



长枝木霉T6菌株蛋白粗提液对秀丽隐杆线虫行为毒性和繁殖能力的影响

李英英 吉宝丽 张树武 徐秉良

Effects of crude protein extract from *Trichoderma longibrachiatum* strain T6 on the behavior of *Caenorhabditis elegans*

LI Yingying, JI BaoLi, ZHANG Shuwu, XU Bingliang

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.11829/j.issn.1001-0629.2023-0530>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

环境因子和储藏时期对长枝木霉PT6蛋白培养滤液杀线活性评价

Nematicidal activity of *Trichoderma longibrachiatum* PT6 protein culture filtrate under different environmental factors and storage periods

草业科学. 2022, 39(10): 2095 <https://doi.org/10.11829/j.issn.1001-0629.2021-0749>

两种乔木落叶浸提液对高羊茅幼苗生长和根际土壤酶活性的影响

Effects of two kinds of tree litter leaf extracts on the growth and rhizosphere soil enzyme activity of *Festuca arundinacea*

草业科学. 2024, 41(6): 1288 <https://doi.org/10.11829/j.issn.1001-0629.2023-0164>

NaCl溶液模拟胁迫下耐盐木霉菌筛选及其耐盐活性

Screening and determining the salt tolerance strain of *Trichoderma* under NaCl stress simulation

草业科学. 2023, 40(3): 665 <https://doi.org/10.11829/j.issn.1001-0629.2021-0745>

饲料油菜粗蛋白含量及其氨基酸组成

The study on the crude protein content and amino acid composition in *Brassica napus* feed

草业科学. 2023, 40(12): 3150 <https://doi.org/10.11829/j.issn.1001-0629.2022-0802>

杂草水提液对3种一年生牧草种子萌发特性和幼苗生长的化感效应

Allelopathic effects of water extract from three species of annual forage on seed germination and seedling growth

草业科学. 2024, 41(7): 1690 <https://doi.org/10.11829/j.issn.1001-0629.2024-0109>

植物叶蛋白提取工艺及蛋白肽制备技术研究进展

Advances in the techniques for the extraction of plant leaf protein and the preparation of protein peptides

草业科学. 2024, 41(5): 1241 <https://doi.org/10.11829/j.issn.1001-0629.2023-0043>



关注微信公众号，获得更多资讯信息

DOI: 10.11829/j.issn.1001-0629.2023-0530

李英英, 吉宝丽, 张树武, 徐秉良. 长枝木霉 T6 菌株蛋白粗提液对秀丽隐杆线虫行为毒性和繁殖能力的影响. 草业科学, 2025, 42(1): 44-52.

LI Y Y, JI B L, ZHANG S W, XU B L. Effects of crude protein extract from *Trichoderma longibrachiatum* strain T6 on the behavior of *Caenorhabditis elegans*. Pratacultural Science, 2025, 42(1): 44-52.

长枝木霉 T6 菌株蛋白粗提液对秀丽隐杆线虫行为毒性和繁殖能力的影响

李英英, 吉宝丽, 张树武, 徐秉良

(甘肃农业大学植物保护学院 / 甘肃省农作物病虫害生物防治工程实验室, 甘肃 兰州 730070)

摘要: 长枝木霉 (*Trichoderma longibrachiatum*) T6 菌株作为重要的植物病害生防菌之一, 对植物线虫具有较强的毒杀作用。本研究基于线虫形态和生理等指标评价了不同浓度 T6 菌株蛋白粗提液对秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 行为毒性和繁殖能力的影响。结果表明: 浓度为 50、100、150、200 和 250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 T6 菌株蛋白粗提液对秀丽隐杆线虫具有不同程度杀线活性, 其中 250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 蛋白粗提液效果最显著 ($P < 0.05$)。显微观察发现, 浓度为 250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 蛋白粗提液处理后, 可导致线虫体壁透明、溶解、内含物渗出、虫体破裂。与无菌水对照相比, 蛋白粗提液处理后可导致线虫头部摆动频率、身体弯曲频率、向前运动频率、向后运动频率、觅食能力和生殖能力均显著降低 ($P < 0.05$), 分别较对照降低 76.00%、79.21%、48.21%、46.15%、63.78% 和 30.47%, 然而线虫 Omega/U 型摆动频率未受显著影响。综上, T6 菌株蛋白粗提液对秀丽隐杆线虫的运动、觅食和繁殖能力具有明显影响。

关键词: 木霉 T6; 蛋白粗提液; 秀丽隐杆线虫; 行为毒性; 觅食能力; 繁殖能力

文献标识码: A 文章编号: 1001-0629(2025)01-0044-09

Effects of crude protein extract from *Trichoderma longibrachiatum* strain T6 on the behavior of *Caenorhabditis elegans*

LI Yingying, JI BaoLi, ZHANG Shuwu, XU Bingliang

(College of Plant Protection, Gansu Agricultural University / Engineering Laboratory for Biological Control of Crop Diseases and Pests, Lanzhou 730070, Gansu, China)

Abstract: *Trichoderma longibrachiatum* strain T6, as an important bacterium for the biocontrol of plant diseases, has been found to have strong toxic effects on plant nematodes. In this study, we evaluated the effects of different concentrations of a crude protein extract from the T6 strain on the behavior of *Caenorhabditis elegans* based on assessments of morphological and physiological parameters. The results revealed that a crude protein extract derived from the T6 strain (at concentrations of 50, 100, 150, 200, and 250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) had significant effects on nematodes, with the highest assessed concentration having the most pronounced effects. The body walls of nematodes treated with 250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ were found to be transparent and disrupted, leading to the leakage of the internal contents and subsequent fragmentation of the worm body. Nematodes that were exposed to the crude protein were characterized by significant reductions of 76.00%, 79.21%, 48.21%, 46.15%, 63.78%, and 30.47% in head thrashes, body bends, forward turns, backward turns, foraging behaviors, and reproduction ($P < 0.05$), respectively, whereas we detected no significant effects on the Omega/U-shaped swing frequency. Collectively, these

收稿日期: 2023-10-09 接受日期: 2023-11-16

基金项目: 甘肃农业大学“伏羲杰出人才培养计划”项目 (Gaufx-03J03); 甘肃省杰出青年基金项目 (18JR3RA161); 兰州市科技计划项目 (2021-1-39)

第一作者: 李英英 (1997-), 女, 青海民和人, 在读硕士生, 研究方向为植物保护。E-mail: 15597437232@qq.com

通信作者: 张树武 (1984-), 男, 甘肃庆阳人, 副教授, 硕导, 博士, 研究方向为植物病害生物防治。E-mail: zhangsw704@126.com

findings revealed that a crude protein extract of the T6 strain of *T. longibrachiatum* has significant effects on the movement, foraging, and reproduction of *C. elegans*.

Keywords: *Trichoderma longibrachiatum* strain T6; crude protein extract; *Caenorhabditis elegans*; behavioral toxicity; foraging ability; reproduction

Corresponding author: ZHANG Shuwu E-mail: zhangsw704@126.com

木霉菌 (*Trichoderma* spp.) 作为自然界广泛存在的真菌之一, 不仅对植物真菌及植物线虫病害具有防治作用^[1], 而且具有促进植物生长、提高植物抗性和耐盐等功能, 如谢琳淼等^[2]发现哈茨木霉 (*Trichoderma harzianum*) 能够促进紫羊茅 (*Festuca rubra*) 和草地早熟禾 (*Poa pratensis*) 生长, 并诱导其产生抗病性; 陈臻等^[3]研究表明长枝木霉 T6 菌株分生孢子悬浮液能促进禾本科和豆科牧草及白三叶 (*Trifolium repens*) 种子及幼苗的生长, 提高植物抗病性; 古丽君等^[4]发现深绿木霉 (*Trichoderma aureoviride*) 对草坪禾草腐霉病原菌瓜果腐霉 (*Pythium aphanidermatum*) 生长具有抑制作用; 张树武等^[5]发现长枝木霉 T6 菌株孢子悬浮液和发酵液对禾谷孢囊线虫 (*Heterodera avenae*) 二龄幼虫具有寄生和致死作用, 但是有关木霉菌对秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 致死作用方面研究较少。

据报道, 几丁质层和蛋白层作为线虫卵壳和体壁的主要组成成分, 对线虫起保护作用, 阻止外来物的侵入^[6], 目前已从多种生防菌中发现其胞外蛋白酶对线虫具有毒杀作用, 如食线虫真菌的丝氨酸蛋白酶作为一种重要的毒力因子在降解线虫体壁的过程中发挥着重要作用^[7]; 长枝木霉产生的胞外几丁质酶与线虫卵寄生率正相关^[8]; 铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 中高溶解度 pachi 融合蛋白与 Cry21Aa 混合, 可快速降解秀丽隐杆线虫卵壳、角质层和肠道, 能有效防治线虫^[9]。同时, 木霉菌分泌的几丁质酶和蛋白酶能降解线虫的卵壳和体壁, 使线虫发育受阻、卵壳溶解、内容物外渗^[10-11], 但是目前有关长枝木霉 T6 菌株蛋白粗提液对线虫行为毒性和繁殖能力影响方面尚少见研究。

前期研究发现长枝木霉 PT6 蛋白培养滤液对禾谷孢囊线虫具有较好的毒杀活性^[12], 但是其蛋白粗提液对线虫行为毒性和繁殖能力是否有影响方面。秀丽隐杆线虫作为一种模式线虫, 具有生活周期短、易培养、结构简单、通体透明易观察和对毒性敏

感等特点^[13]。因此, 以模式线虫秀丽隐杆线虫作为供试线虫, 探究 T6 菌株蛋白粗提液对秀丽隐杆线虫头部摆动频率、身体弯曲频率、基本运动能力、觅食能力和繁殖能力的影响, 以期 T6 菌株蛋白粗提液防治植物寄生线虫提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 供试材料

长枝木霉 T6 菌株: 由甘肃农业大学植物保护学院植物病原实验室分离保存。

秀丽隐杆线虫野生型 N2 线虫: 购自福建上源生物科学技术有限公司, 并保存于甘肃农业大学植物保护学院植物病毒学和分子生物学实验室。

K_2HPO_4 - KH_2PO_4 缓冲液: 10.83 g K_2HPO_4 、3.56 g KH_2PO_4 , 加适量水溶解并定容至 100 mL, 调节 pH 6.0, 高温高压灭菌备用。

OP50: 大肠杆菌。

NGM 培养基: NaCl 3 g、蛋白胨 2.5 g、琼脂粉 18 g, 加水定容至 1 L, 高压灭菌后分别加入灭菌的 $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 $MgSO_4$ 溶液、 $CaCl_2$ 溶液、 K_2HPO_4 - KH_2PO_4 缓冲液 1 mL, 立即混匀。

酪蛋白培养基: 10 g 酪蛋白加入 1 L 水中溶解。

M9 缓冲液: 1.5 g KH_2PO_4 、3 g $NaHPO_4$ 、1.5 g NaCl、0.5 mL 1M $MgSO_4$ 溶液, 加水至 500 mL, 高压灭菌后分装使用。

线虫裂解液: 将 $5\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 NaClO 溶液、 $5\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 NaOH 溶液及超纯水以 1:1:1 的比例混合, 现配现用。

1.2 试验方法

1.2.1 长枝木霉 T6 菌株蛋白粗提液的制备及浓度的测定

参考张树武等^[5]方法制备发酵液。取 1 皿培养 4 d 的长枝木霉 T6 菌株 PDA 培养基加入无菌水, 将孢子悬浮液浓度配制为每毫升 1.0×10^7 个, 并在每

50 mL 酪蛋白培养基中加入 1 mL 分生孢子悬浮液, 置于 28 °C、180 r·min⁻¹ 恒温摇床培养 4 d 后离心过滤 (4 °C, 12 000 r·min⁻¹) 25 min, 收集上清液即为无菌发酵液原液。然后, 将得到的无菌发酵液进行硫酸铵盐析沉淀至饱和, 于 4 °C 静置 12 h 后并经离心收集沉淀, 利用 20 mol·L⁻¹ Tris-HCl 溶解后透析除盐获得蛋白粗提液。采用考马斯亮蓝法测定蛋白浓度^[14]。取 125 μL 考马斯亮蓝染色液加入 25 μL 待测样品中反应, 并置于 595 nm 波长下测定吸光度, 根据标准曲线计算蛋白质浓度, 试验重复 3 次, 得到蛋白粗提液的浓度为 262.31 μg·mL⁻¹, 后续分别稀释为 50、100、150、200 和 250 μg·mL⁻¹ 备用。

1.2.2 秀丽隐杆线虫的培养及同步化处理

秀丽隐杆线虫的培养采用含大肠杆菌 OP50 的 NGM 培养基进行培养^[15]。利用 M9 缓冲液冲洗培养至产卵期的线虫并收集于离心管中, 3 500 r·min⁻¹ 离心 1 min 后弃上清, 重复 3 次后按 1:1 的比例加入线虫裂解液, 处理 5 min 后于 3 500 r·min⁻¹ 离心 1 min, 弃上清, 重复 3 次后收集线虫沉淀, 并加入 1 mL M9 缓冲液冲洗沉淀 3 次, 即得到线虫卵。然后将其转入含有大肠杆菌 OP50 的 NGM 培养基中, 于 20 °C 下分别黑暗培养 12、36 和 48 h 后获得 L1、L3 和 L4 期的幼虫, 并利用无菌 K 液冲洗 3 次后用于后续试验。

1.2.3 长枝木霉 T6 菌株蛋白粗提液对秀丽隐杆线虫致死作用及显微观察

利用无菌的 96 孔细胞培养板测定蛋白粗提液的杀线活性, 每孔中先加入 10 μL 浓度为 1 mL 2 × 10² 条秀丽隐杆线虫的 L2 期幼虫悬浮液, 再分别加入 90 μL 蛋白粗提液, 以加入等量的无菌水和 20 mmol Tris-HCl (pH 7.5) 分别作为阴性对照、阳性对照, 每个处理 16 个重复, 置于 20 °C 恒温培养箱中黑暗培养, 每隔 6 h 观察一次, 死亡 2 龄幼虫虫体僵直且用竹针轻轻拨动时静止不动, 活虫虫体呈弯曲状态且能蠕动。根据记录数据计算其校正死亡率。

死亡率 = (死亡 2 龄幼虫数量 / 供试 2 龄幼虫数量) × 100%。

校正死亡率 = (处理死亡率 - 对照死亡率) / (1 - 对照死亡率) × 100%。

利用无菌的 24 孔细胞培养板观察长枝木霉 T6 蛋白粗提液对秀丽隐杆线虫的毒杀作用。试验

中每个孔中先加入 100 μL 的 L1 期线虫悬浮液 (每毫升 100 条), 再加 900 μL 不同浓度 (50、150、和 250 μg·mL⁻¹) 的长枝木霉 T6 蛋白粗提液, 以加入等量的无菌水作为对照, 每个处理和对照均重复 6 次, 置于 20 °C 恒温培养箱中黑暗培养, 分别在处理 24、48 和 72 h 时在显微镜下观察并拍照记录。

1.2.4 长枝木霉 T6 菌株蛋白粗提液对秀丽隐杆线虫运动能力的测定

取无菌的 96 孔细胞培养板, 将经过同步化处理且培养至 L4 期的秀丽隐杆线虫 300 条加入到 900 μL 稀释成不同浓度 (分别为 50、100、150、200 和 250 μg·mL⁻¹) 的蛋白粗提液和含有大肠杆菌 OP50 的孔中, 以加入等量无菌水作为对照, 处理组和对照组均重复 6 次, 置于 20 °C 恒温培养箱中黑暗培养 24 h 后用 K 液冲洗 3 次并收集线虫于离心管中制成线虫悬浮液, 用于各项生理指标的测定。

头部摆动频率参照许云等^[16]测定方法略作修改。将处理后的线虫用 K 液冲洗后, 吸取 20 μL 的 L4 幼虫悬浮液于不含大肠杆菌 OP50 的 NGM 培养基上, 使其恢复 1 min 后, 在显微镜下观察并记录线虫在 1 min 之内的头部摆动频率, 线虫头部从身体一侧摆到另一侧再摆回来记为摆动 1 次, 每个处理观察 20 条线虫, 重复 3 次。

身体弯曲频率参考 Tsalik 等^[17]的方法略作修改。将处理后的 L4 幼虫 20 μL 转移至不含大肠杆菌 OP50 的 NGM 培养基上, 待 1 min 自由活动使其行为稳定, 在显微镜下观察并记录线虫在 20 s 内的身体弯曲频率, 假定线虫身体以咽泵方向为 Y 轴, 其身体在 X 轴方向上的运动改变记为身体弯曲 1 次, 每个处理观察 20 条线虫, 重复 3 次。

1.2.5 长枝木霉 T6 菌株蛋白粗提液对秀丽隐杆线虫基本运动能力测定

根据 Murakami 等^[18]方法测定线虫的基本运动能力, 包括向前摆动、向后摆动、Omega/U 型摆动。将 20 μL 利用不同浓度蛋白粗提液处理后的 L4 幼虫转移至不含大肠杆菌 OP50 的 NGM 培养基上, 使其稳定 1 min 后于显微镜下观察记录线虫在 30 s 内的摆动次数, 每个处理观察 20 条线虫, 重复 3 次。

1.2.6 长枝木霉 T6 菌株蛋白粗提液对秀丽隐杆线虫觅食能力测定

参考 Kohra 等^[19]方法略作修改。取食行为的测

定采用菌落接触率法,用移液枪加 5 μL 的大肠杆菌 OP50 于直径为 9 cm 的 NGM 培养基中央,使其形成直径为 1 cm 的圆形菌斑,将不同浓度处理过的 L4 期线虫用 K 液冲洗 3 次后分别挑取 10 条于距培养基中心 3 cm 处,每个处理和对照重复 3 次,分别于 2、4、6、8 和 24 h 观察并记录接触到菌落的线虫数,计算菌落接触率。

$$\text{菌落接触率} = \frac{\text{接触菌落的线虫数}}{\text{供试线虫数}} \times 100\%。$$

1.2.7 长枝木霉 T6 菌株蛋白粗提液对秀丽隐杆线虫

参考 Swain 等^[20]方法略作修改。将经过同步化处理培养至 L3 期的 20 条幼虫挑取至含有不同浓度蛋白粗提液和大肠杆菌 OP50 的 NGM 培养基上,以加入等量无菌水和大肠杆菌 OP50 为对照,培养 12 h 后取 1 条线虫转移至新的只含大肠杆菌 OP50 的 NGM 培养基上,置于 20 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱观察其产卵情况,至秀丽隐杆线虫不再产卵,每个处理和对照重复 10 次。秀丽隐杆线虫的产卵量为每条线虫在产卵期产卵的总和。

1.2.8 数据处理

采用 SPSS 27.0 软件进行统计分析,用平均值 \pm 标准误表示测定结果,分别对不同浓度同一处理时间和不同浓度不同处理时间进行单因素方差分析,并利用显著性分析和 Duncan 氏新复极差法进行多重比较。采用 Excel 2016 软件进行统计和作图。

2 结果和分析

2.1 长枝木霉 T6 蛋白粗提液对秀丽隐杆线虫致死作用测定及毒杀作用显微观察

不同浓度长枝木霉 T6 菌株蛋白粗提液处理秀丽隐杆线虫 6 h 后,各浓度间其致死作用差异不显著 ($P > 0.05$),处理 12 h 后,只有 250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 蛋白粗提液处理后线虫致死作用与其他浓度差异显著 ($P < 0.05$);处理 18 和 24 h 后,随着浓度的增大和时间的延长,各浓度处理下线虫致死率出现明显差异 (图 1)。浓度为 250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的蛋白粗提液处理秀丽隐杆线虫 24 h 对其毒杀作用最佳,线虫死亡率达 75.42%,处理浓度和时间越短,毒杀作用越弱,浓度为 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的蛋白粗提液在处理线虫 6 h 时的死亡率仅为 24.26% (图 1),因此后续采用 50、150 和 250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 进行显微观察。

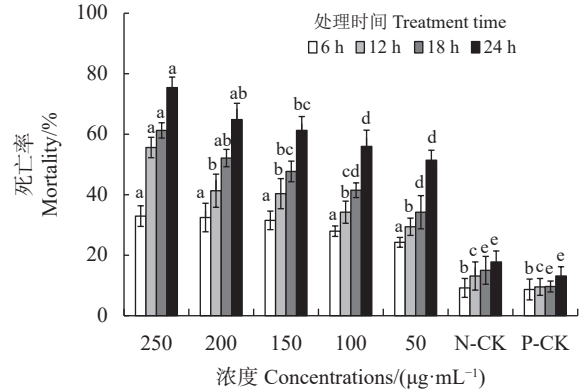


图 1 不同浓度长枝木霉 T6 蛋白粗提液对秀丽隐杆线虫的致死作用

Figure 1 Lethality of different concentrations of *Trichoderma longibrachiatum* T6 crude protein extract against *Caenorhabditis elegans*

N-CK 为阴性对照, P-CK 为阳性对照。不同小写字母表示相同时间不同浓度处理间差异显著 ($P < 0.05$); 图 6 同。

N-CK: negative control, P-CK: positive control. Different lowercase letters indicate significant differences among different treatment times for the same concentration at the 0.05 level. This is applicable for Figure 6 as well.

不同浓度长枝木霉 T6 蛋白粗提液处理秀丽隐杆线虫 L1 幼虫后,随着蛋白粗提取液浓度的增大及处理时间的延长,其毒杀作用呈逐渐增强的趋势。经 50、150 和 250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的蛋白粗提液处理线虫 24 h 后,50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度处理的线虫可移动、弯曲 (图 2),与对照相比无显著变化 ($P > 0.05$),而 150 和 250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度处理的线虫虫体僵直、呈死亡状态;处理 48 h 后,50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度处理的线虫运动缓慢、虫体变直但未死亡,而 250 和 150 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度处理的线虫体壁透明、虫体发生畸形;处理 72 h 后,50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度下的线虫虫体僵直,150 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度下的线虫虫体明显透明、肠道断裂,250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度下的线虫虫体断裂、体壁溶解、内容物外渗,导致透明现象消失,然而对照处理的线虫 72 h 后仍然未发生死亡,只是运动速度缓慢、出现波形运动。

2.2 长枝木霉 T6 蛋白粗提液对秀丽隐杆线虫头部摆动频率的影响

经不同浓度长枝木霉 T6 菌株蛋白粗提液处理后,秀丽隐杆线虫头部摆动频率随着蛋白粗提液浓度的增大而逐渐降低。浓度为 50 和 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,其头部摆动频率无显著差异 ($P > 0.05$);当浓度为 150、200 和 250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,各浓度间差异显著

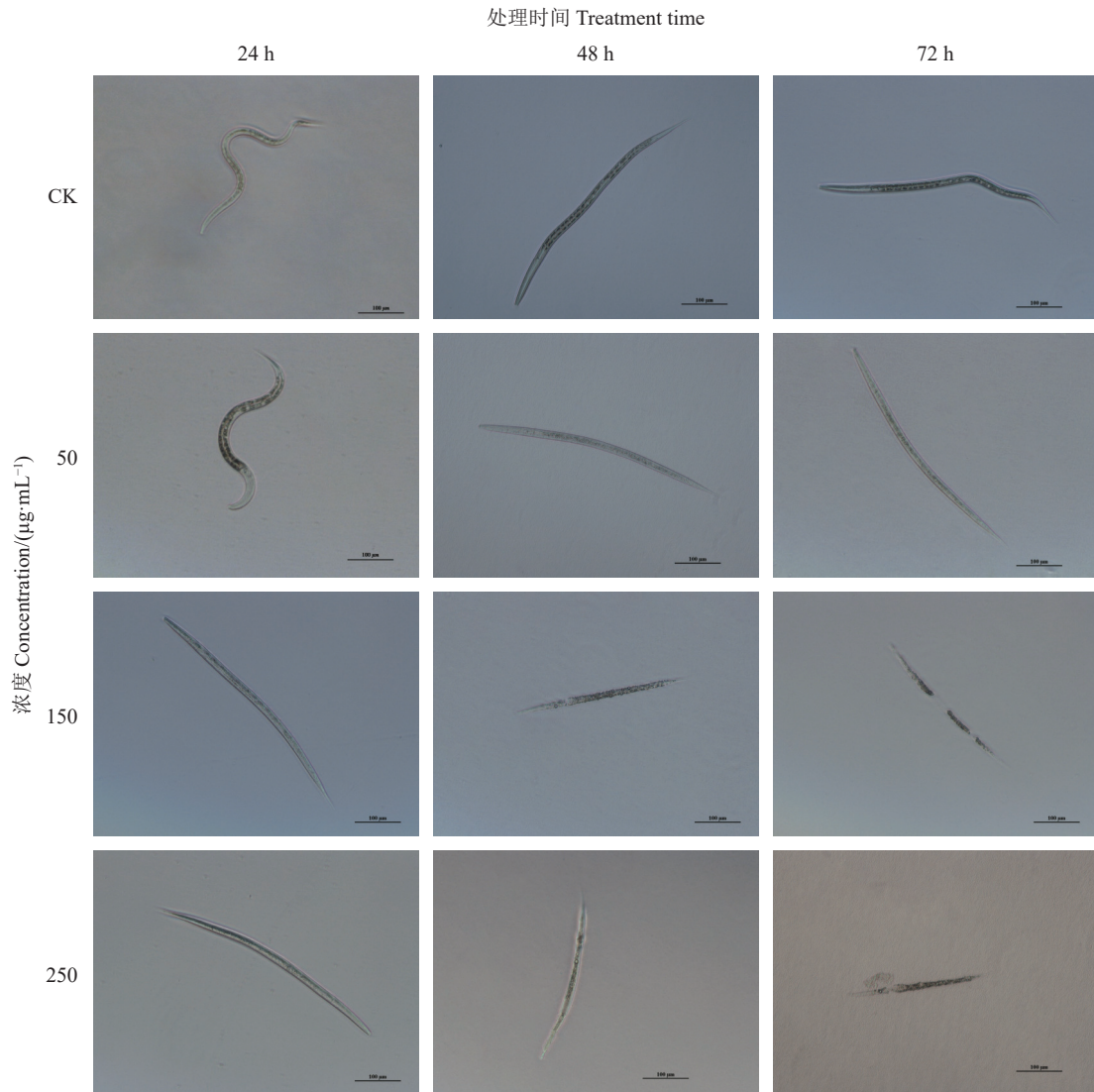


图2 长枝木霉 T6 菌株蛋白粗提液对秀丽隐杆线虫致死作用显微观察

Figure 2 Microscopic observations of the lethal effects of a crude protein extract from *Trichoderma longibrachiatum* T6 against *Caenorhabditis elegans*

($P < 0.05$), 其头部摆动频率与对照相比分别降低了 53.39%、57.26% 和 76.00% (图 3)。

2.3 长枝木霉 T6 蛋白粗提液对秀丽隐杆线虫身体弯曲频率的影响

经不同浓度的长枝木霉 T6 菌株蛋白粗提液处理秀丽隐杆线虫 24 h 后, 其身体弯曲频率随着蛋白粗提液浓度的升高而逐渐降低 (图 4)。浓度为 $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 线虫的身体弯曲频率与对照组相比差异不显著 ($P > 0.05$), 而浓度为 100、150、200、250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 线虫的身体弯曲频率分别为 1.25、1.16、0.72 和 0.29 $\text{次}\cdot\text{s}^{-1}$, 与对照身体弯曲频率 ($27.9 \text{ 次}\cdot\text{s}^{-1}$) 相比分别显著降低了 90.14%、83.15%、51.61% 和

20.79% ($P < 0.05$)。

2.4 长枝木霉 T6 蛋白粗提液对秀丽隐杆线虫基本运动能力的影响

浓度为 250、200 和 $150 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的长枝木霉 T6 菌株蛋白粗提液能够降低秀丽隐杆线虫向前和向后运动频率, 浓度为 100 和 $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 T6 菌株蛋白粗提液对其无显著影响, 而各浓度的 T6 菌株蛋白粗提液对 Omega/U 型摆动频率均无显著影响 ($P > 0.05$)。与对照相比, 向前运动频率与向后运动频率在蛋白粗提液浓度为 $250 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时差异最明显, 分别降低了 48.21% 和 46.15% ($P < 0.05$), 当蛋白粗提液浓度小于 $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 向后运动频率与对照相

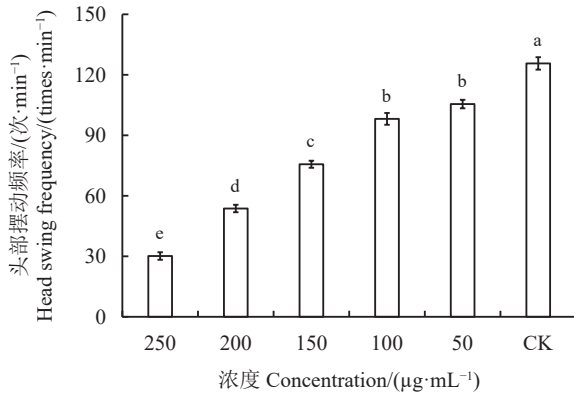


图 3 长枝木霉 T6 菌株蛋白粗提液对秀丽隐杆线虫头部摆动频率的影响

Figure 3 Effects of a crude protein extract from *Trichoderma longibrachiatum* T6 on the frequency of head swinging in *Caenorhabditis elegans*

不同小写字母表示不同处理间差异显著 ($P < 0.05$); 图 4、图 7 同。

Different lowercase letters indicate significant differences among different treatments at the 0.05 level. This is applicable for Figure 4, Figure 7 as well.

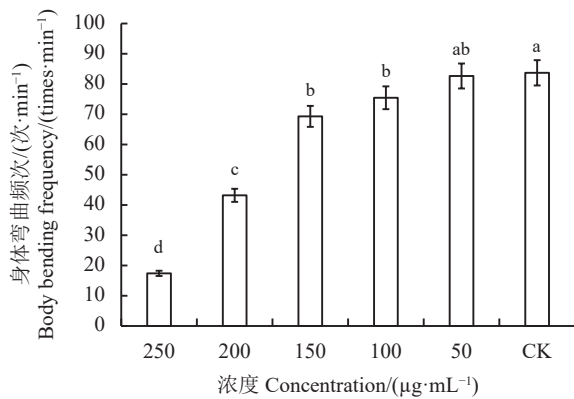


图 4 长枝木霉 T6 菌株蛋白粗提液对秀丽隐杆线虫身体弯曲频率的影响

Figure 4 Effects of crude protein extract from *Trichoderma longibrachiatum* T6 on the frequency of body bending in *Caenorhabditis elegans*

比无显著影响,而向前运动频率随浓度的减小而增大(图 5)。

2.5 长枝木霉 T6 蛋白粗提液对秀丽隐杆线虫觅食能力的影响

长枝木霉 T6 菌株高浓度蛋白粗提液短时间内对秀丽隐杆线虫菌落接触率存在抑制作用。浓度 $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 T6 菌株蛋白粗提液处理线虫 2 h 后其菌落接触率与对照相比无显著差异 ($P > 0.05$), 其余浓度处理后差异显著 ($P < 0.05$), 其中浓度为 $250 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

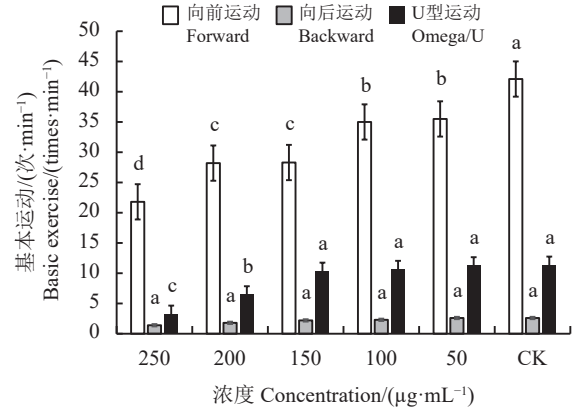


图 5 长枝木霉 T6 菌株蛋白粗提液对秀丽隐杆线虫基本运动能力的影响

Figure 5 Effects of a crude protein extract from *Trichoderma longibrachiatum* T6 on the mobility of *Caenorhabditis elegans*

不同小写字母表示相同运动方式不同处理间差异显著 ($P < 0.05$)。

Different lowercase letters indicate significant differences for the same among different treatments at the 0.05 level.

处理后其菌落接触率最低,与对照相比降低了 63.78%; 处理时间大于 2 h 后其菌落接触率无显著差异 ($P > 0.05$), 处理 24 h 后其菌落接触率只在浓度为 $250 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 表现出差异, 其余浓度下其菌落接触率无显著差异(图 6)。

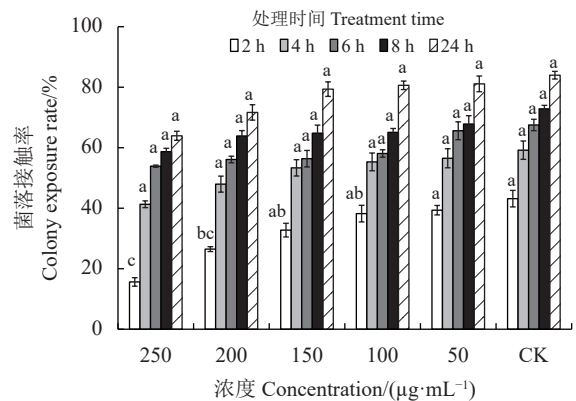


图 6 长枝木霉 T6 菌株蛋白粗提液对秀丽隐杆线虫觅食能力的影响

Figure 6 Effects of a crude protein extract from *Trichoderma longibrachiatum* T6 strain on the attainment level of *Caenorhabditis elegans*

2.6 长枝木霉 T6 蛋白粗提液对秀丽隐杆线虫繁殖能力的影响

与对照相比,当蛋白粗提液浓度较高时对秀丽隐杆线虫产卵量具有显著的降低作用 ($P < 0.05$), 当蛋白粗提液浓度较低时对线虫产卵量无显著影响

($P > 0.05$)。当蛋白粗提液浓度小于 $150 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时其产卵量与对照无显著差异,而浓度 250 和 $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 处理后产卵量降低作用显著,分别降低了 30.47% 和 24.88% (图 7)。

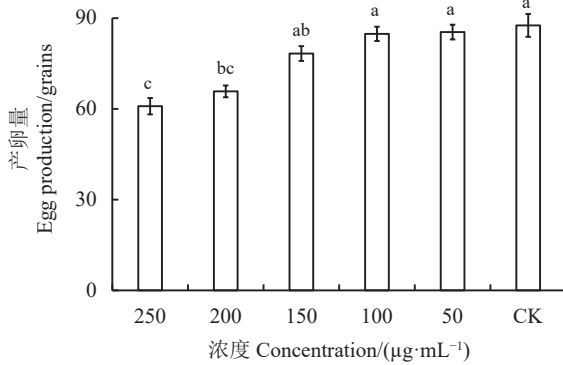


图 7 长枝木霉 T6 菌株蛋白粗提液对秀丽隐杆线虫产卵率的影响

Figure 7 Effects of a crude protein extract from *Trichoderma longibrachiatum* T6 on the egg production of *Caenorhabditis elegans*

3 讨论

前期研究表明,线虫体壁是抵御外界不良环境的重要结构,主要由蛋白质、脂质和碳水化合物组成^[21],真菌分泌的水解酶具有软化或破坏几丁质层而机械侵入的作用^[22]。本研究显微观察发现,不同浓度长枝木霉 T6 菌株蛋白粗提液对秀丽隐杆线虫具有致死作用且对体壁降解效果具有浓度依赖性,其中 $250 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 蛋白粗提液效果最明显,处理后可导致虫体断裂、体壁溶解、内容物外渗。Hu 等^[23]发现内生细菌蜡状芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*) 蛋白酶粗提液对根结线虫体壁具有溶解作用,且能导致其内容物渗漏;这与黄薇^[24]发现侧孢短芽孢杆菌 (*Brevibacillus laterosporus*) 蛋白酶能够降解秀丽隐杆线虫体壁且线虫致死率与其浓度与呈正相关关

系的研究结果一致。

另外,本研究发现,不同浓度的长枝木霉 T6 菌株蛋白粗提液处理线虫能显著抑制其头部摆动频率、身体弯曲频率、向前运动、向后运动能力,而对其 Omega/U 型摆动无显著影响,这与田雨等^[25]研究发现 $50 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 久效磷处理秀丽隐杆线虫后其头部摆动频率、身体弯曲频率、向前运动和觅食能力显著降低,而 Omega/U 型摆动频率无显著差异的研究结果一致。运动行为是反应神经系统最基本的指标,受到外界刺激后线虫会躲避,并根据危险程度向前运动或改变方向^[26]。相关研究表明秀丽隐杆线虫运动受多种神经元调控,乙酰胆碱作为应用最广泛的神经递质,对线虫的多种运动起着重要的调控作用^[27],推测 T6 菌株蛋白粗提液可能通过抑制神经递质的释放抑制了线虫的运动能力。本研究发现高浓度的长枝木霉 T6 菌株蛋白粗提液降低了秀丽隐杆线虫的菌落接触率,影响了其觅食能力,而低浓度无显著影响。线虫的觅食行为是通过多种感应神经元寻找食物而产生的嗅器快速摆动^[28],当外界胁迫使神经系统受损时,以菌落接触率为指标之一的觅食行为就会受到影响^[29],推测 T6 菌株粗蛋白提取液通过扰乱神经系统进而抑制觅食行为。此外,高浓度 T6 菌株粗蛋白提取液能降低秀丽隐杆线虫的产卵量,而低浓度无显著影响,推测低浓度的蛋白粗提液暴露时间较短,中毒症状不明显,这与何龙喜等^[30]发现利用嗜麦芽窄食单孢菌 (*Stenotrophomonas maltophilia*) 胞外代谢产物处理松材线虫后产卵量降低的研究结果一致。

综上所述,长枝木霉 T6 蛋白粗提液对秀丽隐杆线虫行为毒性和繁殖能力均具有显著的抑制作用,但有关长枝木霉 T6 蛋白粗提液对秀丽隐杆线虫行为毒性和繁殖能力影响的关键蛋白种类和生物学功能有待进一步深入研究。

参考文献 References:

- [1] 陆洪省,张雪,高宇婷,孙珮铭,邱萌萌. 哈茨木霉 SKD-ZX-1 的鉴定、发酵及其生防效果. 生物技术通报, 2019, 35(11): 132-140.
- LU H S, ZHANG X, GAO Y T, SUN P M, QIU M M. Identification, fermentation and biocontrol efficiency of *Trichoderma harzianum* SKD-ZX-1. Biotechnology Bulletin, 2019, 35(11): 132-140.
- [2] 谢琳淼,常春丽,姚志红,王洪瑞,赵冬雪,张荣沐,敖红. 哈茨木霉对紫羊茅和草地早熟禾的促生及抗性诱导作用. 草业科学,

- 2018, 35(9): 2079-2086.
- XIE L M, CHANG C L, YAO Z H, WANG H R, ZHAO D X, ZHANG R S, AO H. Growth promotion and resistance induction effect of *Trichoderma harzianum* on *Festuca rubra* and *Poa pratensis*. *Pratacultural Science*, 2018, 35(9): 2079-2086.
- [3] 陈臻, 古丽君, 徐秉良, 张树武, 蒲崇建. 长枝木霉对 6 种牧草种子发芽与生理效应的影响. *草地学报*, 2013, 21(3): 564-570.
- CHEN Z, GU L J, XU B L, ZHANG S W, PU C J. Effects of *Trichoderma longibrachiatum* on seed germination and physiological effects of six forage varieties. *Acta Agrestia Sinica*, 2013, 21(3): 564-570.
- [4] 古丽君, 徐秉良, 梁巧兰, 李荣峰. 生防木霉菌 T2 菌株对禾草腐霉病抑菌作用及机制研究. *草业学报*, 2011, 20(2): 46-51.
- GU L J, XU B L, LIANG Q L, LI R F. Antagonism and mechanism of action of *Trichoderma aureoviride* against *Pythium aphanidermatum* causing turfgrass root rot. *Acta Prataculturae Sinica*, 2011, 20(2): 46-51.
- [5] 张树武, 徐秉良, 薛应钰, 古丽君. 长枝木霉对小麦禾谷孢囊线虫的致死作用. *应用生态学报*, 2014, 25(7): 2093-2098.
- ZHANG S W, XU B L, XUE Y Y, GU L J. Lethal effects of *Trichoderma longibrachiatum* on *Heterodera avenae*. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2014, 25(7): 2093-2098.
- [6] CHEN Q, CHEN W, KUMAR A, JIANG X, JANEZIC M, ZHANG K Y J, YANG Q. Crystal structure and structure-based discovery of inhibitors of the nematode chitinase CeCht1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2021, 69(11): 3519-3526.
- [7] 汤丽燕, 杨乐, 邢新婧, 柏桂珍, 张克勤, 杨金奎. 食线虫真菌致病相关丝氨酸蛋白酶的研究进展. *微生物学通报*, 2017, 44(4): 911-919.
- TANG L Y, YANG L, XING X J, BAI G Z, ZHANG K Q, YANG J K. Advances in pathogenicity-related serine proteases in nematophagous fungi. *Microbiology China*, 2017, 44(4): 911-919.
- [8] 陈秀菊, 坚晋卓, 李惠霞, 李瑞, 卢智琴. 2 株真菌的鉴定及对禾谷孢囊线虫的防治效果. *华南农业大学学报*, 2020, 41(1): 108-115.
- CHEN X J, JIAN J Z, LI H X, LI R, LU Z Q. Identification of two fungi strains and their control effects to *cereal cyst* nematode. *Journal of South China Agricultural University*, 2020, 41(1): 108-115.
- [9] CHEN L, JIANG H, CHENG Q P, CHEN J P, WU G B, KUMAR A, SUN M, LIU Z D. Enhanced nematocidal potential of the chitinase pachi from *Pseudomonas aeruginosa* in association with Cry21Aa. *Scientific Reports*, 2015, 5: 14395.
- [10] POCURULL M, FULLANA A M, FERRO M, VALERO P, SORRIBAS F J. Commercial formulates of *Trichoderma* induce systemic plant resistance to *Meloidogyne incognita* in tomato and the effect is additive to that of the mi-1.2 resistance gene. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 10: 3042.
- [11] LI J, ZOU C G, XU J P, JI X I, U X M, YANG J K, HUANG X W, ZHANG K Q. Molecular mechanisms of nematode nematophagous microbe interactions: Basis for biological control of plant-parasitic Nematodes. *Annual Review Phytopathology*, 2015, 53: 67-95.
- [12] 刘永红, 毛维兴, 陈瑞莲, 马耀杰, 张树武, 徐秉良. 环境因子和储藏时期对长枝木霉 PT6 蛋白培养滤液杀线活性评价. *草业科学*, 2022, 39(10): 2095-2101.
- LIU Y H, MAO W X, CHEN R L, MA Y J, ZHANG S W, XU B L. Nematicidal activity of *Trichoderma longibrachiatum* PT6 protein culture filtrate under different environmental factors and storage periods. *Pratacultural Science*, 2022, 39(10): 2095-2101.
- [13] XU T, ZHANG M, HU J, LI Z, HE D. Behavioral deficits and neural damage of *Caenorhabditis elegans* induced by three rare earth elements. *Chemosphere*, 2017, 181: 55-62.
- [14] DENG X, HOU Y, ZHOU H J, LI Y L, XUE Z Q, HUANG G H, HUANG K L, HE X Y, XU W T. Hypolipidemic, anti-inflammatory, and anti-atherosclerotic effects of tea before and after microbial fermentation. *FoodScience Nutrition*, 2021, 9(2): 1160-1170.
- [15] STERKEN M G, VAN W M H, QUAMME E C, RIKSEN J A G, CARNELL L, MATHIES L D, DAVIES A G, KAMMENGA J E, BETTINGER J C. Transcriptional analysis of the response of *Caenorhabditis elegans* to ethanol exposure. *Scientific Reports*, 2021, 11(1): 10993.
- [16] 许云, 阮秦莉, 纪蕾蕾, 嵇晶, 吴晨曦, 王梦. 芫花素对模式生物秀丽隐杆线虫的毒性作用. *中国药理学与毒理学杂志*, 2017, 31(5): 414-421.

- XU Y, RUAN Q L, JI L L, JI J, WU C X, WANG M. Toxic effect of genkwanin on model organism *Caenorhabditis elegans*. *Chinese Journal of Pharmacology and Toxicology*, 2017, 31(5): 414-421.
- [17] TSALIK E L, HOBERT O. Functional mapping of neurons that control locomotory behavior in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Neurobiology*, 2003, 56(2): 178-197.
- [18] MURAKAMI H, BESSINGER K, HELLMANN J, MURAKAMI S. Aging-dependent and independent modulation of associative learning behavior by Insulin/Insulin-like growth factor-1 signal in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Neuroscience*, 2005, 25(47): 10894-10904.
- [19] KOHRA S, KUWAHARA K, TAKAO Y, ISHIBASHI Y, LEE H C, ARIZONO K, TOMINAGA N. Effect of bisphenol-A on the feeding behavior of *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Health Science*, 2002, 48(1): 93-95.
- [20] SWAIN S C, KEUSEKOTTEN K, BAUMEISTER B, STÜRZENBAUM S R. *Caenorhabditis elegans* metallothioneins: new insights into the phenotypic effects of cadmium toxicosis. *Journal of Molecular Biology*, 2004, 341(4): 951-959.
- [21] MORTON O, HIRSCH P, KERRY B. Infection of plant-parasitic nematodes by nematophagous fungi—a review of the application of molecular biology to understand infection processes and to improve biological control. *Nematology*, 2004, 6(2): 161-170.
- [22] DIJKSTERHUIS J, VEENHUIS M, HARDER W. Ultrastructural study of adhesion and initial stages of infection of nematodes by conidia of *Drechmeria coniospora*. *Mycological Research*, 1990, 94: 1-8.
- [23] HU H, GAO Y, LI X, CHEN S L, TIAN X J. Identification and nematocidal characterization of proteases secreted by endophytic bacteria *Bacillus cereus* BCM2. *Phytopathology*, 2019, 110(2): 336-344.
- [24] 黄薇. 蛋白酶胁迫下线虫的体壁覆盖层蛋白组学分析. 福州: 福建师范大学硕士学位论文, 2012.
HUANG W. Differential proteomic analysis of nematode surface coat proteins under bacterial protease stress. Master Thesis. Fuzhou: Fujian Normal University, 2012.
- [25] 田雨, 汝少国, 王蔚, 田华. 久效磷对秀丽隐杆线虫运动、学习和觅食行为的影响. *环境科学研究*, 2015, 28(2): 275-282.
TIAN Y, RU S G, WANG W, TIAN H. Effects of monocrotophos on the locomotion, learning and foraging behavior of *Caenorhabditis elegans*. *Research of Environmental Sciences*, 2015, 28(2): 275-282.
- [26] JESSE M G, JOSEPH J H, CORNELIA I B. A circuit for navigation in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005, 102(9): 3184-3191.
- [27] 玛伊拜尔·普拉提, 熊荣康, 霍菁, 温泉. 乙酰胆碱门控氯离子通道受体突变影响秀丽线虫运动学和运动状态转换. *生物化学与生物物理进展*, 2023, 50(6): 1381-1390.
Mayibaier-Pulati, XIONG R K, HUO J, WEN Q. Mutations in acetylcholine-gated chloride channel receptors affect locomotion kinematics and motor state transitions in *C. elegans*. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2023, 50(6): 1381-1390.
- [28] SAEKI A, YAMAMOTO M, IINO Y. Plasticity of chemotaxis revealed by paired presentation of a chemoattractant and starvation in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of Experimental Biology*, 2001, 204(100): 1757-1764.
- [29] COHN J, MACPHAILI R C. Ethological and experimental approaches to behavior analysis: Implications for ecotoxicology. *Environmental Health Perspectives*, 1996, 104: 299-304.
- [30] 何龙喜, 薛旗, 吴小芹. 松材线虫体内细菌对宿主繁殖和致病力的影响. *南京林业大学学报 (自然科学版)*, 2016, 40(3): 47-51.
HE L X, XUE Q, WU X Q. Effects of endobacteria on reproduction and virulence of *Bursaphelenchus xylophilus*. *Journal of Nanjing Forestry University (Natural Sciences Edition)*, 2016, 40(3): 47-51.

(责任编辑 苟燕妮)