

# *Wallemia sebi* 的 RNase 活性和抗植物病原真菌活性的初步研究

郭永霞<sup>1</sup> 赵爽<sup>1</sup> 刘庆洪<sup>1</sup> 王贺祥<sup>1</sup> 王有智<sup>2\*</sup>

(中国农业大学微生物系 北京 100094)<sup>1</sup> (中国科学院微生物研究所 北京 100080)<sup>2</sup>

**摘要:** *Wallemia* 是中国的一新记录属, 该属只有 *Wallemia sebi* 一个种。 *Wallemia sebi* 在 PDA 平板上对植物病原真菌尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporum*) 和大丽花轮枝孢 (*Verticillium dahliae*) 有强抑制作用。 YG 培养基上培养的 *Wallemia sebi* 菌丝体有 RNase 活性, 在 0.1 mol/L pH7.5 的磷酸缓冲液中其活性最高, 达 322.00 U/mg。

**关键词:** *Wallemia sebi*, 植物病原真菌, RNase

**中图分类号:** Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 02-0030-04

## Preliminary Investigation of RNase Activity and Antifungal Activity of *Wallemia sebi*

GUO Yong-Xia<sup>1</sup> ZHAO Shuang<sup>1</sup> LIU Qing-Hong<sup>1</sup> WANG He-Xiang<sup>1</sup> WANG You-Zhi<sup>2\*</sup>

(Department of Microbiology, China Agricultural University, Beijing 100094)<sup>1</sup>

(Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)<sup>2</sup>

**Abstract:** This paper reported *Wallemia*, a new record genus of China. *Wallemia* is a monotypic genus represented by *W. sebi*. *Wallemia sebi* possessed strong inhibitory activity on phytopathogenic fungi, *Fusarium oxysporum* and *Verticillium dahliae*. The mycelia of *Wallemia sebi* cultivated on the YG medium exhibited high RNase activity, it was 322.00 U/mg in 0.1 mol/L phosphate buffer, pH7.5.

**Key words:** *Wallemia sebi*, Phytopathogenic fungi, RNase

*Wallemia* Johan-Olsen 是中国的一新记录属, 该属只有 *Wallemia sebi* (Fr.) v. Arx 一个种<sup>[1]</sup>。 *Wallemia sebi* 是一种世界上广泛分布的耐高渗透压真菌<sup>[2]</sup>, 它在土壤、干草、织物、腌鱼、蛋糕、果酱、腌鱼、布丁、小麦、玉米和花生都能存活, 其主要借助风力进行孢子传播<sup>[3]</sup>。它是一种已知的过敏原, 可引起干热和哮喘<sup>[4]</sup>。其产生的毒素有 walleminol 和 wallemione<sup>[5,6]</sup>。 *Wallemia sebi* 虽然在很多具有高渗透压的食品上都能存活<sup>[7]</sup>, 但发现的不多, Pitt 和 Hocking 将其归因于分离技术的问题。 *Wallemia sebi* 在一般高水活度 ( $a_w$ ) 真菌培养基上生长缓慢, 但在高渗透压的真菌培养基上生长良好, 在 DG18 和 MEA 培养基上形成小的棕褐色突起菌落<sup>[7]</sup>, 其在麦芽汁琼脂培养基上偶尔也能生长。本文首次在中国报道了该菌, 并对其 RNase 活性和抗植物病原真菌活性进行了初步研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**菌种及其来源:** *Wallemia sebi* 从土壤中分离得到, 中国科学院微生物研究所菌种保

\* 通讯作者 Tel: 86-10-62537794, E-mail: yzwang@im.ac.cn

收稿日期: 2005-05-17, 修回日期: 2005-06-30

藏中心保藏。两株植物病原真菌为：引起棉花枯萎病的尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporum*) 以及引起棉花黄萎病的大丽花轮枝孢 (*Verticillium dahliae*)，均由中国农业大学刘西莉博士提供。

## 1.2 方法

1.2.1 菌种培养：分别采用下列 6 种培养基，25℃ 静止培养 4 周，收集菌丝体。

(1) PD 培养基：马铃薯（去皮）200g，葡萄糖 20g，蒸馏水定容至 1,000mL，pH 自然， $1 \times 10^5$  Pa 灭菌 20min。

(2) YG 培养基：酵母粉 10.0g，葡萄糖 50.0g，磷酸氢二钾 4.0g，加蒸馏水至 1,000mL，pH6.2， $1 \times 10^5$  Pa 灭菌 20min。

(3) DG18：葡萄糖 10g，蛋白胨 5g，磷酸二氢钾 1.0g，硫酸镁 0.5g，100℃ 煮沸 30min，甘油 220 g，1mL 0.2% 2, 6-二氨-4-硝基苯胺，加蒸馏水至 1,000mL， $1 \times 10^5$  Pa 灭菌 20min。

(4) 麦粒培养基：麦粒 500g，100℃ 煮沸 30min，然后加 30 g 葡萄糖，分装 5 瓶， $1 \times 10^5$  Pa 灭菌 30min。

(5) 谷子培养基：谷子 500g，100℃ 煮沸 30min，然后加 30 g 葡萄糖，分装 5 瓶， $1 \times 10^5$  Pa 灭菌 30min。

(6) 虫草培养基：大米 600 g，蚕蛹 20 g，葡萄糖 30g，蛋清 50 g，硫酸镁 0.8 g，磷酸二氢钾 1 g，VB<sub>1</sub> 50mg，自来水定容至 1,000mL， $1 \times 10^5$  Pa 灭菌 30min。

1.2.2 RNase 活性测定：参照 Kunitz 的方法稍加修改测定<sup>[8]</sup>。反应体系为 10μL tRNA (10mg/mL)，5μL 酶液和 135μL 0.1 mol/L pH5.0 醋酸缓冲液或 0.1 mol/L pH7.5 磷酸缓冲液，37℃ 反应 15min，加 350μL 3.7% 高氯酸终止反应，15,000 r/min 离心 5min，上清液在 260nm 比色。酶活单位 (U) 定义为：在特定条件下每分钟每毫升所产生的核苷酸在 260nm 光吸收值每增加一个单位所需酶的量。

1.2.3 抑菌实验：先将 *Wallemia sebi* 接种到 PDA 平板上，25℃ 培养 7d，将已活化的棉花枯萎病菌和大丽花轮枝孢菌块分别接种到已培养 *Wallemia sebi* 7d 的平板上（距离 3cm），25℃ 继续培养 3~5d，观察抑菌效果。

## 2 结果与分析

### 2.1 *Wallemia sebi* 的形态特征

菌落在 PDA 培养基上生长缓慢，25℃ 培养 7d 直径约 10 mm，形状通常不规则，呈不同程度的褐色。分生孢子梗简单，长度变化较大，宽 1μm~3μm；产孢细胞分隔断裂，形成节孢子；分生孢子球形或近球形，浅褐色，具小疣而显粗糙，成链，2μm~3 μm，见图 1。

### 2.2 抗真菌作用

从图 2 可以看出在靠近 *Wallemia sebi* 一侧，大丽花轮枝孢 (*Verticillium dahliae*) (A) 和尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporum*) (B) 的生长受到明显的抑制。

### 2.3 RNase 活性

结果 (表 1) 表明 *Wallemia sebi* 菌丝 RNase 活性在不同培养基上差异很大，其中 YG 培养基培养的 *Wallemia sebi* 菌丝 RNase 活性明显高于其他培养基培养的 *Wallemia sebi* 菌丝 RNase 活性，在 pH7.5 的磷酸缓冲液反应体系中其 RNase 活性高于 pH5.0 的醋

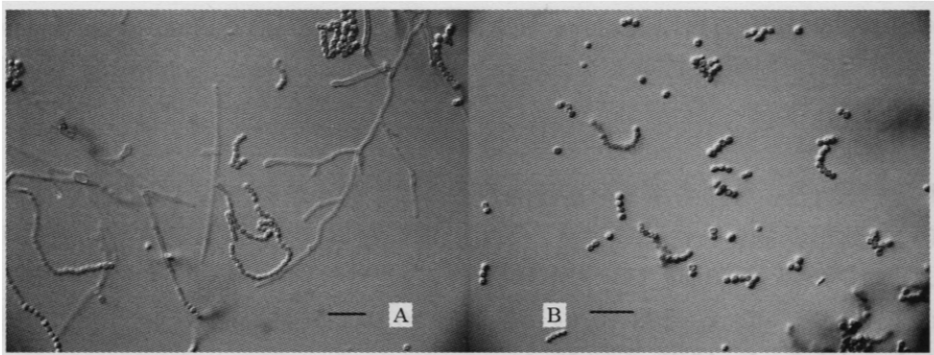


图 1 *Wallemia sebi* 形态特征

A 分生孢子梗, B 分生孢子, 标尺 = 20  $\mu\text{m}$

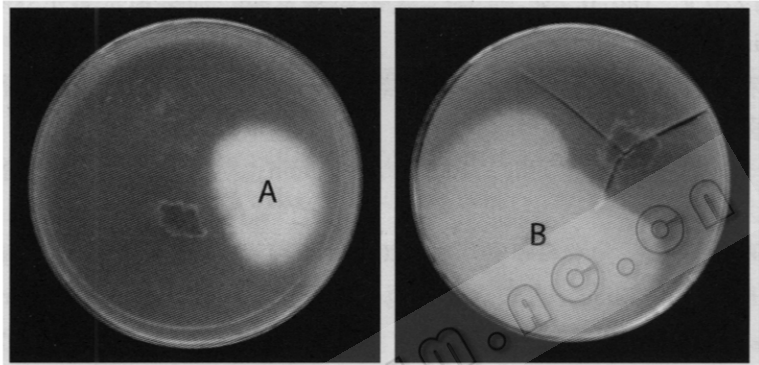


图 2 *Wallemia sebi* 对 *Verticillium dahliae* (A) 和 *Fusarium oxysporum* (B) 的抑制作用

酸缓冲液反应体系中的 RNase, 其活性为 322.0U/mg。

表 1 不同培养基培养 *Wallemia sebi* 菌丝的 RNase 活性

培养基	RNase 比活性 (U/mg) (pH7.5)	RNase 比活性 (U/mg) (pH5.4)
YG 培养基	322.0	212.8
PD 培养基	93.6	34.0
DG18 培养基	30.0	9.6
麦粒培养基	37.2	35.2
谷子培养基	28.4	18.0
蛹虫草培养基	21.6	39.2

3 讨论

*Wallemia sebi* 对大丽花轮枝孢 (*Verticillium dahliae*) 和尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporum*) 有很强的抑制作用, 对其抗菌物质进一步分离纯化, 如果是大分子的抗真菌蛋白, 可以克隆其基因并将其导入作物来达到抗病的目的; 如果是小分子的抗生素类物质, 对其安全性评价后可以直接作为农用抗生素来防治作物病害。

*Wallemia sebi* 是一种嗜干菌, 其最佳生长的水活度 ( $a_w$ ) 为 0.65 ~ 0.75, 温度为 25℃。*Wallemia sebi* 在 YG、DG18 和麦粒 3 种培养基上生长良好, 但只有在 YG 培养基上生长的菌丝具有较高的 RNase 活性, 这主要是因为 RNase 表达具有特异性, 控制 RNase 的基因在不同的境遇时有选择地表达, 其表达量随环境条件的变化而变化较大。

根据反应的最适 pH 不同, RNase 分为酸性核糖核酸酶 (Acid RNase, ACR) 和碱

性核糖核酸酶 (Alkaline RNase, AKR)。AKR 主要存在于细胞的溶酶体中, 水解所吞噬的异物中的 RNA; AKR 存在于胞液中, 水解胞液中的 RNA。*Wallemia sebi* 的 RNase 活性在 pH5 时要低于 pH7.5 时的活性, 说明其是一种碱性 RNase。

核糖核酸酶 (ribonuclease, RNase) 是一类具有特异性切割 RNA 功能的酶, 对于调节 RNA 的代谢、基因的表达和蛋白质的合成起到重要作用, 因此又称为“看家酶”。近年来, 越来越多的研究表明, RNase 不仅具有消化酶的功能, 而且还可作为一种有选择性的细胞毒素, 具有抗病毒和抗肿瘤等特殊生物学功能<sup>[9,10]</sup>, 将 *Wallemia sebi* RNase 分离纯化并对其生物学功能进行研究后, 希望其在疾病的诊断和治疗方面具有应用价值。

## 参 考 文 献

- [1] Kirk P M, Cannon P F, David J C, *et al.* Dictionary of the Fungi. CAB International, UK. 2001.
- [2] Pitt J I, Hocking A D, Xerophiles. In: Fungi and Food Spoilage. Blackie Academic and Professional, London, 1997. 417 ~ 438.
- [3] Hanhela R, Louhelainen K, Pasanen A L. Scan J Work Environ Health, 1995, **21**: 223 ~ 238.
- [4] Sakamoto T, Urisu A, Yamada M, *et al.* Int Arch Allergy Appl Immunol, 1989, **90**: 368 ~ 372.
- [5] Wood, G M, Mann, P J, Lewis, D F, *et al.* Food Addit Contam, 1990, **7**: 69 ~ 77.
- [6] Frank, M, Kingston E, Jeffery J C, *et al.* Tetrahedron Letters, 1999, **40**: 133 ~ 136.
- [7] Hocking, A D, Pitt J I. Appl Environ Microbiol, 1980, **39**: 488 ~ 492.
- [8] Kunitz M. J Bio Chem, 1946, **164**: 563 ~ 568.
- [9] Irie M, Nitta K, Nonaka T. Cell Mol Life Sci, 1998, **54**: 775 ~ 784.
- [10] Michaelis M, Matousek J, Vogel J U, *et al.* Anticancer Drug, 2000, **11**: 369 ~ 371.