

链孢粘帚霉几丁质酶的诱导及其抗真菌活性研究*

马桂珍¹ 高会兰² 张拥华² 李世东^{2*} 谢丙炎³

(淮海工学院海洋学院 连云港 222005)

(中国农科院植物保护研究所 北京 100081)² (中国农科院蔬菜研究所 北京 100081)³

摘要 链孢粘帚霉 HL-1-1 菌株在不同培养条件下产几丁质酶活性不同,核盘菌菌核对其几丁质酶的诱导作用高于几丁质,首次用菌核配制培养基成功诱导了几丁质酶的产生,其产酶的最适初始 pH 值为 4.5,最适培养时间为 6d。几丁质酶对 10 种病原菌都有不同的抑制作用,对小麦雪腐病、葡萄白腐病、玉米黄斑病及斑点落叶病等病原菌的孢子萌发具有明显的抑制作用,该几丁质酶还能明显抑制核盘菌和立枯丝核菌的菌核萌发。

关键词 链孢粘帚霉,几丁质酶,诱导,抗菌作用

中图分类号:Q78 文献标识码:A 文章编号:0253-2654(2007)05-0905-04

Chitinases Induced from *Gliocladium catenulatum* HL-1-1 and Their Antagonistic Activity Against Plant Pathogenic Fungi*

MA Gui-Zhen¹ GAO Hui-Lan² ZHANG Yong-Hua² LI Shi-Dong^{2*} XIE Bing-Yan³

(Huaihai Institute of Technology and Development, Ocean Institute, Lianyungang 222005)

(Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081)²

(Institute of Vegetable and Flower, CAAS, Beijing 100081)³

Abstract Induction and antagonistic activity of chitinases produced by *Gliocladium catenulatum* HL-1-1 were studied. Results showed that the isolate could produce chitinases under various culture conditions. Sclerotia powder could induce the isolate to produce much more chitinases. The optimum conditions to produce the enzyme were pH 4.5 at initial medium and to culture the isolate for 6 days. The chitinases were proved to inhibit the conidial germination of *Fusarium nivale*, *Coniella diplodiella*, *Curvularia lunata* and *Alternaria alternata* and the sclerotial germination of *Sclerotinia sclerotiorum* and *Rhizoctonia solani* obviously.

Key words: *Gliocladium catenulatum*, Chitinase, Induction, Antagonistic activity

由核盘菌(*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Bary)引起的菌核病是一类重要的植物土传病害,该病原菌寄主种类多,据报道可达 75 科 450 多种,如油菜、大豆、向日葵等油料作物,莴苣、芹菜、萝卜等多种蔬菜作物和多种豆类等菌核病^[1],对作物的产量和品质构成了严重威胁。

粘帚霉是一种寄生于核盘菌菌核上的重要菌寄生菌,可使菌核腐烂,从而应用于防治作物的菌核病,是一种具有生防价值和潜力的菌寄生菌。我们在研究大豆菌核病菌核重寄生菌时,经大量筛选获得一株对菌核有强寄生能力的链孢粘帚霉菌

株(*G. catenulatum*)HL-1-1,该菌株室内平板试验对菌核的寄生率达 100%,并使 90% 以上的菌核腐烂,同时对多种植物病原真菌具有抑制作用^[2-4]。生物学特性研究表明,该菌株适应性强,易于培养^[5],具有较好的应用前景。已有的研究表明,菌寄生菌在寄生过程中分泌几丁质酶、葡聚糖酶、纤维素酶和蛋白酶等一系列细胞壁降解酶,其中以几丁质酶最为重要,Lorito 等测定了哈茨木霉几丁质酶对 9 种植物病原真菌的抗菌活性,其中内切几丁质酶对灰葡萄孢霉(*Botrytis cinerea*)分生孢子萌发的 ED₅₀ 为 45 μg/mL ~ 49 μg/mL^[6]。本研究探讨链孢粘帚霉 HL-

* 国家 863 计划资助项目(No.2006AA10A211)

** 通讯作者 Tel 010-68919573, E-mail: lisd@public.bta.net.cn

收稿日期:2006-12-11,修回日期:2007-05-15

1-1 菌株的几丁质酶产生条件及其抗真菌活性,为几丁质酶的纯化及其基因克隆和转化奠定基础。

1 材料和方法

1.1 供试菌株

链孢粘帚霉(*Gliocladium catenulatum*)菌株 HL-1-1 分离自湖南浏阳的红壤土稻田中。所用病原菌及其来源为:黄瓜枯萎病菌(*Fusarium oxysporum*)、油菜菌核病菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)和辣椒疫霉病

菌(*Phytophthora capsici*)由中国农科院植保所提供,小麦雪腐病菌(*Fusarium nivale*)、葡萄白腐病菌(*Coniella diplodiella*)、小麦赤霉病菌(*Fusarium gramineicola*)和苹果腐烂病菌(*Cytospora mali*)由中科院微生物所提供。

1.2 链孢粘帚霉 HL-1-1 菌株几丁质酶的诱导

1.2.1 产几丁质酶培养基的筛选:将链孢粘帚霉 HL-1-1 菌株等量接种到 12 种不同配方培养液中,在相同条件下发酵培养。培养液配方见表 1。

表 1 供试培养基组分

培养液	组分
蛋白胨酵母膏几丁质	蛋白胨 0.5g, MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.5g, 酵母膏 0.5g, FeSO ₄ ·0.01g, K ₂ HPO ₄ 0.7g, ZnSO ₄ 0.001g, 粉状几丁质 10g, 水 1000mL
蔗糖几丁质	KH ₂ PO ₄ 680mg, 蔗糖 5g, K ₂ HPO ₄ 870mg, FeSO ₄ 2mg, KCl 200mg, ZnSO ₄ 2mg, NH ₄ NO ₃ 1g, MnSO ₄ 2mg, MgSO ₄ ·7H ₂ O 200mg, CaCl ₂ 200mg, 粉状几丁质 10g, 水 1000mL
酵母膏几丁质	200g, 10g, 酵母膏 5g, 粉状几丁质 2g, 水 1000mL
微量元素几丁质	MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.2g, ZnSO ₄ ·7H ₂ O 0.002g, K ₂ HPO ₄ 0.9g, NH ₄ NO ₃ 1.0g, FeSO ₄ ·7H ₂ O 0.002g, MnSO ₄ ·4H ₂ O 0.002g, KCl 0.2g, 粉状几丁质 2g, 水 1000mL
氯化钠几丁质	粉状几丁质 10g, NaCl 3g, K ₂ HPO ₄ 3g, MgSO ₄ 3g, 水 1000mL
菌核粉几丁质	粉状几丁质 5g, 菌核粉 5g, NaCl 3g, K ₂ HPO ₄ 3g, MgSO ₄ 3g, 水 1000mL
PD	葡萄糖 20g, 马铃薯 200g, 水 1000mL

将核盘菌的成熟干燥菌核用样品粉碎机粉碎过 100 目筛,制成菌核粉。以等量的菌核粉代替表 2 不同培养基中的几丁质,配制成相应的菌核培养基,与表中培养基共同实验。

从生长 1 周的 HL-1-1 菌落边缘取直径 6mm 菌苔 15 个接种于 120mL PD 培养液中,30℃ 180 r/min 振荡培养 24h 作为种子液,取 4mL 接种于 120mL 的不同培养液中,每种接种 3 瓶。30℃ 180r/min 恒温振荡培养 6d,4℃ 6000r/min 离心,上清液即为粗酶液,测定不同培养液的几丁质酶活性,筛选出产酶较高的培养液配方用于 1.2.2 和 1.2.3 试验。

1.2.2 培养时间对几丁质酶产生的影响:按上述筛选出的最适培养液配方及其接种方法接种 30 瓶,30℃ 180r/min 培养 1d、2d、3d、4d、5d、6d、7d、8d、9d、10d,每天取 3 瓶测定几丁质酶活性。

1.2.3 初始 pH 值对产酶的影响:将筛选出的最适培养基的初始 pH 分别调节为 4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5,振荡培养 6d,测定不同 pH 值处理培养基的几丁质酶活性。

1.3 几丁质酶活性的测定

取 1% 胶状几丁质 0.4mL,加入 0.1mol/L pH5.8 磷酸缓冲液 0.4mL 和 0.4mL 酶液,混匀。于 37℃ 保

温 2h,10000r/min 离心 10min^[7,8]。

取上清液 0.4mL 加入 40μL 3% 的蜗牛酶溶液,37℃ 保温 30min 后加入 0.2mL 饱和硼砂溶液,100℃ 水浴 7min,冷却,加入 2mL 冰醋酸和 1mL 1% 的 DMAB 溶液,37℃ 温浴 15min,测 585nm 处 OD 值,用 N-乙酰氨基葡萄糖作标准曲线,以每小时产生 1μg N-乙酰氨基葡萄糖的量为一个酶活性单位^[9]。重复 3 次。

1.4 几丁质酶对病原真菌菌丝生长的抑制作用

采用牛津杯法。将供试的不同病原真菌接种于 PDA 平板上,当菌落生长到 3cm~4cm 时,在菌落的四周距菌落边缘 1cm 处放置无菌的牛津杯,杯中加入 200μL 粗酶液,以等量的培养基为对照,12h 观察结果。每一病菌接种 3 皿为 3 次重复。

1.5 几丁质酶对病原菌孢子和菌核萌发的抑制作用

用几丁质酶液把培养 7d 的病原真菌孢子配成浓度为 10⁶/mL 左右的孢子悬浮液,取 0.2mL 涂布于 PDA 平板上,2h 后调查孢子萌发率,每一处理接种 3 皿为 3 次重复。

将立枯丝核菌和核盘菌的菌核表面消毒吹干后,在粗酶液中浸泡 24h,用无菌滤纸将表面吸干置

于 PDA 平板上,以无菌水为对照,每种病菌处理 50 粒菌核 2d 后调查菌核的萌发率。

2 结果和分析

2.1 产几丁质酶培养基的筛选

链孢粘帚霉 HL-1-1 菌株在以菌核为唯一碳源的氯化钠菌核培养液中产生的几丁质酶活性最高,达 162.27U,其次为蔗糖几丁质培养液,为 126.41U,PD 培养液未检测到酶活性。表明氯化钠菌核培养液是供试培养液中产几丁质酶的最佳培养基配方,可作为本研究其它试验项目产酶培养基配方。以氯化钠菌核培养液几丁质酶的相对酶活性为 100%,计算其它配方的酶活相对百分数,作图比较供试的不同培养液中的几丁质酶活性高低(图 1)。

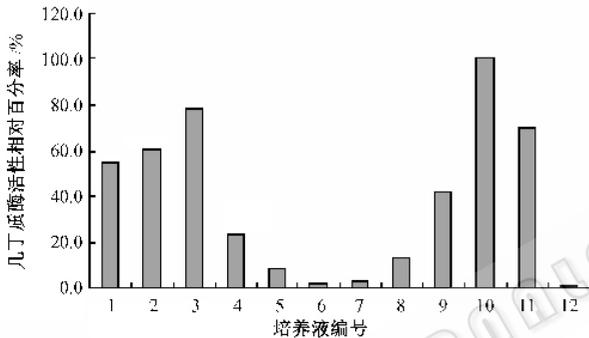


图 1 链孢粘帚霉在不同培养液中几丁质酶活性

注:1 蛋白胨酵母膏几丁质 2 蛋白胨酵母膏菌核 3 蔗糖几丁质; 4 蔗糖菌核 5 酵母膏几丁质 6 酵母膏菌核 7 微量元素几丁质; 8 微量元素菌核 9 氯化钠几丁质 10 氯化钠菌核 11 菌核粉几丁质 12 PD

选择氯化钠菌核培养液为供试培养液。链孢粘帚霉培养不同时间的几丁质酶活性不同,接种 1d 后开始产生几丁质酶,以后酶活性逐渐升高,培养 6d 的酶活性达到最高为 134.418U,第 7d 次之为 114.207U,第 8d 开始明显下降。表明培养 6d 是链孢粘帚霉产几丁质酶的最佳培养时间。以第 6d 的几丁质酶活性为 100% 相对酶活,计算其它培养时间的相对酶活百分率,作图比较不同培养时间的几丁质酶活性(图 2)。

2.2 初始 pH 值对产酶的影响

培养液的初始 pH 值不同,几丁质酶活性明显不同,pH4 时几丁质酶的活性为 83.187U,pH4.5 时,几丁质酶活性达 114.462U,pH5 时,几丁质酶活性为 84.218U,pH5.5 时几丁质酶活性下降到 64.536U,表明链孢粘帚霉产几丁质酶的最适初始

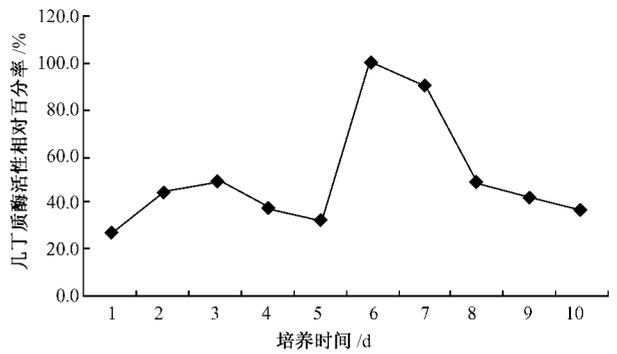


图 2 链孢粘帚霉在氯化钠菌核培养液中培养不同时间后的几丁质酶活性

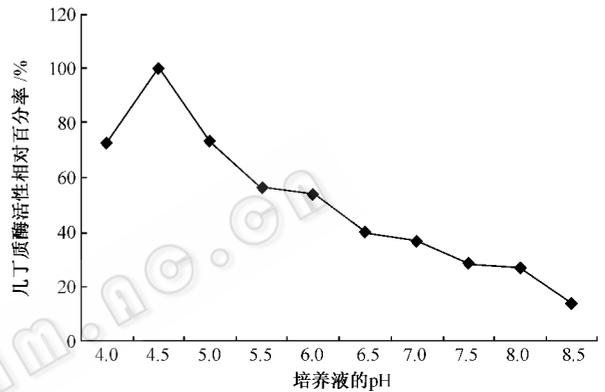


图 3 不同初始 pH 对链孢粘帚霉几丁质酶活性的影响

pH4~5。以 pH4.5 的几丁质酶活性为 100% 相对酶活,计算其它初始 pH 值的相对酶活百分率,作图比较不同初始 pH 值的几丁质酶活性(图 3)。

2.3 粘帚霉几丁质酶对病原菌菌丝生长的影响

粗酶液对供试的 10 种病原菌的菌丝生长表现出了不同程度的抑制作用。其中对病原菌 *B. cinerea*、*C. diploidiella* 的抑菌作用较强,抑菌带宽度较大,分别达到 3.34mm 和 3.28mm,对 *P. capsici* 的抑菌作用较小,抑菌带宽度为 0.59mm。见表 2。

表 2 几丁质粗酶液对 10 种病原菌的抑菌带宽度(mm)

病原菌	抑菌带宽度	病原菌	抑菌带宽度
<i>Fusarium oxysporum</i>	2.47 ± 0.11	<i>Botrytis cinerea</i>	3.34 ± 0.55
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	3.08 ± 0.06	<i>Curvularia lunata</i>	2.21 ± 0.20
<i>Phytophthora capsici</i>	0.59 ± 0.08	<i>Alternaria solani</i>	1.58 ± 0.17
<i>Coniella diploidiella</i>	3.28 ± 0.28	<i>Alternaria alternata</i>	2.40 ± 0.04
<i>Fusarium graminecola</i>	2.71 ± 0.11	<i>Rhizoctonia solani</i>	2.41 ± 0.27

2.4 链孢粘帚霉几丁质酶对病原菌孢子和菌核萌发的影响

从图 4 可以看出几丁质酶对 *F. nivale*、*C. diploidiella*、*C. lunata*、*A. alternata* 的分生孢子萌

发的抑制作用较强,酶液处理的孢子萌发率明显低于对照,对 *A. solani* 的分生孢子萌发的抑制作用较小,对 *P. capsici* 孢子萌发的抑制作用最小,其孢子萌发率与对照差异极小。

油菜菌核病菌的菌核被无菌水处理后的萌发率为 93%,粗酶液处理后的萌发率为 56%。立枯丝核菌的菌核被无菌水处理后的萌发率为 95%,被粗酶液处理后的萌发率为 45%,说明酶液对供试的两种植物病原真菌的菌核萌发具有明显的抑制作用,对立枯丝核菌菌核的萌发抑制作用高于对油菜菌

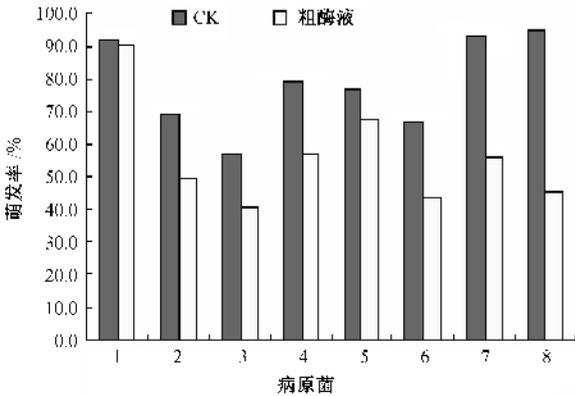


图 4 几丁质酶处理病原菌孢子和菌核的萌发率

注:1 *P. capsici* 2 *F. nivale* 3 *C. diploidiella* 4 *C. lunata* ;
5 *A. solani* 6 *A. alternata* 7 *S. sclerotiorum* 8 *R. solani*

核病病原菌菌核的萌发率的抑制作用(图 4)。

3 结论与讨论

研究结果表明在有适当底物存在的情况下 HL-1-1 可被诱导产生大量的几丁质酶,在所供试的 12 种培养基中,以菌核粉为唯一碳源配制成的氯化钠菌核培养基的诱导效果最好,在 PD 培养液中几乎未检测到几丁质酶活性,说明几丁质酶在非诱导条件下表达量很少,而在诱导条件下大量产生。前人在对木霉几丁质酶的研究中发现,在哈茨木霉寄生齐整小核菌的菌核过程中,在菌核内部检测到木霉分泌的几丁质酶活性及 β -1,3-葡聚糖酶活性,进一步研究表明菌核的侵染部位检测到几丁质酶的活性,但在非侵染部位未检测到其活性。用纯化几丁质或植物病原真菌,如立枯丝核菌(*R. solani*)和灰葡萄孢霉(*B. cinerea*)细胞壁作唯一碳源,可在离体条件下诱导木霉产生几丁质酶^[6,10]。以往的重寄生菌研究中几丁质酶的诱导物主要为几丁质和菌丝的细胞壁,有关以菌核为几丁质酶诱导物的研

究尚未见报道。

大多数成熟真菌菌核的主要成分为碳水化合物(约 75%)、蛋白质(约 10%~25%)、脂类(2%~3%)和灰分(3.5%~5.0%),其中糖类主要包括 β -葡聚糖、几丁质、海藻糖、甘露糖和其他少量的还原糖类^[11]。本试验首次用菌核成功诱导了供试菌株的几丁质酶,这一结果对研究和揭示该菌株对菌核具有强寄生作用的生化机理具有重要意义,有关菌核对几丁质酶的诱导作用高于几丁质的作用机理尚在进一步研究中。

链孢粘帚霉 HL-1-1 产生的几丁质酶对供试的多种病原真菌的菌丝生长、孢子萌发及菌核萌发都具有明显抑制作用,对供试的两种卵菌纲真菌的菌丝生长和孢子萌发的抑制作用较小,说明几丁质酶在链孢粘帚霉侵染菌核和抑制真菌生长的过程中起重要作用。本文研究结果与 Lorito^[6]和柳良好等人^[10]对木霉几丁质酶的研究结果基本一致,表明链孢粘帚霉几丁质酶与木霉产生的几丁质酶有着共同的抗菌作用。与木霉几丁质酶一样^[12],粘帚霉产生的几丁质酶对植物病原真菌的抑制作用具有广谱性、协同增效作用,能够降解具有几丁质-葡聚糖复合结构的老熟细胞壁和菌核,具有开发应用前景。

致谢 衷心感谢中国科学院微生物研究所刘杏忠研究员在菌株鉴定及试验过程中给与的热情指导和大力帮助。

参考文献

- [1] Boland G J, Hall R. Canadian Journal of Plant Pathology, 1994, 16: 93~108.
- [2] 马桂珍, 吴学仁, 杨文兰. 华中农业大学学报, 2004, 23(1): 96~99.
- [3] 暴增海, 吴学仁, 杨文兰, 等. 吉林农业大学学报, 2004, 26(4): 394~398.
- [4] 暴增海, 马桂珍, 杨文兰, 等. 河南农业科学, 2004, 10: 40~43.
- [5] 马桂珍, 李世东, 张拥华, 等. 植物病理学报, 2004, 34(4): 307~313.
- [6] Lorito M, Harman G E, Hayes C K, et al. Phytopathology, 1993, 83: 302~307.
- [7] las Mercedes D M. Current Genetics, 2001, 38: 335~42.
- [8] Paul B. FEMS Microbiological Letter, 1999, 181: 277~280.
- [9] Zeilinger S. Fungal Genetics and Biology, 1999, 26: 131~40.
- [10] 柳良好, 徐同. 植物病理学报, 2003, 33(4): 359~363.
- [11] Carsolio C. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65: 929~35.
- [12] 柳良好, 徐同. 植物病理学报, 2002, 32(2): 97~102.