

芦笋茎枯病菌细胞壁降解酶活性的测定及条件优化

杨迎青¹ 孟凡^{1,2} 兰波¹ 徐沛东^{1,3} 张顺梁¹ 李湘民¹

1. 江西省农业科学院植物保护研究所, 南昌 330200;

2. 江西农业大学农学院, 南昌 330045; 3. 江西农业大学生物科学与工程学院, 南昌 330045

摘要 为明确芦笋茎枯病菌细胞壁降解酶的活性及测定条件, 利用3,5-二硝基水杨酸法(DNS法)测定7种常见细胞壁降解酶的活性, 比较不同底物对3种主要酶的诱导作用, 并从温度、时间、pH值等方面优化酶活性的测定条件。结果表明: 7种细胞壁降解酶中, 多聚半乳糖醛酸酶(polygalacturonase, PG)的活性较高, 其次是果胶甲基半乳糖醛酸酶(polymethylgalacturonase, PMG)和 β -1,4-内切葡聚糖酶(endo- β -1,4-glucanase, Cx), 其他4种酶活性较低。在3种主要细胞壁降解酶中, Cx以1%羧甲基纤维素钠盐(CMC)作为底物的诱导效果较好, PG和PMG以1%柑橘果胶(pectin)作为底物的诱导效果较好。Cx的最佳反应温度是50℃, PG的最佳反应温度是50~60℃, PMG的最佳反应温度是60℃; Cx的最佳反应时间是50 min, PG和PMG的最佳反应时间是60 min; Cx和PG的最佳反应pH值是4.0, PMG的最佳反应pH值是8.0。

关键词 芦笋; 茎枯病菌; 细胞壁降解酶; 酶活性

中图分类号 S 432.4⁺4; S 436.44 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2014)02-0057-04

芦笋(*Asparagus officinalis* Linn.)又称石刁柏, 属百合科天门冬属植物, 是世界十大名菜之一, 在国际市场上被称为蔬菜之王。芦笋营养价值高, 能润肺、镇咳、祛痰, 且具有抑制肿瘤生长等功能, 深受人们的喜爱^[1]。近年来, 随着芦笋栽培面积的扩大, 病害的发生也逐年加重, 尤其是茎枯病的发生和危害已严重影响了芦笋的产量与质量^[2-3]。由天门冬拟茎点霉[*Phomopsis asparagi* (Sacc.) Bubak]引起的芦笋茎枯病, 是一种世界性分布的毁灭性病害^[4]。在中国、日本、泰国、印尼等亚洲芦笋种植国家发生比较严重, 尤以中国发病最重, 在芦笋生产省份均发生普遍, 且南方重于北方^[5-6]。茎枯病的发生需要湿热气候条件, 欧美芦笋主产区均为冷凉气候, 因此, 在欧美国家基本不发生茎枯病, 相应的研究报道也较少。

已有的试验结果表明, 拮抗细菌及其发酵物和甲基托布津等农药对芦笋茎枯病菌有较强的抑制作用^[7-8], 但长期以来, 该病尚未得到有效控制, 并有逐渐加重之势。这主要是因为目前无高抗茎枯病的芦笋品种, 且对引起芦笋茎枯病的病原菌致病机制尚

不清楚, 因此, 单纯靠药剂筛选和生物农药不能根本解决该病的防治问题, 只有探索其致病机制并以此作为靶标进行遗传育种才是防控的可行途径。细胞壁降解酶是植物病原真菌的重要致病因子^[9-11], 但目前尚未有芦笋茎枯病菌细胞壁降解方面的相关报道。笔者通过人工诱导的方法, 提取芦笋茎枯病菌的细胞壁降解酶, 纯化后测定了几种主要细胞壁降解酶的活性, 并从温度、时间、pH值等方面对其测定条件进行优化, 旨在明确芦笋茎枯病菌细胞壁降解酶的离体培养条件、酶活性测定条件和酶活性大小, 为了解其致病机制和病害防治提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试菌株: 芦笋茎枯病菌株 FJ2, 由笔者所在实验室分离与保存, 为强致病力菌株^[2], 在PDA平板上26℃培养, 备用; 供试芦笋品种: JK701, 由江西省农业科学院芦笋创新中心提供。

1.2 培养液配制

改良的 Marcus 培养液: KNO₃ 2.0 g, KCl

收稿日期: 2013-06-01

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项(201003074)、国家重点基础研究发展计划项目(2011CB111603)和江西省农业科学院创新基金项目(2011CBS006)

杨迎青, 博士, 助理研究员。研究方向: 植物病理学。E-mail: yyq8295@163.com

通信作者: 李湘民, 博士, 研究员。研究方向: 植物病理学。E-mail: xmlil025@yahoo.com.cn

0.5 g, FeSO₄ 0.01 g, K₂HPO₄ 1.0 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.5 g, VB₁ 0.2 mg, L-天冬酰胺 0.5 g, 柑橘果胶(pectin, Sigma)或羧甲基纤维素钠盐(CMC) 10.0 g, 蒸馏水 1 000 mL。培养液调至 pH 5.0 后经 121 °C 高压灭菌 20 min^[10-11]。

1.3 细胞壁降解酶的提取与纯化

病菌在 Marcus 培养液中静置培养 8 d, 过滤除去菌丝后, 将得到的培养滤液在饱和度 60% 的 (NH₄)₂SO₄ 中 4 °C 过夜, 然后在 4 °C、11 000 r/min 下离心 20 min, 得到沉淀。用 50 mmol/L 的醋酸-醋酸钠缓冲液(pH 5.0)溶解沉淀, 在同样缓冲液中 4 °C 透析 24 h, 期间更换透析液 2 次, 得到的酶液置于 -20 °C 保存备用。

1.4 酶活性测定

1) 酶浓度测定。按照 0.2 mL 酶液 + 0.8 mL 的 0.9% NaCl 溶液、0.4 mL 的酶液 + 0.6 mL 的 0.9% NaCl 溶液和 0.6 mL 酶液 + 0.4 mL 0.9% NaCl 溶液的比例配制 3 管酶溶液, 加 5 mL 考马斯亮蓝 G-250 溶液后测定 D₅₉₅ 值, 将 D₅₉₅ 值代入牛血清白蛋白标准曲线函数^[10], 计算出酶浓度, 取 3 个数值的平均值。

2) 细胞壁降解酶活性测定。参照高增贵等^[12]和李宝聚等^[13]的方法测定 β-1,4-内切葡聚糖酶(endo-β-1,4-glucanase, Cx)、多聚半乳糖醛酸酶(polygalacturonase, PG)、果胶甲基半乳糖醛酸酶(polymethylgalacturonase, PMG)和滤纸酶(filter paper enzyme, FPA)的活性并略作修改。试验中采用的 DNS 用量为 1.5 mL, 加蒸馏水定容到 10 mL 后测定 D₅₄₀ 值, 以 50 °C 下每分钟催化底物释放 1 μg 还原糖所需酶量为 1 个酶活单位(U)。

利用 NaOH 滴定法计算酶作用后所释放的羧基的数量来计算果胶甲基酯酶(pectin methylesterase, PE)活性。按李宝聚等^[13]的方法在 232 nm 处测定反应混合液的消光值, 计算多聚半乳糖醛酸反式消除酶(polymethylgalacturonase trans-eliminase, PGTE)和果胶甲基反式消除酶(pectin methyl-trans-eliminase, PMTE)的活性, 以 30 °C 下每分钟催化底物释放 1 μmol 不饱和醛酸所需酶量为 1 个酶活单位(U)。所有酶活性测定均重复 3 次, 酶蛋白浓度按 Bradford^[14]的方法计算。

3) 底物对细胞壁降解酶的诱导。分别在加入 1% CMC、1% 柑橘果胶和 0.5% CMC + 0.5% 柑橘果胶 3 种底物的 Marcus 培养液中静置培养 8 d,

并按上述方法进行提取、纯化和酶活性测定, 比较 3 种底物对 Cx、PG 和 PMG 的诱导作用。

1.5 不同条件下酶活性的观察

1) 温度。分别在设置 20、30、40、50、60、70 °C 的恒温条件下, 按上述方法测定 Cx、PG 和 PMG 酶的活性, 找出酶活性测定的最适反应温度。

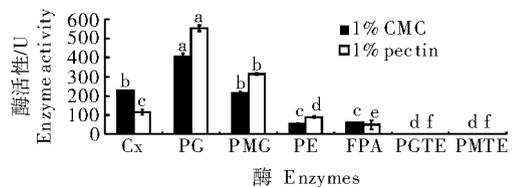
2) 反应时间。分别测定细胞壁降解酶与相应底物反应 10、20、30、40、50、60、70 min 后 Cx、PG 和 PMG 酶的活性, 明确酶活性与反应时间的关系。

3) pH 值。以 KH₂PO₄-K₂HPO₄ 为缓冲体系, 分别在 pH 值为 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0 的条件下测定 Cx、PG 和 PMG 酶的酶活性, 观察 pH 值对这 3 种酶活性的影响。

2 结果与分析

2.1 细胞壁降解酶活性的测定

测定结果表明: PG 酶的活性较高, 以 1% CMC 作为底物和以 1% 果胶作为底物下的酶活分别为 407.60 U 和 553.55 U; 其次是 PMG 和 Cx, 以 1% CMC 作为底物和以 1% 果胶作为底物下的酶活分别为 214.50 U、324.50 U 和 227.54 U、114.42 U(图 1)。



图中数据为 3 次重复的平均值 ± 标准误差, 采用 Duncan 氏新复极差法(DMRT)进行差异显著性分析, 不同字母表示在 5% 水平上差异显著(下图同)。Data in the figure were the average ± S.E. of three replicates, and analyzed for significant difference by using DMRT, the data with the different letters are significantly difference at 5% level (the same as following figures).

图 1 几种主要细胞壁降解酶的活性

Fig. 1 Enzyme activities of several common cell wall degrading enzymes

2.2 底物对细胞壁降解酶的诱导作用

测定结果表明: Cx 用 1% CMC 的诱导效果较好, PG 和 PMG 用 1% 果胶的诱导效果较好(图 2)。

2.3 不同条件对酶活性的影响

测定结果表明: Cx 的最佳反应温度是 50 °C, PG 的最佳反应温度是 50~60 °C, PMG 的最佳反应温度是 60 °C(图 3-A); Cx 的最佳反应时间是 50 min, PG 和 PMG 的最佳反应时间是 60 min

(图 3-B); Cx 和 PG 的最佳反应 pH 值是 4.0, PMG 的最佳反应 pH 值是 8.0(图 3-C)。

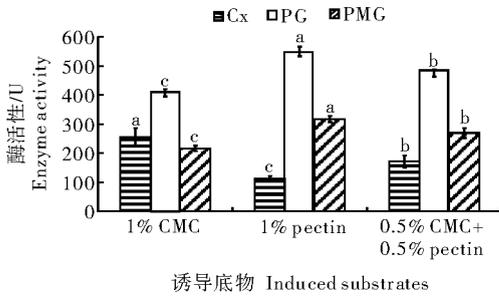


图 2 不同底物对 3 种细胞壁降解酶的诱导

Fig. 2 Induced effects of different substrates on 3 main cell wall degrading enzymes

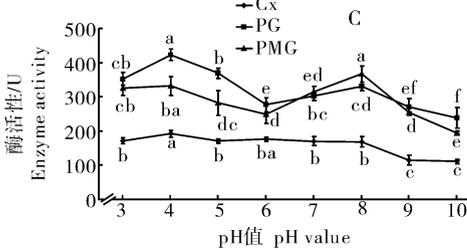
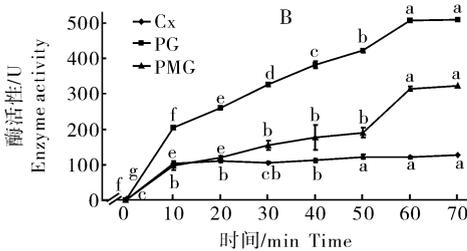
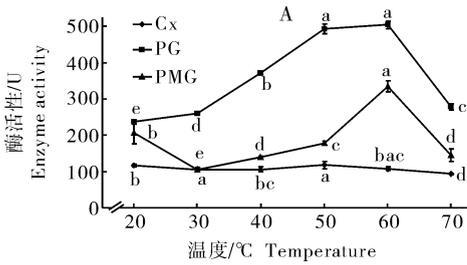


图 3 不同条件下 3 种细胞壁降解酶的活性

Fig. 3 Enzyme activities of 3 main cell wall degrading enzymes under different conditions

3 讨论

细胞壁降解酶是植物病原真菌的一个重要致病因子,在植物病害发病过程中起着重要作用^[9-11]。已有的研究表明,植物病原菌细胞壁降解酶在离体诱导时出现的顺序是不同的,果胶酶的产生要早于纤维素酶,增加 CMC 的量会缩短纤维素酶出

现的时间,果胶酶和纤维素酶的产生会相互抑制^[15]。本试验结果表明,芦笋茎枯病菌菌丝体在改良的 Marcus 培养液中培养 8 d 生长较好,产生的细胞壁降解酶浓度较高。为比较各种细胞壁降解酶的活性差异,本试验采用改良的 Marcus 培养液统一培养 8 d。

本试验测定了常见的 7 种细胞壁降解酶(Cx、PG、PMG、PE、FPA、PGTE 和 PMTE)的活性,结果发现 Cx、PG 和 PMG 酶的活性较高,而其他 4 种酶的活性较低,这与其他植物病原真菌方面的研究结果基本一致^[10]。此外,通过观察与测定不同诱导底物对 Cx、PG 和 PMG 等 3 种主要酶的诱导作用,结果发现 Cx 用 1% CMC 诱导效果最佳,PG 和 PMG 用 1% 果胶诱导效果最佳,这也与已有的研究结果基本一致^[10,15]。

本试验还从温度、反应时间、pH 值 3 个方面,对 Cx、PG 和 PMG 酶的活性测定条件进行了优化。在最佳反应温度方面,本试验结果表明:Cx 的最佳反应温度是 50 °C,PG 为 50~60 °C,PMG 为 60 °C,这与前人的研究结果略有差异。杨媚等^[10]的研究结果证明,水稻纹枯病菌 Cx 的最佳反应温度是 30 °C,PG 和 PMG 的最佳反应温度是 50 °C;高增贵等^[12]等通过试验得到玉米茎腐病菌 Cx 和 PG 最佳酶活测定温度是 50 °C,PMG 的最佳温度是 40 °C。造成芦笋茎枯病菌与水稻纹枯病菌和玉米腐病菌细胞壁降解酶最佳反应温度不同的原因,可能与其亲缘关系较远有关,相应其细胞壁降解酶的化学组成和结构略有差异。

在酶反应时间方面,本试验结果表明:Cx 的适宜反应时间为 50 min,PG 和 PMG 的适宜反应时间为 60 min。高增贵等^[12]对玉米茎腐病菌 PG 最佳反应时间的观察结果也是 60 min。杨媚等^[10]对水稻纹枯病菌 PG 最佳反应时间观察的结果是 0~40 min 时酶活性增幅较大,反应 40 min 后酶活性增大趋势变缓,与本试验结果(0~60 min 为酶活性作用关键期)略有不同,这可能与试验所用的病原菌不同有关。

本试验结果表明:Cx 和 PG 的最佳反应 pH 值是 4.0, PMG 的最佳反应 pH 值是 8.0。这与高增贵等^[12]对玉米茎腐病菌的研究结果略有不同(Cx 和 PG 酶最佳 pH 值均为 6.0, PMG 的最佳反应 pH 值为 5.0),其差异可能与它们是不同属真菌有关。

参 考 文 献

- [1] 刘克均,陆悦健,陈永莹,等. 芦笋茎枯病菌的生物学特性[J]. 植物病理学报,1994,24(4):299-304.
- [2] 杨迎青,李湘民,孟凡,等. 芦笋茎枯病抗性鉴定方法的建立及芦笋抗病种质资源的筛选[J]. 植物病理学报,2012,42(6):649-654.
- [3] 杨迎青,李湘民,孟凡,等. 芦笋茎枯病菌的鉴定及区域差异性分析[J]. 植物保护学报,2012,39(4):315-320.
- [4] 刘克均,张凤如,陈永查. 芦笋茎枯病原菌的订正[J]. 真菌学报,1991,10(4):329-330.
- [5] UECKER F A,JOHNSON D A. Morphology and taxonomy of species of *Phomopsis* on *Asparagus* [J]. *Mycologia*,1991,83(2):192-199.
- [6] DAVIS R D. Asparagus stem blight recorded in Australia [J]. *Australasian Plant Pathology*,2001,30(2):181-182.
- [7] 林佩力,汪国强,梁训义. 不同农药对芦笋茎枯病菌联合作用的毒力测定[J]. 植物保护,1995,21(6):35-37.
- [8] 马利平,郝变青,秦曙,等. 芦笋茎枯病的生物防治及机理研究[J]. 中国生态农业学报,2009,17(6):1229-1233.
- [9] YANG Y Q,YANG M,LI M H,et al. Cloning and functional analysis of an endo-PG-encoding gene *Rrspgl* of *Rhizoctonia solani*,the causal agent of rice sheath blight [J]. *Canadian Journal of Plant Pathology*,2012,34(3):436-447.
- [10] 杨媚,杨迎青,郑丽,等. 水稻纹枯病菌细胞壁降解酶的组分分析、活性测定及其致病作用[J]. 中国水稻科学,2012,26(5):599-605.
- [11] 李明海,杨迎青,杨媚,等. 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产生的影响[J]. 华中农业大学学报,2010,29(3):272-276.
- [12] 高增贵,陈捷,高洪敏,等. 玉米茎腐病菌产生的细胞壁降解酶种类及其活性分析[J]. 植物病理学报,2000,30(2):148-152.
- [13] 李宝聚,周长力,赵奎华,等. 黄瓜黑星病菌致病机理的研究 II. 细胞壁降解酶及其在致病中的作用[J]. 植物病理学报,2000,30(1):13-18.
- [14] BRADFORD M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Anal Biochem*,1976,72: 248-254.
- [15] LISKER N,KATAN J,HENIS Y. Sequential production of polygalacturonase,cellulase, and pectin lyase by *Rhizoctonia solani* [J]. *Can J Microbiol*,1975,21(9):1298-1304.

Measurement of cell wall degrading enzymes from asparagus stem blight pathogen and its optimization of activity determination conditions

YANG Ying-qing¹ MENG Fan^{1,2} LAN Bo¹ XU Pei-dong^{1,3} ZHANG Shun-liang¹ LI Xiang-min¹

1. Institute of Plant Protection, Jiangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanchang 330200, China;

2. College of Agronomy, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China;

3. College of Biological Science and Engineering, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China

Abstract To define the activity and optimize the determination conditions of the cell wall degrading enzymes from asparagus stem blight pathogen, the activities of 7 cell wall degrading enzymes were determined by the 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) method, the induced effects of different substrates were compared, and the determination conditions for 3 main enzymes were optimized in 3 aspects, i. e. temperature, time and pH value. The results revealed that in the 7 cell wall degrading enzymes the activity of polygalacturonase (PG) was the most vigorous, followed by polymethylgalacturonase (PMG) and endo- β -1,4-glucanase (Cx), whereas the other 4 enzymes were of lower activity. In the 3 main enzymes, 1% CMC was the better induced substrate for Cx and 1% pectin was the better for PG and PMG. In regarding to reaction temperature, it was found that the best reaction temperature for Cx was 50 °C and the best for PG and PMG was 50-60 °C and 60 °C, respectively. In regarding to reaction time, it was found that 50 min was more suitable for Cx, whereas 60 min was more suitable for PG and PMG. In regarding to pH value, it was found that pH 4.0 was more suitable for Cx and PG, whereas pH 8.0 was more suitable for PMG.

Key words asparagus; stem blight pathogen; cell wall degrading enzymes; enzymatic activity

(责任编辑:陈红叶)