

研究报告

马铃薯糖苷生物碱对腐皮镰刀菌呼吸作用及其活性氧代谢的影响

丁德东¹, 赵吉桃¹, 何静^{*1,2}, 侯彩霞¹, 李南¹, 张崇庆¹, 赵倩¹

1 甘肃农业大学林学院, 甘肃 兰州 730070

2 甘肃省枸杞无害化栽培工程研究中心, 甘肃 兰州 730070

丁德东, 赵吉桃, 何静, 侯彩霞, 李南, 张崇庆, 赵倩. 马铃薯糖苷生物碱对腐皮镰刀菌呼吸作用及其活性氧代谢的影响[J]. 微生物学通报, 2023, 50(7): 2937-2949.

DING Dedong, ZHAO Jitao, HE Jing, HOU Caixia, LI Nan, ZHANG Chongqing, ZHAO Qian. Potato glycoalkaloids affect the respiration and reactive oxygen species metabolism of *Fusarium solani*[J]. Microbiology China, 2023, 50(7): 2937-2949.

摘要:【背景】腐皮镰刀菌(*Fusarium solani*)是一种分布较为广泛的致病性真菌,可引起多种植物的土传病害,是枸杞根腐病的主要致病菌之一。马铃薯糖苷生物碱(potato glycoside alkaloids, PGA)为一类植物源提取物,其原材料种植广泛、成本低廉,对腐皮镰刀菌具有较强的抑菌活性。

【目的】探究 PGA 对腐皮镰刀菌呼吸作用及活性氧(reactive oxygen species, ROS)代谢的影响,从能量代谢角度揭示其可能的抑菌机理。【方法】以马铃薯芽为原材料,采用乙酸-氨水沉淀法提取 PGA,以腐皮镰刀菌为供试病原菌,通过 PDA 和 PDB 培养体系考察 PGA 对腐皮镰刀菌菌丝生长的抑制作用,并确定半最大效应浓度(EC_{50});采用氧电极仪检测 PGA 对腐皮镰刀菌呼吸作用的影响;并通过 PDB 液态培养试验体系,研究 PGA 对腐皮镰刀菌抗氧化酶系统、ROS 及其代谢产物丙二醛(malondialdehyde, MDA)的影响。【结果】PGA 处理下菌丝体呼吸速率明显下降,且随着 PGA 处理时间的延长,表现出一定的时间浓度效应。PGA 处理使胞内过氧化氢(H_2O_2)和超氧阴离子(O_2^-)含量显著增高($P < 0.05$),引起了细胞体内过氧化物酶(peroxidase, POD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)和超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)抗氧化酶系统的失衡,加剧了膜脂过氧化进程,导致 MDA 含量增加。透射电镜结果显示,PGA 处理的腐皮镰刀菌线粒体膜组织破裂,线粒体内含物逐渐流失,线粒体消亡。【结论】PGA 抑制了腐皮镰刀菌呼吸作用及活性氧代谢,破坏了其能量代谢途径的主要细胞器——线粒体,最终抑制了病原菌菌丝的生长。

关键词: 马铃薯糖苷生物碱; 腐皮镰刀菌; 呼吸作用; 活性氧; 抗氧化酶系

资助项目: 国家自然科学基金(32060341)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32060341).

*Corresponding author. E-mail: hejing268@aliyun.com

Received: 2022-10-12; Accepted: 2022-11-18; Published online: 2023-01-05

Potato glycoalkaloids affect the respiration and reactive oxygen species metabolism of *Fusarium solani*

DING Dedong¹, ZHAO Jitao¹, HE Jing^{*1,2}, HOU Caixia¹, LI Nan¹, ZHANG Chongqing¹, ZHAO Qian¹

1 College of Forestry, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, Gansu, China

2 Wolfberry Harmless Cultivation Engineering Research Center of Gansu Province, Lanzhou 730070, Gansu, China

Abstract: [Background] *Fusarium solani*, a ubiquitous pathogenic fungus, can cause a variety of soil borne diseases of plants and is one of the main pathogens causing root rot of *Lycium barbarum*. Potato glycoalkaloids (PGAs) have strong activity against *F. solani* and their source plants are widely cultivated with low cost. [Objective] To observe the effects of PGAs on the respiration and reactive oxygen species (ROS) metabolism of *F. solani* and decipher the possible antibacterial mechanism from the perspective of energy metabolism. [Methods] PGAs were extracted from potato buds by acetic acid and ammonia precipitation method, and *F. solani* was selected as the test pathogen. The inhibitory effect of PGAs on the mycelial growth of *F. solani* in PDA and PDB was investigated and the concentration for 50% of maximum effect (EC_{50}) was determined. The effect of PGAs on the respiration of *F. solani* was detected by an oxygen electrode. The effects of PGAs on the antioxidant enzyme system, ROS, and the metabolite malondialdehyde (MDA) of *F. solani* were studied in PDB. [Results] The PGA treatment decreased the mycelial respiration rate in a concentration and time-dependent manner and increased the content of intracellular hydrogen peroxide (H_2O_2) and superoxide anion (O_2^-) ($P < 0.05$). Furthermore, the treatment caused the imbalance of the peroxidase (POD), catalase (CAT), and superoxide dismutase (SOD) system, aggravated the membrane lipid peroxidation, and increased MDA content. Transmission electron microscopy results showed that the PGA treatment broke the mitochondrial membrane, caused the loss of mitochondrial contents, and destroyed the mitochondria of *F. solani*. [Conclusion] PGAs inhibit the respiration and reactive oxygen species metabolism, destroy mitochondria, the main organelle of the energy metabolism pathway, and finally inhibit the mycelial growth of *F. solani*.

Keywords: potato glycoalkaloids; *Fusarium solani*; respiration; reactive oxygen species; antioxidant enzyme system

腐皮镰刀菌(*Fusarium solani*)是一种分布较为广泛的致病性真菌,为植物土传病害的主要病原菌,可引起多种植物部位腐烂,如根腐、茎腐、穗腐和茎基腐等^[1-3],也是引起甘肃省主要经济林种枸杞根腐病的重要病原,发病初期不易被发现,当根部组织腐烂时已难以治愈,是一种极具毁灭性的病害,严重威胁枸

杞产业的可持续发展。目前化学杀真菌剂是防治真菌病害的主要手段,然而其副作用日益突显,常致病原真菌产生耐药性,且对人体健康和农业生态带来一定威胁,基于这些因素,近年来诸多学者开启了寻找对人类健康和环境安全的方法来替代或部分替代化学杀菌剂的相关研究^[4]。

马铃薯糖苷生物碱(potato glycoside alkaloids,

PGA)是一种含氮且有异味的甾体结构生物碱(steroidal glycoalkaloid),由1-4个单糖通过3-O-糖苷键结合而成,主要来自马铃薯薯芽和薯皮中,为次生代谢产物。因其材料来源种植广泛、成本低廉、对环境无危害的特点而受到诸多学者的关注。已有研究表明,PGA具有广泛的生物活性,其90%以上的含量为茄碱(solanine)和查茄碱(chaconine)^[5-6]。Allen等^[7]最早研究发现马铃薯糖苷生物碱具有抵御真菌侵染的作用,并证实其具有一定的抑菌活性。陈伟^[8]研究报道马铃薯糖苷生物碱对枸杞鲜果采后的几种主要致病病原真菌,如交链格孢菌(*Alternaria alternata* strain JL-19)、镰刀菌(*Fusarium* sp.)、链格孢(*Alternaria* sp.) isolate G-54和细极链格孢菌(*Alternaria tenuissima*) strain JL-7w均有一定的抑制作用。多甜甜^[9]采用生长速率法测定马铃薯糖苷生物碱对核桃盘二孢(*Marssonina juglands*)、腐皮镰刀菌(*Fusarium solani*)、胶孢炭疽菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)、链格孢菌(*Alternaria alternata*)和煤炱菌(*Capnodium leaophilum*)这5种受试菌均有抑制效果,并对腐皮镰刀菌效果最明显。曹博文等^[10]将马铃薯糖苷生物碱应用到活体樱桃番茄上,研究了其对灰葡萄孢霉(*Botrytis cinerea*)引起腐烂的抑制作用,得出PGA浓度为300 μmol/L时对灰葡萄孢霉的抑制效果最好,樱桃番茄的腐烂率最低。上述研究证明PGA能够抑制植物病原真菌的生长,从而增强植物的抗病性,具有发展为广谱、高效、环保、安全、新型生物农药的潜力。

本课题组前期研究发现PGA可影响腐皮镰刀菌的物质代谢,但其能量代谢机理暂不明确^[11-12]。因此,本研究以腐皮镰刀菌为研究对象,以活性氧代谢及菌体呼吸作用为切入点,开展PGA对其抑菌机制的相关研究,以期为

更好地开发利用马铃薯糖苷生物碱提供理论依据,并为植物土传病害的生物防控提供可能的途径。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 供试病原菌

Fusarium solani 分离自枸杞发病植株,经致病性测定后由甘肃农业大学森保实验室保存,使用前在PDA培养基上25℃活化处理,于0-4℃保存备用。

1.1.2 供试培养基

马铃薯葡萄糖琼脂培养基(potato dextrose agar, PDA) (g/L)和马铃薯葡萄糖液体培养基(potato dextrose broth, PDB) (g/L)参照瞿佳等^[13]的方法配制。

1.1.3 主要试剂和仪器

线粒体提取缓冲液 Hepes-KOH (pH 7.4)、0.6 mol/L 甘露醇(mannitol)、0.2%牛血清白蛋白(bovine serum albumin)、2 mmol/L 乙二醇双(2-氨基乙基醚)四乙酸(ethylene glycol tetracetic acid)、2 mmol/L 二硫苏糖醇(dithiothreitol)均购自上海源叶生物科技有限公司。

洁净工作台,苏州安泰空气技术有限公司;紫外分光光度计,Nano Drop公司;台式冷冻离心机,上海土森视觉科技有限公司;旋转蒸发器,苏州赛恩斯仪器有限公司;全波长酶标仪,美谷生物科技(浙江)有限公司;透射电子显微镜,日立(中国)有限公司;氧电极仪,点将(上海)科技股份有限公司;恒温培养振荡器(摇床),天津欧诺仪器股份有限公司。

1.2 方法

1.2.1 PGA的制备及其主要成分定量分析

PGA采用乙酸-氨水沉淀法提取^[8,14]。称取马铃薯薯芽粉末100g,加入400mL 5%的乙

酸,用磁力搅拌器搅拌 1 h 后抽滤,残渣再用 200 mL 5%的乙酸重复提取 2 次,合并 3 次滤液。用氨水将 pH 值调至 11.0,而后用水饱和的正丁醇(200 mL)分 3 次进行萃取,收集合并提取液,用旋转蒸发仪蒸干,残留物用 20 mL 甲醇溶解,得到 PGA 提取母液(提取液中残留物质量为 1 762 mg,即母液浓度为 88.10 mg/mL)。

根据显色原理,即 PGA (茄碱和查茄碱)在酸性环境中,可与甲醛形成紫红色络合物,其颜色的深浅与 PGA 含量呈正相关,测定溶液在 530 nm 处的吸光值,在标准曲线上获取样品液 PGA 浓度,计算出 PGA 含量。标准曲线采用课题组前期研究成果^[8],回归方程为 $y=0.3628x+0.0256$, $R^2=0.9583$ 。

测定 PGA 时,取 PGA 提取液 1 mL,按绘制标准曲线的方法操作^[8],甲醇(代替样品液)调零,在 530 nm 处测定吸光度值(A),计算 PGA 含量(FW)^[8]:

$$PGA=(V \times C/W) \times 100$$

式中: V 为所取样液的体积(mL); C 为标准曲线查出的样品液浓度(mg/g); W 为样品鲜重(g)。

对 PGA 提取液进行重复性检验,得到 PGA 的平均含量为 0.503 mg/g,相对标准偏差(RSD)为 3.25% (<10%),说明该方法重复性良好(5 个重复),适用于 PGA 的定量分析。

1.2.2 EC_{50} 值的确定

采用菌丝生长速率法^[15]测定 EC_{50} 。用无菌水将 PGA 提取母液分别配制为 1.101 2、2.202 5、4.405 0、8.810 0、17.620 0 mg/mL 的 5 个供试浓度,将不同浓度 PGA 分别添加到 PDA 培养基中摇匀,制成含药平板,用无菌打孔器($\phi=6$ mm)取菌饼接种供试菌种 *Fusarium solani*,以无菌水(SCK)和甲醇(JCK)为对照,25 °C 恒温培养,每处理 3 次重复。求取毒力回归方程及半最大效应浓度(EC_{50})。

菌丝生长抑制率(%) =

$$\frac{\text{对照(SCK)菌落直径} - \text{处理(PGA)菌落直径}}{\text{对照(SCK)菌落直径}} \times 100^\circ$$

1.2.3 腐皮镰刀菌孢子悬浮液的制备

腐皮镰刀菌孢子悬浮液的制备参照方中达^[15]的方法并加以改进。向多次培养纯化后的腐皮镰刀菌中加入 10 mL 无菌水并滴入 2 滴吐温-80,轻轻摇晃,使分生孢子充分脱落,利用血球计数板将其稀释为 1×10^6 个/mL 溶液,备用。

1.2.4 菌丝体的制备

取制备好的腐皮镰刀菌孢子悬浮液加入 PDB 培养基,25 °C、160 r/min 培养 48 h 后收集菌丝体,将获得的菌丝体定量加入 PDB 含药(EC_{50} PGA)培养基继续培养至 36 h;同时设置无菌水(SCK)和甲醇(JCK)为对照,分别在 0、3、6、9、12、24、36 h 收集菌丝体,无菌水洗涤 3 次,经液氮冷冻后,研磨备用。

1.2.5 腐皮镰刀菌线粒体的提取

采用差速离心法^[16-19]提取腐皮镰刀菌线粒体。

1.2.6 腐皮镰刀菌呼吸速率测定分析

呼吸速率参考尚春雨^[18]及 Guo 等^[20]的方法,用氧电极仪测定 0、30、60、90、120 min 以及 3、6、9、12、24、36 h 后菌丝体的呼吸速率。

1.2.7 腐皮镰刀菌丙二醛含量的测定

丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量测定采用硫代巴比妥酸法测定,记录上清液在 450、532 和 600 nm 波长处的吸光度值,用于计算 MDA 含量,单位表示为 $\mu\text{mol/g}$ 。

1.2.8 腐皮镰刀菌活性氧测定分析

过氧化氢(H_2O_2)含量参考刘俊等^[21]的方法进行测定,单位表示为 $\mu\text{mol/g}$ 。

超氧阴离子自由基(O_2^-)含量测定参考潘瑞焜等^[22]的方法,单位表示为 g/g。

1.2.9 腐皮镰刀菌抗氧化酶活性的测定

称取 0.2 g 1.2.4 制备的菌丝体,用无菌水洗涤 2 次,液氮研磨,4 °C、1 000 r/min 离心 15 min

收集上清液制备粗酶液, 用于酶活性分析。超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性参照吕淑霞^[23]和 Giannopolitis 等^[24]的方法测定; 过氧化物氧化酶(peroxidase, POD)活性采用李合生^[25]的方法测定; 过氧化氢酶(catalase, CAT)活性借鉴高俊凤^[26]的方法测定。

1.2.10 透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM)样品制备

用 EC_{50} PGA 提取液(无菌水和甲醇处理为对照)处理菌丝体 12 h 后提取线粒体, 线粒体提取物用蒸馏水洗涤 2 次, 并用 2.5%戊二醛固定 2 h, 用 0.1 mol/L 磷酸缓冲液调节至 pH 7.4, 处理后用 1%锇酸避光室温固定 2 h 固定后, 将样品在分级乙醇系列(30%、50%、70%、80%、95%和 100%)中脱水, 并分别浸入环氧树脂和 SPI-812 包埋剂中。用 Leica UC7 超薄切片机获得的超薄切片用 2%醋酸铀饱和酒精溶液避光染色, 随后用 2.6%枸橼酸铅溶液避二氧化碳染色。用透射电子显微镜在 80 kV 下进行图像的观察和记录。

1.3 数据分析

采用 Microsoft Excel 2016 对整体数据进行统

计, 应用 SPSS 25.0 进行显著性检验和方差分析, 使用 Duncan's 法进行多重比较分析, 在 $P<0.05$ 的水平上进行显著性比较。运用 Origin 2018 绘图。

2 结果与分析

2.1 PGA 处理对体外培养的腐皮镰刀菌菌丝生长的影响

由表 1 可知, 不同供试浓度(1.101 2、2.202 5、4.405 0、8.810 0、17.620 0 mg/mL) PGA 提取液对 *F. solani* 均具有一定的抑制作用, 随 PGA 处理浓度的增加, 菌落直径逐渐减小(图 1), 且与两组对照相比均具显著差异($P<0.05$)。PGA 对 *F. solani* 的抑制率随浓度的增加而增加, 呈现一定剂量的剂量依赖性, 当浓度为 17.620 0 mg/mL 时, 抑制率达到最大为 80.50%。毒力回归方程为 $y=1.2787x+4.1731$, 相关系数为 0.953 0, 说明回归方程中的变量线性关系密切, 试验可行。半最大效应浓度(EC_{50})为 4.432 7 mg/mL。

2.2 PGA 对腐皮镰刀菌呼吸速率的影响

如图 2A 所示, 随处理时间的增加, SCK 与 JCK 对照组菌丝体呼吸速率变化均呈现先上升再

表 1 不同浓度 PGA 对腐皮镰刀菌的抑菌活性测定

Table 1 Determination of bacteriostatic activity of PGA on *Fusarium solani* at different concentrations

Medicament	Concentration (mg/mL)	Concentration logarithm (x)	Colony diameter (cm)	Inhibition rate (%)	Odds value (y)	EC_{50} value (mg/mL)
SCK	/	/	7.49±0.12a	/	/	4.432 7
JCK	/	/	6.17±0.36b	/	/	
PGA	1.101 2	0.041 9	5.71±0.22bc	25.90	4.353 6	
	2.202 5	0.342 9	5.19±0.32cd	33.43	4.571 1	
	4.405 0	0.653 7	4.60±0.28d	41.90	4.795 5	
	8.810 0	0.945 0	2.94±0.25e	66.10	5.415 2	
	17.620 0	1.246 0	1.94±0.11f	80.50	5.859 6	

SCK: 无菌水对照; JCK: 甲醇对照; PGA: 马铃薯糖苷生物碱处理; /: 无数值; 不同小写字母表示不同处理下菌丝生长速率的统计学差异($P<0.05$)

SCK: Sterile water treatment; JCK: Methanol treatment; PGA: Potato glycoside alkaloid treatment; /: No value; Different lowercase letters indicate statistical differences in mycelial growth rates between treatments at $P<0.05$.

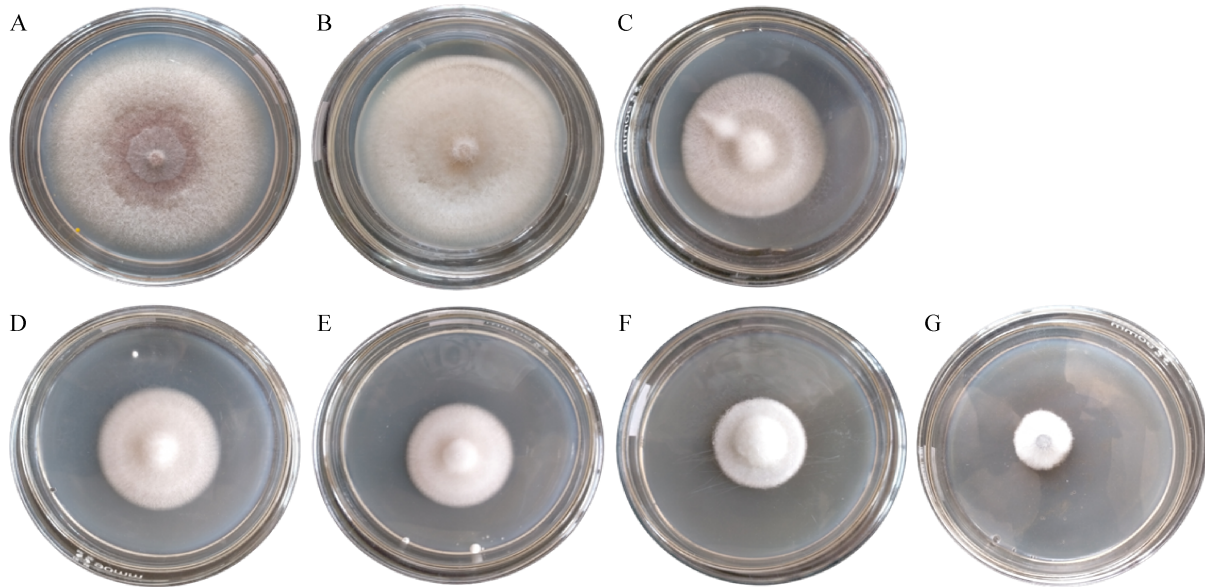


图1 不同浓度PGA对腐皮镰刀菌菌落形态的影响 A: SCK. B: JCK. C: 1.101 2 mg/mL. D: 2.202 5 mg/mL. E: 4.405 0 mg/mL. F: 8.810 0 mg/mL. G: 17.620 0 mg/mL

Figure 1 Effects of different concentrations of PGA on colony morphology of *Fusarium solani*. A: SCK. B: JCK. C: 1.101 2 mg/mL. D: 2.202 5 mg/mL. E: 4.405 0 mg/mL. F: 8.810 0 mg/mL. G: 17.620 0 mg/mL.

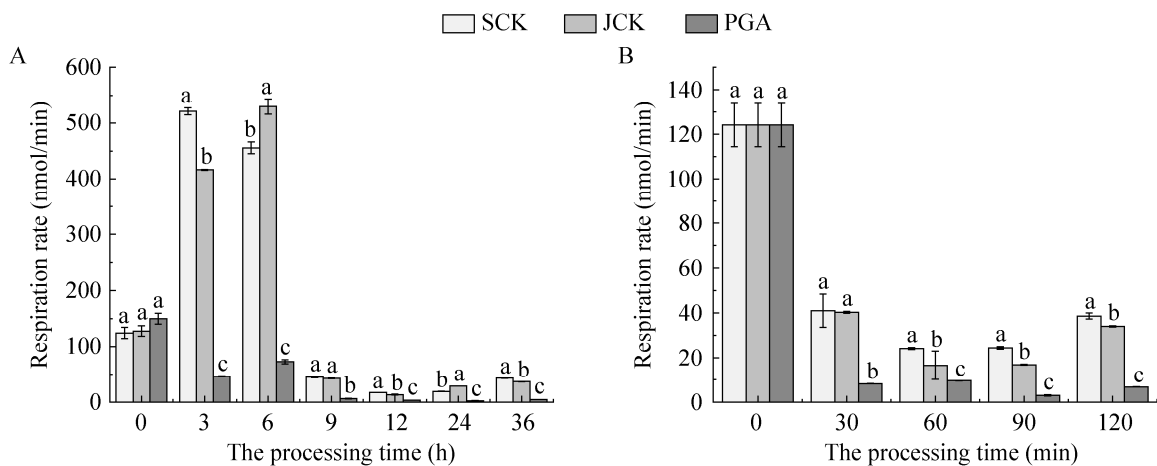


图2 PGA对腐皮镰刀菌呼吸速率的影响 A: 长时间呼吸速率. B: 短时间呼吸速率. 不同小写字母表示不同时间段呼吸速率差异显著($P < 0.05$)

Figure 2 Effect of PGA on respiratory rate of *Fusarium solani*. A: Long-term breathing rate. B: Short-term breathing rate. Different lowercase letters indicate significant differences in respiration rates between time periods at $P < 0.05$.

下降的趋势, 分别在 3 h 和 6 h 达到最大值, 呼吸速率为 521.29 nmol/min 和 529.60 nmol/min. PGA 处理组菌丝体呼吸速率整体低于两对照组且差异显著($P < 0.05$). 说明处理时间越长 PGA 对

F. solani 菌丝体呼吸速率抑制效果越好。

如图 2B 所示, PGA 对 *F. solani* 短时间作用时的呼吸速率也存在不同程度的变化。在 30 min 时 PGA 处理组 *F. solani* 呼吸速率较两组

对照显著降低($P<0.05$), 且与初始值相比下降 93.30%; 对照组 SCK 与 JCK 对 *F. solani* 呼吸速率的影响趋势基本一致, 处在一个较为平稳的状态, 二者均高于 PGA 处理组。表明 PGA 对 *F. solani* 呼吸速率在短时间内有较好的抑制效果。

2.3 PGA 对腐皮镰刀菌活性氧(reactive oxygen species, ROS)的影响

过氧化氢作为活性氧与抗病防御反应信息传递的信号分子, 其含量增加容易引起膜脂过氧化, 从而激活机体的各种防御反应。如图 3A 所示, SCK 和 JCK 处理对 *F. solani* 过氧化氢含量的影响表现较为一致, 整体呈缓慢上升的趋势。PGA 处理后的 *F. solani* 过氧化氢含量在 12 h 低于两组对照, 可能与 CAT 含量在该时间段的增加有关, 而其余时间段均显著高于对照组 ($P<0.05$)。在 24 h 达到峰值, 为 $99.54 \mu\text{mol/g}$ 。说明 PGA 作为外源物对 *F. solani* 有一定的刺激作用, 可促进过氧化氢含量的增加, 从而提高细胞体内活性氧的含量。

O_2^- 是阴离子, 又是自由基, 性质活泼,

具有很强的氧化性和还原性, 过量生成可致组织损伤, 对生物体内 DNA 和蛋白质有一定的影响。它是导致膜质过氧化的重要因子之一, 在体内主要通过超氧化物歧化酶清除。研究结果表明, JCK 对照超氧阴离子自由基含量整体呈下降趋势(图 3B), 在 12 h 含量最低。SCK 对照先下降后上升再下降, 在 12 h 略有上升, 可能与超氧化物歧化酶活性有关。PGA 处理组在 0–36 h 超氧阴离子自由基(O_2^-)含量呈先上升后下降的趋势, 在 12 h 达到峰值, 而后开始下降, 但整体含量高于两组对照。说明 PGA 在一定程度上可加剧细胞的膜质过氧化。

2.4 PGA 对腐皮镰刀菌抗氧化酶活性的影响

POD 是细胞在逆境胁迫下生物防御体系的关键酶之一, 其含量的高低可说明抗氧化能力的强弱。如图 4A 所示, 经 PGA 处理后, POD 活性的变化较为紊乱, 在 6 h 活性达到最大值, 为 $4.49 \mu\text{g}/(\text{g}\cdot\text{min})$; 在 0–9 h, SCK 和 JCK 对照组 POD 活性变化不稳定, 这可能与短期内 ROS 暴发

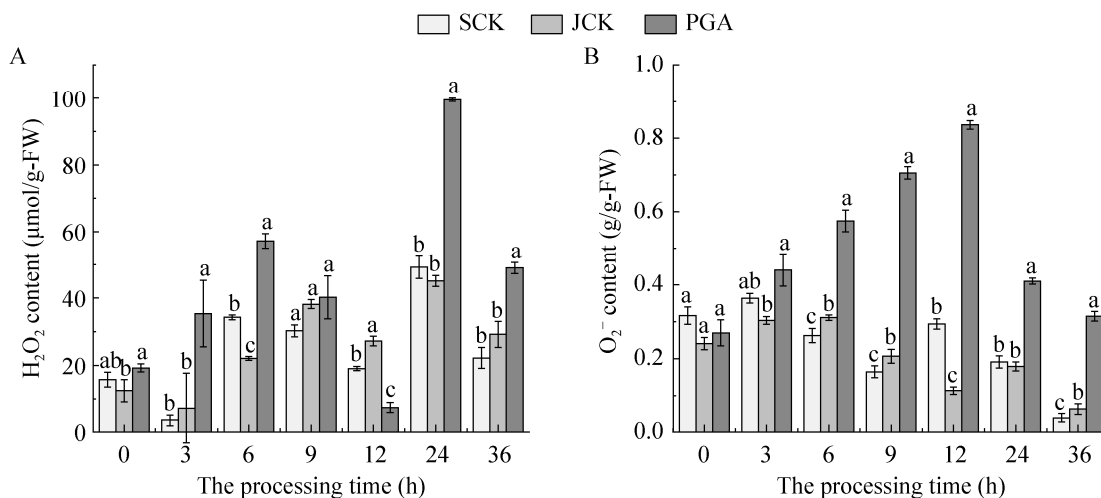


图3 PGA对腐皮镰刀菌ROS含量的影响 A: H_2O_2 含量. B: O_2^- 含量. 不同小写字母表示不同时间段ROS差异显著($P<0.05$)

Figure 3 Effect of PGA on ROS content of *Fusarium solani*. A: H_2O_2 content. B: O_2^- content. Different lowercase letters indicate significant differences in ROS between time periods at $P<0.05$.

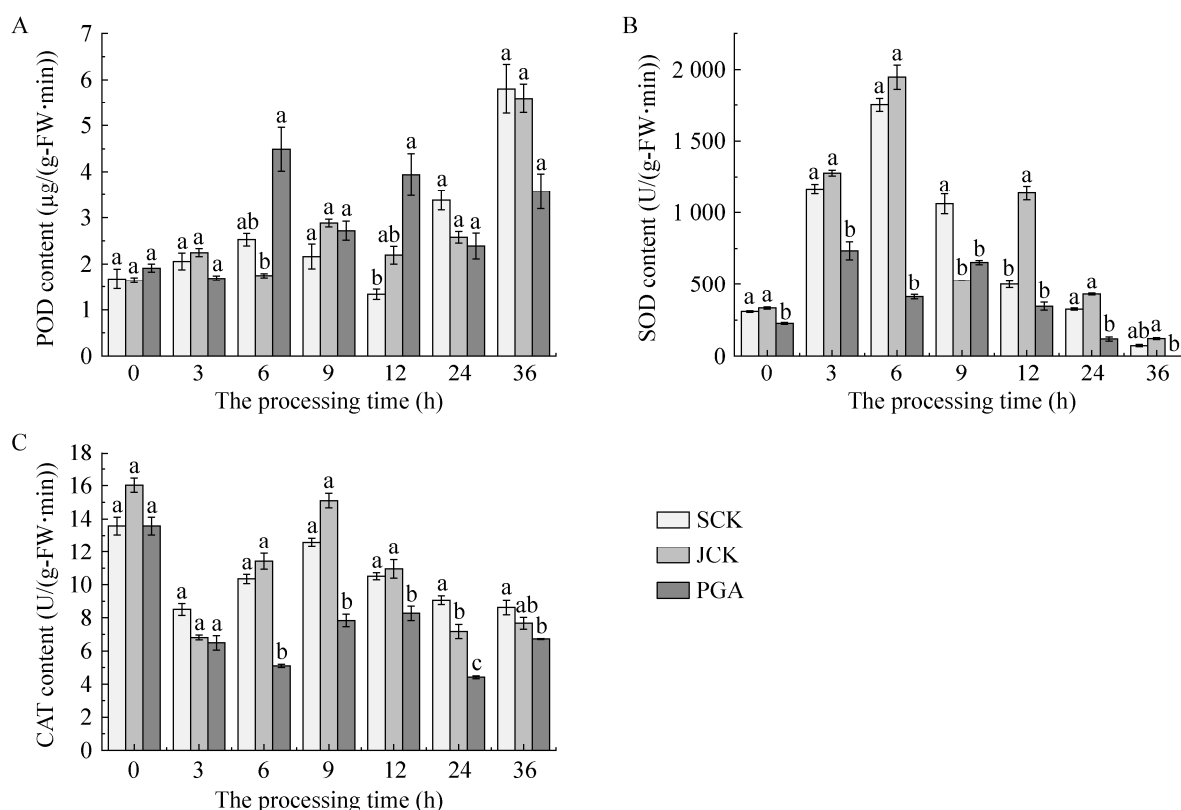


图4 PGA对腐皮镰刀菌抗氧化酶活性的影响 A: POD活性. B: SOD活性. C: CAT活性. 不同小写字母表示不同时间段抗氧化酶活性差异显著($P < 0.05$)

Figure 4 Effect of PGA on antioxidant enzyme activity of *Fusarium solani*. A: POD activity. B: SOD activity. C: CAT activity. Different lowercase letters indicate significant differences in antioxidant enzyme activity between time periods at $P < 0.05$.

有关。在9 h后二者均稳步上升,在36 h达到最大值,分别为 $5.80 \mu\text{g}/(\text{g}\cdot\text{min})$ 、 $5.59 \mu\text{g}/(\text{g}\cdot\text{min})$,较PGA处理组分别升高了62.41%、56.55%。

如图4B所示,各处理组SOD活性均表现为先上升后下降的趋势。不同时间PGA处理组的SOD活性显著低于两组对照($P < 0.05$),相同处理时间对照组与处理组SOD活性也存在明显差异。PGA处理组的变化较为平缓,在3 h达到最大值,为 $734.74 \text{ U}/(\text{g}\cdot\text{min})$ 。SCK与JCK均在6 h达到最大值,分别为 $1752.83 \text{ U}/(\text{g}\cdot\text{min})$ 、 $1947.95 \text{ U}/(\text{g}\cdot\text{min})$ 。

如图4C所示,在0–36 h内,PGA处理组与CK对照组的CAT活性均表现为先下降后上

升再下降的趋势。在6–12 h内,PGA处理后CAT活性略有升高,与 H_2O_2 含量在该时间段下降有关。在全处理时间段内,SCK与JCK处理下CAT活性变化趋势基本一致,说明甲醇对其影响不大;而PGA处理后CAT活性与两组对照相比,整体低于对照组,表明PGA可影响*F. solani*体内CAT活性的降低,导致机体不能有效清除 H_2O_2 ,可能会破坏细胞膜的功能致使细胞死亡。

2.5 PGA对腐皮镰刀菌丙二醛(MDA)含量的影响

MDA是衡量膜脂过氧化程度的重要指标,其含量的高低可从一定程度上说明细胞的

健康水平。如图 5 所示, SCK 与 JCK 基本一致, 均呈现先下降后上升的趋势, MDA 含量在 0.13–1.14 mmol/g 之间。PGA 处理组显著高于两组对照($P<0.05$), 在 3 h 含量达到最大, 为 2.22 mmol/g。3–9 h 下降明显, 可能与抗氧化酶活性的上调有关。

2.6 PGA 对腐皮镰刀菌线粒体结构的影响

线粒体既是氧自由基产生的重要场所, 也是氧化损伤的主要靶细胞器。线粒体的损伤可直接影响细胞的活性。图 6A、6B 分别为 SCK 和 JCK 对照下的 *F. solani* 线粒体微观结构, 其形态大部分呈圆形或椭圆形, 内部结构规则, 表面光滑致密, 线粒体内脊完整; 而 PGA 处理下(图 6C)的腐皮镰刀菌线粒体出现髓鞘样层状结构, 膜组织破裂, 线粒体内含物逐渐流失, 线粒体消亡。

3 讨论

呼吸作用是衡量生物体生理机能的一项重要指标^[27]。在线粒体电子传递过程中, 正常呼吸状态下消耗的氧气有 1%–2%并未完全还原为水, 其转化为了 H_2O_2 和高活性的 OH^- ^[28]。在逆境条件下, 生物会出现呼吸异常以及 ROS 增加的情况, 这些自由基可使细胞某些功能受到威胁^[29]。通过对腐皮镰刀菌呼吸耗氧速率的测

定可直观探究腐皮镰刀菌的生理状态。本研究发现, PGA 处理下的腐皮镰刀菌呼吸耗氧速率明显受到抑制。而且随着 PGA 处理时间的增加, 腐皮镰刀菌呼吸速率持续下降。与之相对应, SCK 与 JCK 两组对照中, 腐皮镰刀菌的呼吸耗氧速率则一直保持在较高的水平。在短时效应试验中, PGA 处理组一直处于下降趋势且呼吸耗氧速率始终低于两组对照, 说明 PGA 抑制了腐皮镰刀菌菌丝体的呼吸。这与杨立宾等^[30]

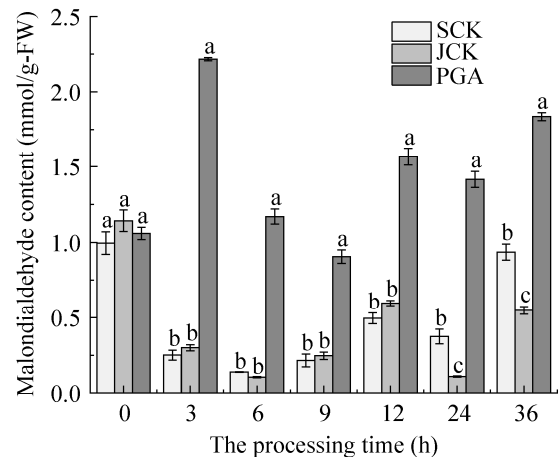


图 5 PGA 对腐皮镰刀菌 MDA 含量的影响 不同小写字母表示不同时间段 MDA 差异显著 ($P<0.05$)

Figure 5 Effect of PGA on MDA content of *Fusarium solani*. Different lowercase letters indicate significant differences in MDA between time periods at $P<0.05$.



图 6 腐皮镰刀菌线粒体微观结构观察 TEM: 80.0 kV×15.0 k, Bar=0.5 μm

Figure 6 Observation of mitochondrial microstructure of *Fusarium solani*. TEM: 80.0 kV×15.0 k, Bar=0.5 μm.

在哈茨木霉菌株发酵液乙酸乙酯提取物对致病疫霉呼吸速率的研究结果一致。黄聪亮等^[31]研究发现, 草果提取物通过抑制细胞呼吸代谢, 使其不能正常生长繁殖, 从而达到抑菌作用。

H_2O_2 是一种具有破坏性的氧化剂及信号分子, 在 ROS 代谢过程中具有极其重要的意义^[28,32]。 H_2O_2 含量过高会造成细胞结构和功能受损, 破坏蛋白质并引起 DNA 结构的定位损伤, 进而导致细胞死亡^[33-35]。Grant 等^[36]已经证明, O_2^- 和 H_2O_2 具有直接抑制菌生长的作用。在本研究中, 我们观察到 PGA 处理使得腐皮镰刀菌体内 O_2^- 和 H_2O_2 含量大幅上升, 且呈现一定程度的时间依赖性。武淑娟等^[37]发现抗菌肽 P-1 处理使粉红单端孢(*Trichothecium roseum*)胞内 O_2^- 含量显著增高($P < 0.05$), 加剧了脂质过氧化和蛋白羰基化程度, 最终抑制了菌体的生长。王星星等^[38]研究结果表明, 茶树精油处理能显著提高灰葡萄孢霉中 H_2O_2 含量, 导致氧化暴发。POD、CAT、SOD 是清除细胞内 ROS 的防御酶系, 主要通过催化氧化还原反应加快活性氧分解, 从而抵御活性氧的产生, 去除其带来的毒害作用^[39]。本研究结果表明, 经 PGA 处理后, 3 种抗氧化酶活性的表达均受到不同程度的抑制, SOD 和 CAT 活性始终显著低于两组对照($P < 0.05$), POD 活性在前期变化不稳定, 可能与短期内 O_2^- 和 H_2O_2 含量迅速上升有关。形成了氧化胁迫环境, 损坏了菌体抗氧化系统, 从而发挥抑菌作用。

线粒体是菌体呼吸及产生活性氧的重要细胞器^[40], 透射电镜结果显示, PGA 处理可以破坏腐皮镰刀菌线粒体结构, 最终会导致线粒体消亡。吴方丽^[19]用丙烷脒处理灰霉病菌后发现线粒体出现髓鞘样层状结构, 之后线粒体内出现病理性的包含物, 电子致密度增大, 逐渐形成一个一个小液泡而溶解。这些现象通常发

生在细胞趋于坏死时, 线粒体成分逐渐崩解, 是线粒体消亡的征兆, 为线粒体不可修复性损伤的标志。同时, 在本研究中, 培养于液体培养基中的菌丝经 PGA 处理后, 其菌丝变细, 呈浑浊、黏稠、碎段状, 表明 PGA 抑制了菌丝的生长。

4 结论

采用乙酸-氨水沉淀法提取 PGA, 通过 PDA 和 PDB 培养体系考察了 PGA 对腐皮镰刀菌的抑菌机制。研究结果表明, PGA 抑制了腐皮镰刀菌呼吸作用及活性氧代谢, 破坏了其能量代谢途径的主要细胞器——线粒体, 最终抑制了病原菌菌丝的生长。后期我们将重点对线粒体功能及其电子传递链进行研究, 确定 PGA 在腐皮镰刀菌线粒体上的主要作用位点, 以期在分子层面揭示其可能的抑菌机理, 为 PGA 在植物病害防治领域的开发提供理论依据。

REFERENCES

- [1] LESLIE JF, SUMMERELL BA. The Fusarium Laboratory Manual[M]. Ames, Iowa: Blackwell Pub., 2006.
- [2] 牛世全, 耿晖, 韩彩虹, 阎薇如, 达文燕. 甘肃陇西黄芩根腐病病原菌的分离与鉴定[J]. 西北师范大学学报(自然科学版), 2016, 52(2): 75-78, 83.
NIU SQ, GENG H, HAN CH, YAN WR, DA WY. Isolation and identification of pathogens causing *Astragalus membranaceus* root rot in Gansu Longxi[J]. Journal of Northwest Normal University (Natural Science Edition), 2016, 52(2): 75-78, 83 (in Chinese).
- [3] RAMPERSAD SN. Pathogenomics and management of *Fusarium* diseases in plants[J]. Pathogens, 2020, 9(5): 340.
- [4] ELGAYYAR M, DRAUGHON FA, GOLDEN DA, MOUNT JR. Antimicrobial activity of essential oils from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganisms[J]. Journal of Food Protection, 2001,

- 64(7): 1019-1024.
- [5] 段光明, 冯彩萍. 马铃薯糖苷生物碱[J]. 植物生理学通讯, 1992, 28(6): 457-461.
DUAN GM, FENG CP. Glycoalkaloids of potato[J]. Plant Physiology Communications, 1992, 28(6): 457-461 (in Chinese).
- [6] 段光明, 刘加, 李霞. 马铃薯糖苷生物碱的生物学作用及开发利用[J]. 资源开发与市场, 1995, 11(2): 61-65, 96.
DUAN GM, LIU J, LI X. Biological effect of potato glycoalkaloids, its development and application[J]. Resource Development & Market, 1995, 11(2): 61-65, 96 (in Chinese).
- [7] ALLEN E H, KUĆ J. α -Solanine and α -chaconine as fungitoxic compounds in extracts of Irish potato tubers[J]. Phytopathology, 1968, 58(6): 776-781.
- [8] 陈伟. 马铃薯糖苷生物碱对枸杞鲜果采后诱导抗病性及保鲜作用研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学硕士学位论文, 2018.
CHEN W. Study on induced resistance to postharvest disease and its fresh-keeping effect of potato glycoalkaloids on *Lycium barbarum* L. fresh fruits[D]. Lanzhou: Master's Thesis of Gansu Agricultural University, 2018 (in Chinese).
- [9] 多甜甜. 马铃薯糖苷生物碱对五种经济林病原真菌的抑菌活性及其机理研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学硕士学位论文, 2017.
DUO TT. Studies on antibiotic activity and mechanism of total glycoalkaloid extract against five economic forest plant pathogenic fungus[D]. Lanzhou: Master's Thesis of Gansu Agricultural University, 2017 (in Chinese).
- [10] 曹博文, 韩育梅, 孙培珍, 莎日娜. 金属盐结合马铃薯糖苷生物碱对灰葡萄孢菌引起樱桃番茄腐烂抑制效果的研究[J]. 内蒙古农业大学学报(自然科学版), 2014, 35(4): 90-94.
CAO BW, HAN YM, SUN PZ, SHA RN. Inhibition study of metal salts combined with potato glycoalkaloids on cherry tomatoes decay induced by *Botrytis cinerea*[J]. Journal of Inner Mongolia Agricultural University (Natural Science Edition), 2014, 35(4): 90-94 (in Chinese).
- [11] HE J, DUO T T, CHEN W, ZHANG XY. Mechanism of action of potato glycoalkaloids against *Fusarium solani*[J]. International Journal of Agriculture & Biology, 2021, 25(4): 873-880.
- [12] 多甜甜, 何静, 陈伟, 张金文, 冯生辉, 马鸿雁, 杜鹃, 党永旭. 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.
DUO TT, HE J, CHEN W, ZHANG JW, FENG SH, MA HY, DU J, DANG YX. Antifungal activity of potato glycoalkaloid and its effect on fungi cell membrane permeability[J]. Journal of Gansu Agricultural University, 2017, 52(5): 50-54 (in Chinese).
- [13] 瞿佳, 门欣, 陈锐, 孙晓宇, 赵玲侠, 宁硕瀛. 核桃黑斑病拮抗放线菌 WMF106 的筛选、鉴定及防效[J]. 微生物学通报, 2021, 48(10): 3621-3631.
QU J, MEN X, CHEN R, SUN XY, ZHAO LX, NING SY. Screening, identification and biocontrol effect of antagonistic actinomycete WMF106 against walnut blight[J]. Microbiology China, 2021, 48(10): 3621-3631 (in Chinese).
- [14] 薄丽丽, 孙晓彦, 林浩, 戴明婧, 牛继平, 张金文, 王蒂. 马铃薯中糖苷生物碱的提取研究[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(3): 1448, 1492.
BO LL, SUN XY, LIN H, DAI MJ, NIU JP, ZHANG JW, WANG D. Study on extraction of glycoalkaloids in potato[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2012, 40(3): 1448, 1492 (in Chinese).
- [15] 方中达. 植病研究方法[M]. 3 版. 北京: 中国农业出版社, 1998.
FANG ZD. Research Methods of Plant Diseases[M]. 3rd ed. Beijing: China Agriculture Press, 1998 (in Chinese).
- [16] CHANCE B, WILLIAMS GR. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. I. Kinetics of oxygen utilization[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1955, 217(1): 383-393.
- [17] 王熠, 彭丽桃. 一种意大利青霉线粒体提取方法[P]. 中国: CN109321474A, 2019-02-12.
WANG Y, PENG LT. Italian penicillium mitochondria extraction method[P]. China: CN109321474A, 2019-02-12 (in Chinese).
- [18] 尚春雨. B-萜烯对柑橘青霉病菌的抑菌机理研究[D]. 武汉: 华中农业大学硕士学位论文, 2017.
SHANG CY. Studies about antifungal mechainsm of

- β -pinene against *Penicillium* of citrus[D]. Wuhan: Master's Thesis of Huazhong Agricultural University, 2017 (in Chinese).
- [19] 吴方丽. 丙烷脒对番茄灰霉病菌的抑菌机理初探[D]. 杨凌: 西北农林科技大学博士学位论文, 2008.
WU FL. Primary study on inhibiting mechanism of propamidine against *Botrytis cinerea*[D]. Yangling: Doctoral Dissertation of Northwest A & F University, 2008 (in Chinese).
- [20] GUO T, MA YL, GUO P, XU ZR. Antibacterial effects of the Cu(II)-exchanged montmorillonite on *Escherichia coli* K88 and *Salmonella choleraesuis*[J]. *Veterinary Microbiology*, 2005, 105(2): 113-122.
- [21] 刘俊, 吕波, 徐朗莱. 植物叶片中过氧化氢含量测定方法的改进[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2000, 27(5): 548-551.
LIU J, LÜ B, XU LL. Improved method for the determination of hydrogen peroxide in leaves[J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2000, 27(5): 548-551 (in Chinese).
- [22] 潘瑞焜, 董愚得. 植物生理学[M]. 3版. 北京: 高等教育出版社, 1995, 318-335.
PAN RC, DONG YD. *Plant Physiology*[M]. 3rd ed. Beijing: Higher Education Press, 1995, 318-335 (in Chinese).
- [23] 吕淑霞. 基础生物化学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2003.
LÜ SX. *Basic Biochemistry*[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2003 (in Chinese).
- [24] GIANNOPOLITIS CN, RIES SK. Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants[J]. *Plant Physiology*, 1977, 59(2): 309-314.
- [25] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000.
LI HS. *Principles and Techniques of Plant Physiological Biochemical Experiment*[M]. Beijing: Higher Education Press, 2000 (in Chinese).
- [26] 高俊凤. 植物生理学实验指导[M]. 高等教育出版社, 2006: 208-218.
GAO JF. *Experimental Guide to Plant Physiology*[M]. Higher Education Press, 2006: 208-218 (in Chinese).
- [27] 王琴琴, 蔡兴东, 吴义, 马洪明, 黄志宏, 林敏娟, 陈丽, 骆文志, 廖华, 林嘉欣, 车丽, 刘升明. 鲍曼不动杆菌体外诱导耐药及其诱导前后交叉耐药和呼吸耗氧率分析[J]. *微生物学通报*, 2020, 47(3): 852-859.
WANG QQ, CAI XD, WU Y, MA HM, HUANG ZH, LIN MJ, CHEN L, LUO WZ, LIAO H, LIN JX, CHE L, LIU SM. Intermediate resistance development in *Acinetobacter baumannii* in vitro and analysis of bacterial respiratory[J]. *Microbiology China*, 2020, 47(3): 852-859 (in Chinese).
- [28] POYTON RO, BALL KA, CASTELLO PR. Mitochondrial generation of free radicals and hypoxic signaling[J]. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, 2009, 20(7): 332-340.
- [29] RIGOLET M, YOBOUE ED, DEVIN A. Mitochondrial ROS generation and its regulation: mechanisms involved in H₂O₂ signaling[J]. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2011, 14(3): 459-468.
- [30] 杨立宾, 宋瑞清, 李冲伟. 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[J]. *北京林业大学学报*, 2013, 35(2): 92-96.
YANG LB, SONG RQ, LI CW. Effects of ethyl acetate extract of *Trichoderma harzianum* fermentation liquid on physiological index of *Phytophthora infestans*[J]. *Journal of Beijing Forestry University*, 2013, 35(2): 92-96 (in Chinese).
- [31] 黄聪亮, 彭美芳, 陈文学. 草果萃取物对金黄色葡萄球菌的抑菌作用及其机理研究[J]. *食品工业*, 2015, 36(9): 185-188.
HUANG CL, PENG MF, CHEN WX. Bacteriostatic action and mechanism of extract from amomum tsao-ko on *Staphylococcus aureus*[J]. *The Food Industry*, 2015, 36(9): 185-188 (in Chinese).
- [32] 李天来, 高晓倩, 刘玉凤. 夜间低温胁迫下钙对番茄幼苗根系活力及活性氧代谢的调控作用[J]. *西北农业学报*, 2011, 20(8): 127-132.
LI TL, GAO XQ, LIU YF. Effects of calcium on root activity and metabolism of reactive oxygen species of tomato seedlings under low night temperature stress[J]. *Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica*, 2011, 20(8): 127-132 (in Chinese).
- [33] WOLFF SP, GARNER A, DEAN RT. Free radicals, lipids and protein degradation[J]. *Trends in Biochemical*

- Sciences, 1986, 11(1): 27-31.
- [34] 覃鹏, 刘飞虎, 梁雪妮. 超氧化物歧化酶与植物抗逆性[J]. 黑龙江农业科学, 2002(1): 31-34.
QIN P, LIU FH, LIANG XN. Superoxide dismutase and plant resistance to the environmental stress[J]. Heilongjiang Agricultural Science, 2002(1): 31-34 (in Chinese).
- [35] HOU WC, LU YL, LIU SY, LIN YH. Activities of superoxide dismutase and glutathione peroxidase in leaves of different cultivars of *Liriope spicata* L. on 10% SDS-PAGE gels[J]. Botanical Bulletin-Academia Sinica Taipei, 2003, 44(1): 37-41.
- [36] GRANT JJ, LOAKE GJ. Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance[J]. Plant Physiology, 2000, 124(1): 21-29.
- [37] 武淑娟, 贲建民, 王睿, 何奎, 毛永强, 赵风云, 张紊玮, 艾对元. 短小芽孢杆菌 HN-10 抗菌肽 P-1 对粉红单端孢细胞膜结构和活性氧代谢的影响[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(23): 83-90.
WU SJ, YUN JM, WANG R, HE K, MAO YQ, ZHAO FY, ZHANG WW, AI DY. Effects of antifungal peptide P-1 from *Bacillus pumilus* HN-10 on cell membrane structure and ROS metabolism of *Trichothecium roseum*[J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(23): 83-90 (in Chinese).
- [38] 王星星, 李永华, 韦莹莹, 陶能国, 邵兴锋. 茶树精油对灰葡萄孢霉活性氧代谢的影响[J]. 中国食品学报, 2018, 18(12): 180-187.
WANG XX, LI YH, WEI YY, TAO NG, SHAO XF. The effect of tea tree oil on reactive oxygen species metabolism of *Botrytis cinerea*[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2018, 18(12): 180-187 (in Chinese).
- [39] 周春华, 刘红霞, 韦军. 活性氧与果实成熟衰老[J]. 上海交通大学学报(农业科学版), 2002, 20(1): 77-84.
ZHOU CH, LIU HX, WEI J. The role of reactive oxygen species in ripening and senescing of fruit[J]. Journal of Shanghai Jiao Tong University (Agricultural Science), 2002, 20(1): 77-84 (in Chinese).
- [40] RICH PR, BONNER WD. The sites of superoxide anion generation in higher plant mitochondria[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1978, 188(1): 206-213.