

不同碳、氮源组合对小麦全蚀病菌 产生胞外 β 1, 3-葡聚糖酶的影响

余永廷, 谢媛媛, 黄丽丽, 康振生

(西北农林科技大学 植保学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘要] 利用改进的MS液体培养基, 通过改变碳、氮源组合, 分别在振荡培养小麦全蚀病菌7, 14, 21 d时(26, 150 r/min), 用3, 5-二硝基水杨酸(DNS)比色法测定培养滤液中的 β 1, 3-葡聚糖酶活性。结果表明, 培养基中分别以小麦茎秆、叶片, 玉米茎秆、叶片和根系为碳源与不同氮源组合, 培养滤液中 β 1, 3-葡聚糖酶活性有明显差异, 其中以小麦叶片为碳源时酶活性最高, 以玉米根系为碳源时酶活性较低, 但两者之间酶活性无明显差异。培养基中加入有机氮时酶活性均明显高于加入无机氮, 但两种有机氮培养基中的酶活性变化趋势完全不同。以牛肉膏为氮源时, 在小麦全蚀病菌培养7 d时培养滤液中的酶活性最高, 且酶活性随病菌培养时间的延长而逐渐下降; 以蛋白胨为氮源时酶活性则呈上升趋势, 在病菌培养21 d时最高。以上结果表明, 供试各组合中以牛肉膏为氮源、小麦叶片为碳源的组合为最佳组合, 7 d时有相对较高的酶活性。

[关键词] 小麦全蚀病菌; 禾顶囊壳小麦变种; β 1, 3-葡聚糖酶; MS培养基; 碳源; 氮源

[中图分类号] S435.121

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)02-0110-04

Effects of different combinations of carbon and nitrogen sources in MS medium on activities of extracellular β 1, 3-glucanase produced by take-all pathogen

YU Yong-ting, XIE Yuan-yuan, HUANG Li-li, KANG Zhen-sheng

(College of Plant protection, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: The pathogenic fungi *Gaeum annanycyes graminis* var. *tritici* (Ggt) was cultured in modified MS medium (26, 150 r/min) with different combinations of carbon and nitrogen sources. The enzyme activity in the culture filtrate was detected by 3, 5-dinitrosalicylic acid (DNS) in 7, 14, 21 d after culturing the fungus. The results showed the enzyme activities were obviously different in the culture filtrate with wheat stalks, wheat leaves, maize stalks, maize leaves and maize roots as carbon source combined with different nitrogen sources. The highest enzyme activities were detected in the culture filtrate with wheat leaves as the carbon source and the lowest enzyme activities were in the culture filtrate with maize roots as the carbon source. The enzyme activities were not significantly different in the culture filtrate with wheat tissues as compared with that with maize tissues. Comparing 4 nitrogen sources, the enzyme activities were obviously higher in the culture filtrate with organic nitrogen than that with inorganic nitrogen. The highest enzyme activities were detected in the culture filtrate with beef extract as nitrogen source 7 d after culturing the fungus. The enzyme activities detected in the culture filtrate with peptone were low and

· [收稿日期] 2006-01-23

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30270863); 教育部“长江学者和创新团队”支持计划(PCSIRT200558); 西北农林科技大学创新团队资助项目

[作者简介] 余永廷(1980-), 男, 安徽淮北人, 在读硕士, 主要从事小麦全蚀病致病机理研究。E-mail: yuyongting@126.com

[通讯作者] 黄丽丽(1961-), 女, 陕西周至人, 教授, 主要从事植物病害综合防治研究。E-mail: huanglili1@hotmail.com

reached the peak 21 d after culturing the fungus. The enzyme activities in the culture filtrate with beef extract decreased gradually during the culture stage. The best carbon and nitrogen combination in the medium for enzyme activities was beef exact and wheat leave detected 7 d after culturing the fungus.

Key words: take-all pathogen of wheat; *Gaeum annanycyes gram inis* var. *tritici*; β 1, 3-glucanases; M S medium; carbon source; nitrogen source

小麦全蚀病是由禾顶囊壳小麦变种(*Gaeum annanycyes gram inis* (Sacc.) von Arx and Olivier var. *tritici* Walker) 侵染小麦引起的重要根茎部病害, 主要引起黑根、分蘖减少、枯白穗等症状, 造成严重的产量和经济损失。由于该病在世界小麦种植区广泛分布, 且在小麦生育期均可危害, 加之没有免疫和高抗品种, 使得病害防治更加困难。国内外植物病理工作者在小麦全蚀病的化学防治、生物防治、致病机理等方面已经进行了大量的研究工作^[1-8], 基本明确了小麦全蚀病菌侵染过程的细胞学行为以及细胞壁降解酶在致病过程中的作用^[5-8], 特别是对病菌分泌的纤维素酶、半纤维素酶、果胶酶在侵染、致病过程中的作用进行了研究, 但目前关于小麦全蚀病菌分泌胞外 β 1, 3-葡聚糖酶及其与致病过程的关系研究报道甚少。

本课题组在对受小麦全蚀病菌侵染的根组织进行细胞化学研究时证实, 小麦根组织受侵染后产生的防御反应结构——“木质管(lignin-tube)”中含有大量的 β 1, 3-葡聚糖^[9-10], 据此推测小麦全蚀病菌在穿透木质管的过程中可能会分泌胞外 β 1, 3-葡聚糖酶, 以降解 β 1, 3-葡聚糖, 达到穿透木质管而入侵、扩展和定殖的目的。另外, 采用液体发酵方法培养小麦全蚀病菌, 用生物化学方法已经证实培养滤液中含有病菌分泌的胞外 β 1, 3-葡聚糖酶^[11], 但由于该酶产量少、活性低, 分离纯化困难, 所以目前仍未明确其酶学性质、结构及其功能。因此, 本研究在前期工作的基础上, 筛选有利于产酶的培养基, 为进一步研究小麦全蚀病菌胞外 β 1, 3-葡聚糖酶的性质、结构, 揭示其在病菌侵染、致病过程中的作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌种 禾顶囊壳小麦变种 *Gaeum annanycyes gram inis* var. *tritici* (Ggt)9826 菌株, 由西北农林科技大学植物病理研究所提供。病菌按常规方法在 PDA 平板培养基上繁殖、保存备用。

1.1.2 基础培养基 液体发酵产酶培养基(改进的

M S 液体培养基), 参考 Van Hoof 等^[12] 和王旭丽等^[11] 的方法。

1.1.3 供试碳源 将 1.1.2 改进的 M S 液体培养基中的麸皮分别改为收获后晒干的小麦茎秆、叶片及玉米根系、茎秆和叶片, 用量为 1%。

1.1.4 供试氮源 将 1.1.2 改进的 M S 液体培养基中的酵母浸膏分别改为牛肉膏、蛋白胨、硝酸铵、氯化铵, 用量为 1%。

1.1.5 化学试剂及来源 昆布多糖(Laminarin)为 Sigma 公司产品, 其他试剂均为国产。

1.2 方法

1.2.1 培养方法 将在 PDA 平板培养基上黑暗培养(26 $^{\circ}$ C)3~5 d 的小麦全蚀病菌, 用打孔器取直径 5 mm 的菌饼 4 块, 放入装有 50 mL 液体培养基的 150 mL 三角瓶中, 设 3 个重复, 置恒温摇床振荡培养(26 $^{\circ}$ C、150 r/min, 黑暗)。并根据不同碳、氮源设为不同处理。

1.2.2 酶液的提取 分别在振荡培养 7, 14, 21 d 时, 于无菌条件下吸取培养液, 4 $^{\circ}$ C、10 000 r/min 离心 5 min, 取上清液备用。

1.2.3 酶活性的测定 酶活性的测定采用 3, 5-二硝基水杨酸(DNS)比色法。取 0.05 mol/L pH 5.5 的乙酸钠-乙酸缓冲液配制的 0.1% 底物昆布多糖 100 μ L, 37 $^{\circ}$ C 水浴预热 5 min 后加入 100 μ L 酶液, 混匀, 置 37 $^{\circ}$ C 保温 30 min。采用 DNS 法测定生成的还原性糖^[11]。

一个酶活力单位(U)定义为: 37 $^{\circ}$ C, 每 min 分解底物昆布多糖产生 1 μ mol 葡萄糖的酶量。

2 结果与分析

2.1 以小麦组织为碳源对产酶的影响

由图 1 可以看出, 分别以小麦茎秆、叶片为碳源与牛肉膏、蛋白胨、硝酸铵、氯化铵组合, 培养滤液中小麦全蚀病菌胞外 β 1, 3-葡聚糖酶活性在不同培养时间、不同组合之间明显不同。从图 1 a 可以看出, 以小麦茎秆与牛肉膏组合, 培养滤液中 β 1, 3-葡聚糖酶活性在病菌培养 7 d 时较高, 为 0.062 U/mL, 明显高于其他组合, 14 d 时酶活性略有下降(0.06 U/

mL),但仍然高于其他组合,到21 d时酶活性下降至 0.051 U/mL ,较第7天下降了17.7%。以小麦茎秆与蛋白胨组合,培养滤液中 β 1,3-葡聚糖酶活性在病菌培养过程中呈明显上升趋势,7 d时酶活性较低,只有 0.027 U/mL ,14 d时酶活性为 0.044 U/

mL,较第7天时增加了63.0%,到21 d时酶活性继续上升,较第7天时增加了122.2%,达到 0.06 U/mL 。而以小麦茎秆与硝酸铵和氯化铵的组合,培养滤液中 β 1,3-葡聚糖酶活性在整个病菌培养过程中均较低,且酶活性变化不大。

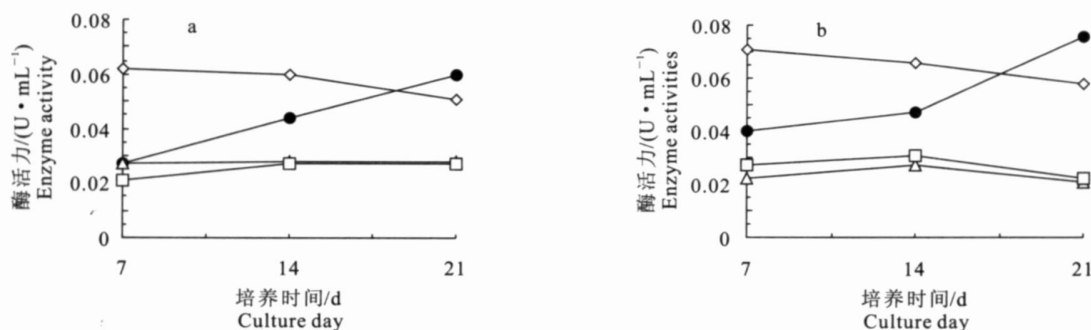


图1 以小麦组织为碳源时不同氮源对小麦全蚀病菌产生胞外 β 1,3-葡聚糖酶的影响

- - - 牛肉膏; - • - 蛋白胨; - - - 硝酸铵; - □ - 氯化铵; a 小麦茎秆; b 小麦叶片

Fig. 1 Extracellular β 1,3-glucanase activity detected in the different media of wheat stalk as the single

Carbon source and beef extract, peptone, NH_4NO_3 and NH_4Cl as nitrogen source, respectively, in the different incubation time

- - - Beef extract; - • - Peptone; - - - ammonium nitrate; - □ - Ammonium chloride; a Wheat stalk; b Wheat leaves

由图1 b可以看出,小麦叶片与牛肉膏组合,培养滤液中 β 1,3-葡聚糖酶活性在病菌培养过程中呈逐渐下降趋势;以小麦叶片与蛋白胨组合,培养滤液中 β 1,3-葡聚糖酶活性在病菌培养过程中呈明显上升趋势;以小麦叶片为碳源与牛肉膏、蛋白胨组合时,培养滤液中 β 1,3-葡聚糖酶活性在病菌培养过程中均高于小麦茎秆与牛肉膏、蛋白胨组合。以小麦叶片为碳源与硝酸铵和氯化铵组合,培养滤液中 β 1,3-葡聚糖酶活性在整个病菌培养阶段均较低,且酶活性变化不大。从图1还可以看出,以硝酸铵和氯化铵为氮源时, β 1,3-葡聚糖酶活性在病菌培养期间明显低于以牛肉膏和蛋白胨为氮源,说明有机氮较无机氮有利于小麦全蚀病菌胞外 β 1,3-葡聚糖酶的产生。

2.2 以玉米组织为碳源对产酶的影响

由图2可以看出,以玉米茎秆、叶片及根系分别为碳源,与牛肉膏、蛋白胨、硝酸铵、氯化铵组合,小麦全蚀病菌胞外 β 1,3-葡聚糖酶活性在小麦全蚀病菌不同培养时间、不同组合之间明显不同。从图2 a可以看出,以玉米茎秆与牛肉膏组合,培养滤液中 β 1,3-葡聚糖酶活性在病菌培养过程中呈逐渐下降趋势,在7 d时最高,为 0.057 U/mL ,14 d之后酶活性明显下降,21 d时酶活性下降至 0.03 U/mL ,较第7

天时下降了47.4%,且明显低于其他组合;而以蛋白胨为氮源的组合酶活性呈现升高趋势,7 d时酶活性为 0.037 U/mL ,14 d时达到 0.049 U/mL ,较第7天时升高了13.3%,21 d时酶活性上升至 0.075 U/mL ,明显高于其他组合;以硝酸铵及氯化铵为氮源的组合酶活性均较低($0.021\sim 0.027\text{ U/mL}$),在病菌培养过程中酶活性虽有上升,但幅度较小。

以玉米叶片为碳源与不同氮源组合,在不同培养时间 β 1,3-葡聚糖酶活性变化趋势以及酶活性水平与以玉米茎秆为碳源时相似(图2 b)。以蛋白胨为氮源,21 d时以玉米叶片为碳源的酶活性比以玉米茎秆为碳源的低10.7%;以硝酸铵为氮源,21 d时以玉米叶片为碳源的酶活性比以玉米茎秆为碳源的高11.1%。

从图2 c可以看出,以玉米根系为碳源与牛肉膏组合, β 1,3-葡聚糖酶活性水平在不同时间与以玉米茎秆、叶片为碳源的相似,酶活性在14 d时比7 d时略高,之后明显下降;以蛋白胨为氮源的组合,酶活性水平在不同时间均较以玉米茎秆、叶片为碳源的组合低,在21 d时相差更明显,分别比二者低35.8%和42.7%,且酶活性在培养期间增幅较小,14和21 d的酶活性分别较7 d时增长12.9%和38.7%;以硝酸铵及氯化铵为氮源的组合,酶活性水平均比以玉米茎秆、叶片为碳源的组合低,酶活性变化趋势

也与二者不同。

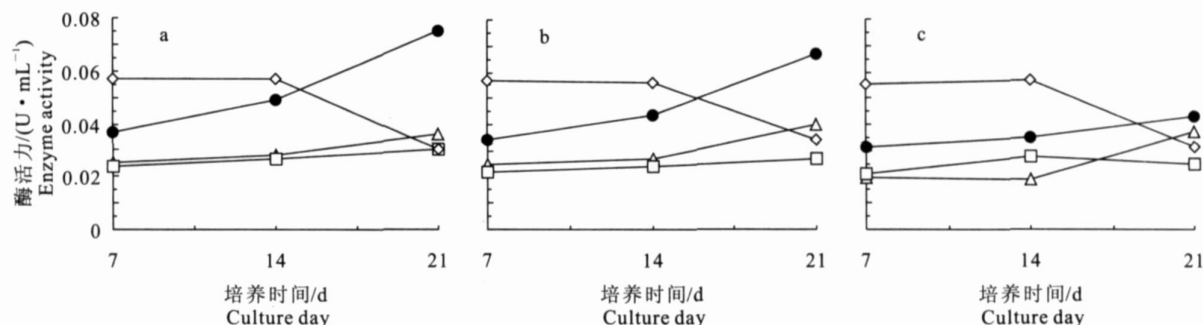


图2 以玉米组织为碳源时不同氮源对小麦全蚀病菌产生胞外 β 1, 3-葡聚糖酶的影响

- - - 牛肉膏; - • - 蛋白胨; - - - 硝酸铵; - □ - 氯化铵; a 玉米茎秆; b 玉米叶片; c 玉米根系

Fig 2 Extracellular β 1, 3-glucanase activity detected in the different media of maize stalk as the single

Carbon source and beef extract, peptone, NH_4NO_3 and NH_4Cl as nitrogen source, respectively, in the different incubation time

- - - Beef extract; - • - Peptone; - - - ammonium nitrate; - □ - Ammonium chloride; a Maize stalk; b Maize leaves; c Maize roots

从图2还可以看出,以玉米茎秆、叶片及根系为碳源,有机氮明显较无机氮有利于小麦全蚀病菌胞外 β 1, 3-葡聚糖酶的产生;以牛肉膏为氮源,在病菌培养早期酶活性较高;以蛋白胨为氮源,在病菌培养后期酶活性较高;以硝酸铵和氯化铵为碳源,无论何种供试氮源均不利于病菌产酶。

综合以上结果可以看出,以小麦茎秆、叶片及玉米茎秆、叶片和根系为碳源与不同氮源组合, β 1, 3-葡聚糖酶活性受碳源的影响较小而受氮源的影响较大,有机氮明显比无机氮有利。从培养时间来看,以牛肉膏为氮源时在培养初期即可获得较高的酶活性,较王旭丽等^[11]报道的培养时间缩短了2倍,更有利于酶的分离纯化。

3 讨论

小麦全蚀病菌侵染过程的细胞化学研究结果显示,病菌的侵染过程可能涉及 β 1, 3-葡聚糖酶^[9-10],该病菌在液体培养过程中也能够产生胞外 β 1, 3-葡聚糖酶^[11]。因此,为了分离纯化出足量的小麦全蚀病菌胞外 β 1, 3-葡聚糖酶,明确该酶在病菌侵染过程中的作用,以及为抗病基因工程研究提供物质基础,首先应筛选出产酶培养基和利于小麦全蚀病菌分泌胞外 β 1, 3-葡聚糖酶的条件。

利于不同植物病原真菌生长和产生胞外 β 1, 3-葡聚糖酶的碳、氮源不同,如大麦葡聚糖或茯苓多糖有利于里氏木霉菌(*Trichoderma reesei*)产生胞外 β 1, 3-葡聚糖酶,但在以葡萄糖为碳源的培养基中产酶量较少^[13];燕麦麸皮和酵母浸膏利于炭色旋孢腔菌(*Cochliobolus carbonum*)产酶,少量蔗糖则抑制其产

酶^[12];而Santos等^[14]利用以葡萄糖和硝酸钠分别为碳、氮源的查氏(Czapek)培养基培养意大利青霉菌,使其产生胞外 β 1, 3-葡聚糖酶,但同时研究发现培养基中过量的葡萄糖会抑制意大利青霉菌产酶,王旭丽等^[11]在研究小麦全蚀病菌产酶条件筛选时也发现,葡萄糖和蔗糖会抑制病菌分泌胞外 β 1, 3-葡聚糖酶,以小麦麸皮和牛肉膏分别为碳、氮源的组合比其他组合更利于产酶。本研究发现,供试各组合中以牛肉膏为氮源,小麦叶片为碳源的组合最好,在病菌培养早期 β 1, 3-葡聚糖酶活性就达到较高水平。这些研究结果对前期的结果是有很好的补充和完善。

[参考文献]

- [1] 陈怀古,王裕中,陈厚德,等.小麦全蚀病药剂防治技术与应用研究[J].江苏农业科学,1997(1):38-41.
- [2] 王美南,商鸿生.华山新麦草对小麦全蚀病的抗病性研究[J].西北农林科技大学学报:自然科学版,2000,28(6):49-71.
- [3] Garder P A, Angus J F, Pitson G D, et al. A comparison of six methods to control take-all in wheat[J]. Australian Journal of Agricultural Research, 1998, 49(8): 1225-1240.
- [4] Cook R J. Problems and progress in the biological control of wheat take-all[J]. Plant Path, 1994, 43: 429-437.
- [5] Dori S, Hershenhorn J, Solel Z, et al. Characterization of an endopolygalacturonase associated with take-all disease of wheat[J]. Physiological and Molecular Plant Pathology, 1992, 40(3): 203-210.
- [6] Dori S, Solel Z, Kashman Y, et al. Cell wall-degrading enzymes produced by *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* in vitro and in vivo [J]. Physiological and Molecular Plant Pathology, 1995, 46(3): 189-198.

- [7] Weste G. Extra-cellular enzyme production by various isolates of *Ophiobolus graminis* Sacc[J]. *Phytopath Z*, 1970a, 52: 204-206
- [8] Weste G. Extra-cellular enzyme production by various isolates of *Ophiobolus graminis* and *O. graminis* var. *avenae* II. Enzymes produced within the host tissue[J]. *Phytopath Z*, 1970b, 67: 327-336
- [9] Kang Z S, Huang L L, Buchenauer H. Cytochemistry of cell wall component alterations in wheat roots infected by *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*[J]. *J Plant Dis Protec*, 2000, 107(4): 337-351
- [10] Huang L L, Kang Z S, Buchenauer H. Comparison of infection of wheat roots by *Phialophora graminicola* and *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* by ultrastructural and cytochemical studies[J]. *J Plant Dis Protec*, 2001, 108(6): 593-607
- [11] 王旭丽, 黄丽丽, 康振生, 等. 小麦全蚀病菌胞外 β 1, 3-葡聚糖酶的产生和部分特性的研究[J]. *菌物系统*, 2003, 22(4): 628-633
- [12] Van Hoof A, Leykam J, Schaeffer H J, et al. A single β 1, 3-glucanase secreted by the maize pathogen *Cochliobolus carbonum* acts by an exolytic mechanism[J]. *Physiol Molec Path*, 1991, 39: 259-267
- [13] Bamforth C W. The adaptability, purification, and properties of exo- β 1, 3-glucanase from the fungus *Trichoderma reesei*[J]. *Biochem J*, 1980, 191: 863-866
- [14] Santos T, Villanueva J R, Nombela C. Production and catabolite repression of *Penicillium italicum* beta-glucanases[J]. *J Bacteriol*, 1977, 129(1): 52-58

(上接第109页)

[参考文献]

- [1] 张国海, 郭香凤, 史国安, 等. 鲜食葡萄采后贮藏研究进展[J]. *河南科技大学学报: 农学版*, 2003, 23(3): 31-34
- [2] 中国农业年鉴编辑委员会. *中国农业年鉴*[M]. 北京: 中国农业出版社, 2003
- [3] 潘春云. 葡萄贮藏保鲜技术研究[J]. *葡萄栽培与酿酒*, 1992(3): 32-34
- [4] 饶景萍, 任小林. *园艺产品贮运学*[M]. 西安: 陕西人民出版社, 2003: 226
- [5] 修德任, 周延文. 红地球葡萄贮藏保鲜技术[J]. *保鲜与加工*, 2002(5): 24-26
- [6] 贺普超. *葡萄学*[M]. 北京: 中国农业出版社, 1999: 217
- [7] 王如福, 吴彩娥, 范三红. 采后GA₃和2, 4-D处理对葡萄贮藏效果的影响[J]. *山西农业大学学报*, 2000, 20(3): 263-264
- [8] 欧阳寿如. *葡萄的品种及其研究*[M]. 太原: 山西人民出版社, 1980: 25
- [9] 薛应龙. *植物生理学实验手册*[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1985: 403-410
- [10] 于大永. 无核白葡萄浆果耐拉力、耐压力的研究[D]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学, 2003: 30-31
- [11] 吴德玲, 修德任, 张文恩, 等. 葡萄浆果耐压力、浆果和果柄间耐拉力与贮藏性关系的研究初报[J]. *葡萄科技*, 1981, 17(2): 1-5
- [12] 刘春香, 何启伟, 于占东. 黄瓜质地与组织结构、纤维素及果胶含量的关系[J]. *中国蔬菜*, 2003(5): 3-7