

• 研究论文 •

不同温度下纳他霉素对灰葡萄孢的抑制活性和作用机理初探

张 鹏^a, 姜兴印^{* a}, 房 锋^a, 纪春涛^a
王建国^a, 张培正^b, 李大鹏^b

(山东农业大学 a 植物保护学院, b 食品科学与工程学院, 山东 泰安 271018)

摘 要:采用菌丝生长速率法测定了不同温度下纳他霉素和乙霉威对灰葡萄孢 *Botrytis cinerea* 的抑制活性,同时采用药液培养法间接测定了不同温度下药剂对菌丝体糖、蛋白和电解质渗漏的影响。结果表明:纳他霉素对菌丝生长的抑制中浓度 (EC_{50}) 在 25°C 下为 37.42 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 在 5°C 下为 0.984 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 活性提高了 37 倍;乙霉威对供试菌的活性在 5°C 下较 25°C 提高了 5 倍。25°C 下经纳他霉素处理 8 h 后,菌丝体可溶性糖渗漏量为 6.5 mg/g, 蛋白渗漏量为 162 $\mu\text{g}/\text{g}$, 药液电导率为 700 $\mu\text{s}/\text{cm}$, 均显著高于相同条件下的 0.1% 吐温-80 对照和乙霉威处理。不同处理温度之间,温度越低菌丝内含物的渗漏量越少。

关键词:纳他霉素;灰葡萄孢;抑制作用;作用机理

中图分类号: S481.1

文献标志码: A

文章编号: 1008-7303(2007)04-0351-06

Primary Studies on Inhibitory Activity of Natamycin to *Botrytis cinerea* under Different Temperatures and its Action Mechanism

ZHANG Peng^a, JIANG Xing-yin^{* a}, FANG Feng^a, JI Chun-tao^a
WANG Jian-guo^a, ZHANG Pei-zheng^b, LI Da-peng^b

(a College of Plant Protection, b. College of Food Science and Engineering, Shandong Agricultural University, Taian 271018, Shandong Province, China)

Abstract Inhibitory activity of natamycin and diethofencarb to *Botrytis cinerea* Pers under different temperatures was tested by mycelium growth rate method. Mycelial leakage of sugar, protein and electrolyte was tested by liquid cultivate method indirectly. The results showed that EC_{50} values of natamycin were 37.42 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in 25°C, and 0.984 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in 5°C, increased 37-fold. The activity of diethofencarb to *B. cinerea* increased 5-fold. Eight hours after treated by natamycin, the sugar leakage was 6.5 mg/g, the protein leakage was 162 $\mu\text{g}/\text{g}$ and the conductance was 700 $\mu\text{s}/\text{cm}$. All of these were higher than that treated by 0.1% tween-80 (CK) and diethofencarb. The mycelial leakage decreased as the temperature fell down.

Key words natamycin; *Botrytis cinerea*; inhibitory activity; action mechanism

收稿日期: 2007-09-11; 修回日期: 2007-10-30

作者简介: 张鹏 (1983-), 男, 硕士研究生; * 通讯作者 (Author for correspondence): 姜兴印 (1967-), 男, 山东临沂人, 副教授, 博士, 主要从事农药毒理及农业有害生物无公害控制研究。联系电话: 0538-8241897; E-mail: xyjiang@sdau.edu.cn

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划课题 (2006BAK02A23)。

由灰葡萄孢 *B. cinerea* 引起的灰霉病 (Gray mold) 是我国北方保护地蔬菜生产中的一种重要病害, 可为害番茄、黄瓜、茄子、甜椒、草莓、葡萄等多种水果蔬菜, 平均造成减产 20%~40%, 严重的可达 60% 以上^[1,2]。该病菌还会引起果蔬贮藏过程中的腐烂, 缩短储藏期, 降低品质, 是果蔬贮藏中的重要病原菌^[3,4]。目前生产中普遍使用化学药剂对其进行防治, 但灰葡萄孢具有繁殖快、遗传变异大和适合度高的特点, 连续使用同一药剂易产生抗药性^[5]。随着人们对食品安全问题越来越关注, 寻找更加安全、广谱的生物源抑菌剂成为当前果蔬生产及采后保鲜病害控制的研究热点。

纳他霉素 (natamycin) 也称匹马霉素 (pimaricin), 商品名霉克, 是纳他链霉菌 *Streptomyces natalensis* 经发酵得到的一种次级代谢产物, 属多烯大环内酯类抗真菌剂, 能够选择性地抑制酵母菌和霉菌, 有良好的理化稳定性^[6]。降解后的纳他霉素在急性毒性和亚慢性毒性试验中对动物无损害^[7], 已成为许多国家广泛使用的一种天然生物源食品防腐剂和抗菌添加剂^[8]。目前国内有关纳他霉素的应用研究大多集中在食品保鲜方面^[8], 在果蔬保鲜领域的研究也已初见报道^[9-11], 但有关纳他霉素对灰葡萄孢的抑制活性及其作用机理的研究尚未见报道。

乙霉威 (diethofencarb) 属氨基甲酸酯类内吸性杀菌剂, 与苯并咪唑类杀菌剂有负交互抗性, 是目前生产中防治灰霉病的常用药剂, 特别对抗多菌灵的菌株有特效。

本研究以灰葡萄孢 *B. cinerea* 为靶标菌, 以乙霉威为对照药剂, 比较了不同温度下纳他霉素和乙霉威的活性差异, 初步研究了纳他霉素的作用机理, 以期为其用作农用杀菌剂防治田间及采后储藏期灰霉病提供一定的理论依据。

1 材料和方法

1.1 供试菌株

从山东省沂源县采集感染灰霉病的草莓果实。该地为山区, 零星种植草莓, 未使用过化学杀菌剂。菌株经室内分离、纯化培养后接种到草莓

上, 待发病后再分离、纯化培养, 经形态结构分析及显微观察证实为灰葡萄孢。

1.2 供试药剂及主要仪器

95% 的纳他霉素 (natamycin) 原药, 北京东方瑞德生物技术有限公司提供; 96.5% 的乙霉威 (diethofencarb) 原药, 江苏省新沂农药有限公司提供; 考马斯亮蓝, 进口分装; 萘酚, 分析纯。

HZQ-F160 全温振荡培养箱; DDS-II A 型电导率仪。

药剂配制参照“农药室内生物测定试验准则”^[12] 进行。纳他霉素先用 0.1 mol/L 的盐酸无菌水溶液配成 10 000 μg/mL 的母液, 乙霉威先用丙酮溶解, 配成 10 000 μg/mL 的母液, 再分别用 0.1% 的吐温-80 无菌水溶液稀释至所需浓度备用。经预备试验证实 0.01% 的吐温-80 对供试菌生长无影响。

1.3 不同温度下药剂对灰葡萄孢的活性测定

采用菌丝生长速率法^[13] 测定, 经 DPS 统计软件^[14] 分析求出毒力回归方程及抑制中浓度 EC_{50} 值。分别测定 25、20、15、10 和 5℃ 条件下纳他霉素和乙霉威对灰葡萄孢的抑制活性。

1.4 药剂对灰葡萄孢菌丝体内含物渗漏的影响

将灰葡萄孢接种于 PDA 培养基上, 25℃ 恒温培养 3 d 后用直径 5 mm 的灭菌打孔器取 8 个菌饼, 接入灭菌的、盛有 150 mL PD 培养基的三角瓶中, 20℃、120 r/min 振荡培养 7 d, 取出菌丝, 在超净工作台上用灭菌去离子水冲洗并抽滤, 洗掉附着在菌丝上的培养基。药液用灭菌去离子水配制成 25℃ 下的 EC_{50} 浓度。称取 10 g 洗净的菌丝放入盛有 50 mL 药液的三角瓶中, 置于 25℃ 的振荡培养箱中, 每隔 1 h 测定药液中可溶性糖及电导率的变化, 每隔 2 h 测定可溶性蛋白的变化, 连续测定 8 h, 每一处理重复 3 次, 对照添加 0.1% 的吐温-80 无菌水溶液。药液中糖、蛋白变化均换算成单位质量菌丝的渗漏量, 并同时于 20℃ 下测定电导率。按上述方法分别测定 20、15、10 和 5℃ 下糖、蛋白和电导率的变化, 药液浓度均为相应温度下的 EC_{50} 浓度。

$$\text{菌丝体内含物渗漏量} (\mu\text{g/g}) = \frac{\text{药液中渗漏物含量} (\mu\text{g/mL}) \times \text{药液体积} (\text{mL})}{\text{菌丝质量} (\text{g})}$$

可溶性糖测定: 采用萘酚比色法^[15]。

色法^[15]。

可溶性蛋白测定: 采用考马斯亮蓝 G-250 染

采用 DDS-II A 型电导率仪测定电导率。

2 结果与分析

2.1 不同温度下药剂对灰葡萄孢的抑制活性

由表 1 可知, 低温 (5、10℃) 下纳他霉素对灰

葡萄孢有很好的抑菌活性, 5℃ 时的 EC₅₀ 值为 0.984 0 μg/mL, 活性较 25℃ 提高了 37 倍, 乙霉威在 5℃ 时的活性较 25℃ 提高 5 倍, 证明纳他霉素对灰葡萄孢的活性随温度下降而显著提高。

表 1 不同温度下纳他霉素和乙霉威对灰葡萄孢的抑制作用

Table 1 Inhibitory activities of natamycin and diethofencarb to *B. cinerea* at different temperatures

| 药剂 Pesticides | 温度 Temperature/℃ | 毒力回归方程 Regression equation | EC ₅₀ (95% 置信限) EC ₅₀ (95% C.L.) / (μg/mL) | 毒力倍数 Toxicity ratio |
|----------------------|---------------------|-------------------------------|---|------------------------|
| 纳他霉素 Natamycin | 25 | Y = 3.730 6 + 0.806 9x | 37.42(35.65~40.26) | 1.0 |
| | 20 | Y = 4.776 8 + 0.159 0x | 25.35(22.09~29.11) | 1.5 |
| | 15 | Y = 4.412 6 + 0.301 2x | 20.21(16.28~25.15) | 1.9 |
| | 10 | Y = 5.036 3 + 0.113 3x | 1.48(1.24~1.81) | 25.3 |
| | 5 | Y = 5.006 8 + 0.970 4x | 0.98(0.72~1.25) | 38.2 |
| 乙霉威 Diethofencarb | 25 | Y = 2.063 0 + 1.452 0x | 151.21(125.24~175.24) | 1.0 |
| | 20 | Y = 1.410 3 + 1.710 5x | 125.51(98.12~153.69) | 1.2 |
| | 15 | Y = 1.215 4 + 1.854 9x | 100.25(84.22~112.22) | 1.5 |
| | 10 | Y = 1.320 1 + 1.546 8x | 60.21(51.25~71.15) | 2.5 |
| | 5 | Y = 2.101 3 + 1.356 2x | 25.14(22.15~29.31) | 6.0 |

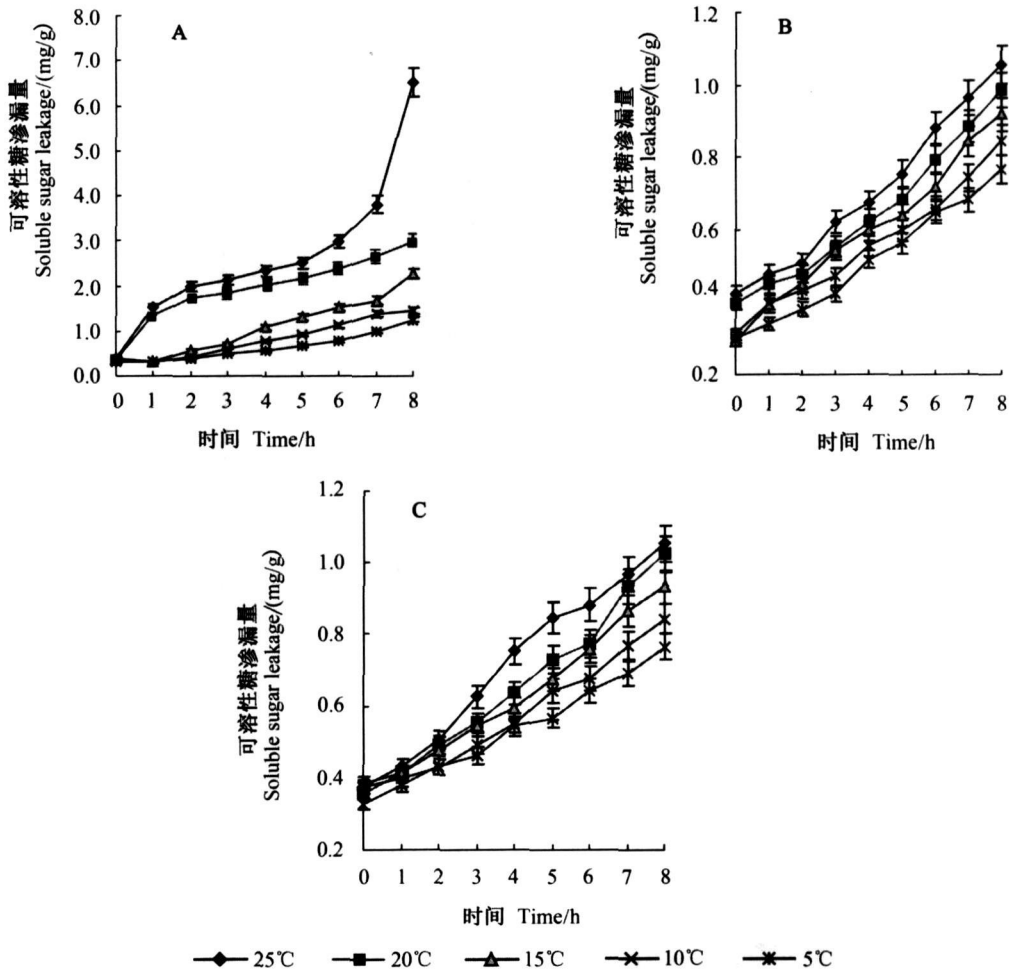


图 1 不同温度下药剂处理后菌丝体可溶性糖的渗漏量

Fig 1 Mycelial soluble sugar leakage after treated with different pesticides at different temperatures

Note: A. 纳他霉素 Natamycin; B. 乙霉威 Diethofencarb; C. 0.1% 吐温-80(对照) 0.1% Tween-80 (CK)

2.2 药剂对菌丝体内含物渗漏的影响

2.2.1 不同温度下药剂对菌丝体可溶性糖渗漏的影响 由图 1可知,菌丝体可溶性糖的渗漏随时间延长而加剧,经纳他霉素处理后糖渗漏量变化最显著。25℃下经纳他霉素处理 8 h后,单位质量菌丝体可溶性糖渗漏量达到 6.5 mg/g,为初始时的 16倍,乙霉威与空白对照处理分别为 2.5和 2.8倍。且相同条件下经纳他霉素处理后可溶性糖的渗漏量明显高于乙霉威及空白对照处理。20℃下经纳他霉素处理 7 h后,单位质量菌丝体可溶性糖渗漏量为 2.7 mg/g 而乙霉威与空白对照分别为 0.8和 0.9 mg/g。菌丝体可溶性糖渗漏量的相对变化和绝对变化都说明纳他霉素对菌丝体的破坏作用较乙霉威和空白对照显著。同一药剂在不同温度下处理,随温度下降菌丝体可溶性糖渗漏逐渐减少。5℃下经纳他霉素处理 8 h后可溶性糖的渗漏量仅为 25℃下的 19%,而乙霉威与空

白对照均为 25℃下的 73%,说明温度对纳他霉素作用效果的影响较大。

2.2.2 不同温度下药剂对菌丝体可溶性蛋白渗漏的影响 由图 2可知,经药剂处理后,菌丝体内可溶性蛋白的渗漏量亦随时间延长而增加。其中,经纳他霉素处理后可溶性蛋白的渗漏量显著高于空白对照,25℃下处理 8 h 单位质量菌丝体可溶性蛋白渗漏量达到 162 μg/g 较对照提高 50%;经乙霉威处理后的蛋白渗漏量与空白对照无明显差异。25℃下经纳他霉素处理 8 h后,单位质量菌丝体蛋白渗漏量较初始时提高了 67.4%,而乙霉威与空白对照处理分别为初始时的 24.5%和 17.4%。随处理温度下降,纳他霉素处理组菌丝体可溶性蛋白的渗漏量减少,20、15、10和 5℃下处理 8 h后的单位质量菌丝体蛋白渗漏量分别为 150、140、121、111 μg/g

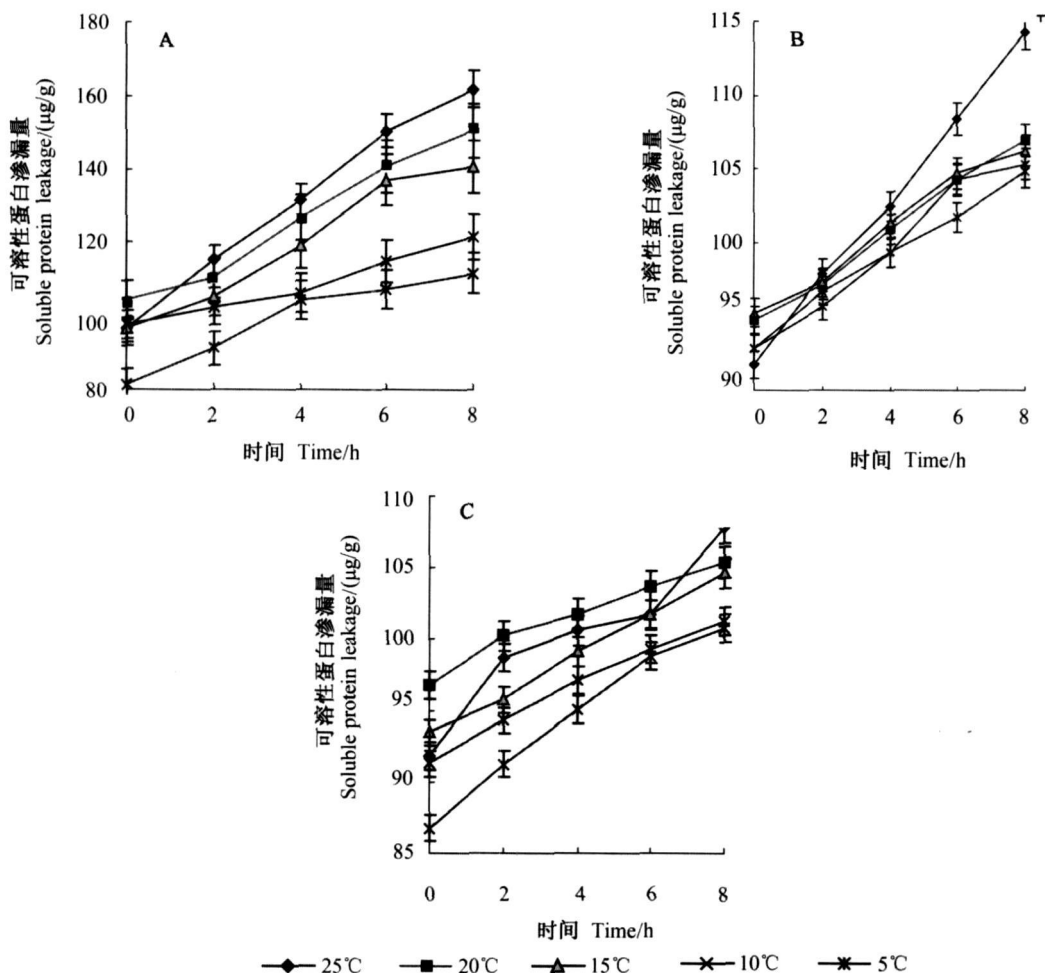


图 2 不同温度下药剂处理后菌丝体可溶性蛋白的渗漏量

Fig 2 Mycelial soluble protein leakage after treated with different pesticides at different temperatures

Note A. 纳他霉素 Natamycin; B. 乙霉威 Difenoconazole; C. 0.1% 吐温-80(对照) 0.1% Tween-80 (CK)

2.2.3 不同温度下药剂对菌丝体细胞膜通透性的影响 由图 3 可知,各处理药液的电导率均有不同程度的增加,说明药剂处理后菌丝体细胞膜的通透性增大,细胞内电解质出现外渗。25℃下经纳他霉素处理 8 h 后,药液电导率达到 700 $\mu\text{s}/\text{cm}$,分别为空白对照的 3.1 倍、乙霉威的 2.7 倍。该处理下,纳他霉素药液电导率是初始时

的 5.8 倍,而空白对照是初始时的 2.6 倍,说明经纳他霉素处理后菌丝体内电解质的平均渗漏速度显著高于对照。同一药剂处理相同时间后,随温度下降电导率降低,25、20、15、10 和 5℃下纳他霉素处理 8 h 后的电导率分别是 700、673、641、597 和 482 $\mu\text{s}/\text{cm}$,表明温度是菌丝体电解质渗漏的重要影响因素。

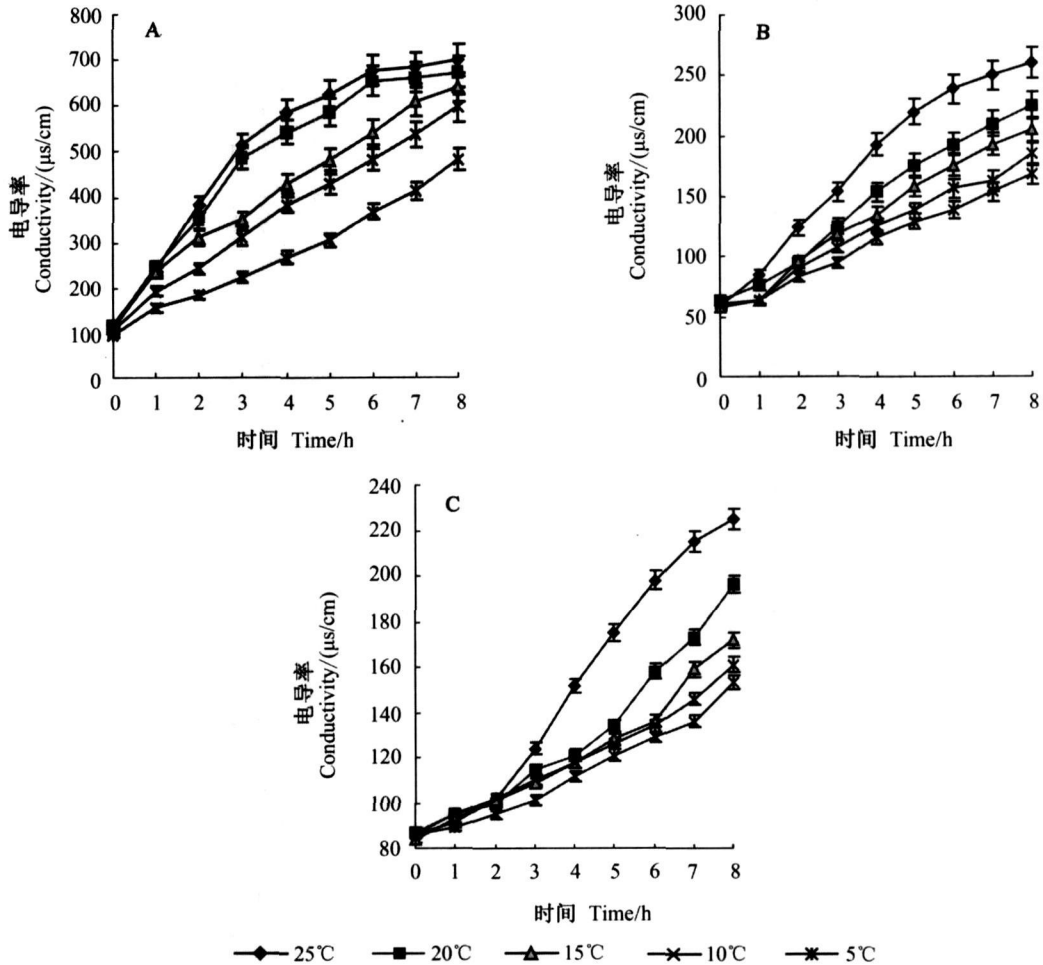


图 3 不同温度下药剂处理后电导率的变化

Fig. 3 Change of conductivity after treated with different pesticides at different temperatures

Note. A. 纳他霉素 Natamycin; B. 乙霉威 Dithofencarb; C. 0.1% 吐温-80(对照) 0.1% Tween-80 (CK)

3 讨论

2000年, Wyatt等^[16]研究了纳他霉素在饲料防霉中的应用,得出纳他霉素对各种曲霉的最小致死剂量(MIC值)都在 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下。王建国等^[10]研究了纳他霉素在冬枣贮藏中的应用,发现用纳他霉素 500~1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 处理可有效抑制贮藏期冬枣浆孢病菌 *Alternaria Nees ex Wallr* 的危害。本研究得出 25℃下纳他霉素对灰葡萄孢的 EC_{50} 值为 37.42 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。说明其具有一定的广谱

性,这与文献报道相符^[8]。

菌丝体内的糖、蛋白和电解质对其生命活动至关重要。正常情况下,由于细胞膜的保护作用,菌体细胞内物质不会渗漏。本试验通过测定药剂处理后菌丝体内糖、蛋白和电解质的渗漏情况,间接证明了纳他霉素的作用机理在于破坏菌丝细胞膜的结构,引起细胞膜通透性变化,造成内含物渗漏。有报道认为,纳他霉素的作用位点是真菌细胞膜上的甾醇^[7]。甾醇是构成细胞膜的主要成分,对细胞膜的通透性具有重要作用^[17]。但纳他

霉素对真菌的作用机理与现有甾醇生物合成抑制剂(SBI)的作用机理是否相同还有待进一步研究。

由试验结果可知,温度对菌丝体内糖、蛋白和电解质渗漏的影响较明显,这与温度对纳他霉素活性的影响较大相一致。相同时间内菌丝体内含物的渗漏量随温度升高而增加,说明菌体细胞膜的流动性与代谢活力增强,膜上靶标对药剂的作用更加敏感,造成的伤害更加明显。但毒力研究结果却表明,随温度升高,药剂的活性下降,这与温度对菌丝渗漏的影响似乎是矛盾的。但比较二者的测定方法可知,菌丝渗漏是在相对较短的时间内(8 h)测定的,且菌体处于营养匮乏状态,表现出的主要是温度对药剂作用的影响,对菌丝生长的影响甚微;而毒力测定是在相对较长的时间内(4 d)进行的,且菌体的营养源相对丰富,表现出的主要是温度对菌丝生长的影响。

本研究表明,纳他霉素在低温下有较好的抑菌作用,特别是在果蔬最佳保鲜温度范围(2~8℃)内对灰葡萄孢的抑制作用最佳,而且其作为一种生物源抗真菌剂,不易对人体产生伤害,因此研究纳他霉素在低温贮藏中的应用有着重要意义。纳他霉素的作用机理不同于多菌灵、乙霉威等目前生产中常用的药剂,因而作为辅助药剂使用可以延缓田间菌株抗药性的发展,符合果蔬生长中后期及采后对灰葡萄孢无公害防治的要求,因此该抗菌素作为农用杀菌剂应具有较好的应用前景。

参考文献:

- [1] FAN M u-zhen(樊慕贞), ZHU Jie-hua(朱杰华), HUANG T ian-cheng(黄天成). 草霉灰霉病的发生和防治研究 [J]. J Agric Univ Hebei(河北农业大学学报), 1995, 18(2): 21-30
- [2] JI M ing-shan(纪明山), Q I Z h i q i u (祁之秋), W A N G Y i n g - z i (王英姿). 番茄灰霉病菌对啞霉胺的抗药性 [J]. Acta Phytopythica Sinica(植物保护学报), 2003, 30(4): 396-400
- [3] T I A N S h i p i n g (田世平). 低温对葡萄孢菌(Botrytis cinerea)菌丝生长和孢子萌发以及对贮藏菊苣侵染力的影响 [J]. Acta Phytopathologica Sinica(植物病理学报), 2001, 31(1): 155-159
- [4] Z H A O S h u - y a n (赵淑艳), L I X i h o n g (李喜宏), C H E N L i (陈丽). 蒜薹采后致病菌种类及侵染规律研究 [J]. Chin Agric Sci Bull(中国农学通报), 2005, 21(9): 74-78
- [5] L I N K o n g - x u n (林孔勋). Toxicology of Fungicide(杀菌剂毒理学) [M]. Beijing(北京): China Agriculture Press(中国农业出版社), 1995 27.
- [6] B R I K H . Natamycin [C] // Analytical Profiles of Drug Substances New York: Academic Press 1994 514-557
- [7] F A N Y o u - r a n (范悠然). 纳他霉素——一种抗真菌生物防腐剂 [J]. China Food Additives(中国食品添加剂), 2006 (5): 165-171.
- [8] W E I B a o - d o n g (魏宝东), M E N G X i a n - j u n (孟宪军). 天然生物食品防腐剂纳他霉素的特性及其应用 [J]. Liaoning Agric Sci(辽宁农业科学), 2004, (2): 24-25
- [9] Y A N G D e - s h a n (杨德山), L U O J i a n - m e i (骆健美), X U G u a n g - y u (徐广宇). 纳他霉素防治苹果贮运期病害的初步研究 [J]. Chin Plant Protection(中国植保导刊), 2006 26(10): 11-13.
- [10] W A N G J i a n - g u o (王建国), J I A N G X i n g - y i n (姜兴印), Z H A N G P e n g (张鹏). 纳他霉素对冬枣浆胞病菌的毒力及保鲜生理效应研究 [J]. Chin J Pestic Sci(农药学学报), 2006 8(4): 313-318.
- [11] S U N Y u a n - g o n g (孙远功), H U Y u - x i a (呼玉侠), F E N G X i n (冯昕). 纳他霉素在柑桔防腐保鲜中的应用 [J]. Food Research and Development(食品研究与开发), 2006, 27(7): 190-192
- [12] N Y / T 1156 2—2006 农药室内生物测定试验准则 [S]. Beijing(北京): China Agriculture Press(中国农业出版社), 2006 1-3.
- [13] M U L i y i (慕立义). The Research Method of Plant Chemical Protection(植物化学保护研究方法) [M]. Beijing(北京): China Agriculture Press(中国农业出版社), 1994 76.
- [14] T A N G Q i y i (唐启义), F E N G M i n g - g u a n g (冯明光). Statistical Analysis and DPS Data Processing System(实用统计分析及其DPS数据处理系统) [M]. Beijing(北京): Science Press(科学出版社), 2002 135
- [15] L I H e - s h e n g (李合生), S U N Q u n (孙群), Z H A O S h i - j i e (赵世杰), et al Principles and Techniques of Plant Physiological and Biochemical Experiment(植物生理生化实验原理和技术) [M]. Beijing(北京): Higher Education Press(高等教育出版社), 2000 184.
- [16] W Y A T T R D, B R O T H E R S A M. The Antifungal Activity of Natamycin toward Molds Isolated from Commercially Manufactured Poultry Feed [J]. Avian Dis, 2000 44 (3): 490-497.
- [17] H A N X i k a i (韩薰莱). 新型内吸杀菌剂麦角甾醇生物合成抑制剂(EBIs) [J]. J Plant Protec(植物保护), 1984 (6): 22-24.

(Ed. TANG J)