

杨 婷,李仟仟,史红安,等. 3 种酚类物质对油茶炭疽病病菌的抑菌机制[J]. 江苏农业科学,2018,46(23):106-109.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.23.026

### 3 种酚类物质对油茶炭疽病病菌的抑菌机制

杨 婷<sup>1,2</sup>, 李仟仟<sup>1</sup>, 史红安<sup>1</sup>, 吴梅凤<sup>1</sup>, 张志林, 王立华<sup>1</sup>

(1. 湖北工程学院特色果蔬质量安全控制湖北省重点实验室/湖北工程学院生命科学技术学院,湖北孝感 432000;

2. 湖北大学生命科学学院,湖北武汉 430062)

**摘要:**为明确酚类物质对油茶炭疽病的多重作用方式及活性机制,从香芹酚、丁香酚、异丁香酚对油茶炭疽菌菌丝的细胞膜通透性、可溶性蛋白和还原糖含量的影响进行研究。结果表明:处理后,油茶炭疽菌菌丝畸变,粗细不均,分支增多,局部膨大;油茶炭疽菌菌丝处理液的电导率随处理时间和酚类化合物浓度增加而增大;香芹酚、丁香酚、异丁香酚在浓度为 400  $\mu\text{g/mL}$  时,处理 12 h 后病原菌菌丝体内的可溶性蛋白含量分别为 7.55、7.69、8.01  $\text{mg/g}$ ,还原糖含量分别为 4.95、6.18、5.71  $\text{mg/g}$ 。试验结果为将香芹酚、丁香酚、异丁香酚开发成天然杀菌剂应用于农业生产实践提供了理论依据。

**关键词:**酚类物质;油茶炭疽病;抑菌机理;通透性;可溶性蛋白;还原糖

**中图分类号:** S763.744 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)23-0106-04

油茶(*Camellia oleifera* Abel)属山茶科(Theaceae)山茶属(*Camellial*)植物,为我国特有的优质食用油料植物<sup>[1]</sup>。茶油易被人体吸收,且烟点高,不含对人体有害的黄曲霉毒素、棉酚、芥酸等成分<sup>[2-3]</sup>。此外,茶油还具有保健功能,能提高人体免疫力,减轻脂肪堆积,降低血浆中胆固醇浓度,有效改善和预防高血压、冠心病、动脉硬化等心血管疾病<sup>[4-6]</sup>,是一种高档的保健食用油。茶油被联合国粮食及农业组织作为重点推广对象<sup>[7]</sup>。但是随油茶种植面积的增加,油茶病害日趋严重,生产绿色无公害茶油,已成为我国油茶产业可持续发展急需解决的关键问题<sup>[8]</sup>。

油茶炭疽病病菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)是油茶的主要病害之一,严重影响油茶的生长和产量<sup>[9]</sup>。萜类化合物为植物代谢的主要产物,具有抑菌活性强、低毒、易降解、不污

染环境、不易产生抗性等优点,是一种安全高效的天然杀菌剂<sup>[10-11]</sup>。前期研究发现,萜类化合物中香芹酚、丁香酚、异丁香酚对油茶炭疽病病菌具有较好的抑制活性。本试验研究香芹酚、丁香酚、异丁香酚对油茶炭疽病病菌细胞膜通透性、可溶性蛋白和还原糖含量的影响,了解其作用机制,以期将为香芹酚、丁香酚、异丁香酚开发成天然杀菌剂提供理论依据。

#### 1 材料与方法

##### 1.1 供试萜类化合物

香芹酚(carvacrol)、丁香酚(eugenol)、异丁香酚(isoeugenol)购自梯希爱(上海)化成工业发展有限公司,纯度大于 95%。

##### 1.2 供试病原菌

油茶炭疽病病菌从湖北省孝感市区植物病株上采得,采用常规组织分离法分离纯化病原菌,并观察其形态学特征,同时结合 rDNA-ITS(内转录间隔区)序列分析,对病原菌进行分离和分子鉴定得到<sup>[12]</sup>。

##### 1.3 试验方法

1.3.1 萜类化合物对病原菌菌丝形态的影响 在无菌条件下,用 6 mm 打孔器在培养好的供试菌菌落边缘打取长势相同的菌饼接入萜类化合物系列浓度梯度为 50、100、200、

收稿日期:2017-07-18

基金项目:湖北省教育厅科研项目(编号:B2016185);湖北省自然科学基金(编号:2014CFB571);特色果蔬质量安全控制湖北省重点实验室开放课题。

作者简介:杨 婷(1990—),女,湖北孝感人,硕士研究生,研究方向为植物病虫害。E-mail:xyangting@163.com。

通信作者:张志林,博士,研究方向为化学生态学。E-mail:zhangzhilin913@sina.com。

[19]郑斯竹,张 凯,杨晓军,等. 墨天牛属昆虫 *CO I* 基因比较及系统学初步研究[J]. 应用昆虫学报,2015,52(2):370-381.

[20]Liu H,Beckenbach A T. Evolution of the mitochondrial cytochrome oxidase II gene among 10 orders of insects [J]. Molecular Phylogenetics and Evolution,1992,1(1):41-52.

[21]Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. Molecular Biology and Evolution,2011,28(10):2731-2739.

[22]张裕君,刘跃庭,廖 芳,等. DNA 条形码技术研究进展及其在植物检疫中的应用展望[J]. 中国植保导刊,2010,30(4):15-17.

[23]王 颖,王 勇,高 涛,等. DNA 条形码技术用于原木携带蚊种的鉴定[J]. 中国国境卫生检疫杂志,2013(4):249-251.

[24]董 昆. 基于 *CO I* 基因的苹果蠹蛾地理种群遗传差异分析及幼虫快速分子鉴定[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2010.

[25]赵文静,张春林,陈汉彬,等. 基于 *CO I* 与 *ITS* 序列的杂鳞库蚊复组(双翅目:蚊科)分子系统发育[J]. 环境昆虫学报,2016(4):821-830.

[26]彭居刚,王绪桢,何舜平. DNA 条形码技术的研究进展及其应用[J]. 水生生物学报,2008,32(6):916-919.

[27]袁俊杰,马新华,龙 阳,等. 利用 DNA 条形码对 10 种苍耳属杂草的鉴定[J]. 杂草学报,2016,34(3):11-16.

400  $\mu\text{g/mL}$  的 PDA 培养基平板中,每个处理设 3 次重复,以不加药的 PDA 平板作为对照,培养 6 d 后,挑取菌落边缘的菌丝,在显微镜下观察菌丝的形态变化。

1.3.2 细胞膜通透性试验 (1) 菌丝体培养。将油茶炭疽菌在 PDA 培养基上培养 7 d,取直径为 6 mm 的菌饼数,放入含有 200 mL PD 培养基的三角瓶中,培养 7 d (28  $^{\circ}\text{C}$ , 180 r/min)。在无菌条件下将菌丝团取出,用灭菌的去离子水冲洗 3 次后,再用布氏漏斗抽滤,收集菌丝体。

(2) 电导率测定。称取 1 g 菌丝,放入含有 100 mL 灭菌去离子水的三角瓶中,分别加入香芹酚、丁香酚、异丁香酚至系列浓度梯度 (50、100、200、400  $\mu\text{g/mL}$ ),以无菌去离子水加溶剂作为对照,每个处理重复 3 次,于摇床上振荡培养 (28  $^{\circ}\text{C}$ , 180 r/min),室温下,于 0、30、60、90、120 min 时测定电导率。根据下式计算各处理随时间的延长引起的电导率增加的幅度:

电导率增幅 = (不同时间电导率 - 0 min 时的电导率) / 0 min 时的电导率  $\times 100\%$ 。

1.3.3 可溶性蛋白含量测定 (1) 菌丝体培养。具体方法同“1.3.1”节。

(2) 酶液制备。称取 5 g 菌丝,放于含有 100 mL PD 培养基的三角瓶中悬浮,分别加入香芹酚、丁香酚、异丁香酚至系列浓度梯度 (50、100、200、400  $\mu\text{g/mL}$ ),以无菌去离子水加溶剂作为对照,每个处理重复 3 次。处理 12 h 后,在无菌条件下将菌丝取出,用磷酸缓冲液 (0.2 mol/L, pH 值为 7.5) 冲洗 2 次,之后用布氏漏斗抽滤。称取 0.5 g 菌丝,移入加有 2 mL 磷酸缓冲液的研钵中,冰浴下研磨至糊状,加入磷酸缓冲液至体积为 10 mL,于 4  $^{\circ}\text{C}$  离心 (12 000 r/min) 15 min,收集上清液备用。

(3) 可溶性蛋白含量的测定。采用考马斯亮蓝法测定可

溶性蛋白含量,吸取 1 mL 酶液至 10 mL 离心管中,再加入 5 mL 考马斯亮蓝,摇匀,静置 5 min,以 1 mL 蒸馏水 + 5 mL 考马斯亮蓝作为空白对照,于 595 nm 测定吸光度,每个处理重复 3 次。通过标准曲线查得蛋白质含量,根据以下公式计算样品中蛋白质含量 (mg/g):

样品中蛋白质含量 =  $C \times V_i / (V_s \times W_F \times 1\ 000)$ 。

式中:  $C$  为查标准曲线所得含量  $\mu\text{g/g}$ ;  $V_i$  为提取液总体积, mL;  $V_s$  为测定时加样量, mL;  $W_F$  为样品鲜质量, g。

1.3.4 还原糖含量的测定 菌丝体培养同“1.3.1”节,酶液制备同“1.3.3”节。还原糖含量的测定:用二硝基水杨酸 (DNS) 法测还原糖含量,取制备的酶液 1 mL,空白对照用去离子水代替,加入 2 mL DNS,于沸水中加热 5 min,取出后立即浸入冷水中冷却至室温,再加去离子水定容至 10 mL,在 540 nm 处比色并记录  $D_{540\text{ nm}}$ ,重复 3 次,取平均值。还原性糖含量 (mg/g) 计算公式如下:

样品中还原糖含量 =  $(a \times V_i / V) / m$ 。

式中:  $A$  为根据标准曲线计算得到的还原糖含量, mg/g;  $V_i$  为提取液总体积, mL;  $V$  为测定液体积, mL;  $m$  为样品质量, g。

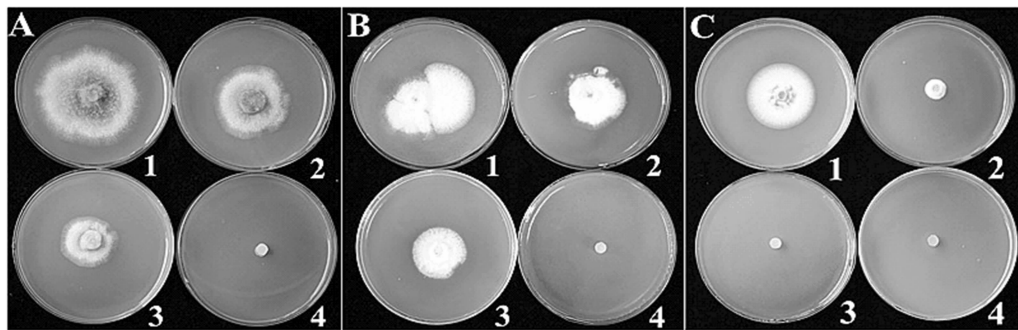
## 1.4 数据处理

试验数据采用 Excel 2010 和 SPSS 19.0 统计分析软件处理。用 SPSS 软件进行单因素方差分析,处理间差异多重比较采用 Duncan 氏新复极差法。

## 2 结果与分析

### 2.1 酚类物质对病原菌菌丝形态的影响

由酚类对供试病原菌菌丝生长抑制效果 (图 1) 可以看出,香芹酚、丁香酚、异丁香酚对供试菌具有明显的抑制作用,且菌落直径随着酚类物质浓度的增加而变小。同时,经醛类化合物处理后的菌丝粗细不均、畸形、发生扭曲、分支增多 (图 2)。



A—异丁香酚; B—丁香酚; C—香芹酚; 1—50  $\mu\text{g/mL}$ ; 2—100  $\mu\text{g/mL}$ ; 3—200  $\mu\text{g/mL}$ ; 4—400  $\mu\text{g/mL}$

图1 3种酚类物质不同浓度对炭疽菌的抑菌活性

### 2.2 对油茶炭疽菌细胞膜通透性的影响

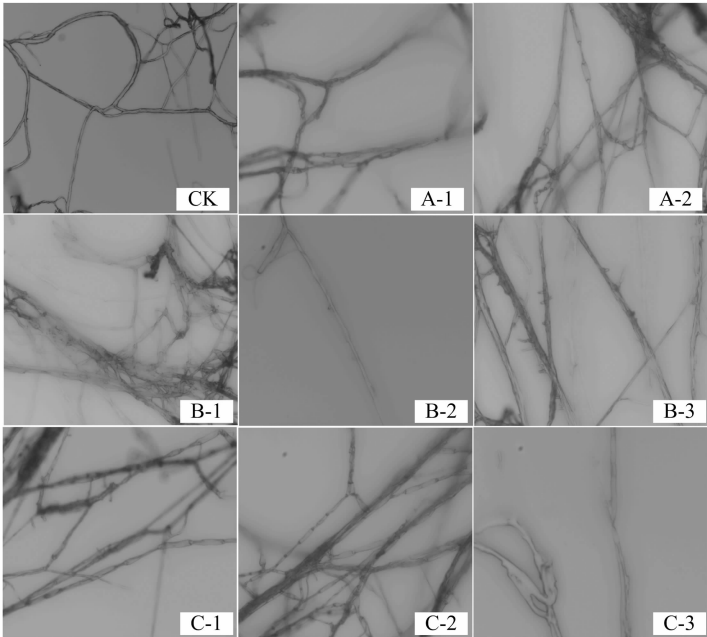
酚类物质对油茶炭疽菌菌丝电导率变化的测定结果表明,油茶炭疽菌菌丝处理液的电导率均随着处理时间的延长而升高,且电导率增幅均随着酚类物质浓度的增大而增大 (图 3 ~ 图 5)。

香芹酚处理 30 min 时, 50、100  $\mu\text{g/mL}$  浓度的电导率增幅变化不大; 当处理时间大于 30 min 时, 浓度为 100  $\mu\text{g/mL}$  的电导率增幅明显高于浓度为 50  $\mu\text{g/mL}$  的。丁香酚处理 30 ~ 60 min 时, 50、100、200  $\mu\text{g/mL}$  浓度处理下的电导率增幅较小, 60 min 后电导率增幅随着浓度的增加而上升。异丁香酚

处理浓度为 50  $\mu\text{g/mL}$  时, 电导液的电导率与对照无明显差异, 在 100、200、400  $\mu\text{g/mL}$  浓度下, 电导液的电导率增幅明显高于对照。

### 2.3 油茶炭疽菌菌丝的可溶性蛋白含量

处理 12 h 后, 油茶炭疽菌菌丝体内可溶性蛋白含量测定结果表明, 油茶炭疽菌菌丝体内可溶性蛋白含量均随着浓度的降低而下降 (表 1)。当香芹酚、丁香酚、异丁香酚浓度为 400  $\mu\text{g/mL}$  时, 可溶性蛋白含量最低, 分别为 7.55、7.69、8.01 mg/g, 与对照相比分别下降了 46.49%、45.50%、43.23%。



A—香芹酚；B—丁香酚；C—异丁香酚；1—50 µg/mL；2—100 µg/mL；3—200 µg/mL  
图2 酚类物质处理后炭疽菌菌丝的形态(40×)

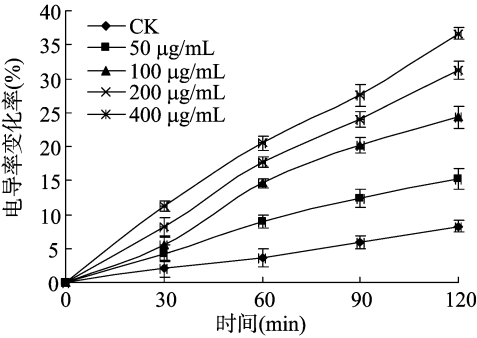


图3 香芹酚对油茶炭疽菌菌丝细胞膜通透性的影响

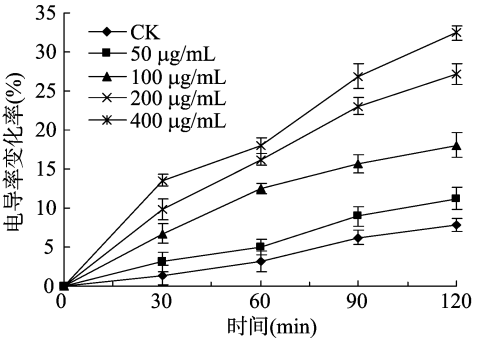


图5 异丁香酚对油茶炭疽菌菌丝细胞膜通透性的影响

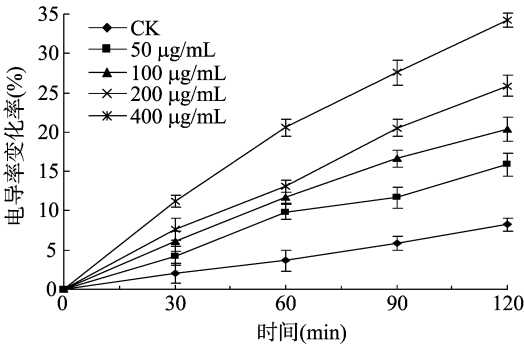


图4 丁香酚对油茶炭疽菌菌丝细胞膜通透性的影响

表 1 3 种酚类物质对油茶炭疽菌菌丝可溶性蛋白含量的影响

药品	酚类物质浓度 (µg/mL)	可溶性蛋白含量 (mg/g)	抑制率 (%)
CK		14.11 ± 0.73a	—
香芹酚	50	12.58 ± 0.85b	10.84
	100	11.07 ± 0.65c	21.55
	200	9.22 ± 1.05d	34.66
	400	7.55 ± 0.62e	46.49
丁香酚	50	12.34 ± 0.70b	12.54
	100	11.13 ± 0.86c	21.12
	200	9.91 ± 1.12d	29.77
	400	7.69 ± 0.50e	45.50
异丁香酚	50	13.09 ± 0.40b	7.23
	100	12.07 ± 0.85c	14.46
	200	10.22 ± 0.69d	27.57
	400	8.01 ± 0.94e	43.23

注:不同小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ )。下表同。

2.4 还原糖含量的测定结果

由表 2 可以看出,经香芹酚、丁香酚、异丁香酚处理后,胶孢炭疽菌菌丝体内还原糖含量都随着浓度的升高而下降,当酚类物质浓度为 400 µg/mL 时,还原糖含量最低,分别为 4.95、6.18、5.71 mg/g,较对照分别下降 59.82%、49.84%、53.65%。

3 讨论与结论

菌体细胞膜为菌体的保护屏障,能调节和选择物质进出。

膜通透性增大是细胞膜受到损伤的主要表现之一。细胞膜受到损害后,其通透性增大,不能有选择地运送细胞内外的营养物质和代谢产物,导致细胞内含物外泄,使菌丝体失去正常生长所需的营养物质,扰乱代谢途径,从而迫使菌体死亡<sup>[13]</sup>。

表 2 3 种酚类物质对油茶炭疽菌菌丝还原糖含量的影响

药品	浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	还原糖含量 ( $\text{mg/g}$ )	抑制率 (%)
CK		12.32 $\pm$ 0.82a	—
香芹酚	50	9.96 $\pm$ 1.14b	19.16
	100	8.30 $\pm$ 0.92c	32.63
	200	6.63 $\pm$ 0.68d	46.19
	400	4.95 $\pm$ 1.12e	59.82
丁香酚	50	10.88 $\pm$ 0.65b	11.69
	100	9.44 $\pm$ 0.89c	23.38
	200	7.58 $\pm$ 1.06d	38.47
	400	6.18 $\pm$ 0.78e	49.84
异丁香酚	50	11.08 $\pm$ 1.16b	10.06
	100	9.97 $\pm$ 0.84c	19.07
	200	7.57 $\pm$ 0.69d	38.56
	400	5.71 $\pm$ 1.01e	53.65

Odds 等研究表明,作用于细胞膜的抑菌物质可使细胞膜通透性增大,使其内含物如蛋白质、核酸、还原糖、金属离子  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$  等外泄<sup>[14-15]</sup>。在本试验中,经酚类物质处理后,炭疽菌菌体液电导率随着处理时间的延长而呈逐渐上升的趋势,并且随着酚类物质浓度的增加,电导率增幅增加。汪金莲等研究茶多酚对稻瘟病菌的抑制得出,茶多酚使稻瘟病菌的细胞膜通透性增大,从而破坏细胞膜的结构,使其失去保护屏障,由此达到抑菌目的<sup>[16]</sup>。由此推测,酚类对炭疽菌抑菌活性是其损伤或破坏菌体细胞膜的结构,导致大量内含物外泄,最终导致菌体死亡,但是其具体作用位点还须进一步研究。

彭璇等研究白薇提取液对意大利青霉的抑菌机制时发现,其提取液可以降低意大利青霉菌菌丝体内总糖、可溶性蛋白含量<sup>[17]</sup>。蛋白质是构成细胞膜的主要成分之一,是菌丝维持生命活动所需的基本物质<sup>[18]</sup>。菌体内蛋白质含量减少,会使菌丝体生长受到影响。经香芹酚、丁香酚、异丁香酚处理后,油茶炭疽菌菌丝体内可溶性蛋白含量都随着处理液浓度的升高而下降。周梦娇等研究发现,桂枝提取液对指状青霉具有抑制作用,通过测定其电导率变化、可溶性蛋白质和总糖含量,研究其抑菌机制,结果表明,指状青霉金桂枝提取物经处理后,菌丝体内可溶性蛋白、可溶性糖含量均减少<sup>[19]</sup>。

还原糖是菌体细胞的主要能源物质之一,是维持病原菌细胞正常生理代谢所需的能量来源和物质基础,还原糖的利用率直接影响菌丝生长和繁殖<sup>[20-22]</sup>。在本研究中,2 种病原菌经处理后,体内还原糖含量减少,且含量随着酚类物质浓度的升高而降低,表明酚类物质促进菌体细胞内还原糖的分解,使菌体失去能量物质,扰乱菌体的生理代谢,从而导致菌体死亡。

综上所述分析,酚类化合物香芹酚、丁香酚、异丁香酚增大了供试菌的细胞膜透性,使菌体内含物外泄或抑制菌体内能量物质的合成代谢,从而达到抑菌目的。

#### 参考文献:

[1] 邓小军,周国英,刘君昂,等. 湖南油茶林丛枝菌根真菌多样性及

其群落结构特征[J]. 中南林业科技大学学报,2011,31(10): 38-42.

[2] 刘振香,陈 鑫,罗小会. 茶油在医药方面的活性成分研究进展[J]. 金华职业技术学院学报,2014,14(3):77-81.

[3] 李 丽,吴雪辉,寇巧花,等. 茶油的研究现状及应用前景[J]. 中国油脂,2010,35(3):10-14.

[4] 马 力,陈永忠. 茶油的功能特性分析[J]. 中国农学通报,2009,25(8):82-84.

[5] 钟 丹,蒋孟良,王 霆. 茶油的化学成分、药理作用及临床应用研究进展[J]. 中南药学,2012,10(4):299-303.

[6] Satou T, Sato N, Kato H, et al. The effect of *Camellia* seed oil intake on lipid metabolism in mice[J]. Natural Product Communications, 2016,11(4):511-513.

[7] 袁德桂. 重庆生态油茶产业化现状及发展策略[J]. 中国农业资源与区划,2016,37(1):188-191.

[8] 国家林业局. 全国油茶产业规划(2009—2020)[Z]. 2009.

[9] 杨 华,赵丹阳,秦长生,等. 不同油茶种和品种对炭疽病的抗性观察[J]. 植物保护,2015,41(2):195-199.

[10] 胡林峰,许明录,朱红霞. 植物精油抑菌活性研究进展[J]. 天然产物研究与开发,2011,23(2):384-391.

[11] Vaio C D, Graziani G, Gaspari A, et al. Essential oils content and antioxidant properties of peel ethanol extract in 18 lemon cultivars[J]. Scientia Horticulturae, 2010,126(1):50-55.

[12] 史红安,傅本重,张志林,等. 侵染油茶的两种病原菌的鉴定及其生物学特性研究[J]. 湖北农业科学,2015,54(23):5908-5911.

[13] 沈晓强. 丁香提取物对番茄疫霉根腐病菌生物活性的研究[D]. 晋中:山西农业大学,2015.

[14] Odds F C, Brown A J, Gow N A. Antifungal agents: mechanisms of action[J]. Trends in Microbiology, 2003,11(6):272-279.

[15] Carson C F, Mee B J, Riley T V. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy[J]. Antimicrobial Agents & Chemotherapy, 2002,46(6):1914-1920.

[16] 汪金莲,邱业先,扶教龙,等. 茶多酚对稻瘟病菌的抑制作用及抑菌机理[J]. 天然产物研究与开发,2011,23(5):918-922.

[17] 彭 旋,陈玉环,陈金印. 白薇提取液对意大利青霉抑菌机理及脐橙青霉病防治效果的研究[J]. 植物病理学报,2017,47(3):398-405.

[18] 张婷婷,马 磊. 菌渣固态发酵菌体蛋白饲料的工艺优化[J]. 江苏农业科学,2016,44(9):270-272.

[19] 周梦娇,万春鹏,陈金印. 柑橘绿霉病中草药高效抑菌剂的筛选及抑菌机理研究[J]. 现代食品科技,2014(3):144-149.

[20] 马欣燕,王国正,郭成金. 正交试验设计法筛选印度块菌液体培养基[J]. 江苏农业科学,2016,44(3):200-203.

[21] 张婷婷,马 磊. 菌渣固态发酵菌体蛋白饲料的工艺优化[J]. 江苏农业科学,2016,44(9):270-272.

[22] 梁永增,魏冬梅,王 磊,等. 1 株鱼类水霉病原真菌拮抗菌的发酵条件优化[J]. 江苏农业科学,2017,45(1):141-145.