

DOI: 10.12161/j.issn.1005-6521.2023.05.001

银杏外种皮提取物对苹果链格孢霉的抑制作用

聂文琦, 王琛郴, 孙浩*, 叶淑红*
(大连工业大学 食品学院, 辽宁 大连 116034)

摘要: 为研究银杏外种皮提取物(*Ginkgo biloba* exocarp extract, GBEE)对苹果链格孢霉的抑制作用,采用乙醇提取法和水提取法提取银杏外种皮活性成分,并采用菌丝生长速率法,测定银杏外种皮提取物对苹果链格孢霉的抑制效果,研究银杏外种皮乙醇提取物对苹果链格孢霉孢子萌发和芽管伸长的影响。通过测定电导率,蛋白质、核酸的渗漏量,细胞膜损伤程度以及抗性相关酶活性来进一步研究抑制行为。GBEE的抑菌作用呈浓度依赖性,水溶性提取物于1 200 mg/L抑菌率达到16.94%,乙醇提取物于1 200 mg/L抑菌率达到61.39%,约为水溶性提取物的3.6倍。银杏外种皮乙醇提取物使苹果链格孢霉菌体细胞膜通透性增加,膜脂过氧化程度加剧,丙二醛(malondialdehyde, MDA)和H₂O₂含量升高,胞内核酸、蛋白质外泄,抑制抗性相关酶活性,通过光学显微镜观察到乙醇提取物处理组的链格孢霉菌无细胞壁间隔。乙醇提取物的抑菌效果比水提取物好,通过破坏苹果链格孢霉菌的细胞膜完整性和抑制抗性相关酶活性来达到抑菌目的。

关键词: 银杏外种皮;提取物;苹果链格孢霉;抑菌作用;细胞膜完整性

Inhibitory Effect of *Ginkgo biloba* Exocarp Extract on *Alternaria alternata* in Apples

NIE Wen-qi, WANG Chen-chen, SUN Hao*, YE Shu-hong*

(School of Food Science and Technology, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, Liaoning, China)

Abstract: This study aimed to analyze the inhibitory effect of *Ginkgo biloba* exocarp extract (GBEE) on *Alternaria alternata* in apples. The active components of *G. biloba* exocarp were extracted by alcohol extraction and water extraction, and the inhibitory effect of GBEE on *A. alternata* in apples was determined by the method of mycelial growth rate to investigate the effect of ethanol extract of *G. biloba* exocarp on spore germination and germ tube elongation of *A. alternata* in apples. The inhibition behaviors were further studied by measuring the electrical conductivity, the amounts of protein and nucleic acid released, the degree of cell membrane damage, and the activity of resistance-related enzymes. The bacteriostatic effect of GBEE was concentration-dependent. The bacteriostatic rate of water-soluble extract at 1 200 mg/L reached 16.94%, and that of alcohol-soluble extract at 1 200 mg/L reached 61.39%, about 3.6 times that of water-soluble extract. The alcohol-soluble GBEE increased the permeability of the cell membrane of *A. alternata* in apples, intensified the degree of membrane lipid peroxidation, elevated the content of malondialdehyde and H₂O₂, promoted the leakage of intracellular nucleic acid and protein, and inhibited the activity of resistance-related enzymes. No cell wall compartment was observed in *A. alternata* in the ethanol extract group by the light microscope. The bacteriostatic effect of the ethanol extract was superior to that of the water extract, which was achieved by destroying the cell membrane integrity of *A. alternata* in apples and inhibiting the activity of resistance-related enzymes.

Key words: *Ginkgo biloba* exocarp; extract; *Alternaria alternata* in apples; bacteriostatic effect; cell membrane integrity

引文格式:

聂文琦,王琛郴,孙浩,等.银杏外种皮提取物对苹果链格孢霉的抑制作用[J].食品研究与开发,2023,44(5):1-8.

NIE Wenqi, WANG Chenchen, SUN Hao, et al. Inhibitory Effect of *Ginkgo biloba* Exocarp Extract on *Alternaria alternata* in Apples[J]. Food Research and Development, 2023, 44(5): 1-8.

基金项目:国家自然科学基金(32171836);辽宁省自然科学基金(LJKZ0528, 2020-MZLH-37)

作者简介:聂文琦(1997—),女(汉),硕士,研究方向:食品生物技术。

*通信作者:孙浩(1965—),男(汉),副教授,博士,研究方向:食品加工技术的开发与研究、食物资源开发与综合利用;叶淑红(1972—),女(汉),教授,博士,研究方向:微生物食用资源的开发与安全性研究、森林食用资源的开发与利用。

银杏外种皮是银杏仁外的多汁表皮,其含有银杏酚酸、多糖、黄酮、内酯、矿物元素等多种成分,与银杏叶和种核的成分类似,具有抗肿瘤转移、抑菌、杀菌、抗氧化等作用,开发前景良好^[1]。目前对银杏外种皮的研究鲜有报道,银杏外种皮占整个种子质量的70%左右,我国每年生产1.2万吨~1.4万吨种核,约有3.6万吨~4.2万吨的银杏外种皮遭到废弃,这不仅造成了银杏资源的巨大浪费,而且造成了环境的严重污染^[2]。

我国苹果生产总量虽然较大,但我国苹果品质相对较差,主要表现为果形不整齐、成色较差、风味不足且不耐贮藏和运输。并且在果实生长前期、采收前、贮藏期的主要病害苹果霉心病危害很大,严重影响了果农的经济收入^[3]。有数据显示,果蔬采后腐烂占20%以上,其中大部分是由微生物感染引起,而链格孢霉菌是果蔬采后病害的主要致病菌^[4]。

近年来包括我国在内的许多国家对高毒、高残留的农药实施了禁用的政策。与化学合成农药相比,植物源农药具有选择性高、低毒、易降解等优点。为此,开发高效、低毒、绿色环保型的植物源抑菌剂成为当前解决农业生产中病害的新途径之一。深入开展银杏外种皮的研究和开发利用,不但可做到废物利用,变废为宝,还可防止环境污染,从而获得较大的经济效益和社会效益。本研究以银杏外种皮为原料探究其对苹果链格孢霉菌的抑制作用,为新型植物源农药的开发提供参考。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

银杏外种皮:大连工业大学校园内收集;苹果链格孢霉菌:大连工业大学食品学院303实验室保藏。

考马斯亮蓝G-250、三氯乙酸、硫代巴比妥酸、愈创木酚、柠檬酸、邻苯二酚、30%过氧化氢、丙酮(均为分析纯):天津市科密欧化学试剂有限公司;无水乙醇、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、四氯化钛(均为分析纯):天津大茂化学试剂厂;氨水(分析纯):广州市浩盈化工科技有限公司。

1.2 仪器与设备

PH-070A型电热恒温干燥箱:上海一恒科学仪器有限公司;JYL-CO2DE多功能破壁料理机:九阳股份有限公司;N-1200BV型旋转蒸发器:上海爱朗仪器有限公司;Scientz-18N型真空冷冻干燥机:宁波新芝生物科技有限公司;ME204型分析天平:梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;SW-CJ-2FD型超净工作台:苏州安泰空气技术有限公司;ZHWY-211B型恒温冷冻摇床:上海智城分析仪器制造有限公司;SX-500型压力蒸汽灭菌器:日本TOMY公司;SHP-150型生化培

养箱:上海森信实验仪器有限公司;CX31型光学显微镜:日本OLYMPUS公司;TGL-16M型高速冷冻离心机:湖南湘仪离心机仪器有限公司;SHZ-III型循环水真空泵:上海亚荣生化仪器厂;雷磁DDS-307型电导率仪:上海仪电科学仪器股份有限公司;UV2400型紫外可见分光光度计:上海舜宇恒平科学仪器有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 苹果链格孢霉菌菌饼及菌丝体的制备

苹果链格孢霉菌接种于马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基中央,28℃培养5d,用无菌打孔器在培养基边缘取直径为6mm菌饼,即为试验所用菌饼。取适量苹果链格孢霉菌丝体接种于100mL马铃薯葡萄糖(potato dextrose, PD)培养基中,28℃、150r/min培养3d。用磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)冲洗,4层无菌纱布过滤培养液,无菌滤纸吸干菌丝体表面水分,即为试验所用的湿菌丝体。

1.3.2 银杏外种皮提取物的提取

银杏外种皮清洗、烘干、粉碎,过40目筛,制得银杏外种皮粉,用80%乙醇在70℃~75℃和去离子水在100℃回流下,将风干粉状的银杏外果皮(1kg)提取3次,每次3h,然后抽滤得到提取物上清液,将上清液浓缩、冻干得到银杏外种皮水提取物和乙醇提取物(*Ginkgo biloba* exocarp extract, GBEE)。

1.3.3 银杏外种皮提取物对苹果链格孢霉菌的抑制作用

将水和乙醇提取物按0、200、400、600、800、1000、1200mg/L浓度等量添加到PDA培养基中。将1周龄的链格孢菌饼(直径6.0mm)置于90mm培养皿的中心,然后将板密封并放置在28℃的培养箱中。每个处理重复3次。3d后,采用十字交叉法测定链格孢霉菌落直径,菌丝生长抑制率计算公式如下。

$$\text{菌丝生长抑制率}/\% = \frac{D_0 - D_1}{D_0 - 6} \times 100$$

式中: D_0 为对照组菌落直径,mm; D_1 为处理组菌落直径,mm。

将孢子悬浮液(1×10^6 孢子/mL)接种到含有2mL 0、200、400、600、800、1000、1200mg/L乙醇提取物的马铃薯葡萄糖肉汤(potato glucose broth, PDB)中。然后将40 μ L的每种混合物分别逐滴添加到血细胞计数器中,并置于28℃的培养箱中。12h后,记录孢子萌发情况。

使用光学显微镜研究提取物对苹果链格孢霉菌丝形态的影响。将孢子悬浮液接种在具有不同乙醇提取物浓度(0、200mg/L)的PDB培养基中,然后150r/min、28℃培养3d。3d后,收集菌丝在光学显微镜下观察。

1.3.4 电导率的测定

采用雷磁DDS-307型电导率仪测定孵育培养基

的电导率来评估来自菌丝体的胞质泄漏^[5]。将孢子悬浮液接种到 PDB 培养基中,然后在 150 r/min、28 ℃ 下孵育。3 d 后,用 PBS 冲洗 3 次,用无菌吸水纸收集菌丝体。将每 0.5 g 菌丝体悬浮在不同浓度(0、100、200 mg/L)GBEE 中,在相同条件下继续培养,然后分别在培养 0、2、4、6、8、10、12 h 时测定电导率。测定重复 3 次。

1.3.5 丙二醛(malondialdehyde,MDA)、H₂O₂ 含量的测定

采用硫代巴比妥酸比色法进行测定^[6]。将孢子悬浮液接种到 PDB 培养基中,然后在 150 r/min 和 28 ℃ 下孵育。3 d 后,用 PBS 冲洗 3 次,用无菌吸水纸收集菌丝体。将每 0.5 g 菌丝体悬浮在不同浓度(0、100、200 mg/L)GBEE 中,在相同条件下进一步孵育,然后分别在 0、2、4、6、8、10、12 h 将菌体用 PBS 冲洗,滤纸吸干表面水分,放入研钵中研磨,加入 20%三氯乙酸 10 mL、0.6%硫代巴比妥酸 3 mL,混匀,95 ℃水浴 30 min,冰水浴冷却 10 min。转移至离心管中,4 ℃、12 000 r/min 离心 20 min。收集上清液,分别在波长 532、450、600 nm 处测定吸光度,设置 3 组平行。MDA 含量计算公式如下。

$$\text{MDA 含量}/(\text{mmol}/\text{kg}) = \frac{[6.45(A_{532} - A_{600}) - 0.564A_{450}] \times N}{W}$$

式中: N 为上清液体积, mL; W 为菌丝体鲜重, g。

将每 0.5 g 菌丝体悬浮在不同浓度(0、100、200 mg/L)GBEE 中,在相同条件下进一步孵育,然后分别在 0、2、4、6、8、10、12 h 将菌体用 PBS 冲洗,滤纸吸干表面水分,放入研钵中研磨,加入丙酮在 4 ℃、12 000 r/min 离心 10 min。取 1 mL 上清液与 100 μL 的 20%四氯化钛反应,用 17 mol/L 氨水沉淀,然后加入 1 mol/L 硫酸重悬沉淀,在 410 nm 处测定吸光度,设置 3 组平行。

1.3.6 蛋白质、核酸泄漏量的测定

采用考马斯亮蓝 G-250 比色法测定^[7]。将孢子悬浮液接种到 PDB 培养基中,然后在 150 r/min、28 ℃ 下孵育。3 d 后,用 PBS 冲洗 3 次,用无菌吸水纸收集菌丝体。将每 0.5 g 菌丝体悬浮在不同浓度(0、100、200 mg/L)GBEE 中,在相同条件下进一步孵育,然后分别在 0、2、4、6、8、10、12 h 取 1 mL 培养液加 5 mL 考马斯亮蓝 G-250 试剂,振荡、混匀,静置 2 min,每组设置 3 组平行,于波长 595 nm 处测定蛋白质的含量。

将孢子悬浮液接种到 PDB 培养基中,然后在 150 r/min、28 ℃ 下孵育。3 d 后,用 PBS 冲洗 3 次,用无菌吸水纸收集菌丝体。将每 0.5 g 菌丝体悬浮在不同浓度(0、100、200 mg/L)GBEE 中,在相同条件下进一步孵育,然后分别在 0、2、4、6、8、10、12 h 取 1 mL 培养液通过测定 260 nm 的光密度来定量核酸。

1.3.7 抗性相关酶活性的测定

1.3.7.1 过氧化物酶活性的测定

过氧化物酶(peroxidase, POD)活性参考文献[8]测定。酶活性定义:以 1 min 内 470 nm 处吸光度降低 0.01 为一个酶活性单位,活性单位为 U/(g·min)。

将孢子悬浮液接种到 PDB 培养基中,然后在 150 r/min、28 ℃ 下孵育。3 d 后,用 PBS 冲洗 3 次,用无菌吸水纸收集菌丝体。将每 0.5 g 菌丝体悬浮在不同浓度(0、100、200 mg/L)GBEE 中,在相同条件下进一步孵育,然后分别在 0、2、4、6、8、10、12 h 将菌体用 PBS 冲洗,滤纸吸干表面水分,放入研钵中,加入 10 mL PBS,研磨至匀浆状态,4 ℃、10 000 r/min 离心 10 min,上清液即为所得粗酶液。取 2.9 mL 0.05 mol/L pH6.8 的 PBS,加入 1 mL 0.05 mol/L 愈创木酚和 0.1 mL 酶提取液,迅速置于水浴锅 37 ℃水浴保温 10 min。立即加入 2%过氧化氢 1 mL,停止反应,从加入开始计时,每 20 s 记录 1 次 470 nm 下吸光度,持续 2 min~3 min,以煮沸失活的酶液为对照。酶的比活力计算公式如下。

$$X = \frac{\Delta A \times D}{0.01 \times t \times W}$$

式中: X 为酶的比活力, U/(g·min); ΔA 为反应时间内吸光度的变化; D 为稀释倍数即提取的总酶液为反应系统内酶液体积的倍数; t 为反应时间, min; W 为菌丝体质量, g。

1.3.7.2 多酚氧化酶活性的测定

多酚氧化酶活性参考文献[9]测定,将孢子悬浮液接种到 PDB 培养基中,然后在 150 r/min 和 28 ℃ 下孵育。3 d 后,用 PBS 冲洗 3 次,用无菌吸水纸收集菌丝体。将每 0.5 g 菌丝体悬浮在不同浓度(0、100、200 mg/L)GBEE 中,在相同条件下进一步孵育,然后分别在 0、2、4、6、8、10、12 h 将菌体用 PBS 冲洗,滤纸吸干表面水分,放入研钵中,加入 10 mL PBS,研磨至匀浆状态,4 ℃、10 000 r/min 离心 10 min。取 3.9 mL 0.05 mol/L pH7.8 的 PBS,然后加入 0.1 mol/L 儿茶酚 1 mL 和 0.8 mL 酶提取液。水浴锅 37 ℃水浴保温 10 min。保温结束迅速放入冰浴中加入 2 mL 20%的三氯乙酸终止反应。在 420 nm 下测定吸光度,对照组采用煮沸失活同体积酶液。计算公式同过氧化物酶的计算公式。

1.3.7.3 过氧化氢酶活性的测定

过氧化氢酶活性参考文献[10]测定,将孢子悬浮液接种到 PDB 培养基中,然后在 150 r/min 和 28 ℃ 下孵育。3 d 后,用 PBS 冲洗 3 次,用无菌吸水纸收集菌丝体。将每 0.5 g 菌丝体悬浮在不同浓度(0、100、200 mg/L)GBEE 中,在相同条件下进一步孵育,然后分别在 0、2、4、6、8、10、12 h 将菌体用 PBS 冲洗,滤纸吸干表面水分,放入研钵中,加入 10 mL PBS,研磨至匀浆状态,4 ℃、10 000 r/min 离心 10 min,上清液即为酶

提取液。上清液用生理盐水定容至 10 mL。取 0.2 mL 上清液(酶液)加入 2.8 mL 30 mmol/L 的 H_2O_2 (采用 pH 7.8, 浓度 50 mmol/L 的 PBS 配制)中。反应 10 s 后于 240 nm 处测定其吸光度,至少连续测定 3 min。保持每隔 1 min 记录 1 次吸光度,直至数值没有明显变动。酶活性单位标准:以 1 min 内 240 nm 处吸光度降低 0.01 为 1 个酶活性单位。结果以 $U/(g \cdot min)$ 表示。对照组采用煮沸失活同体积酶液。计算公式同过氧化物酶的计算公式。

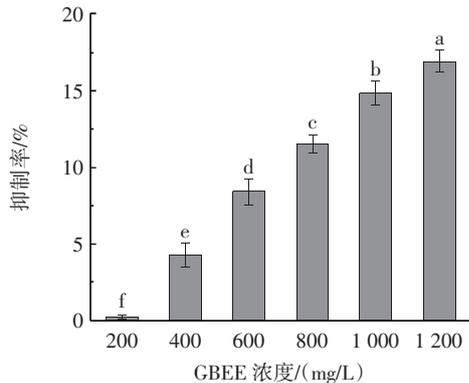
1.4 数据分析

所有样品均重复分析,取平均值。平均值和标准差用 Microsoft Office Excel 2016 计算。采用 SPSS 统计软件进行单因素方差分析。 $p < 0.05$ 为差异有统计学意义。所有的图表分别使用 Origin 8.0 创建。

2 结果与分析

2.1 银杏外种皮提取物对苹果链格孢霉的抑制作用

银杏外种皮水提取物对苹果链格孢霉的抑制效果见图 1。



不同小写字母表示差异显著, $p < 0.05$ 。

图 1 银杏外种皮水提取物对苹果链格孢霉的抑制效果

Fig.1 Inhibitory effect of *Ginkgo biloba* exocarp water extract on *Alternaria alternata* in apples

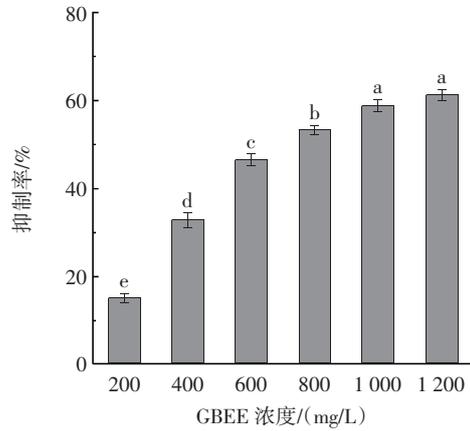
由图 1 可知,银杏外种皮水提取物浓度为 200 mg/L 时,对苹果链格孢霉基本没有抑制效果,浓度为 1 200 mg/L 时,抑菌率为 16.94%。

银杏外种皮乙醇提取物对苹果链格孢霉的抑制效果见图 2。

由图 2 可知,GBEE 浓度为 1 200 mg/L 时,抑菌率为 61.39%,抑菌效果为水提取物的 3.6 倍,并以剂量依赖的方式明显抑制了链格孢霉菌丝体的生长。银杏外种皮乙醇提取物的抑制效果更好。用 SPSS 分析得到 IC_{50} 值为 744.074 mg/L。

2.2 乙醇提取物对链格孢霉孢子萌发和芽管伸长的影响

银杏外种皮乙醇提取物对苹果链格孢霉菌孢子

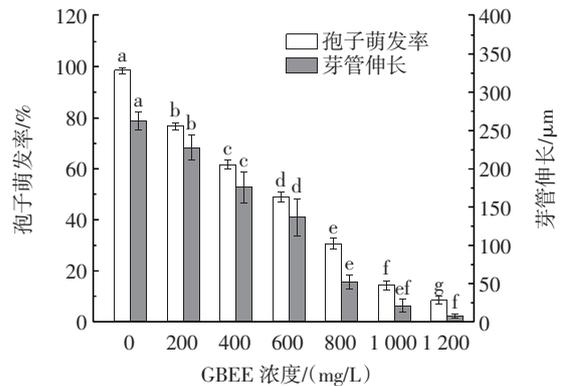


不同小写字母表示差异显著, $p < 0.05$ 。

图 2 银杏外种皮乙醇提取物对苹果链格孢霉的抑制效果

Fig.2 Inhibitory effect of *Ginkgo biloba* exocarp ethanol extract on *Alternaria alternata* in apples

萌发率和芽管伸长的影响见图 3。



不同小写字母表示组间差异显著, $p < 0.05$ 。

图 3 银杏外种皮乙醇提取物对苹果链格孢霉菌孢子萌发率和芽管伸长的影响

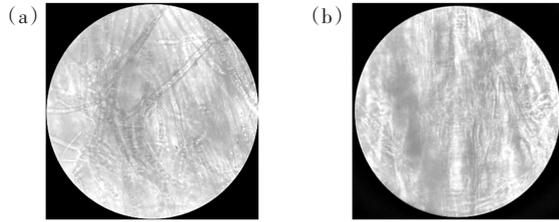
Fig.3 Effect of ethanol extract of *Ginkgo biloba* exocarp on spore germination and germ tube elongation of *Alternaria alternata* in apples

由图 3 可知,不同浓度的 GBEE 对链格孢霉孢子萌发率和芽管伸长具有显著的抑制作用($p < 0.05$),孵育 12 h 后,对照组中的所有链格孢霉孢子均发芽,萌发率达 98.63%。而 1 000 mg/L 和 1 200 mg/L GBEE 处理组的孢子萌发率分别为 14.28% 和 8.37%,链格孢霉孢子萌发被显著抑制($p < 0.05$)。此外,链格孢霉芽管伸长对 GBEE 敏感,GBEE 浓度的增加抑制了芽管的伸长。孵育 12 h 后,对照中的芽管长度为 262 μm ,1 000 mg/L GBEE 处理组的芽管长度为 21 μm 。

2.3 乙醇提取物处理链格孢霉菌形态学观察

银杏外种皮乙醇提取物处理苹果链格孢霉菌形态学观察结果见图 4。

如图 4 所示,用光学显微镜观察发现 GBEE 对苹



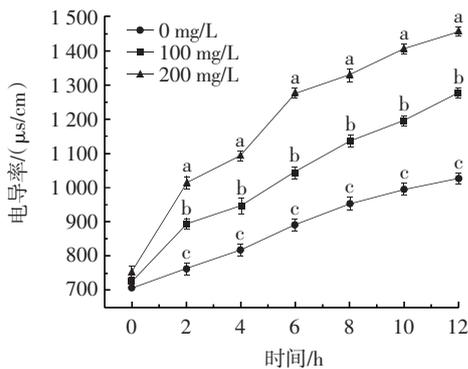
(a)未添加 GBEE 的对照组;(b)添加 GBEE 的处理组。

图4 银杏外种皮乙醇提取物处理苹果链格孢霉菌形态学观察结果
Fig.4 Morphological observation of *Alternaria alternata* in apples treated with ethanol extract of *Ginkgo biloba* exocarp

果链格孢霉菌细胞壁具有明显破坏作用,改变了细胞膜结构和其通透性:GBEE 处理的链格孢霉菌菌丝出现断裂、变细、变形且无细胞壁间隔。因此判断 GBEE 能破坏链格孢霉菌细胞壁和细胞膜的完整性^[11],使胞内物质渗出,菌丝体和分生孢子变形,从而使链格孢霉菌生长代谢受到影响。

2.4 银杏外种皮乙醇提取物对苹果链格孢霉菌细胞膜通透性的影响

银杏外种皮乙醇提取物对苹果链格孢霉菌细胞膜通透性的影响见图5。



不同小写字母表示组间差异显著, $p < 0.05$ 。

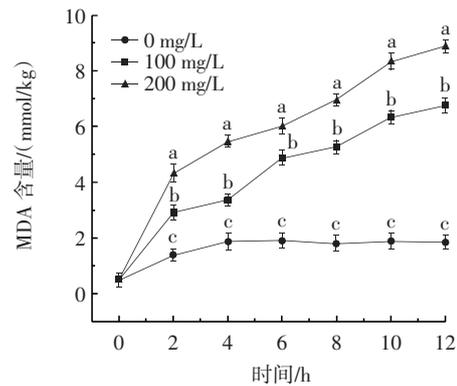
图5 银杏外种皮乙醇提取物对苹果链格孢霉菌细胞膜通透性的影响
Fig.5 Effect of *Ginkgo biloba* exocarp ethanol extract on cell membrane permeability of *Alternaria alternata* in apples

细胞膜对维持细胞内环境的稳定和机体新陈代谢发挥着重要作用。细胞膜可以将细胞与外界环境分隔,维稳胞内环境并选择控制物质进出细胞。膜系统被破坏的一个重要指标是细胞膜的通透性增大^[12],菌体生长繁殖的时候,会大量吸收培养液中的无机盐等营养物质。一般情况下,电导率指标随时间推移逐渐下降,代表营养物质被吸收。而当菌体遭到逆境迫害时^[13],首先作用于菌体细胞膜,使其通透性变大,胞内物质外泄,导致细胞破裂死亡。因此,膜透性的大小可用电解质渗透率即电导率的变化来衡量,以佐证细胞膜系统是否遭到损伤和破坏^[14]。由图5可知,GBEE 处理明显提高了胞外电导率,所有处理组都随着处理时间

的延长而增加。然而,用 100 mg/L 或 200 mg/L GBEE 处理的链格孢霉菌的电导率高于对照(0 mg/L)。孵育 2 h,用 200 mg/L GBEE 处理的链格孢霉菌的电导率迅速增加,说明链格孢霉菌受到 GBEE 的刺激,对细胞膜破坏较严重,胞内物质泄漏,使培养液电导率升高^[15]。

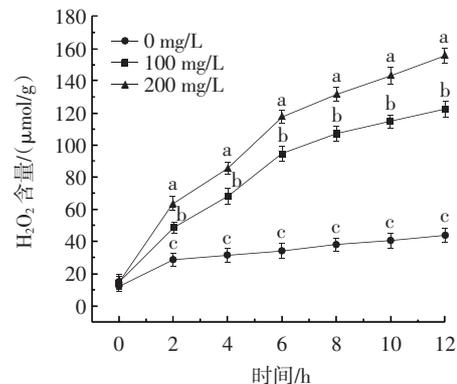
2.5 银杏外种皮乙醇提取物对苹果链格孢霉菌细胞膜损伤的影响

生物体发生器官衰老时或逆境条件时,细胞内活性氧代谢平衡被破坏。活性氧积累与膜上受体、酶等反应生成丙二醛(MDA)。生物膜上发生的膜脂过氧化反应,破坏了细胞膜通透性,不利于细胞与外界进行稳定的物质交换。MDA 和 H_2O_2 作为产物,其含量高低表示膜脂过氧化程度。同时也反映细胞对逆境条件耐受的强弱,正常的脂质过氧化反应对机体的新陈代谢有着重要的作用^[16]。MDA 和 H_2O_2 是细胞膜损伤的主要指标,脂质过氧化和氧化应激是造成杀真菌作用的主要机制。MDA 和 H_2O_2 含量反映了对细胞膜的损伤程度,具体见图6和图7。



不同小写字母表示组间差异显著, $p < 0.05$ 。

图6 银杏外种皮乙醇提取物对苹果链格孢霉菌 MDA 含量的影响
Fig.6 Effect of *Ginkgo biloba* exocarp ethanol extract on the MDA content of *Alternaria alternata* in apples



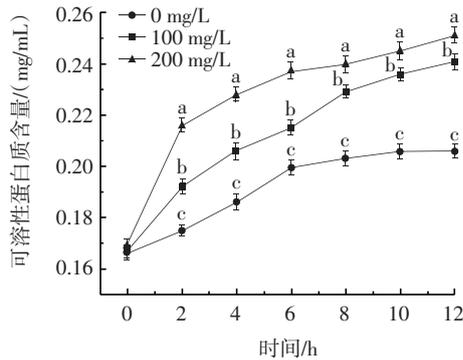
不同小写字母表示组间差异显著, $p < 0.05$ 。

图7 银杏外种皮乙醇提取物对苹果链格孢霉菌 H_2O_2 含量的影响
Fig.7 Effect of *Ginkgo biloba* exocarp ethanol extract on the H_2O_2 content of *Alternaria alternata* in apples

由图6和图7可知,GBEE可增加链格孢霉MDA和H₂O₂含量。200 mg/L GBEE处理12 h后,链格孢霉菌丝中的MDA和H₂O₂含量显著高于对照组(MDA为8.896 mmol/kg,是对照组的4.86倍,而H₂O₂为155.794 μmol/g,是对照组的3.51倍),表明银杏外种皮乙醇提取物有效地损伤了苹果链格孢霉菌细胞膜,加剧了链格孢霉菌膜脂过氧化进程。

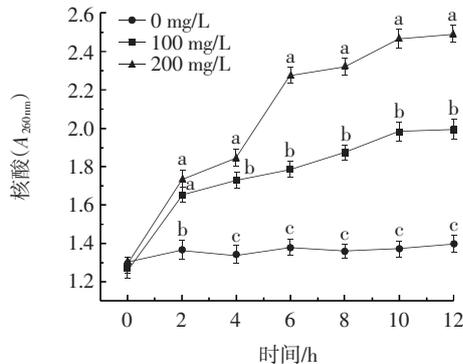
2.6 银杏外种皮乙醇提取物对苹果链格孢霉蛋白质、核酸泄漏量的影响

培养液中蛋白质、核酸含量可以反映抑菌剂对菌体细胞膜的破坏程度和细胞膜通透性的变化,还可以反映对蛋白质、核酸的渗漏情况^[7]。银杏外种皮乙醇提取物对苹果链格孢霉蛋白质、核酸泄漏量的影响见图8和图9。



不同小写字母表示组间差异显著, $p < 0.05$ 。

图8 银杏外种皮乙醇提取物对苹果链格孢霉蛋白质泄漏量的影响
Fig.8 Effect of ethanol extract of *Ginkgo biloba* exocarp on the leakage of protein of *Alternaria alternata* in apples



不同小写字母表示组间差异显著, $p < 0.05$ 。

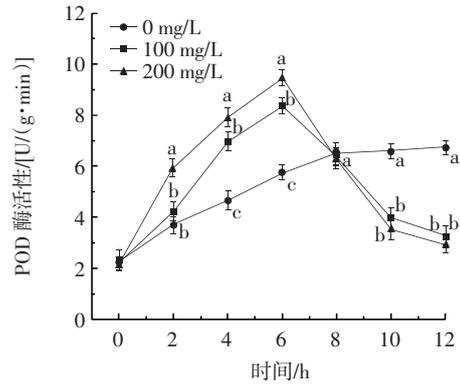
图9 银杏外种皮乙醇提取物对苹果链格孢霉核酸泄漏量的影响
Fig.9 Effect of ethanol extract of *Ginkgo biloba* exocarp on the leakage of nucleic acid of *Alternaria alternata* in apples

由图8和图9可知,GBEE以剂量依赖的方式诱导链格孢霉菌丝体的大量蛋白质和核酸渗漏。0~2 h,试验组蛋白质、核酸含量迅速升高,是因为加入GBEE对细胞膜破坏程度加剧,细胞与外界进行物质交换的选择性丧失,导致蛋白质、核酸渗漏,蛋白质、核酸透过

细胞膜渗透到培养液中致使溶液中蛋白质、核酸含量迅速攀升。

2.7 银杏外种皮乙醇提取物对苹果链格孢霉 POD 酶活性的影响

银杏外种皮乙醇提取物对苹果链格孢霉 POD 酶活性的影响见图10。



不同小写字母表示组间差异显著, $p < 0.05$ 。

图10 银杏外种皮乙醇提取物对苹果链格孢霉 POD 酶活性的影响
Fig.10 Effect of ethanol extract of *Ginkgo biloba* exocarp on POD enzyme activity of *Alternaria alternata* in apples

由图10可知,GBEE处理后链格孢霉菌的POD酶活性呈先上升后下降的趋势,但随着培养时间的延长,8 h后处理组明显低于对照组POD酶活性,0~6 h内,处理组酶活性上升,高于对照组,这可能是因为链格孢霉出现对外界的应激反应,机体对细胞的保护作用使得产生的过氧化物含量升高,机体POD酶合成水平提高^[18]。6 h后,POD酶活力开始下降,表明链格孢霉菌在逆境环境中遭到严重破坏,部分POD酶失活,降低了H₂O₂等活性氧的清除能力,从而对链格孢霉产生抑制作用^[19]。

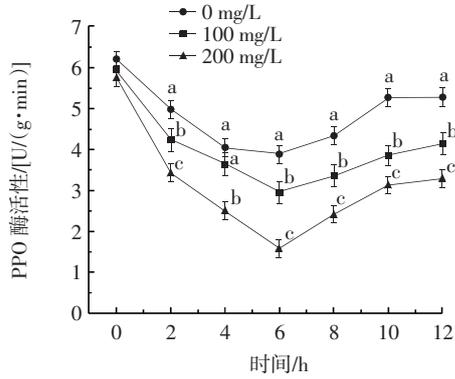
2.8 银杏外种皮乙醇提取物对苹果链格孢霉多酚氧化酶活性的影响

多酚氧化酶(polyphenoloxidase, PPO)是一类与植物的抗病性和微生物的抗逆性密切相关的酶类,能够催化酚类物质形成对病原菌有抑制作用的醌类物质^[20]。银杏外种皮乙醇提取物对苹果链格孢霉PPO酶活性的影响见图11。

如图11所示,GBEE处理后链格孢霉菌的PPO酶活性呈先下降后上升的趋势,12 h后处理组酶活性显著低于对照组($p < 0.05$),0~6 h处理组链格孢霉PPO酶活性迅速降低。6 h后,PPO酶活性出现小幅度的恢复,但仍远低于正常条件下的酶活水平,说明链格孢霉在逆境胁迫下,机体做出应激反应,但其抗逆性较差。

2.9 银杏外种皮乙醇提取物对苹果链格孢霉过氧化氢酶活性的影响

过氧化氢酶(catalase, CAT)是一种酶的清除剂,也

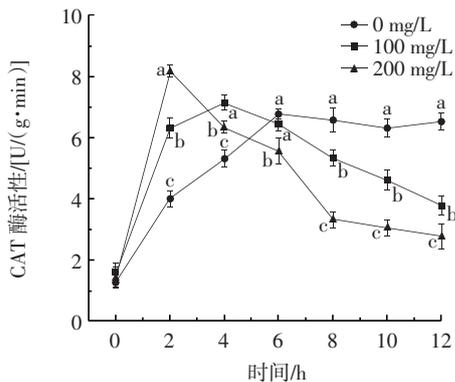


不同小写字母表示组间差异显著, $p < 0.05$ 。

图 11 银杏外种皮乙醇提取物对苹果链格孢霉 PPO 酶活性的影响

Fig.11 Effect of ethanol extract of *Ginkgo biloba* exocarp on PPO enzyme activity of *Alternaria alternata* in apples

被称为过氧化氢酶,它是一种以铁卟啉为辅料的结合酶。银杏外种皮乙醇提取物对苹果链格孢霉 CAT 酶活性的影响见图 12。



不同小写字母表示组间差异显著, $p < 0.05$ 。

图 12 银杏外种皮乙醇提取物对苹果链格孢霉 CAT 酶活性的影响

Fig.12 Effect of ethanol extract of *Ginkgo biloba* exocarp on CAT enzyme activity of *Alternaria alternata* in apples

由图 12 可知,GBEE 处理后链格孢霉菌的 CAT 酶活性呈先上升后下降的趋势,但随着培养时间的延长,6 h 后处理组明显低于对照组 CAT 酶活性。0~2 h 内,处理组 CAT 酶活性明显上升,明显高于对照组 CAT 酶活性,说明链格孢霉出现对外界逆境环境的应激反应,机体对细胞的保护作用,使 CAT 酶活性升高。2 h 后,CAT 酶逐渐失活,无法正常参与胁迫反应。

3 结论

银杏外种皮提取物的抑菌作用呈浓度依赖性,水溶性提取物于 1 200 mg/L 抑菌率达到 16.94%,乙醇提取物于 1 200 mg/L 抑菌率达到 61.39%,约是水溶性提取物的 3.6 倍,IC₅₀ 值为 744.074 mg/L。不同浓度的银杏外种皮乙醇提取物对链格孢霉孢子萌发和芽管伸长具有显著的抑制作用,对照组中的所有链格孢霉孢子

均发芽,萌发率达 98.63%,而 1 000 mg/L GBEE 处理组的孢子发芽率为 14.28%。对照中的芽管长度为 262 μm,处理组的芽管长度为 21 μm。通过光学显微镜观察到处理组的链格孢霉菌菌丝出现断裂、变细、变形且无细胞壁间隔。此外,银杏外种皮乙醇提取物使苹果链格孢霉菌体细胞膜通透性增加,膜脂过氧化程度加剧,MDA 和 H₂O₂ 含量升高,分别为对照组的 4.86 倍和 3.51 倍。银杏外种皮乙醇提取物使胞内核酸、蛋白质外泄,并抑制抗性相关酶活性。因此,得出乙醇提取物的抑菌效果好,其抑制行为通过破坏苹果链格孢霉菌的细胞膜完整性和抑制抗性相关酶活性实现。

参考文献:

- [1] 沈婷婷,许爱华,郑媛媛,等. 银杏外种皮提取物对 C₅₇BL/6J 小鼠 Lewis 肺癌转移的抑制作用及其机制[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2013, 27(1): 67-71.
- [2] SHEN Tingting, XU Aihua, ZHENG Yuanyuan, et al. Anti-metastasis effect of *Ginkgo biloba* exocarp extracts on metastasis of Lewis lung cancer in C₅₇BL/6J mice and its mechanism[J]. Chinese Journal of Pharmacology and Toxicology, 2013, 27(1): 67-71.
- [3] 张心慧,郭起荣,汪贵斌,等. 银杏外种皮研究进展[J]. 黑龙江农业科学, 2018(11): 156-160.
- [4] ZHANG Xinhui, GUO Qirong, WANG Guibin, et al. Research progress of *Ginkgo biloba* sarcotesta[J]. Heilongjiang Agricultural Sciences, 2018(11): 156-160.
- [5] 门小鹏,许雪峰,王玉斌,等. 我国苹果生产的现状、问题与发展对策[J]. 农村实用技术, 2022(1): 25-27, 59.
- [6] MEN Xiaopeng, XU Xuefeng, WANG Yubin, et al. Present situation, problems and development countermeasures of apple production in China[J]. Nongcun Shiyong Jishu, 2022(1): 25-27, 59.
- [7] EL GHAOUTH A, WILSON C, WISNIEWSKI M. Biologically-based alternatives to synthetic fungicides for the control of postharvest diseases of fruit and vegetables[M]// Diseases of fruits and vegetables: Volume II. Dordrecht: Springer Netherlands, 2004.
- [8] SUN M Q, YE S H, XU Z C, et al. Endophytic *Bacillus altitudinis* Q7 from *Ginkgo biloba* inhibits the growth of *Alternaria alternata* in vitro and its inhibition mode of action[J]. Biotechnology & Biotechnological Equipment, 2021, 35(1): 880-894.
- [9] 王婧,翟伟卜,高环,等. 链格孢引起的病害严重危害农作物生产并危及农产品安全[J]. 植物保护, 2017, 43(4): 9-15.
- [10] WANG Jing, ZHAI Weibo, GAO Huan, et al. Serious damage to crop production caused by *Alternaria* diseases and the safety of agricultural products[J]. Plant Protection, 2017, 43(4): 9-15.
- [11] 周洁尘,周国英,刘君昂,等. 垂序商陆及胜红蓟提取物对降香黄檀炭疽病菌的抑菌机理研究[J]. 植物保护, 2017, 43(4): 46-50, 60.
- [12] ZHOU Jiechen, ZHOU Guoying, LIU Jun'ang, et al. Antifungal mechanisms of the ethyl acetate extracts from *Phytolacca americana* and *Ageratum conyzoides* against *Colletotrichum gloeosporioides* of *Dalbergia odorifera*[J]. Plant Protection, 2017, 43(4): 46-50, 60.
- [13] 李德全,汪宝华,曹云英,等. 生防菌 NH-8 及其高效突变体诱导番茄抗性的比较[J]. 江苏农业科学, 2021, 49(7): 111-114.
- [14] LI Dequan, WANG Baohua, CAO Yunying, et al. Comparison of systemic resistance induced by biocontrol agent NH-8 and its high efficient mutant in tomato[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2021, 49(7): 111-114.

- [9] 陈旭,周涛,黄志芳,等.新鲜丹参中酚酸成分的含量测定及其多酚氧化酶对含量的影响研究[J].中国中药杂志,2021,46(5):1148-1154.
CHEN Xu, ZHOU Tao, HUANG Zhifang, et al. Content determination of phenolic acids in fresh *Salvia miltiorrhiza* and effect of polyphenol oxidase on content[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2021, 46(5): 1148-1154.
- [10] ULGEN C, YILDIRIM A B, SAHIN G, et al. Do magnetic field applications affect *in vitro* regeneration, growth, phenolic profiles, antioxidant potential and defense enzyme activities (SOD, CAT and PAL) in lemon balm (*Melissa officinalis* L.)?[J]. Industrial Crops and Products, 2021, 169: 113624.
- [11] JI D C, CHEN T, MA D Y, et al. Inhibitory effects of methyl thujate on mycelial growth of *Botrytis cinerea* and possible mechanisms[J]. Postharvest Biology and Technology, 2018, 142: 46-54.
- [12] 刘兴菊,马源,马晖玲,等.2,3-BD多次诱导对匍匐翦股颖抗褐斑病的效果[J].草原与草坪,2017,37(6):65-71,77.
LIU Xingju, MA Yuan, MA Huiling, et al. Resistance effects of creeping bentgrass on brown spot disease repeatedly induced by 2,3-BD[J]. Grassland and Turf, 2017, 37(6): 65-71, 77.
- [13] 李冲伟.菌株T-33抑菌活性物质及其对杨树烂皮病菌的抑制机理[D].哈尔滨:东北林业大学,2012.
LI Chongwei. Antifungal substances extracted from strain T-33 and its inhibiting mechanism on *Cytosporachrysosperma*[D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2012.
- [14] 林清洪,章宁,刘福平,等.银杏外种皮提取液对几种蔬菜和花卉病原菌的抑制效应研究[J].福建农业学报,2005,20(S1):87-89.
LIN Qinghong, ZHANG Ning, LIU Fuping, et al. Inhibition of extract from exopleura of *Ginkgo biloba* L. on pathogens of some economic crops[J]. Fujian Journal of Agricultural Sciences, 2005, 20(S1): 87-89.
- [15] YANG J, CHEN Y Z, WU Y X, et al. Inhibitory effects and mechanisms of vanillin on gray mold and black rot of cherry tomatoes[J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2021, 175: 104859.
- [16] 戴鹏辉.黑附球菌和植物提取物对蓝莓贮藏保鲜的影响[D].大连:大连理工大学,2019.
DAI Penghui. Effects of *Epicoccum nigrum* and plant extracts on postharvest preservation of blueberry[D]. Dalian: Dalian University of Technology, 2019.
- [17] MA D Y, JI D C, LIU J L, et al. Efficacy of methyl thujate in inhibiting *Penicillium expansum* growth and possible mechanism involved[J]. Postharvest Biology and Technology, 2020, 161: 111070.
- [18] 李春艳,朱宗财,张王斌.杨树响应腐烂病菌感染后抗性酶变化规律[J].林业科技,2022,47(3):31-35.
LI Chunyan, ZHU Zongcai, ZHANG Wangbin. Changes of resistant enzymes in poplar in response to rot pathogen infection[J]. Forestry Science & Technology, 2022, 47(3): 31-35.
- [19] 谢东锋,薛书浩,曾钰婷,等.采前微生物菌肥处理连作土壤对番茄生长及抗性酶活性的影响[J].北方园艺,2018(21):136-141.
XIE Dongfeng, XUE Shuhao, ZENG Yuting, et al. Effects of pre-harvest microbial fertilizers treatment of continuous cropping soil on tomato growth and resistance enzymes activity[J]. Northern Horticulture, 2018(21): 136-141.
- [20] YANG J, LIN L N, ZHANG X B, et al. Sodium pheophorbide a has photoactivated fungicidal activity against *Pestalotiopsis neglecta*[J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2019, 158: 25-31.

加工编辑:刘艳美

收稿日期:2022-10-13