

栗疫病菌对板栗几丁质酶活性的诱导^{*}

刘德兵¹, 范崇辉¹, 魏军亚¹, 秦 岭²

(1 西北农林科技大学 园艺学院, 陕西 杨陵 712100; 2 北京农学院 园艺系, 北京 102206)

[摘 要] 以板栗(*Castanea mollissima* Bl.)实生苗和嫁接苗(怀黄)为试材, 研究了栗疫病菌(*Cryphonectria parasitica*)菌块、CFE、ME 等对板栗几丁质酶的诱导, 测定了几丁质酶活性、比活性, 并对其进行初步纯化。结果表明, 菌块对板栗几丁质酶总活性、比活性的诱导效果最佳; 接种后 35~40 h 几丁质酶活性持续上升并达到高峰, 之后开始下降。能够同时检测到板栗几丁质酶的内切酶和外切酶, 以内切酶活性稍高。初步确定板栗几丁质酶的分子质量为 60 ku。

[关键词] 板栗; 栗疫病菌; 几丁质酶

[中图分类号] S664 201

[文献标识码] A

[文章编号] 1000-2782(2002)03-0063-03

几丁质酶(EC 3.2.1.14)能将几丁质分解为几丁寡聚糖或N-己酰氨基葡萄糖, 在许多高等植物体内普遍存在。几丁质酶与植物抵御病原侵害的防卫反应有关, 因而其功能和特性日益受到重视。植物几丁质酶具有可诱导性, 病原菌侵染均可诱导其酶活性提高^[1~2]。目前, 各种体内、体外及转基因试验已证实植物几丁质酶具有抗真菌活性, 是植物防卫系统的重要成员。人们希望通过对该酶的广泛深入研究, 将其用于真菌和线虫等病害的综合防治。栗疫病为一种弱寄生的真菌性病害^[3], 在我国大多数栗产区有不同程度的发生, 且有不断加重的趋势^[4], 对我国板栗生产、出口及资源的持久抗病性带来不良影响。国内有关板栗抗栗疫病菌方面的几丁质酶研究目前还未见报道, 为了解几丁质酶在板栗抗栗疫病菌中的作用, 本研究用栗疫病菌菌块、病菌代谢物及其对照等处理对板栗进行诱导, 检测板栗几丁质酶活性并进行初步纯化, 以期对板栗抗栗疫病菌研究提供理论依据。

1 材料与方法

材 料 以抗病性强的板栗(*Castanea mollissima* Bl.)实生苗和抗病性弱的嫁接苗(怀黄)当年生新梢为材料^[5], 以菌落桔黄色的野生强毒力菌株 CQX002 做为供试菌株, 经 PDA 培养基活化后备用。

感染试验 配制液体培养后滤液(CFE)、干菌丝提取液(ME)、菌块(FB)、无菌水及空白 PDA 培

养基^[6], 感染试验参照王克荣等^[7]的方法。CFE、ME 对照为无菌水, 菌块的对照为空白 PDA 培养基。

酶活性测定 酶活性测定参照文献^[8]的方法。规定每小时分解胶体几丁质产生 1 μg N-己酰氨基葡萄糖的酶量为 1 个酶活性单位。

蛋白质含量测定 参照文献^[9]的方法。

几丁质酶的纯化 参照杜良成等^[10]的方法。

SDS-PAGE 电泳 参照文献^[11]的方法, Marker 选用上海生工生产的低分子量标准蛋白。

2 结果与分析

2.1 板栗几丁质酶总活性诱导的分析

试验结果表明, 经过菌块、ME 和 CFE 诱导后, 板栗几丁质酶总活性显著高于空白对照, 其酶活性提高 3~6 倍。在检测期间存在一个酶活性高峰期, 位于接种后 35~40 h (图 1)。菌块处理诱导后的嫁接苗(怀黄)和实生苗的几丁质酶总活性均高于另外两种诱导物(CFE 和 ME), 这表明 3 种诱导物中以菌块的诱导效果最佳。此外, 经相同处理诱导后, 实生苗(抗病性强)的酶活性显著高于嫁接苗。

2.2 板栗几丁质酶比活性诱导的分析

从不同处理对板栗几丁质酶比活性的诱导检测结果(图 2)来看, 不同处理在高峰期的比活性均高于各个对照。相对于空白对照而言, 诱导植株前期的比活性稍低于空白对照。在对板栗比活性诱导的 3 种处理中, 以菌块的诱导效果最佳。经菌块诱导后,

* [收稿日期] 2001-06-20

[基金项目] 北京科技新星计划资助项目(951872200)

[作者简介] 刘德兵(1975-), 男, 河南信阳人, 讲师, 硕士, 主要从事果树栽培的教学和研究工作。

实生苗的比活性显著高于嫁接苗(怀黄)。

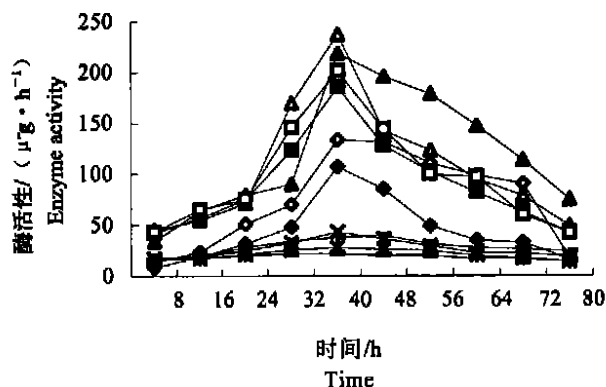


图 1 不同处理对板栗几丁质酶总活性的诱导

- - 干/黄; - - 干/实; - ▲ - 块/黄; - - 块/实;
- □ - 液/黄; - □ - 液/实; - * - 空/黄; - □ - 空/实

Fig 1 The induction of different treatment to total activity of chestnut chitinases

- - ME/Grafting; - - ME/Seeding;
- ▲ - FB/Grafting; - □ - FB/Seeding;
- □ - CFE/Grafting; - □ - CFE/Seeding;
- * - Blank/Grafting; - □ - Blank/Seeding

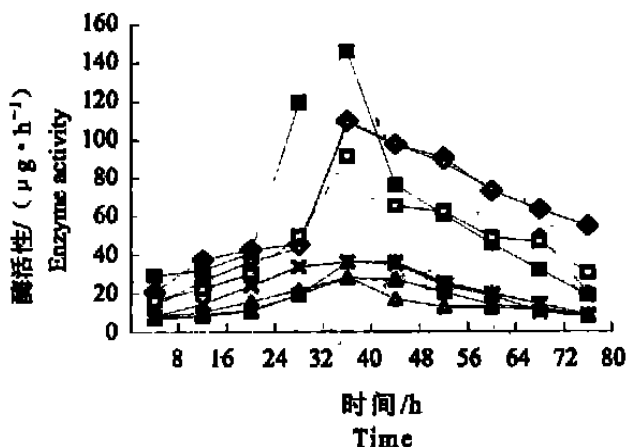


图 3 不同处理对板栗几丁质酶比活性的诱导

- - 干/黄; - □ - 干/实; - ▲ - 块/黄; - □ - 块/实;
- □ - 液/黄; - * - 液/实; - □ - 空/黄; - □ - 空/实

Fig 3 The induction of different treatment to specific activity of chestnut chitinases

- - ME/Grafting; - □ - ME/Seeding;
- ▲ - FB/Grafting; - □ - FB/Seeding;
- □ - CFE/Grafting; - * - CFE/Seeding;
- □ - Blank/Grafting; - □ - Blank/Seeding

2 3 板栗几丁质内切、外切酶活性诱导的分析

从板栗几丁质酶的内切、外切酶和总酶活性的检测结果来看,不同处理诱导后均能同时检测到内切几丁质酶和外切几丁质酶活性,且内切酶活性较高。几丁质内切、外切酶和总酶活性在接种后 35~40 h 达到高峰,之后缓慢下降(图 3)。这说明板栗几丁质酶能被栗疫病菌诱导并有 1 个高峰期,为

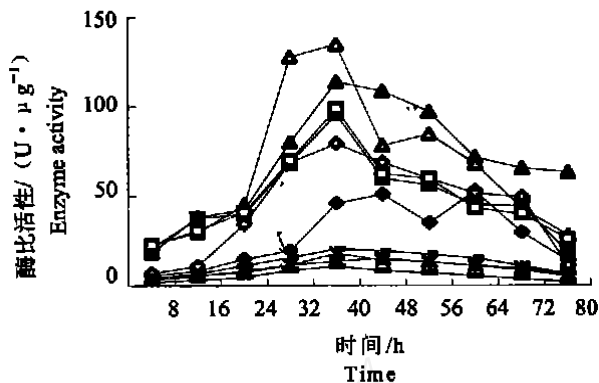


图 2 不同处理与对照对板栗几丁质酶比活性的诱导

- - 干/黄; - □ - 干/实; - ▲ - 块/黄; - □ - 块/实;
- □ - 液/黄; - * - 液/实; - □ - 空/黄; - □ - 空/实

Fig 2 The induction of different treatment and control to activity of chestnut chitinases

- - ME/Grafting; - □ - ME/Seeding;
- ▲ - FB/Grafting; - □ - FB/Seeding;
- □ - CFE/Grafting; - * - CFE/Seeding;
- □ - Blank/Grafting; - □ - Blank/Seeding

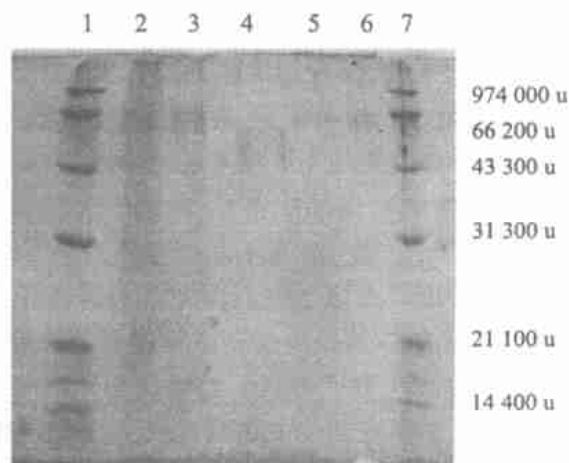


图 4 板栗几丁质酶 SDS-PAGE 电泳

1, 7 Marker; 2, 3, 5, 6 未纯化; 4 纯化后

Fig 4 SDS-PAGE of purified chestnut chitinase

1, 7 Marker; 2, 3, 5, 6 Nonpurified; 4 Purified

具有两种形式的酶。

2 4 板栗几丁质酶 SDS-PAGE 电泳

栗疫病菌诱导的板栗几丁质酶粗酶液用再生几丁质亲和柱初步纯化后,用于 SDS-PAGE 电泳(图 4)。初步确定其分子质量为 60 ku。

3 讨论

目前,植物几丁质酶已被证实具有两种类型:内

切几丁质酶和外切几丁质酶^[12]。在本研究中也同时检测到了经栗疫病菌诱导的板栗几丁质酶的内切酶和外切酶活性, 内切酶活性相对高于外切酶活性, 这与其他学者^[12]的研究结果相同。

关于几丁质酶活性在细胞间的分布已有许多报道, 本研究参考 Boller 等^[13]的方法, 试图确定板栗几丁质酶的活性分布, 然而即使将原来离心力 (10 min, 1 000 g) 增加 10 倍 (10 min, 10 000 g), 仍未能

得到细胞间提取液。另外, 在进行纯化板栗几丁质酶 SDS-PAGE 电泳分析时, 电泳板上显示出板栗几丁质酶的分子质量大约为 60 ku, 这与陈崇顺等^[12]的报道有较大的出入, 在第一次出现这种现象时, 曾怀疑是否是其他蛋白的影响, 但经过多次重复、改进纯化和电泳过程, 仍在相同的 Marker 位置重复出现时, 才最后确定其分子质量约为 60 ku。

[参考文献]

- [1] 李 晓, 杨家秀 植物几丁质酶与抗病性的关系[J]. 西南农业学报, 1997, 10: 118- 121.
- [2] Collinge D B, Kragh K M, Mikkelsen J D, et al Plant chitinase[J]. Plant J, 1993, 3(1): 31- 40
- [3] 秦 岭, 王有年, 韩 涛, 等 板栗三高栽培技术[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 1998
- [4] 王克荣, 陆家云 中国东部 11 省(市)栗疫病的发生条件[J]. 南京农业大学学报, 1993, 16(3): 44- 49
- [5] Qin L, Gao X H, Cheng J H, et al Evaluation of chestnut cultivars for resistance to *Cryphonectria parasitica*[J]. Acta Horticultural, 1999, 494: 383- 389
- [6] 王 颖, 胡景江, 朱 峰, 等 杨树溃疡病寄主诱导抗病性的研究[J]. 西北林学院学报, 1996, 11(1): 1- 4
- [7] 王克荣, 邵见阳, 陆家云 栗疫病菌的致病力分化[J]. 果树科学, 1993, 10(1): 25- 28
- [8] 汤章城 现代植物生理学实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1999
- [9] 华东师大生物系植生教研组 植物生理学实验指导[M]. 上海: 人民教育出版社, 1980 163- 165
- [10] 杜良成, 王 钧 稻瘟菌诱导的水稻几丁酶、 β -1, 3-葡聚糖酶活性及分布[J]. 植物生理学报, 1992, 18(1): 29- 33
- [11] 陈毓荃 生物化学实验技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 1995 189- 193
- [12] 陈崇顺, 朱雪峰, 郁志芳 蔬菜植物几丁质酶最新研究评述[J]. 园艺学进展, 1998, 2: 330- 335
- [13] Boller T, Gehri A, Mach F, et al Chitinase in bean leaves: induction by ethylene, purification, properties, and possible function[J]. Plant, 1983, 157: 23- 31

The induction and purification of *Cryphonectria parasitica* to chitinase of chestnut

L IU De-bing¹, FAN Chong-hui¹, WEI Jun-ya¹, QIN Ling²

(1 College of Horticulture, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Department of Horticulture, Beijing Agricultural College, Beijing 102206, China)

Abstract: The seedling chestnut and grafting chestnut (Huai Huang) were selected as experimental materials. The induction of block of *Cryphonectria parasitica*, CFE and ME to chestnut chitinase and the measurements of activity and specific activity of chestnut and the simple purification of them were reviewed. The result showed that the block of *Cryphonectria parasitica* had the highest induced effect to activity and specific activity of chestnut chitinase, during 35- 40 h the activity of it were increasing after treatment and reduced in later stage. Endochitinase activity and exochitinase activity of chestnut were observed simultaneously, the latter was higher than the former. The molecular weight of chestnut chitinase was 60 ku.

Key words: chestnut; *Cryphonectria parasitica*; chitinase