

井冈霉素对水稻纹枯病菌细胞壁降解酶活性和可溶性蛋白的影响*

李明海 杨迎青 杨媚 周而勋**

华南农业大学资源环境学院, 广州 510642

摘要 为进一步阐明井冈霉素防治水稻纹枯病的作用机制,研究了井冈霉素对水稻纹枯病菌(*Rhizoctonia solani* Kühn)多聚半乳糖醛酸酶(PG)、纤维素酶(Cx)和果胶甲基半乳糖醛酸酶(PMG)3种细胞壁降解酶活性以及菌丝可溶性蛋白的影响。结果表明:与空白对照相比,井冈霉素在质量浓度分别为20、100、500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,均不同程度地降低了3种细胞壁降解酶的活性。当井冈霉素质量浓度为20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,与空白对照相比,Cx或PG的活性下降程度分别达到显著水平。在各供试浓度下,PMG的活性与空白对照相比均未达显著水平。通过聚丙烯酰胺凝胶电泳分析,每个处理的病菌菌丝可溶性蛋白均可分辨出20条谱带,较为清晰的谱带有16条。与空白对照相比,不同处理之间的病菌菌丝可溶性蛋白谱带数目和迁移率均相同,但谱带颜色的深浅和谱带的粗细有差异,表明蛋白种类一致,只是含量不同。在蛋白分子质量为90 u处,井冈霉素质量浓度为500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时的谱带明显增强;在分子质量为16~35 u之间有6条谱带,当井冈霉素质量浓度为500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时的谱带明显减弱。这说明井冈霉素质量浓度为500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,对病菌菌丝可溶性蛋白有一定的影响;在质量浓度为20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,对病菌菌丝可溶性蛋白无显著影响。

关键词 井冈霉素; 水稻纹枯病菌; 细胞壁降解酶; 可溶性蛋白

中图分类号 S 435.111.4⁺2 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2010)03-0272-05

立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani* Kühn)是一种经济上非常重要的土传性病原真菌,可侵害多种作物,而且不同作物上的立枯丝核菌具有交互致病性,即可以互相侵染,给防治带来很大困难^[1]。由立枯丝核菌引起的水稻纹枯病(rice sheath blight disease)是世界上重要的水稻真菌病害之一,同时也是我国水稻三大病害之首,给水稻生产造成了严重的经济损失^[2-3]。井冈霉素(Jinggangmycin)作为防治水稻纹枯病的主要农药品种,对水稻纹枯病的防治发挥了重要作用,但其作用机制至今不明。进一步阐明井冈霉素防治水稻纹枯病的机制,对发挥其更大的作用具有重要意义。关于井冈霉素防治水稻纹枯病的机制,沈寅初^[4]和Muller等^[5]的研究结果显示,井冈霉素抑制了水稻纹枯病菌(*R. solani*)海藻糖酶的活性,使得水稻纹枯病菌的菌丝不能正常生长,从而达到防治病害的目的;张穗等^[6]的研究结果显示,井冈霉素具有激发水稻防卫反应表达的特性,并证明这种防御水稻纹枯病的作用是其自身的抑菌

作用和诱导植株产生抗性防卫反应协同作用的结果。但是,井冈霉素体外的抑菌作用很弱,只有在质量浓度达到1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,其抑制作用方可达到传统意义上80%的杀菌效果^[6]。除了以上作用机制外,井冈霉素的作用机制是否会涉及到抑制水稻纹枯病菌致病因子的表达?有关这方面的研究目前国内外尚未见报道。已有的研究表明,水稻纹枯病菌产生的细胞壁降解酶具有显著的致病作用,是水稻纹枯病菌的主要致病因子^[7-9]。笔者从井冈霉素是否会影响水稻纹枯病菌致病因子表达的角度,观察了井冈霉素对水稻纹枯病菌的细胞壁降解酶活性和菌丝可溶性蛋白的影响,旨在为揭示井冈霉素防治水稻纹枯病菌的作用机制提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试菌株:水稻纹枯病菌(*Rhizoctonia solani* Kühn)GD-118菌株,由华南农业大学热带亚热带真

收稿日期:2009-12-22; 修回日期:2010-01-26

* 国家2007年公益性行业(农业)科研专项经费项目(nyhyzx3-16,原nyhyzx07-049)资助

** 通讯作者. E-mail: exzhou@scau.edu.cn

李明海,男,1981年生,硕士研究生.研究方向:植物病原真菌学. E-mail: lmh1910@163.com

菌研究室提供,经测定为强致病力菌株。

主要试剂:井冈霉素原药 60A(武汉科诺生物科技有限公司产品);考马斯亮蓝 R-250(生化试剂,上海伯奥生物科技有限公司产品);D-半乳糖醛酸(生化试剂,北京齐华盛生物技术发展中心产品);果胶(纯度 87%,Sigma 公司产品);甘氨酸(生化试剂,上海伯奥生物科技有限公司产品);甲叉双丙烯酰胺(电泳级,Sigma 公司产品);丙烯酰胺(电泳级,GenView);无水葡萄糖(分析纯,上海伯奥生物科技有限公司产品);三羟甲基氨基甲烷(生化试剂,GenView);羧甲基纤维素钠(分析纯,天津市科密欧化学试剂有限公司产品);透析袋 9000D(Axy-gen);乙醇、甲醇、冰醋酸、过硫酸铵、硫酸铵等试剂均为分析纯。

1.2 井冈霉素的处理和酶提取液的制备

用内径 5.0 mm 打孔器在 PDA 培养基上生长的病菌菌落边缘打取菌丝块,挑取 10 块菌丝块,移至盛有 100 mL 改良 Marcus 培养液^[10]的 250 mL 三角瓶中,加入井冈霉素母液,使其终质量浓度分别为 20、100、500 $\mu\text{g}/\text{mL}$,以不加井冈霉素的作为空白对照(用 CK 表示,用灭菌水代替井冈霉素母液,下同),于 26 $^{\circ}\text{C}$ 下培养,6 d 后过滤除去菌丝,滤液在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下 15 000 r/min 离心 20 min,弃去沉淀,上清液即为酶提取液,留下备用。

在上述酶提取液中加入硫酸铵至 60% 饱和度(25 $^{\circ}\text{C}$),在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下静置 5 h 后,在 4 $^{\circ}\text{C}$ 、15 000 r/min 下离心 20 min,弃上清液,用 50 mmol/L 醋酸-醋酸钠缓冲液(pH 5.0)分别溶解沉淀。沉淀在同样的缓冲液中于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下透析 2 d,每 12 h 换 1 次透析液,纯化的酶置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 下保存备用。

1.3 葡萄糖标准曲线的绘制

葡萄糖含量标准曲线的绘制参考文献^[11]中的方法。以不同葡萄糖浓度为横坐标,以各浓度对应的 540 nm 处的吸光值($A_{540\text{ nm}}$)为纵坐标,绘制标准曲线,得到线性回归方程

$$y=0.0016x-0.0504(r=0.9984)$$

1.4 蛋白质标准曲线的绘制

采用考马斯亮蓝染色法测定可溶性蛋白浓度^[11]。以 $A_{595\text{ nm}}$ 值(y)为纵坐标,以蛋白质浓度(x)为横坐标,绘制标准曲线,得到牛血清蛋白质的线性回归方程

$$y=0.0009x+0.0299(r=0.9987)$$

1.5 细胞壁降解酶的活性测定

采用紫外-可见分光光度法测定细胞壁降解酶的活性。利用二硝基水杨酸试剂(DNS),通过日立 U-2910 紫外分光光度计在 540 nm 处测定反应混合液释放的还原糖,通过葡萄糖含量标准曲线计算出多聚半乳糖醛酸酶(PG)、纤维素降解酶(Cx)和果胶甲基半乳糖醛酸酶(PMG)还原糖的量。酶活性单位定义为 50 $^{\circ}\text{C}$ 下每分钟催化底物释放 1 μg 还原糖所需酶量(U)。

1.6 菌丝可溶性蛋白的提取与分析

1) 菌丝可溶性蛋白的提取。在 PDA 平板上培养水稻纹枯病菌菌丝,2 d 后在菌落边缘取直径 5 mm 的 5 块菌丝块,分别接入 CK 和含有 3 个不同质量浓度(20、100、500 $\mu\text{g}/\text{mL}$)井冈霉素的查氏培养液中(250 mL 的三角瓶中盛有 100 mL 培养液),25 $^{\circ}\text{C}$ 恒温,150 r/min 振荡培养 5 d。菌丝用布氏漏斗抽滤,并用去离子水冲洗 3 次。每个浓度处理称取鲜菌丝 1.0 g,加 2 mL 磷酸缓冲液(pH 7.0),冰浴研磨成匀浆,4 $^{\circ}\text{C}$ 下 20 000 r/min 离心 20 min,取上清液备用^[12]。

2) 菌丝可溶性蛋白聚丙烯酰胺垂直板凝胶电泳。采用不连续垂直板聚丙烯酰胺凝胶电泳,并参照文献^[12]中的方法进行。电泳时使用 8% 分离胶(pH 8.8)和 4% 浓缩胶(pH 6.8),电极缓冲液为 pH 8.3 的 Tris-甘氨酸缓冲系统,每样品蛋白点样量为 100 μg 。电泳在 4 $^{\circ}\text{C}$ 的环境中进行,浓缩胶内电压为 70 V,进入分离胶后电压增大为 100 V,当前沿指示剂距底边 1.5 cm 处时停止电泳。取出胶板后以考马斯亮蓝 R-250 染色 30 min,再用 7% 冰醋酸脱色,固定后拍照。

2 结果与分析

2.1 井冈霉素对细胞壁降解酶的影响

试验结果表明(表 1),质量浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的井冈霉素对水稻纹枯病菌多聚半乳糖醛酸酶(PG)的活性虽然有一定程度影响(下降),但与空白对照相比无显著差异。当井冈霉素质量浓度达到 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,与空白对照相比 PG 的活性下降程度差异显著,即井冈霉素在该浓度下显著减少了水稻纹枯病菌 PG 的产生。但随着井冈霉素质量浓度增加到 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$,PG 的活性并不进一步下降,即井冈霉素质量浓度在 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上时,各处理之间 PG 的活性差异不显著。

从表 1 可看出,当井冈霉素的质量浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,与空白对照相比水稻纹枯病菌 C_x 的活性下降程度达到显著差异。随着井冈霉素质量浓度增加到 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, C_x 的活性进一步下降。当井冈霉素质量浓度增加到 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, C_x 的活性虽然比在 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时略有上升,但与空白对照相比, C_x 的活性下降程度仍然有显著差异,即井

冈霉素在 3 种供试浓度下都显著减少了水稻纹枯病菌 C_x 的产生,从而使 C_x 的活性显著下降。

从表 1 还可看出,各供试浓度井冈霉素在一定程度上都降低了 PMG 的活性。但统计分析表明,各供试浓度井冈霉素对 PMG 的活性影响并无显著差异,即井冈霉素在各供试浓度下对水稻纹枯病菌 PMG 的产生并没有显著影响。

表 1 井冈霉素对水稻纹枯病菌细胞壁降解酶活性的影响¹⁾

Table 1 Effects of Jinggangmycin on the activities of cell wall degrading enzyme of *R. solani*

U

$\rho/(\mu\text{g}/\text{mL})$	多聚半乳糖醛酸酶活性 PG activity	纤维素酶活性 C_x activity	果胶甲基半乳糖醛酸酶活性 PMG activity
CK	19.28 \pm 0.40 a	33.97 \pm 3.56 a	21.82 \pm 1.23 a
20	18.39 \pm 0.36 ab	24.32 \pm 1.55 bc	21.01 \pm 0.04 a
100	17.24 \pm 0.40 b	20.26 \pm 0.34 c	19.51 \pm 1.06 a
500	17.81 \pm 0.31 b	27.81 \pm 0.27 b	19.92 \pm 0.41 a

1)表中数据为 3 次重复的平均值,采用邓肯氏新复极差法(DMRT)进行差异显著性分析,同列数据字母相同者表示在 5% 水平上差异不显著。

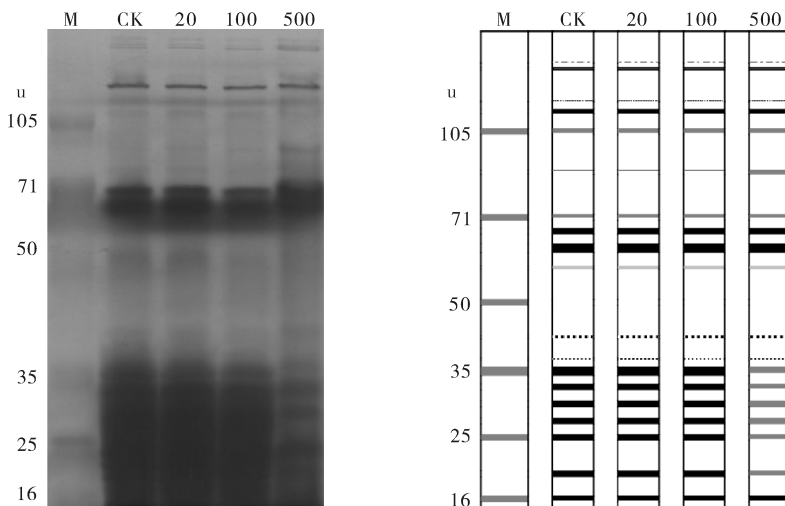
Data in this table, representing the average of three replicates, were analyzed for significant difference by using Duncan's multiple range test(DMRT), and the same letter in the same column are not significantly different from each other at 5% level.

2.2 井冈霉素对菌丝可溶性蛋白的影响

聚丙烯酰胺凝胶电泳分析结果如图 1 所示。由图 1 可知,水稻纹枯病菌经井冈霉素各供试质量浓度(20、100、500 $\mu\text{g}/\text{mL}$)处理后的蛋白电泳谱型与空白对照相似性较高,各浓度处理的谱带数目均为 20 条,且较为清晰的谱带有 16 条。尽管井冈霉素各供试质量浓度处理与空白对照比较谱带数目相同,但在蛋白分子质量为 90 u 处,井冈霉素质量浓

度为 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时的处理相对于其他处理明显加强。

在水稻纹枯病菌菌丝可溶性蛋白电泳图谱的下端,蛋白分子质量为 35~16 u 之间有 6 条谱带,井冈霉素质量浓度为 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时的处理相对于其他处理条带明显减弱。在井冈霉素浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时的处理,相对于空白对照图谱的一致性非常高,且没有明显变化(图 1)。



M: 蛋白质分子质量标记 Protein molecular weight marker

图 1 井冈霉素不同浓度下培养的水稻纹枯病菌菌丝可溶性蛋白电泳图谱

Fig. 1 Electrophoresis patterns of soluble mycelial protein of *R. solani* cultured at different concentrations of Jinggangmycin

3 讨论

本研究结果表明:供试井冈霉素在质量浓度 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,能分别显著降低水稻纹枯病菌 2 种细胞壁降解酶(纤维素降解酶和多聚半乳糖醛酸酶)的活性;随着井冈霉素浓度的增加, Cx 和 PG 的活性进一步下降;尽管井冈霉素在 3 种供试浓度下都不同程度地降低了 PMG 的活性,但与空白对照相比并未达到显著差异水平。在对水稻纹枯病菌菌丝可溶性蛋白的影响方面,井冈霉素各浓度处理下的菌丝可溶性蛋白谱带数目与空白对照相比较完全相同,谱带的迁移率也一致,但对菌丝可溶性蛋白浓度有一定程度的影响。井冈霉素质量浓度为 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,谱带在蛋白分子质量为 90 u 处明显加强,在蛋白分子质量为 16~35 u 之间的 6 条谱带明显减弱。这说明井冈霉素质量浓度在 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,对水稻纹枯病菌菌丝可溶性蛋白有一定的影响;井冈霉素质量浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,对菌丝可溶性蛋白没有显著影响。这是目前国内关于井冈霉素对水稻纹枯病菌细胞壁降解酶和可溶性蛋白影响的首次报道。

井冈霉素是一种由吸水链霉菌井冈变种 (*Streptomyces hygrosopicus* var. *jinggangensis*) 产生的农用抗生素(antibiotic)^[4]。自从 20 世纪 70 年代开发应用以来,井冈霉素一直是防治水稻纹枯病的经济、高效、低毒、低残留的药剂^[13]。近年来,尽管有些报道认为水稻纹枯病菌对井冈霉素产生了一定程度的抗药性,防效有所降低^[14-16],但在目前并没有更好的替代药剂以及没有高抗纹枯病的水稻品种可利用以前,井冈霉素仍然是防治水稻纹枯病的首选药剂。因此,弄清楚井冈霉素防治水稻纹枯病的机制,对发挥其更大的作用具有重要意义。

张穗等^[6]认为,抑菌作用和诱导植株产生抗性防卫反应是井冈霉素防治水稻纹枯病的主要作用机制。本研究结果表明,井冈霉素显著降低了水稻纹枯病菌的主要致病因子,即 2 种细胞壁降解酶的活性,据此推测井冈霉素可能减弱了水稻纹枯病菌对寄主水稻的侵染能力,从而起到抑制纹枯病的作用。这与 Robson 等^[17]对有效霉素 A(validamycin A)对立枯丝核菌(*R. solani*) A79 菌株的作用机制类似。本研究从井冈霉素抑制水稻纹枯病菌致病因子表达这一角度进行了有益探讨,补充和丰富了井冈霉素防治水稻纹枯病的作用机制。

参 考 文 献

- [1] 黄江华,杨媚,周而勋,等. 13 种植物丝核菌对水稻、甜玉米、黄瓜和甘蓝的交互致病性[J]. 华中农业大学学报, 2008, 27(2): 198-203.
- [2] 周而勋,杨媚,陈友林. 土壤环境因素对水稻纹枯病菌腐生定殖能力的影响[J]. 植物病理学报, 2002, 32(3): 214-218.
- [3] 黄世文,王玲,陈惠哲,等. 氮肥施用量和施用方法对超级杂交稻纹枯病发生的影响[J]. 植物病理学报, 2009, 39(1): 104-109.
- [4] 沈寅初. 农用抗生素研究开发的新进展[J]. 国外医药抗生素分册, 1998, 19(2): 155-160.
- [5] MULLER J, BOLLER T, WIEMKEN A. Effects of validamycin A, a potent trehalase inhibitor and phytohormones on trehalose metabolism in roots and root nodules of soybean and cowpea[J]. Planta, 1995, 197(2): 362-368.
- [6] 张穗,郭永霞,唐文华,等. 井冈霉素 A 对水稻纹枯病菌的毒力和作用机理研究[J]. 农药学报, 2001, 3(4): 31-37.
- [7] 陈兵,王坤元,董国强,等. 水稻纹枯病菌的致病性与酶活力的关系[J]. 浙江农业学报, 1992, 4(1): 8-14.
- [8] 张红,陈夕军,童蕴慧,等. 纹枯病菌胞壁降解酶对水稻组织和细胞的破坏作用[J]. 扬州大学学报: 农业与生命科学版, 2005, 26(4): 83-86.
- [9] 陈夕军,张红,徐敬友,等. 水稻纹枯病菌细胞壁降解酶的产生及致病作用[J]. 江苏农业学报, 2006, 22(1): 24-28.
- [10] MARCUS L, BARASH I, SNEH B, et al. Purification and characterization of pectolytic enzymes produced by virulent and hypovirulent isolates of *Rhizoctonia solani* Kühn [J]. Physiological and Molecular Plant Pathology, 1986, 29(3): 325-336.
- [11] 龚佑文,张小娟,王晓宁,等. 花椒和川黄柏精油对水稻纹枯病菌形态和细胞壁降解酶的影响[J]. 天然产物研究与开发, 2008, 20: 193-197.
- [12] MOHAMMADI M, BANIHASHEMI M, HEDJAROUDE G A, et al. Genetic diversity among Iranian isolates of *Rhizoctonia solani* Kühn anastomosis group 1 subgroups based on isozyme analysis and total soluble protein pattern[J]. Journal of Phytopathology, 2003, 151: 162-170.
- [13] 韩新才,阎耀林,黄志农,等. 井冈霉素水溶性粉剂对水稻纹枯病的防治效果[J]. 华中农业大学学报, 2004, 23(1): 100-102.
- [14] 周明国,叶钟音,刘经芬. 稻纹枯病菌对井冈霉素抗药性检测、监测和诱导[J]. 中国水稻科学, 1991, 5(2): 73-78.
- [15] 金梅松,蒋文烈. 浙江省水稻纹枯病菌对井冈霉素的抗药性测定[J]. 浙江农业学报, 1997(3): 127-130.
- [16] 张穗,周梅先. 河南固始等地稻纹枯病菌对井冈霉素的抗药性测定[J]. 植物保护学报, 1999, 26(2): 189-190.
- [17] ROBSON G D, KUHN P J, TRINCI A P J. Effect of validamycin A on the production of cellulase, xylanase and polygalacturonase by *Rhizoctonia solani* [J]. Journal of General Microbiology, 1989, 135: 2709-2715.

Effects of Jinggangmycin on Cell Wall Degrading Enzyme Activity and Soluble Proteins of *Rhizoctonia solani* Kühn

LI Ming-hai YANG Ying-qing YANG Mei ZHOU Er-xun

College of Natural Resources and Environment, South China Agricultural University,
Guangzhou 510642, China

Abstract To further elucidate the mechanism of Jinggangmycin in controlling rice sheath blight, effects of Jinggangmycin on three cell wall degrading enzymes (CWDEs), i. e. polygalacturonase (PG), cellulase (Cx) and pectin methyl-galacturonase (PMG), and soluble mycelial proteins of *Rhizoctonia solani*, the causal agent of rice sheath blight, were investigated in this research. The results showed that the enzyme activities of all three CWDEs decreased in different degrees at all three tested concentrations of 20, 100, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of Jinggangmycin compared with the blank control (absence of Jinggangmycin, the same in later text). Jinggangmycin at the concentration of 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ or 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ caused significant reduction at $P=0.05$ level in enzyme activity of Cx or PG, respectively, when compared with the blank control; however, there was no significant difference at $P=0.05$ level in enzyme activity of PMG at different concentrations of Jinggangmycin compared with the blank control. By using polyacrylamide gel electrophoresis technique, soluble mycelial proteins of each treatment displayed a pattern of 20 protein-bands with 16 clearer ones when the pathogen was cultured at above mentioned three concentrations of Jinggangmycin. The numbers and the mobility rates of protein-bands were identical, whereas the colour darkness and band width were somewhat different compared with those of the blank control, indicating that the kinds of protein were the same, but the protein contents were different; the band with molecular weight of 90 ku was obviously strengthened at 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, whereas the 6 bands with molecular weights between 16 u and 35 u were obviously weakened at the same concentration, which indicated that Jinggangmycin had certain effect on the soluble mycelial proteins at 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, but no significant effects on the soluble mycelial proteins were observed at concentrations of 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Taken all together, our study revealed that Jinggangmycin had an impact on CWDEs and soluble mycelial proteins of *R. solani* weakened the infection of *R. solani* to rice, and thus it is speculated that this may be one of the mechanisms of rice sheath blight control of Jinggangmycin.

Key words Jinggangmycin; *Rhizoctonia solani* Kühn; cell wall degrading enzymes; soluble proteins

(责任编辑:陈红叶)