

哈茨木霉发酵液乙酸乙酯提取物对致病疫霉生理指标的影响

杨立宾¹ 宋瑞清¹ 李冲伟²

(1 东北林业大学林学院 2 黑龙江大学生命科学学院)

摘要:为了探明哈茨木霉菌株发酵液乙酸乙酯提取物对致病疫霉生长的抑制机理,采用生化方法对经提取物处理的致病疫霉菌体内保护酶活性、菌体可溶蛋白含量、丙二醛(MDA)含量、电导率、呼吸速率的影响进行了研究。结果表明:提取物处理的致病疫霉菌体的超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性与对照相比显著降低,48 h分别下降了89.06%、86.96%、97.47%和97.63%;菌体处理48 h后可溶性蛋白含量下降了62.5%,而MDA含量上升了60.98%;处理后病菌电导率一直呈上升状态,呼吸速率缓慢下降,处理48 h后,电导率上升了40.89%,呼吸速率下降为0。综上,哈茨木霉发酵液乙酸乙酯提取物可降低致病疫霉菌体可溶性蛋白含量,降低菌体保护酶(SOD、CAT、POD)活性,提高菌体MDA含量,提高菌体电导率,降低菌体呼吸速率。提取物处理后,致病疫霉系统清除自由基出现障碍、细胞膜被破坏、电解质外露,致使致病疫霉菌体遭受损坏,这可能是哈茨木霉发酵液乙酸乙酯提取物抑制致病疫霉生长的机理之一。

关键词:哈茨木霉;提取物;致病疫霉;生理指标

中图分类号:S432 文献标志码:A 文章编号:1000-1522(2013)02-0092-05

YANG Li-bin¹; SONG Rui-qing¹; LI Chong-wei². **Effects of ethyl acetate extract of *Trichoderma harzianum* fermentation liquid on physiological index of *Phytophthora infestans*.** *Journal of Beijing Forestry University* (2013)35(2)92-96[Ch, 19 ref.]

1 College of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin, 150040, P. R. China;

2 College of Life Sciences, Heilongjiang University, Harbin, 150080, P. R. China.

In order to know the inhibition mechanism of ethyl acetate extract of *Trichoderma harzianum* fermentation liquid on the growth of *Phytophthora infestans*, the effects of the extract on pathogen physiological indexes, such as protective enzyme activity, cell content of soluble protein, malondialdehyde (MDA) content, electrical conductivity and respiration rate, were studied by biochemical method. The results indicated that the pathogen's protective enzyme activities decreased significantly after treated by extract. Forty-eight hours after treatment, the enzyme activity of SOD, CAT, POD and GSH-Px decreased by 89.06%, 86.96%, 97.47% and 97.63% respectively, content of soluble protein reduced by 62.5%, content of MDA increased by 60.98%, electrical conductivity increased by 40.89%, and respiration rate decreased to 0. In conclusion, ethyl acetate extract which was extracted from the fermented liquid of *T. harzianum* reduced the pathogen's soluble protein content. Protective enzyme (SOD, CAT, POD and GSH-Px) activity and respiration rate were also reduced. Ethyl acetate extract was also found to increase MDA content and electrical conductivity. This means the extract can cause the systems of *P. infestans* to be changed through, for example, scavenging free radicals, cell membrane damage and electrolyte exposure, resulting in the *P. infestans* body being damaged. This may be one of the inhibiting mechanisms of ethyl acetate extract of *T. harzianum* to the growth of *P. infestans*.

Key words *Trichoderma harzianum*; extract; *Phytophthora infestans*; physiological index

致病疫霉 (*Phytophthora infestans* Montagne de Bary) 是活体营养型的致病卵菌,在现代生物分类系统中隶属假菌界 (Kingdom Chromista)、卵菌门 (Oomycota)、卵菌纲 (Oomycetes)、霜霉目

收稿日期:2012-04-11 修回日期:2012-05-25

基金项目:“948”国家林业局引进项目(2009-4-39)。

第一作者:杨立宾,博士生,助理研究员。主要研究方向:植物病理与菌物开发利用。Email:ylb1128@qq.com 地址:150040 黑龙江省哈尔滨市和兴路26号东北林业大学林学院。

责任作者:宋瑞清,教授,博士生导师。主要研究方向:林木病理与菌物开发利用。Email:songrq1964@163.com 地址:同上。

本刊网址: <http://journal.bjfu.edu.cn>

(Peronosporales)、腐霉科(Pythiaceae)、疫霉属(*Phytophthora*)^[1]。致病疫霉是引起晚疫病的主要病原菌,主要侵染马铃薯(*Solanum tuberosum*)、番茄(*Lycopersicon esculentum*)等多种茄科植物^[2]。由致病疫霉引起的马铃薯晚疫病,是所有引起粮食作物产量损失病害中最严重的一种真菌病害^[3]。哈茨木霉(*Trichoderma harzianum*)是一种优良的生防菌,具有广谱性、广泛适应性和多机制性等特点^[3]。据不完全统计^[4-5]统计,木霉至少对18个属29种病原真菌在体外或体内表现有抑制作用。它通过产生抗菌素、重寄生作用、溶菌作用、竞争作用等^[6]有效地抑制真菌性病害。

超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)及过氧化物酶(POD)是广泛存在于动物、植物、微生物中的保护酶,它们相互协调,能够维持细胞内氧自由基的产生与清除的动态平衡,防止氧自由基的毒害作用^[7-8]。谷胱氨肽过氧化酶(GSH-Px)是生物体内重要的抗氧化酶和保护酶,可保护细胞膜免受过氧化物的刺激和损伤^[9-10];而丙二醛(MDA)含量是膜脂氧化的主要产物,也是膜系统受害的重要标志之一^[11];这2种生理指标变化情况可以反映出生物体细胞膜系统的被破坏情况。很多研究表明,胁迫与动植物细胞保护酶活性及其丙二醛含量密切相关^[12-14]。本课题组前期研究表明,哈茨木霉发酵液乙酸乙酯提取物对致病疫霉菌丝体生长、孢子囊萌发和孢子囊释放游动孢子均有较强的抑制作用;因此,本文拟从哈茨木霉发酵液乙酸乙酯提取物对致病疫霉处理过程中,致病疫霉菌体生理指标变化的角度,探讨其抑菌机理,为致病疫霉的生物防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试菌株培养及处理

哈茨木霉(*Trichoderma harzianum* Rifai)与致病疫霉(*Phytophthora infestans* Montagne de Bary)菌株均由东北林业大学提供。

哈茨木霉乙酸乙酯提取物制备(以下简称提取物):将哈茨木霉菌株接种到PD培养基中,25℃、120 r/min培养7 d后,过滤,取滤液;按发酵液:乙酸乙酯=1:3的体积比萃取3次后合并,旋转蒸发、旋干后,用5 mL吐温-80溶解。

用PD培养基培养致病疫霉7 d后,过滤,取菌体,用无菌水洗净,按菌体:提取物=1:50的质量与体积比浸泡,常温下分别处理3、6、9、12、24、48 h后,制备菌体组织液。测定SOD、CAT、POD、GSH-Px活性,MDA和蛋白含量,电导率和呼吸速率的变化。

以10%吐温-80水溶液处理菌丝体作为对照。

1.2 酶液的制备及活性测定

酶液的制备:分别称取不同时间处理的菌体1 g,液氮研磨,按质量与体积比加入(SOD酶液加入pH7.8的缓冲液,CAT、POD、GSH-Px酶液加入pH7.0的缓冲液)50 mmol的冷磷酸缓冲液10 mL,4℃、10 000 r/min冷冻离心20 min,上清液即为酶液^[15]。

3种酶活性、MDA含量均采用南京建成生物工程研究所提供的试剂盒测定,蛋白含量采用考马斯亮蓝法测定^[16],电导率采用Sension™5电导仪测定,呼吸速率采用Oxygraph氧电极测定。

1.3 数据处理

采用SPSS软件进行数据处理和分析。

2 结果与分析

2.1 提取物对致病疫霉菌体组织液可溶性蛋白含量的影响

致病疫霉菌体组织液可溶性蛋白含量标准曲线(图1)的线性方程为 $y = 0.87x + 0.0361$, $R^2 = 0.9902 > 0.99$ 。致病疫霉菌体被提取物处理后,其蛋白含量快速下降,12 h后趋于平稳,12、24、48 h的蛋白含量之间无显著性差异;对照组可溶性蛋白含量呈缓慢下降趋势,处理组可溶性蛋白含量总体低于对照组(图2)。

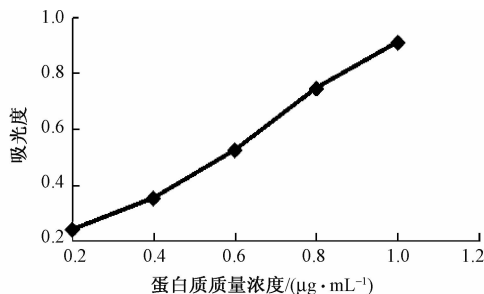


图1 蛋白含量标准曲线

Fig. 1 Standard curves of protein content

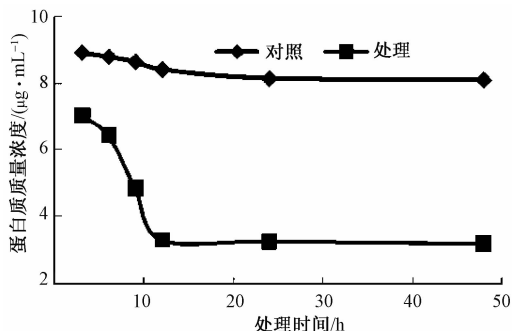


图2 病原菌菌丝体组织液可溶性蛋白含量

Fig. 2 Content of soluble protein in pathogen mycelium fluid

2.2 提取物不同处理时间对致病疫霉菌体保护酶活性的影响

2.2.1 对致病疫霉 SOD 活性的影响

不同时间处理组的 SOD 值之间存在显著性差异,相同处理时间对照组与处理组 SOD 值也存在显著性差异(表 1)。提取物处理组 SOD 活性总体表现为先上升后下降的趋势,从 3 h 开始上升,直至 12 h 时达到最大值,此时是对照组的 2.78 倍;12 h 之后快速降低,24 h 后降低速率较为缓慢,48 h 降至最小值,此时为对照组的 10.97%。对照组 SOD 活性随时间的增加而缓慢的持续上升,48 h 达到最大值,对照组 SOD 值之间存在显著性差异。

2.2.2 对致病疫霉 CAT 活性的影响

提取物处理组 CAT 活性总体表现为先上升后下降的趋势,从 3 h 开始上升,直至 12 h 时达到最大值,此时与对照组相比存在显著性差异;12 h 之后

快速下降,48 h 降至最小值,此时是对照组的 13.05%。处理组不同时间的 CAT 值之间存在显著性差异。相同处理时间对照组与处理组相比,3~9 h 的 CAT 值之间无显著性差异,12~48 h 的 CAT 值之间存在显著性差异(表 1)。

2.2.3 对致病疫霉 POD 活性的影响

提取物处理组 POD 活性总体表现为先上升后下降的趋势,从 3 h 开始上升,直至 12 h 时达到最大值,此时是对照组的 2.2 倍;12 h 之后快速降低,24 h 后降低速率变缓,48 h 降至最小值,此时为对照组的 2.54%。处理组不同时间的 POD 值之间存在显著性差异(表 1)。相同处理时间对照组与处理组 POD 值除 3 h 之外,其他时间段的 POD 值之间存在显著性差异。对照组 POD 活性随时间的增加而持续上升,48 h 达到最大值。

表 1 提取物不同处理时间对病菌 SOD、CAT 和 POD 活性的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.1 Effects of extract on the activities of pathogen's SOD, CAT and POD in different time ($\bar{x} \pm s$)

处理时间/h	SOD 活性/(U·g ⁻¹ ·min ⁻¹)		CAT 活性/(U·g ⁻¹ ·s ⁻¹)		POD 活性/(U·g ⁻¹ ·s ⁻¹)	
	对照组	处理组	对照组	处理组	对照组	处理组
3	16.721 ± 0.215f	9.425 ± 0.336d*	0.029 ± 0.002e	0.029 ± 0.002d	1.591 ± 0.121e	1.608 ± 0.126d
6	17.634 ± 0.231e	23.576 ± 0.201c*	0.037 ± 0.002d	0.039 ± 0.002c	1.609 ± 0.135e	1.849 ± 0.138c*
9	18.790 ± 0.264d	33.762 ± 0.369b*	0.044 ± 0.003c	0.045 ± 0.003b	1.859 ± 0.179d	2.504 ± 0.194b*
12	19.874 ± 0.282c	55.159 ± 0.548a*	0.060 ± 0.004b	0.053 ± 0.004a*	2.220 ± 0.186c	4.881 ± 0.199a*
24	21.790 ± 0.288b	8.799 ± 0.173e*	0.066 ± 0.003ab	0.036 ± 0.005cd*	3.980 ± 0.197b	1.598 ± 0.101d*
48	22.761 ± 0.271a	2.495 ± 0.025f*	0.069 ± 0.003a	0.009 ± 0.001e*	5.721 ± 0.233a	0.145 ± 0.037e*

注:*表示组之间的差异显著性($P < 0.05$);同列数据后不同字母表示差异显著($P < 0.05$)。下同。

2.3 提取物不同处理时间对致病疫霉菌体 GSH-Px 酶活性及 MDA 含量的影响

2.3.1 对 GSH-Px 活性的影响

提取物处理过的菌体 GSH-Px 活性低于对照组,从 3 h 开始上升,6 h 达到最大值;之后开始下降,9~12 h 之间下降速度最快,12 h 之后下降速度变缓,48 h 时将至最低,此时是对照组的 2.37%,处理组数据之间存在显著性差异。对照组 GSH-Px 活

性随时间的增长而增大,相同时间对照组与处理组存在显著性差异。

2.3.2 对 MDA 含量的影响

提取物处理过的菌体 MDA 含量出现先快速增高,后趋于平稳的趋势,48 h 达到最高值,此时是对照组的 2.56 倍;12、24 和 48 h 的 MDA 含量之间无显著性差异(表 2)。对照组中的 MDA 含量随时间的增加而增加。

表 2 提取物不同处理时间对 GSH-Px 活性和 MDA 含量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.2 Effects of extract on the content of pathogen's GSH-Px and MDA in different time ($\bar{x} \pm s$)

处理时间/h	GSH-Px 活性/(kU·g ⁻¹)		MDA 含量/(nmol·g ⁻¹)	
	对照组	处理组	对照组	处理组
3	1.447 9 ± 0.111 5f	1.234 8 ± 0.103 7b*	0.747 ± 0.068e	0.975 ± 0.082d*
6	1.765 4 ± 0.135 6e	1.563 3 ± 0.125 8a*	0.759 ± 0.069d	1.075 ± 0.091c*
9	2.255 3 ± 0.182 6d	1.515 3 ± 0.123 9a*	0.775 ± 0.068c	1.463 ± 0.127b*
12	2.401 3 ± 0.195 7c	0.736 9 ± 0.075 9c*	0.799 ± 0.073b	2.099 ± 0.156a*
24	2.646 5 ± 0.199 2b	0.586 2 ± 0.060 3d*	0.822 ± 0.077a	2.098 ± 0.148a*
48	3.109 3 ± 0.232 1a	0.073 7 ± 0.005 8e*	0.830 ± 0.080a	2.127 ± 0.174a*

2.4 提取物不同处理时间对致病疫霉菌体电导率及呼吸速率的影响

2.4.1 对电导率的影响

提取物对病菌电导率影响显著(图 3)。处理组

从 5 min 开始电导率快速上升,至 90 min 后,上升速率变缓,180 min 达到最大值,总体高于对照组。对照组电导率随时间增加而变大,5~30 min 上升速率较快,30 min 后上升速率变缓,180 min 时达到最高值。

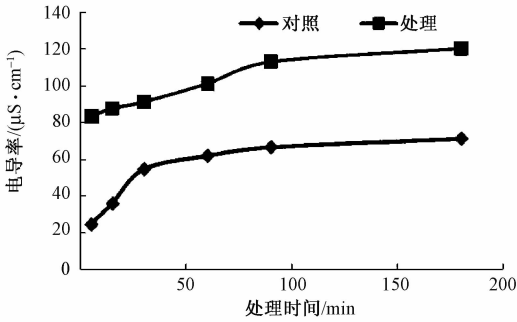


图 3 不同时间处理病原菌的电导率

Fig. 3 Conductivities of different treatment pathogen

2.4.2 对呼吸速率的影响

处理组呼吸速率从 3 h 开始就低于对照组, 总体表现为下降趋势, 48 h 时降到最低点(图 4)。对照组菌体的呼吸速率呈现先快速上升后快速下降的趋势, 12 h 时上升到最高点, 达到最大值, 此后下降直至 48 h, 降到最低点。

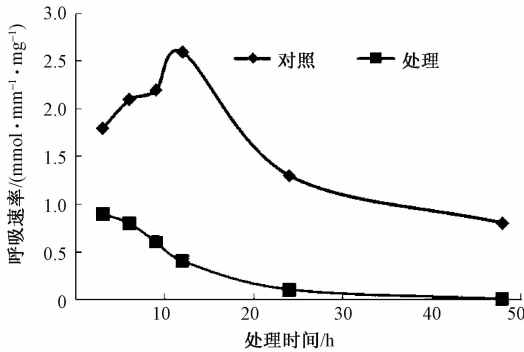


图 4 不同时间处理病原菌的呼吸速率

Fig. 4 Respiration rates of pathogen under different treated time

3 结论与讨论

通过哈茨木霉发酵液乙酸乙酯提取物对致病疫霉处理过程中, 致病疫霉菌体生理指标的变化研究, 得出以下结论: 哈茨木霉发酵液乙酸乙酯提取物可降低致病疫霉菌体可溶性蛋白含量, 降低菌体保护酶(SOD、CAT、POD、GSH-Px)活性, 提高菌体MDA含量, 提高菌体电导率, 降低菌体呼吸速率。

蛋白质的代谢受多种因素影响, 可溶性蛋白是肌体内的渗透调节物质, 能够缓解和调节肌体在胁迫条件下引起的伤害。可溶性蛋白的积累可以通过保护细胞膜的表面来协调细胞与外界渗透压的平衡^[17], 其含量是肌体代谢过程中蛋白质损伤的重要指标, 它的变化可以反映细胞内蛋白质的合成、变性、降解等多方面信息^[11]。肌体可以通过增加细胞功能蛋白的数量来维持细胞的正常代谢, 从而提高植物的抗性。有研究表明, 胁迫条件下植物的可溶性蛋白含量表现为迅速下降并保持在较低的水平^[11, 17]。试验中, 随着提取物处理时间的不断增加, 致病疫霉菌体组织液的可溶性蛋白含量降低, 可

能是由于提取物破坏了蛋白质的结构, 使之沉淀、水解、降解或者变性的缘故。

肌体被破坏的重要原因是活性氧自由基对组织伤害逐渐积累, 导致膜脂过氧化, 引起代谢紊乱。SOD、CAT、POD 被认为是植物体重要的酶保护系统, SOD 可以催化 O_2^- 生成 H_2O_2 和 O_2 , POD 和 CAT 则能清除 H_2O_2 。在胁迫条件下, 活性氧大量增加, 同时肌体内清除系统受到抑制, 导致活性氧的积累和破坏, 酶促系统中的 SOD、CAT、POD 等活性也会相应发生变化来适应环境, 增强本身对胁迫的抵御能力^[17]。GSH-Px 是生物体内重要的含硒抗氧化酶, 它能将脂质过氧化物和过氧化氢还原成相应的醇和水, 并与维生素 E 协同作用, 阻止脂质过氧化的链式反应, 具有抗氧化功能, 可保护细胞膜免受过氧化物的刺激和损伤。当 GSH-Px 的活性受抑制后, GSH-Px 的底物脂质过氧化物则在体内堆积, 导致细胞损害^[9-10]。MDA 是膜脂氧化的主要产物, 也是膜系统受害的重要标志之一, 其含量高低可以反映膜脂过氧化程度和膜结构的受害程度及肌体的自我修复能力。MDA 的积累会引发或加剧膜脂过氧化作用, 与细胞膜上的蛋白质和酶结合, 引起蛋白质分子内和分子间的交联从而使酶失活, 对生物膜和细胞造成一定的伤害^[11]。膜透性的增大是膜系统被破坏的表现之一, 膜透性的大小可用电解质渗漏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, 而此时呼吸强度也会相应地发生变化^[11]。很多研究发现, 肌体在胁迫条件下, 其细胞内自由基清除剂活性下降, SOD、CAT、POD 的活性提高, GSH-Px 活性下降^[10], MDA 含量上升。试验中 3 种保护酶活性均出现先上升后快速下降的趋势, MDA 含量呈现先上升后平稳的趋势, 呼吸速率下降, 电导率上升; 此结果可能是由于提取物对致病疫霉菌体造成了胁迫, 使得菌体细胞保护酶活性和 MDA 含量上升, 致使细胞膜过氧化程度加剧, 导致细胞膜被破坏, 细胞质外露, 直至菌体细胞趋于凋亡。

综上所述, 哈茨木霉发酵液乙酸乙酯提取物使致病疫霉处于胁迫条件下, 由于菌体内的酶较为敏感, 所以其活性上升; 而体内细胞毒性物质 MDA 进行积累, 严重地破坏了细胞膜的完整性, 从而使得细胞呼吸速率降低, 电导率升高。这一系列变化保持相一致, 也充分地反映了细胞以及细胞器之间的协调性和整体性。本研究初步揭示了哈茨木霉发酵液乙酸乙酯提取物抑制致病疫霉生长的机理, 但可能只是其中的一部分, 对以上结果的验证和其他机理的揭示还需进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 林晓民,李振岐,侯军,等. 中国菌物[M]. 北京:中国农业出版社, 2007:315-342.
- [2] 娜仁,赵君,张之为,等. 马铃薯抗晚疫病机制的研究进展[J]. 中国马铃薯, 2008, 22(6):352-356.
- [3] 杨艳丽,罗文富,国立耘. 云南马铃薯晚疫病病原生理小种的研究[J]. 植物保护, 2001, 21(2):529-542.
- [4] 杨春林. 哈茨木霉(*Trichoderma harzianum*)菌株 Th-30 生防特性评价[D]. 成都:四川农业大学, 2009:1-9.
- [5] ZIMAND G, ELAD Y, CHET I. Effect of *Trichoderma harzianum* on *Botrytis cinerea* pathogenicity[J]. Phytopathology, 1996, 86(11):1255-1260.
- [6] 陈方新,齐永霞,戴庆怀,等. 哈茨木霉对几种植物病原真菌的拮抗作用及其抗药性测定[J]. 中国农学通报, 2005, 21(11):314-317.
- [7] 陶晶,陈士刚,秦彩云,等. 盐碱胁迫对杨树各品种丙二醛及保护酶活性的影响[J]. 东北林业大学学报, 2005, 33(3):13-15.
- [8] 蒋继宏,吴薇,曹小迎,等. 苦豆碱对杨小舟蛾体内保护酶系统活力的影响[J]. 南京林业大学学报:自然科学版, 2005, 29(5):91-93.
- [9] 宋增延,姜宁,张爱忠,等. 谷胱甘肽生物学功能的研究进展[J]. 饲料研究, 2008(9):25-27.
- [10] 许丽璇,王春风,王慧云,等. 桐花树抗重金属铅胁迫的谷胱甘肽及抗氧化酶作用[J]. 中国农学通报, 2010, 26(15):215-220.
- [11] 王建书,朱云枝,赵敏,等. 画眉草弯孢霉菌株 QZ-2000 与低剂量化学除草剂复配增效机制研究[J]. 河南农业科学, 2010(10):65-70.
- [12] 王桂清,张涛,孙华,等. 玉米灰斑病菌粗毒素对玉米胚根保护酶活性的影响[J]. 沈阳农业大学学报, 2010, 41(2):156-160.
- [13] 刘厚诚,邝炎华,陈日远. 缺磷胁迫下长豇豆幼苗膜脂过氧化及保护酶活性的变化[J]. 园艺学报, 2003, 30(2):215-217.
- [14] 汪月霞,索标,赵会杰,等. Na₂CO₃胁迫对芦荟幼苗叶片叶绿体保护酶和渗透调节物质的影响[J]. 西北植物学报, 2010, 30(11):2184-2190.
- [15] 张芹. 松针褐斑病菌(*Lecanosticta acicola*)毒素致病作用的细胞学研究[D]. 南京:南京林业大学, 2003:39-50.
- [16] 安志强,孙新顺,乔文庆,等. 考马斯亮蓝法测定青霉素发酵液中可溶性蛋白质含量[J]. 河北化工, 2010, 33(9):60-61.
- [17] 孔治有,刘叶菊,覃鹏. 人工加速老化对小麦种子 CAT、POD、SOD 活性和可溶性蛋白质含量的影响[J]. 中国粮油学报, 2010, 25(10):24-27.
- [18] 计红芳,宋瑞清,杨谦. 绒白乳菇发酵液提取物对杨树叶枯病菌保护酶活性、丙二醛含量及电导率的影响[J]. 北京林业大学学报, 2007, 29(6):156-160.
- [19] 郭兵,王海凤,庞春西,等. 雏鸡感染柔嫩艾美耳球虫对血清中抗氧化酶产生的影响[J]. 河北北方学院学报:自然科学版, 2010, 26(4):38-41.

(责任编辑 董晓燕)