染色结果可知, 经2 mg·L<sup>-1</sup>纳他霉素处

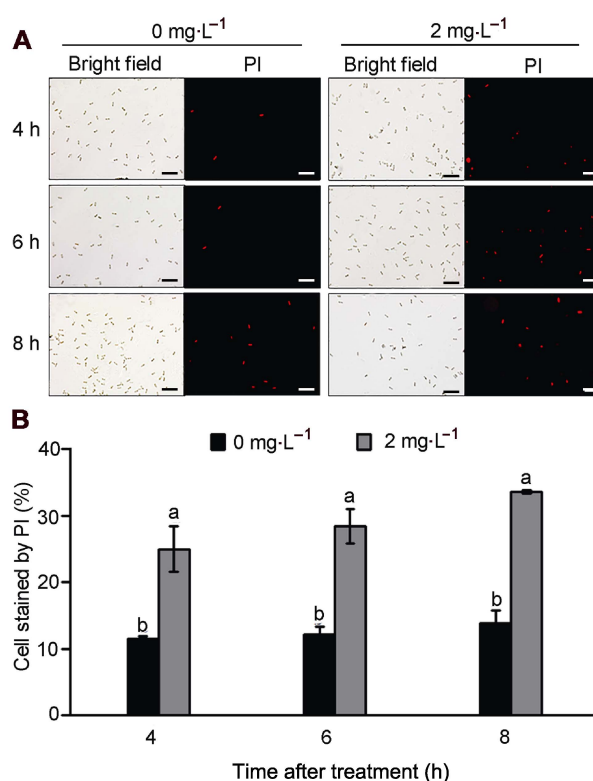


图5 纳他霉素对胶孢炭疽菌孢子细胞膜完整性的影响

(A) 荧光显微镜下碘化丙啶(PI)染色情况, 细胞膜受损的孢子呈红色荧光(Bars=50 μm); (B) PI染色率。不同小写字母表示各处理组间差异显著( $P<0.05$ )。

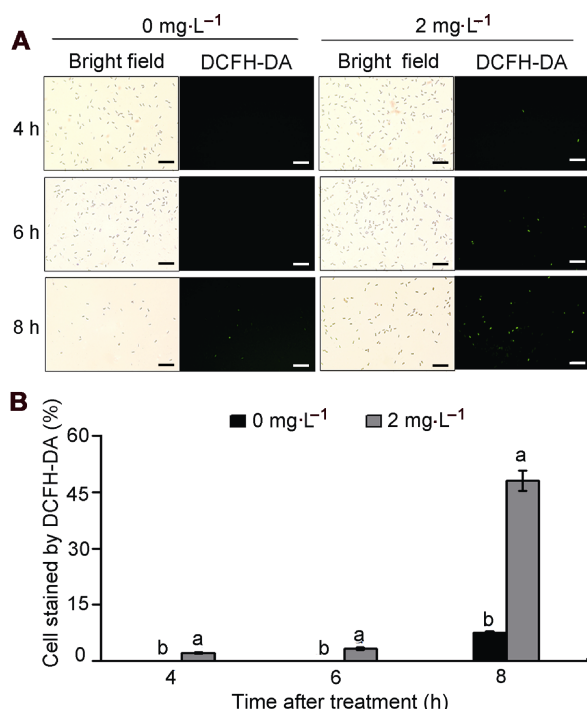
Figure 5 Effect of natamycin on membrane integrity of *Colletotrichum gloeosporioides* conidia

(A) Propidium iodide (PI) staining under fluorescence microscope, conidia with damaged plasma membranes showed red fluorescence (Bars=50 μm); (B) PI staining rate. Treatments followed by different lowercase letters are statistically different by the Duncan's multiple range test ( $P<0.05$ ).

理的孢子, 其细胞膜完整性受到破坏, PI染色率明显高于对照组。4、6和8小时处理组染色率分别为25.4%、28.0%和33.6%, 而对照组染色率仅分别为11.5%、12.2%和13.9%。

## 2.6 纳他霉素对胶孢炭疽菌活性氧积累的影响

采用DCFH-DA探针对细胞内活性氧进行染色, 结果如图6所示。培养6小时, 对照组中未观察到荧光, 处理组染色率为2.67%。培养8小时, 处理组有46.92%的孢子被DCFH-DA染色, 而对照组染色率仅为7.52%。以上结果表明, 纳他霉素能够诱导孢子内活性氧的产生与积累。



**图6** 纳他霉素对胶孢炭疽菌活性氧(ROS)含量的影响  
(A) 荧光显微镜下DCFH-DA染色情况, 诱导活性氧产生的孢子呈绿色荧光(Bars=50  $\mu\text{m}$ ); (B) DCFH-DA染色率。不同小写字母表示各处理组间差异显著( $P<0.05$ )。

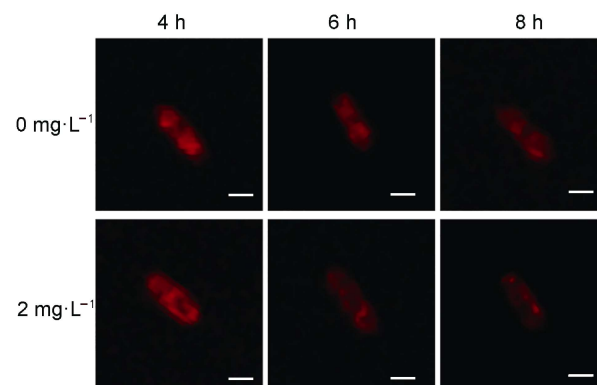
**Figure 6** Effect of natamycin on reactive oxygen species (ROS) content of *Colletotrichum gloeosporioides*  
(A) DCFH-DA staining under fluorescence microscope, conidia with intracellular ROS induction exhibit green fluorescence (Bars=50  $\mu\text{m}$ ); (B) DCFH-DA staining rate. Treatments followed by different lowercase letters are statistically different by the Duncan's multiple range test ( $P<0.05$ ).

## 2.7 纳他霉素对胶孢炭疽菌孢子内线粒体分布的影响

用MitoTracker<sup>®</sup> Red CMTMRos分子探针对线粒体进行专一性染色, 结果如图7所示。对照组孢子有丰富的线粒体且分布均匀, 荧光强度较强, 随着处理时间延长荧光无明显差别。处理6小时, 荧光强度减弱, 孢子内线粒体分布呈局部聚集化, 密度降低且分布不均。处理8小时, 处理组孢子内的荧光十分微弱, 此时大部分线粒体已降解。

## 2.8 讨论

纳他霉素作为一种低毒高效的生物抑菌剂, 相比化学杀菌剂更安全环保。本实验将纳他霉素应用于芒果采



**图7** 纳他霉素对胶孢炭疽菌孢子内线粒体分布的影响  
红色荧光处为线粒体聚集区(Bars=5  $\mu\text{m}$ )。

**Figure 7** Effect of natamycin on the distribution of mitochondria of *Colletotrichum gloeosporioides* conidia  
The red fluorescence represented the mitochondrial aggregation area (Bars=5  $\mu\text{m}$ ).

后胶孢炭疽菌抑菌和病害防治中, 实验结果表明, 纳他霉素抑菌效果显著并存在剂量依赖性, 可以有效抑制胶孢炭疽菌的孢子萌发、芽管伸长和菌丝生长, 说明纳他霉素具备应用于芒果采后炭疽病防治的潜力。

纳他霉素的抑菌机理主要是其可与真菌和酵母细胞膜上的麦角甾醇结合, 改变细胞膜透性。此外, 纳他霉素可以干扰酵母液泡融合和膜融合前麦角甾醇依赖性启动反应, 影响营养物质运输, 对麦角甾醇依赖性相关蛋白产生一定影响(te Welscher et al., 2010)。为探究纳他霉素对胶孢炭疽菌的抑制机理, 我们测定了纳他霉素处理后菌丝细胞膜相对渗透率, 结果表明纳他霉素可以增加细胞膜透性, 使胞内物质渗出而导致细胞死亡; 同时发现纳他霉素处理后菌丝可溶性蛋白含量增加。黄勤知等(2013)用抗菌蛋白处理芒果炭疽菌以及唐群勇(2011)用抗菌肽处理桃(*Amygdalus persica*)软腐病菌后, 均发现菌丝内可溶性蛋白含量增加, 这可能是菌体受到化学胁迫后的一种调节反应, 或是药物处理使细胞功能紊乱, 抑制了蛋白质的分解代谢。PI染色结果表明细胞膜是纳他霉素的作用靶点, 其可引起真菌细胞膜功能紊乱, 破坏细胞膜结构, 导致细胞死亡(Aparicio et al., 2004; Van Leeuwen et al., 2009)。

活性氧是呼吸作用常见的副产物, 但高浓度活性氧能够与脂类、蛋白质和DNA反应, 产生蛋白羰基化、脂质过氧化或mtDNA损伤, 使细胞发生功能障碍,

导致膜破损或细胞死亡(Circu and Aw, 2010; Marchi et al., 2012)。已有研究表明, 许多外源性刺激都会使真菌病原体产生诱导活性氧大量生成的应激反应(Xu and Tian, 2008; Lai et al., 2011)。本研究胶孢炭疽菌经纳他霉素处理后, 孢子内活性氧含量显著升高, 说明纳他霉素可以通过诱导活性氧大量产生而对菌体造成伤害。

线粒体是细胞中主要的能量生成系统, 在各种细胞代谢、钙信号转导和细胞凋亡中发挥关键作用(Chan, 2006)。纳他霉素处理后胶孢炭疽菌孢子内线粒体染色剂荧光信号微弱, 说明纳他霉素对线粒体产生一定的破坏作用, 可能导致线粒体降解和活性下降, 对细胞正常的生理代谢活动产生影响。同时线粒体是细胞内活性氧的重要来源, 在糖酵解和三羧酸循环过程中会产生超氧阴离子而发生氧化还原反应, 造成线粒体损伤(景红娟等, 2012)。高浓度活性氧影响线粒体呼吸链复合酶的活性, 使线粒体膜通透性改变(Avery, 2011), 而线粒体电子传递系统的损伤, 又可进一步促进线粒体内活性氧的生成(Angelova et al., 2005; Indo et al., 2007), 二者形成恶性循环, 最终导致细胞死亡。

综上所述, 纳他霉素可以通过增加细胞膜渗透性和可溶性蛋白含量、破坏细胞膜完整性和线粒体活性以及诱导细胞内活性氧积累等途径, 来影响胶孢炭疽菌正常生理活动, 有效抑制孢子萌发、菌丝生长和芒果炭疽病斑扩展。研究结果不仅为深入揭示纳他霉素抑菌机制奠定了基础, 还为开发生物抑菌剂提供了科学依据。

## 参考文献

- 岑春艺, 黄正学, 李善登, 韦继光, 李良波, 黄荣韶 (2016). 西番莲提取物对三七炭疽病菌和黑斑病菌的抑制作用. 湖北农业科学 55, 912–915.
- 郭萌萌, 李志文, 张平, 农绍庄, 刘莉, 刘翔 (2013). 纳他霉素对葡萄采后灰霉病菌的毒力及其防腐保鲜效果. 食品与发酵工业 39(8), 226–232.
- 呼玉侠, 孙远功, 鲁来政, 李长锁 (2006). 纳他霉素在草莓防腐中的应用. 食品研究与开发 27(8), 170–172.
- 黄勤知, 余莎, 何红, 卢乃会 (2013). 红树内生细菌Ail3抗菌蛋白对杧果炭疽菌的抑制作用. 果树学报 30, 1016–1022.
- 姜爱丽, 胡文忠, 李慧, 田密霞, 范圣第 (2009). 纳他霉素处

- 理对采后甜樱桃生理代谢及品质的影响. 农业工程学报 25, 351–356.
- 景红娟, 周广舟, 谭晓荣, 平康康, 任雪建 (2012). 活性氧对植物自噬调控的研究进展. 植物学报 47, 534–542.
- 石志琦, 沈寿国, 徐朗莱, 范永坚 (2004). 蛇床子素对植物病原真菌抑制机制的初步研究. 农药学报 6(4), 28–32.
- 孙远功, 呼玉侠, 冯昕 (2006). 纳他霉素在柑桔防腐保鲜中的应用. 食品研究与开发 27(7), 190–192.
- 唐群勇 (2011). Fengycin对*Rhizopus stolonifer*作用机理研究. 硕士论文. 南京: 南京农业大学. pp. 1–68.
- Angelova MB, Pashova SB, Spasova BK, Vassilev SV, Siokoska LS (2005). Oxidative stress response of filamentous fungi induced by hydrogen peroxide and paraquat. *Mycol Res* 109, 150–158.
- Aparicio JF, Barreales EG, Payero TD, Vicente CM, de Pedro A, Santos-Aberturas J (2016). Biotechnological production and application of the antibiotic pimarin: biosynthesis and its regulation. *Appl Microbiol Biotechnol* 100, 61–78.
- Aparicio JF, Mendes MV, Anton N, Recio E, Martin JF (2004). Polyene macrolide antibiotic biosynthesis. *Curr Med Chem* 11, 1643–1656.
- Arroyo-López FN, Bautista-Gallego J, Romero-Gil V, Rodríguez-Gómez F, Garrido-Fernández A (2012). Growth/no growth interfaces of table olive related yeasts for natamycin, citric acid and sodium chloride. *Int J Food Microbiol* 155, 257–262.
- Avery SV (2011). Molecular targets of oxidative stress. *Biochem* 434, 201–210.
- Chan DC (2006). Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging, and development. *Cell* 125, 1241–1252.
- Circu ML, Aw TY (2010). Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic Biol Med* 48, 749–762.
- Fajardo P, Martins JT, Fuciños C, Pastrana L, Teixeira JA, Vicente AA (2010). Evaluation of a chitosan-based edible film as carrier of natamycin to improve the storability of saloio cheese. *J Food Eng* 101, 349–356.
- Haack SE, Ivors KL, Holmes GJ, Förster H, Adaskaveg JE (2018). Natamycin, a new biofungicide for managing crown rot of strawberry caused by Qol-resistant *Colletotrichum acutatum*. *Plant Dis* 102, 1687–1695.
- He C, Zhang ZQ, Li BQ, Xu Y, Tian SP (2019). Effect of natamycin on *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum*-postharvest pathogens of grape berries and jujube fruit. *Postharvest Biol Technol* 151, 134–141.
- Hondrodinou O, Kourkoutas Y, Panagou EZ (2011).

- Efficacy of natamycin to control fungal growth in natural black olive fermentation. *Food Microbiol* **28**, 621–627.
- Hu MJ, Yang DP, Huber DJ, Jiang YM, Li M, Gao ZY, Zhang ZK (2014). Reduction of postharvest anthracnose and enhancement of disease resistance in ripening mango fruit by nitric oxide treatment. *Postharvest Biol Technol* **97**, 115–122.
- Indo HP, Davidson M, Yen HC, Suenaga S, Tomita K, Nishii T, Higuchi M, Koga Y, Ozawa T, Majima HJ (2007). Evidence of ROS generation by mitochondria in cells with impaired electron transport chain and mitochondrial DNA damage. *Mitochondrion* **7**, 106–118.
- Jongsri P, Rojsitthisak P, Wangsomboondee T, Seraypheap K (2017). Influence of chitosan coating combined with spermidine on anthracnose disease and qualities of 'Nam Dok Mai' mango after harvest. *Sci Hortic* **224**, 180–187.
- Kefialew Y, Ayalew A (2008). Postharvest biological control of anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) on mango (*Mangifera indica*). *Postharvest Biol Technol* **50**, 8–11.
- Lai TF, Li BQ, Qin GZ, Tian SP (2011). Oxidative damage involves in the inhibitory effect of nitric oxide on spore germination of *Penicillium expansum*. *Curr Microbiol* **62**, 229–234.
- Marchi S, Giorgi C, Suski JM, Agnoletto C, Bononi A, Bonora M, De Marchi E, Missiroli S, Patergnani S, Poletti F, Rimessi A, Duszynski J, Wieckowski MR, Pinton P (2012). Mitochondria-ros crosstalk in the control of cell death and aging. *J Signal Transduction* **2012**, 329635.
- Mehyar GF, Al Nabulsi AA, Saleh M, Olaimat AN, Holley RA (2017). Effects of chitosan coating containing lysozyme or natamycin on shelf-life, microbial quality, and sensory properties of Halloumi cheese brined in normal and reduced salt solutions. *J Food Process Pres* **42**, e13324.
- Perumal AB, Sellamuthu PS, Nambiar RB, Sadiku ER (2018). Effects of essential oil vapour treatment on the postharvest disease control and different defence responses in two mango (*Mangifera indica* L.) cultivars. *Food Bioprocess Tech* **10**, 1131–1141.
- Pipek P, Rohlík BA, Lojková A, Staruch L (2010). Suppression of mould growth on dry sausages. *Czech Food Sci* **28**, 258–263.
- Shi XQ, Li BQ, Qin GZ, Tian SP (2012). Mechanism of antifungal action of borate against *Colletotrichum gloeosporioides* related to mitochondrial degradation in spores. *Postharvest Biol Technol* **67**, 138–143.
- Sivakumar D, Jiang Y, Yahia EM (2011). Maintaining mango (*Mangifera indica* L.) fruit quality during the export chain. *Food Res Int* **44**, 1254–1263.
- te Welscher YM, Jones L, van Leeuwen MR, Dijksterhuis J, de Kruijff B, Eitzen G, Breukink E (2010). Natamycin inhibits vacuole fusion at the priming phase via a specific interaction with ergosterol. *Antimicrob Agents Chemother* **54**, 2618–2625.
- Van Leeuwen MR, Golovina EA, Dijksterhuis J (2009). The polyene antimycotics nystatin and filipin disrupt the plasma membrane, whereas natamycin inhibits endocytosis in germinating conidia of *Penicillium discolor*. *J Appl Microbiol* **106**, 1908–1918.
- Xu XB, Tian SP (2008). Salicylic acid alleviated pathogen-induced oxidative stress in harvested sweet cherry fruit. *Postharvest Biol Technol* **49**, 379–385.



## Antifungal Activity and Mechanisms of Natamycin Against *Colletotrichum gloeosporioides* in Postharvest Mango Fruit

Jiayi Liu<sup>1</sup>, Jiaxin Wang<sup>1</sup>, Haichao Song<sup>2</sup>, Zhengke Zhang<sup>1</sup>, Xiangbin Xu<sup>1</sup>, Xuncong Ji<sup>3\*</sup>, Xuequn Shi<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>College of Food Science and Technology, Hainan University, Haikou 570228, China; <sup>2</sup>Institute of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Haikou 570228, China; <sup>3</sup>Institute of Plant Protection, Hainan Academy of Agricultural Sciences, Haikou 571100, China

**Abstract** In this study, we examined the inhibitory effects of natamycin at different concentrations on the conidial germination and mycelial growth of *Colletotrichum gloeosporioides* *in vitro* as well as the controlled effect of natamycin on postharvest anthracnose of mango (*Mangifera indica*) fruit inoculated with *C. gloeosporioides*. To further explore the underlying antifungal mechanism, we analyzed the membrane permeability, soluble protein content, changes in cell membrane integrity, intracellular reactive oxygen species (ROS) level and mitochondrial distribution in *C. gloeosporioides* after natamycin treatment. Natamycin at 3 mg·L<sup>-1</sup> effectively suppressed the conidial germination, germ tube elongation and mycelial growth of *C. gloeosporioides*. Also, 80 mg·L<sup>-1</sup> natamycin significantly inhibited the expansion of anthracnose lesions in mango fruit during storage. Furthermore, natamycin treatment increased the relative permeability and soluble protein content in the cell membrane of *C. gloeosporioides*. After 8h treatment with natamycin 2 mg·L<sup>-1</sup>, the staining rate of damaged cell membranes in *C. gloeosporioides* was 33.6% and 13.9% in the control. The staining rate of intracellular ROS reached 46.9% in treated conidia, which was 39.7% higher than that of the control. Natamycin treatment caused heterogeneous distribution of intracellular mitochondria along with weaker fluorescence as compared with the control. In summary, natamycin can destroy the cell membrane of *C. gloeosporioides*, induce ROS accumulation and reduce mitochondrial activity, thus interfering in the normal physiological activity of *C. gloeosporioides* and affecting its metabolic activities.

**Key words** natamycin, mango, *Colletotrichum gloeosporioides*, antifungal mechanism

Liu JY, Wang JX, Song HC, Zhang ZK, Xu XB, Ji XC, Shi XQ (2019). Antifungal activity and mechanisms of natamycin against *Colletotrichum gloeosporioides* in postharvest mango fruit. *Chin Bull Bot* **54**, 455–463.

\* Authors for correspondence. E-mail: 757557113@qq.com; shixuequn@163.com

(责任编辑: 白羽红)