

烟草几丁酶 β -1.3-葡聚糖酶的抑菌作用*

刘爱新 董汉松 梁元存 李 华 张 博

(山东农业大学植保系 泰安 271018)

摘要 从三个方面对激发子诱导烟草几丁质酶, β -1.3-葡聚糖酶的病理功能进行了测定, 结果表明: ①两种酶对赤星菌的菌落生长有抑制作用并可抑制孢子萌发, 对其它被测病原物抑制作用非常微弱; ②两种酶对赤星菌等有明显的攻击作用, 直接攻击孢子的反应在 30min 内可见, 到 16h 前后引起孢子破裂; ③扫描电镜观察, 酶对寄主生活叶面上的赤星菌有同样攻击作用。

关键词 烟草赤星病, 激发子, 几丁质酶, β -1.3-葡聚糖酶, 病理功能

分类号 Q93—936 **文献标识码** A **文章编号** ISSN-0253-2654(1999)-01-15-17

INHIBITION OF TOBACCO CHITINASE AND β -1.3-GLUCANASE TO SOME PATHOGENIC FUNGI

Liu Aixin, Dong Hansong, Liang Yuancun, Li Hua, Zhang Bo

(*Depart. of Protection, Shandong Agricultural University, Taian 271018*)

Abstract The in vitro activity of the enzymes was observed by 3 methods. In plate inhibitory tests, Glu showed feeble inhibition to the fungal growth, but neither Cht nor Glu + Cht did. In microscopy, cotton blue staining observation proved that the earlier reactions of the enzymes to attack the fungal spores occurred within 30 min, and direct observation without staining demonstrated the sequent events followed, including the sporal partial plasmolysis in 1h, cytoplasmic swelling-out in 4~6h, intracellular component leakage in 6~8h, cell wall break in 8~12h, and complete collapse in 16~24h. The third method, scanning electronmicroscopy, suggested the similar events and process of the enzymes to attack the fungi artificially inoculated onto tobacco leaves. In all of the tests, Glu was more active than Cht, and Glu + Cht combination expressed no coordinated effect. Tobacco Glu also attacked pathogens of Northern and Southern corn leaf blight and wheat powdery mildew tested.

Key words Tobacco brown spot, elicitor, chitinase, β -1.3-glucanase, pathologic function

植物的诱导抗病性又称系统性获得抗性 (SAR, Systemic acquired resistance), 是寄主植物抵抗病原物侵染的一种主动反应, 涉及多种抗病防卫反应物质的诱导产生^[1]。其中的几丁质酶 (Cht) 和 β -1.3-葡聚糖酶 (Glu) 研究较多, 也深受重视。这是因为这两种酶的作用底物比较特殊, 分别是几丁质和 β -1.3-葡聚糖, 而这两种物质正是大多数植物病原真菌细胞

壁的主要成分。在烟草诱导抗赤星病研究中, 激发子诱导的 Glu 和 Cht 的积累及体外活性已得到证实 (另文报道), 本文作者拟就 Cht 和 Glu 体外对病原物的攻击作用做些研究和探讨。

国家自然科学基金资助项目

1997-12-15收稿, 1998-03-02修回

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 所用烟草品种为 NC89, 温室 22℃ ~ 28℃ 育苗至 6~8 叶期使用。

1.1.2 共选用 4 个菌株进行测试, 分别是烟草赤星菌 (*Alternaria alternata*), 玉米大斑病菌 (*Helminthosporium turcicum*), 玉米小斑病菌 (*Bipolaris maydis*) 和小麦白粉菌 (*Erysiphe graminis*)。

1.2 方法

1.2.1 激发子制备: 烟草赤星病菌弱毒株 TBA16 在 PDA 液体培养 (25℃) 2 周后, 收集菌丝体; 依文献 [2] 制备激发子。

1.2.2 诱导处理: 所得激发子以 1% 水溶液对烟苗下部第 3、4 片叶作诱导处理, 喷水同样处理为对照。

1.2.3 Glu 和 Cht 的提取: 激发子诱导后第 3 天, 取上部未经诱导叶片按 1g 叶片 2mL 缓冲液的量冰冻研磨, 10000g 离心 15min 上清液即为粗酶液。提取 Glu 用 0.05M pH5.0 醋酸缓冲液, Cht 用 0.05M pH6.4 磷酸缓冲液。提取液对 25% 聚乙二醇透析浓缩 (4℃), 再对相应缓冲液透析至原提取体积的 1/2, 备用。

1.2.4 PR 蛋白提取: 采用文献 [3] 的方法提取胞间 PR 蛋白, 然后对聚乙二醇浓缩至原体积 1/2, 备用。

1.2.5 平皿抑菌测定: 用通常方法在 PDA 平板上测定, Glu, Cht 和 PR 蛋白液 (Glu+Cht) 以打孔法注入, 每孔 0.5mL 酶液。

1.2.6 酶对孢子抑制和攻击作用测定: 将上述供试菌繁殖后配成 $10^6 \pm$ /ml 的孢子悬浮液, 分别与酶液按 1:1 等量混合, 置凹玻片中, 25℃ ~ 28℃ 下温育, 0.5、1、3、6、8、12、16、24、36h 分别取样, 两种方法作镜检: ①棉蓝染色法, 即用 2% 棉蓝按 1:1 的量加入待检样, 27℃ 下染 30min, 凉干, 灭菌水轻轻冲洗, 镜检; ②直接镜检法。

1.2.7 酶对寄主体上赤星菌的作用: 以 Glu, Cht 和 PR 蛋白制备菌株 TBA28 孢子悬浮液 (10^6 孢子 /mL), 立即悬滴接种在离体烟叶上表面, 每

叶 6 滴, 每滴 25 μ L, 25℃ 温箱保湿, 3、6、8、12、16、24、36h 取样按通常方法制成扫描电镜样本, 每处理每时间 4 片叶, 每叶从接种点取 6 块组织, 以 0.1% 蔗糖溶液制备的孢子悬浮液同样处理为对照。

2 结果

2.1 酶对菌落生长和孢子萌发的影响

平皿抑菌试验表明, 烟草 Glu 对赤星菌菌落生长有微弱的抑制作用, Glu + Cht 对赤星菌不显示生长抑制作用, Glu, Cht 和 Glu + Cht 对供试其它真菌均无作用。

直接镜检看到, Glu 对 4 种真菌均能较强烈地抑制孢子萌发, Cht 作用很微弱, Glu + Cht 不显示协同增效 (表 1)。

表1 烟草Glu和Cht对4种真菌孢子萌发的影响

菌 种	抑 制 情 况		
	Glu	Cht	Glu+Cht
<i>A. alternata</i> TBA28	++	-	++
<i>H. turcicum</i> 248-4	++	+	+
<i>B. maydis</i> 342	++	+	+
<i>E. graminis</i>	++	-	+

“+”表示作用微弱, “++”表示抑制作用较强, “-”表示无作用

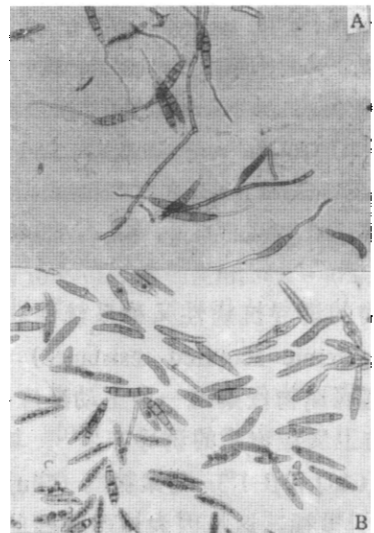


图1 酶对玉米大斑病菌孢子的攻击作用

A.CK, B.Glu处理12h

2 酶对真菌孢子的攻击作用

结果表明激发子诱导的烟草 Glu 不仅对赤星菌有较好的作用而且对非烟草上的病原真菌也有作用,而 Cht 表现作用微弱。以对玉米大斑菌的孢子作用为例,酶攻击孢子的作用在处理 30min 即可观察到,到 1h,孢子出现质壁分离现象,最终导致孢子壁破裂,内含物

泄露,细胞质着色。这些事件可在 8h 内出现,棉蓝染色对此有较好的反应。到孢子受损比较明显时,直接镜检可以清楚地看到。照片还显示原生质体因孢子壁受破坏而向外膨胀的情形(图 1)。

2.3 酶对寄主叶表病菌的作用

由图 2 可见,赤星菌接种到烟草叶表的侵入前阶段,加入的酶明显抑制孢子萌发并破坏了孢子壁,Glu 作用明显,Cht 单独作用很弱(照片未列),Glu 与 Cht 无协同增效作用。

3 讨论

本研究结果表明,激发子诱导的烟草 Glu 体外对赤星菌等病原真菌有较强的破坏作用,随作用时间延长破坏作用愈加明显。但 PR 蛋白(Glu+Cht)的效果并不比 Glu 单独作用时明显,这可能与 Glu、Cht 在植株体内分布有关,因为本研究中所用 PR 蛋白为胞间提取液,而 Glu、Cht 不仅存在于胞间,更多的是存在于液泡内,所用 PR 蛋白液并未包括 Glu 和 Cht 的全部。

另外,从平皿抑菌实验来看,两种酶平板抑菌只显示微弱效果,表明酶的抑制作用与菌体生长之间存在一种相对关系,由此我们可以推测,两种酶在植株体内的诱导积累如果在时间和空间上不能有效抵抗病原物的侵染,则它们在抗性诱导中的作用将是非常微弱的。

参 考 文 献

- [1] 陈三凤,李季伦. 几丁质酶研究历史和发展前景,微生物学通报,1993,20(3): 156~160.
- [2] Gurr S J, Mcpherson M J, Bowles D J, Molecular Plant Pathology, Oxford University Press, New York, 1992, 122~123.
- [3] Boller T, Metraux J P. Physiol. Mol. Plant Pathol., 1988, 33: 11~16.

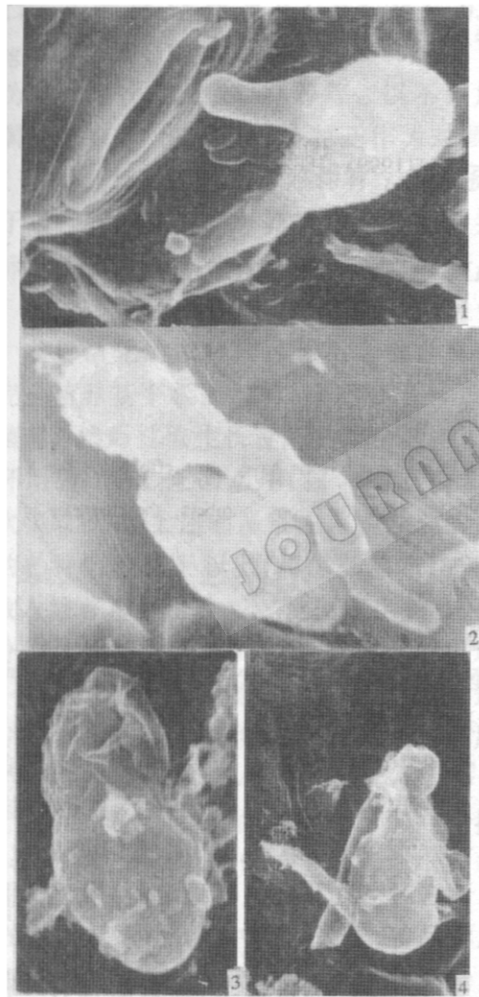


图2 酶对烟草叶表赤星病菌的作用

1. CK 8h(2000×), 2. CK 12h(2000×),
3. Glu. 8h(3000×), 4. Glu+Cht, 12h(1500×)