

链霉菌 S01 菌株几丁质酶对植物病原真菌的拮抗作用

杨文博 冯 波* 佟树敏

(南开大学微生物学系 天津 300071)

摘 要 纯化后的链霉菌 S01 菌株几丁质酶用环柱法在 PDA 平板上对杨树腐烂病菌 (*Valsa sordida*)、葡萄孢菌 (*Botrytis* sp. AS3.2616)、黄瓜黑腥病菌 (*Cladosporium cucumerinum*)、辣椒疫病菌 (*Phytophthora capsici*)、棉花黄萎病菌 (*Verticillium albo-atrum*)、立枯丝核菌 (*Rhizoctonia solani*) 等植物病原真菌及产黄青霉 (*Penicillium chrysogenum*)、啤酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 的生长具有明显的抑制作用。在 6 株植物病原真菌的液体培养物中加入几丁质酶后, 菌丝出现扭曲变形、细胞质聚集、外溢等异常现象。在高渗缓冲液中, 经几丁质酶处理后, 啤酒酵母、葡萄孢菌和产黄青霉的细胞壁受到破坏, 释放出了原生质体。

关键词 链霉菌 S01 菌株, 几丁质酶, 植物病原真菌, 拮抗作用

植物病原真菌的感染是引起植物病害造成作物减产的重要原因。目前对植物病害的防治均采用化学农药杀灭病原菌, 而化学农药对人畜的毒副作用和残留问题至今仍难以有效地解决。自从 1991 年 Toyoda^[1] 发现灰色链霉菌 (*Streptomyces griseus*) 产生的几丁质酶经纯化后对小麦白粉菌 (*Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*) 的吸器具有完全消解作用后, 产几丁质酶的微生物及其离体几丁质酶对真菌生长抑制作用的研究已引起人们的重视。

本文观察了链霉菌 S01 菌株几丁质酶对一些病原真菌细胞壁的破坏现象, 从而为几丁质酶作为无毒、无公害生物防治剂的应用提供了依据。

1 材料与方法

1.1 菌种

1.1.1 产酶菌株及几丁质酶: 链霉菌 S01 菌株 (*Streptomyces* sp. S01) 系由本室分离并保藏。S01 菌株产酶发酵后, 发酵液经硫酸铵盐析、DEAE 纤维素和 Sephadex G-100 柱层析后制备得到电泳纯几丁质酶^[2]。酶活力测定参照 Antonio 和 Masaru^[3,4] 的方法进行。

1.1.2 指示菌株: 由天津市农科院黄瓜研究所和本系真菌学教研室提供 (表 1)。

1.2 培养基

PDA 培养基和麦芽汁培养基^[5]。

1.3 试剂

除 DEAE 纤维素 (DE32, Whatman 产品) 和 Sephadex G-100 (瑞典进口分装) 外, 其它试剂均为国产分析纯。

1.4 指示菌的培养

1.4.1 斜面培养: 将指示菌接种 PDA 斜面 28℃ 培养 4d。啤酒酵母接种麦芽汁斜面 28℃ 培养 2d。

1.4.2 液体培养: 将指示菌接种 PDA 液体培养基中摇床振荡培养。

1.5 S01 菌几丁质酶对指示菌的平板抑菌实验

1.5.1 指示菌孢子 (或细胞) 悬液的制备: 在培养 4d 的指示菌斜面和培养 2d 的啤酒酵母斜面中加入 5ml 含吐温 80 (2~3 滴吐温 80 / 100ml) 的无菌水, 洗脱孢子或细胞, 使悬液中的孢子数或细胞数控制在 10^6 个 / ml 左右。

* 现在工作单位: 天津师范大学生物系

1996-10-25 收稿

1.5.2 环柱测定法:取指示菌孢子悬液 0.1ml, 均匀涂布于 PDA 平板, 啤酒酵母涂布于麦芽汁平板, 将灭菌钢环($\phi 6 \times 10\text{mm}$)置于平板上, 每个钢环内注入纯化后的 S01 菌几丁质酶液 200 μl (酶活力 1200u / ml), 以无菌水为对照, 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 4d 后, 测量抑菌圈的直径(mm)。

1.5.3 S01 菌几丁质酶活力与抑菌活性的关系:几丁质酶(酶活力 1200u / ml)经 65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴分别处理 0、15、30、60min 后, 以啤酒酵母为指示菌, 在麦芽汁平板上用环柱法(酶的加样量同 1.5.2)检测剩余酶活力的抑菌活性。

1.6 S01 菌几丁质酶对指示菌菌丝生长的影响
在 28 $^{\circ}\text{C}$ 液体培养 32h 的指示菌摇瓶内加入纯化后的几丁质酶液至终浓度为 500u / ml, 以无菌水作为对照, 继续培养 16h, 镜检指示菌菌丝的形态变化。

1.7 S01 菌几丁质酶对指示菌细胞壁的破坏作用
将 28 $^{\circ}\text{C}$ 液体培养 30h 的指示菌培养物经 5000 \times g 离心 15min, 收集菌体, 用 pH6.0 的高渗缓冲液(0.1mol / L Na_2HPO_4 -0.05mol / L 柠檬酸-0.8mol / L NaCl)洗涤两次后, 置于用上述高渗缓冲液配制的 S01 菌几丁质酶液 10ml 中, 轻轻振荡使菌丝伸展开, 于 45 $^{\circ}\text{C}$ 静止保温 24h 后, 镜检观察。

2 结果

2.1 S01 菌几丁质酶对指示菌的平板抑菌效果

2.1.1 S01 菌几丁质酶的抑菌谱:表 1 的结果表明, S01 菌几丁质酶对 8 株指示菌均具有明显的抑制作用。特别对杨树腐烂病菌、葡萄孢菌、辣椒疫病菌、立枯丝核菌及黄瓜黑腥病菌表现出很强的抑菌活性, 抑菌圈清晰, 其直径均在 25mm 以上。

2.1.2 S01 菌几丁质酶活力与抑菌活性的相关性:由图 1 的结果可以看出, 经热处理后的酶液随着酶活力的下降, 抑菌圈直径缩小, 抑菌作用减弱。经 65 $^{\circ}\text{C}$ 热处理 30min 的酶液只保留了 55% 的酶活力, 抑菌圈直径仅为未处理酶液抑菌圈直径的 1 / 2。表明 S01 菌几丁质酶对啤酒酵母的抑菌作用与酶活力的高低呈正

相关性。

2.2 S01 菌几丁质酶对指示菌菌丝生长的影响
在指示菌液体培养时, 加入几丁质酶后, 菌

表1 链霉菌S01菌几丁质酶的抑菌谱

指示菌	抑菌圈直径(mm)
杨树腐烂病菌	41
葡萄孢菌	32
黄瓜黑腥病菌	25
产黄青霉	16
棉花黄萎病菌	18
立枯丝核菌	28
辣椒疫病菌	30
啤酒酵母	19

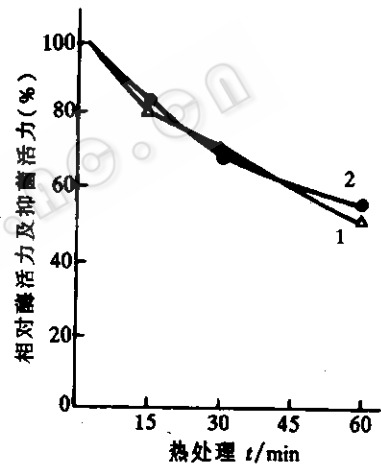


图1 S01菌几丁质酶活力与抑菌活性的相关性

1. 抑菌活力 2. 酶活力

丝在形态上发生了改变。镜检观察到: 杨树腐烂病菌、葡萄孢菌、棉花黄萎病菌和立枯丝核菌的菌丝扭曲变形, 特别是棉花黄萎病菌的菌丝变形更为严重, 菌丝细弱弯曲(见图 2)。细胞质也出现了异常现象, 杨树腐烂病菌、葡萄孢菌、黄瓜黑腥病菌的细胞质不均匀, 局部聚集。而且, 黄瓜黑腥病菌和辣椒疫病的部分菌丝细胞内容物流空, 菌丝成为空壳。这些现象表明, 由于几丁质酶的作用, 植物病原真菌的细胞受到严重破坏, 故而菌丝的生长被抑制。

2.3 S01 菌几丁质酶对真菌细胞壁的破坏作用
以细胞壁成分中含有几丁质的单细胞真菌——啤酒酵母和丝状真菌——葡萄孢菌、产黄青霉为指示菌, 在高渗缓冲液中, 用 S01 菌几丁

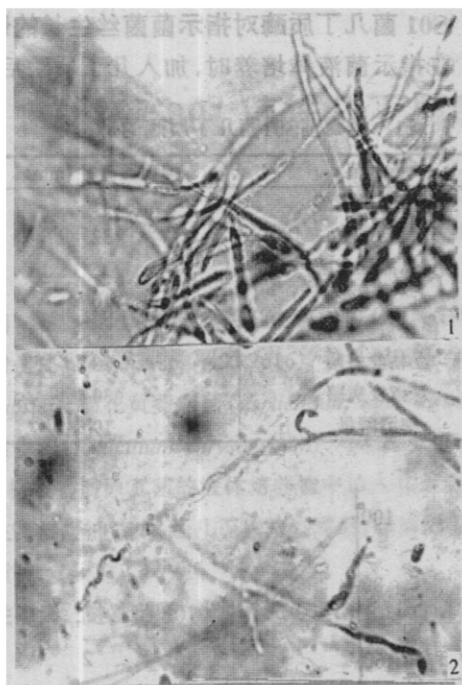


图2 S01菌几丁质酶对植物病原真菌生长的抑制

1. 未经几丁质酶处理的棉花黄萎病菌
2. 经几丁质酶处理的棉花黄萎病菌



图3 在高渗缓冲液中经几丁质酶处理后的葡萄孢菌

- a. 菌丝体
- b. 菌丝细胞壁受到破坏形成原生质体

质酶处理菌体,通过镜检观察到:正常的酵母细胞具有完好的细胞壁,受到几丁质酶作用后,有些细胞的细胞壁已受到破坏,部分缺失,而有些则完全缺失了细胞壁,形成了无壁的原生质体。由图3可以看到,由于S01菌几丁质酶对葡萄孢菌和产黄青霉(图略)细胞壁中几丁质的分解,使细胞壁出现空洞,从而导致细胞质外溢,在高渗缓冲溶液中形成了原生质体。

3 结论

通过本文的观察结果,S01菌几丁质酶对引起黄瓜、辣椒、棉花等经济作物严重病害的病原真菌,以啤酒酵母为代表的单细胞真菌和以产黄青霉为例的丝状真菌都表现出明显的抑菌作用,可以认为该酶对真菌的抑制具有一定的广谱性,酶活力影响抑菌效果,其抑制机理在于破坏了真菌的细胞壁,使细胞内容物外溢,而造成菌丝不能生长。

本文的结果为S01菌几丁质酶作为无公害的生物防治剂的研制提供了依据。但欲以微生物酶进行生物防治尚须进行剂型方面的选择和田间施用实验,此项工作正在进一步研究中。

参 考 文 献

- [1] Toyoda H. Plant Cell Reporter, 1991, 10: 217~220.
- [2] 杨文博,冯波,佟树敏. 微生物学通报, 1997, 24(2): 84~88.
- [3] Antonio R, Ulrich M, Roland B, et al. J Bacteriol, 1992, 174(11): 3450~3454.
- [4] Masaru M, Akira O, Tamo F et al. Agric Biol Chem, 1990, 54(4): 871~877.
- [5] 范秀荣,李广午,沈萍. 微生物学实验, 北京: 高等教育出版社, 1989, 262.

THE ANTAGONISM OF CHITINASE FROM *STREPTOMYCES* SP. S01 AGAINST PATHOGENIC FUNGI OF PLANT

Yang Wenbo Feng Bo Tong Shumin

(Department of Microbiology, Nankai University, Tianjin 300071)

Abstract Adopting the method of circular column on PDA plate, purified chitinase from

Strptomyces sp. S01 had distinctively inhibitive effect on *Penicillium chrysogenum*, *Saccharomyces cerevisiae* and such pathogenic fungi of plant as *Valsa sordida*, *Botrytis* sp. AS3.2616, *Cladosporium cucumerinum*, *phytophthora capsici*, *Verticillium albo-atrum* and *Rhizoctonia solani* etc. When chitinase was added into the liquid substrates of the above six strains of pathogenic fungi of plant, abnormal phenomena as twisting, deformation, conglomeration of protoplasm, and exosmosis happened on the hyphae. In high osmolarity solutions, treated with chitinase, the cell walls of *Sacchchromyces cerevisiae*, *Botrytis* sp. AS3.2616 and *Penicillium* were broken and protoplasts were set out.

Key words *Strptomyces* sp. S01 strain, Chitinase, Pathogenic fungi of plant, Antagonism