

影响重寄生真菌盾壳霉几丁质酶的活性因子*

胡燕梅¹ 李国庆^{2**} 杨 龙²

(¹武汉生物工程学院生物工程系 武汉 430415)

(²华中农业大学湖北省作物病害监测与安全控制重点实验室 武汉 430070)

摘 要 盾壳霉是油菜菌核病菌(核盘菌)的一种重寄生菌,为了探索几丁质酶在盾壳霉寄生核盘菌过程中的作用,本文研究了影响盾壳霉几丁质酶活性的因子.结果表明,盾壳霉几丁质酶促反应的最适温度为50℃,最适pH 8.0.当温度不高于50℃、pH在5.0~9.0范围内酶活性较稳定.一些金属离子,包括Mg²⁺、Fe²⁺、Ca²⁺、Ba²⁺和Mn²⁺等,对盾壳霉几丁质酶活性有促进作用,而另外一些金属离子,包括Zn²⁺和Cu²⁺,却对盾壳霉几丁质酶活性发挥有抑制作用.一定浓度的草酸(1~4 mmol L⁻¹)和硼酸(25~75 mmol L⁻¹)可显著提高盾壳霉几丁质酶活性.本文还就上述结果的生物学意义和潜在利用价值进行了讨论.图6 表1 参19

关键词 盾壳霉;核盘菌;重寄生;几丁质酶

CLC S476:Q949.3206

Characterization of Factors Affecting Activity of Chitinase Produced by Mycoparasite *Coniothyrium minitans**

HU Yanmei¹, LI Guoqing^{2**} & YANG Long²

(¹Department of Bioengineering, Wuhan Bioengineering Institute, Wuhan 430415, China)

(²Key Laboratory of Plant Pathology of Hubei Province, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract *Coniothyrium minitans* is an important mycoparasite of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, the causal agent of *Sclerotinia* stem rot of oilseed rape. In order to elucidate the role of chitinase produced by *C. minitans* in mycoparasitism on *S. sclerotiorum*, the factors affecting the chitinase activity of the *C. minitans* chitinase were characterized in this study. Results showed that the activity of the *C. minitans* chitinase was highest at 50℃ and pH 8.0. The enzyme was stable when the ambient pH ranged from 5.0 to 9.0, whereas lost its activity when it was treated at 60℃ for 10 min. The activity of the chitinase was significantly improved by some ions including Mg²⁺, Fe²⁺, Ca²⁺, Ba²⁺ and Mn²⁺, while it was significantly suppressed by Zn²⁺ and Cu²⁺. The activity of the *C. minitans* chitinase was enhanced by boric acid at 50~100 mmol L⁻¹ and oxalic acid at 2~8 mmol L⁻¹. The importance of these factors in mycoparasitism of *C. minitans* on *S. sclerotiorum* and their potential applications in biological control of the pathogen were discussed in this paper. Fig 6, Tab 1, Ref 19

Keywords *Coniothyrium minitans*; *Sclerotinia sclerotiorum*; mycoparasite; chitinase

CLC S476:Q949.3206

几丁质是包括核盘菌[*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary]]在内的大多数真菌的细胞壁成分,是影响真菌病害防治效果的限制因子之一^[1].几丁质酶(Chitinase)是一类分解几丁质的水解酶,由于其对真菌细胞壁几丁质具有降解作用,故在真菌病害防治中具有潜在的应用前景^[2~4].盾壳霉(*Coniothyrium minitans*)是核盘菌的一种重要生防菌,该菌对核盘菌具有较好的防治效果^[5~7]和广泛的应用前景^[8].Giczey等的研究表明,外切β-1,3-葡聚糖酶和几丁质酶参与了盾壳霉寄生核盘菌菌核的过程^[9],但对于盾壳霉几丁质酶的基本性质及在重寄生中的作用还不明确.我们曾经对盾壳霉产生几丁质酶的培养条件作过详细报道^[10],本文将在此基础上报道影响盾壳霉几丁质酶活性的因子,以期分离纯化几丁质

酶,进而明确其生防作用奠定基础.

1 材料与方法

1.1 盾壳霉菌种及其培养

试验所用的盾壳霉菌株Chy-1分离自湖北省长阳县^[11].将其接种在马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)斜面培养基上,在20℃下培养20 d.用无菌蒸馏水洗下盾壳霉分生孢子,配制成孢子悬浮液,孢子浓度为1×10⁸个/mL.取100 μL孢子悬浮液,接种于装有50 mL改良马铃薯葡萄糖培养液(去皮马铃薯200 g,葡萄糖5 g,硝酸钾1 g,蒸馏水1 000 mL)的三角瓶中.在20℃下以200 r/min转速振荡培养15 d.

1.2 几丁质酶粗酶液制备

将盾壳霉液体培养物通过定性滤纸过滤,保留滤液.将滤液以5 000 r/min转速离心10 min,收集上清液.将硫酸铵缓缓加入上清液中至550 g/L饱和度,并在4℃下盐析24 h,离心收集蛋白质沉淀.并将沉淀溶解在pH 5.4的醋酸-醋酸钠缓冲液中.最后用透析法去盐,得到粗酶液,在4℃下储存备用.

收稿日期:2007-12-05 接受日期:2008-05-04

*国家自然科学基金项目(No. 30070512)资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (General Program) (No. 30070512)

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: guoqingli@mail.hzau.edu.cn)

1.3 胶态几丁质制备

粉状几丁质购自Sigma公司(Sigma Chemical Company, St Louis, MO, USA), 将粉状几丁质制备成浓度约为40 g/L胶态几丁质溶液。

1.4 盾壳霉几丁质酶活性测定

依据Reissing等的方法^[12]测定几丁质酶活性。一个酶活性单位(U)的定义为: 在37 ℃和pH 6.5的条件下每分钟分解胶态几丁质产生1 μmol的N-乙酰氨基葡萄糖。

1.5 温度对几丁质酶活性的影响

将透析过的酶液稀释5倍, 取0.5 mL稀释酶液与0.5 mL胶态几丁质混合, 将混合液分别置于30、40、45、50、60、70 ℃的水浴中保温30 min。然后测定各反应体系在585 nm处的吸光值($A_{585\text{ nm}}$), 计算各处理的酶活性。每一温度处理重复测定3次, 下同。

1.6 pH值对几丁质酶活性的影响

用pH 2.4的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液(0.05 mol/L)和pH 10.0的甘氨酸-氢氧化钠缓冲液(0.05 mol/L)将酶促反应体系的pH分别调为3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0。然后测定各反应体系的 $A_{585\text{ nm}}$ 值, 计算各处理的酶活性。

1.7 温度对几丁质酶热稳定性的影响

将几丁质酶液分别放在40、50、60、70 ℃水中, 处理10、30、40、60 min或80 min。然后用自来水将酶液冷却到室温, 测定各反应体系的 $A_{585\text{ nm}}$ 值, 计算各处理的酶活性。

1.8 环境pH值对几丁质酶稳定性的影响

用pH 2.4的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液(0.05 mol/L)和pH 10.0的甘氨酸-氢氧化钠缓冲液(0.05 mol/L)将待测酶液pH分别调为3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0。并在37 ℃下温育1 h。再将各酶液样品的pH调至6.5, 测定各反应体系的 $A_{585\text{ nm}}$ 值, 计算各处理的酶活性。

1.9 金属离子对几丁质酶活性的影响

分别将100 mmol/L的硫酸铜、硫酸锌、硫酸锂、硫酸亚铁、硫酸镁、硫酸锰、氯化钾、氯化铝、氯化钡、氯化钙溶液与待测酶液按等体积混合, 用蒸馏水为对照。测定各反应体系的 $A_{585\text{ nm}}$ 值, 计算各处理的相对酶活性(相对酶活性指各处理的酶活性与对照的酶活性之比, 下同)。

1.10 草酸对几丁质酶活性的影响

将浓度为2、4、8、16、32、48、64 mmol/L的草酸溶液, 分别与几丁质酶液按等体积混合, 反应体系中草酸的实际浓度分别为1、2、4、8、16、24、32 mmol/L。用蒸馏水与酶液混合为对照。测定各反应体系的 $A_{585\text{ nm}}$ 值, 计算各处理的相对酶活性。

1.11 硼酸对几丁质酶活性的影响

将浓度为10、20、50、100、150、200、300 mmol/L的硼酸溶液分别与几丁质酶液按等体积混合, 反应体系中硼酸的实际浓度分别为5、10、25、50、75、100、150 mmol/L。用蒸馏水与酶液混合为对照。测定各反应体系的 $A_{585\text{ nm}}$ 值, 计算各处理的相对酶活性。

1.12 数据分析

采用SAS软件中方差分析(ANOVA)和邓肯氏新复极差法(Duncan's Multiple Range Test)评估各试验处理间差异显著

性($P=0.05$)。

2 结果与分析

2.1 温度对盾壳霉几丁质酶活性的影响

当反应温度从30 ℃上升至50 ℃时, 反应体系的 $A_{585\text{ nm}}$ 值逐渐升高, 说明几丁质酶活性逐渐增强。但随着反应温度继续上升至60 ℃和70 ℃时, 反应体系的 $A_{585\text{ nm}}$ 值逐渐下降, 表明几丁质酶活性逐渐降低。可见, 盾壳霉几丁质酶促反应的最适温度是50 ℃(图1)。

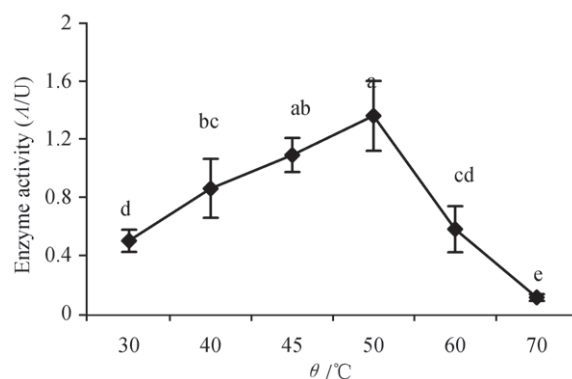


图1 温度对盾壳霉几丁质酶活性的影响
Fig. 1 Effect of temperature on the activity of chitinase produced by *C. minitans*

2.2 pH值对几丁质酶活性的影响

随着反应体系的pH值从3.0上升至8.0, $A_{585\text{ nm}}$ 值逐渐升高, 说明几丁质酶活性逐渐升高。当pH值继续上升至9.0时, $A_{585\text{ nm}}$ 值下降, 说明反应体系的几丁质酶活性下降。可见, 盾壳霉几丁质酶促反应的最适pH值是8.0(图2)。

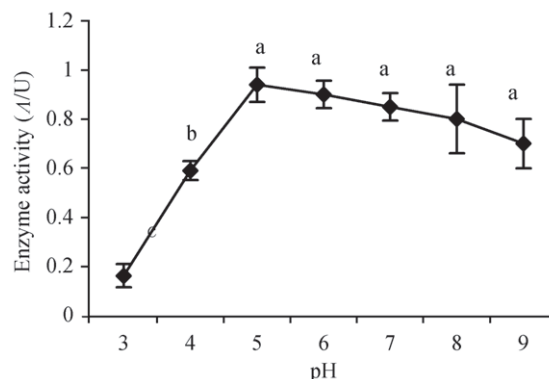


图2 pH对盾壳霉几丁质酶活性的影响
Fig. 2 Effect of ambient pH on the activity of chitinase produced by *C. minitans*

2.3 温度对几丁质酶稳定性的影响

如图3所示, 在40 ℃和50 ℃下, 盾壳霉几丁质酶活性随处理时间的延长逐渐下降; 在60 ℃和70 ℃下处理10 min没有检测出几丁质酶的活性。

2.4 环境pH对几丁质酶稳定性的影响

如图4所示, 当pH从3.0上升至5.0时, 酶液样品的几丁质酶活性上升较快; 当pH继续上升至9.0时, 酶液样品的几丁质酶活性缓慢下降。由此可见, 环境的酸碱度对盾壳霉几丁质

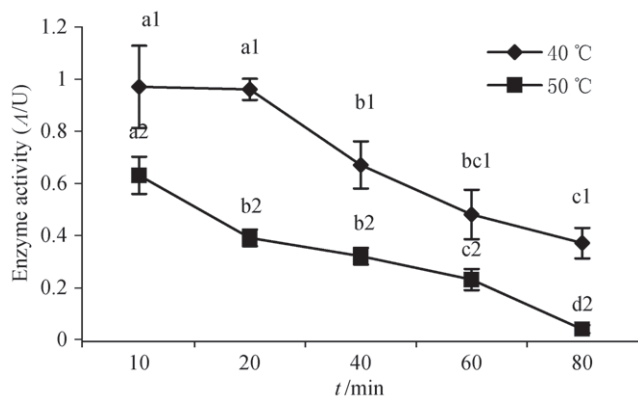


图3 温度对盾壳霉几丁质酶热稳定性的影响
Fig. 3 Effect of temperature on thermal stability of the chitinase produced by *C. minitans*

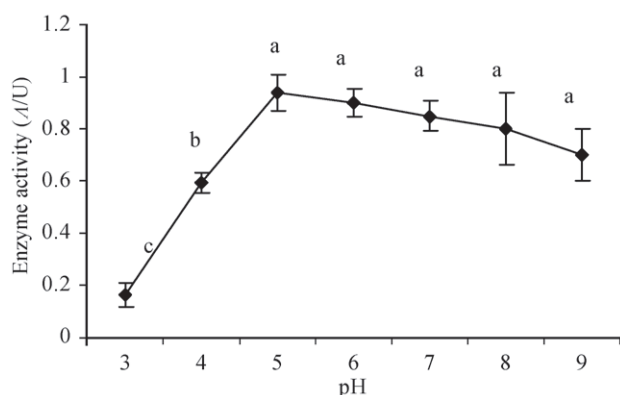


图4 环境pH值对盾壳霉几丁质酶稳定性的影响
Fig. 4 Effect of ambient pH on stability of the chitinase produced by *C. minitans*

酶的稳定性有影响, 当pH值5.0~9.0时, 几丁质酶活性较高且稳定。

2.5 金属离子对几丁质酶活性的影响

在供试的10种金属离子中, 有8种金属离子对盾壳霉几丁质酶活性具有促进作用, 分别是 Mg^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Al^{3+} 、 K^+ 和 Li^+ , 其中 Mg^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Ba^{2+} 和 Mn^{2+} 等离子的促进作用明显, 而 Zn^{2+} 和 Cu^{2+} 则使酶活明显下降。结果见表1。

表1 不同金属离子对盾壳霉几丁质酶活性的影响

Table 1 Effect of ions on the activity of chitinase produced by *C. minitans*

金属离子 Ions	酶活性 Enzyme activity (Δ/U)	相对酶活性 Relative enzyme activity ($\Delta/\%$)
Mg^{2+}	0.52 ± 0.09 a	371 ± 16 a
Fe^{2+}	0.48 ± 0.04 b	343 ± 10 b
Ca^{2+}	0.48 ± 0.12 b	343 ± 9 b
Ba^{2+}	0.4 ± 0.06 c	285 ± 14 c
Mn^{2+}	0.34 ± 0.04 c	243 ± 12 d
Al^{3+}	0.22 ± 0.05 d	143 ± 9 e
K^+	0.18 ± 0.02 e	129 ± 13 ef
Li^+	0.17 ± 0.07 e	121 ± 9 fg
CK	0.14 ± 0.06 f	100 ± 10 gh
Zn^{2+}	0.12 ± 0.02 f	85 ± 14 hi
Cu^{2+}	0.02 ± 0.01 g	74 ± 6 i

2.6 草酸对几丁质酶活性的影响

如图5所示, 当草酸浓度为1~4 mmol L^{-1} 时, 几丁质酶相对活性均高于1, 其中含2 mmol L^{-1} 草酸的反应体系中的几丁质酶相对活性最高, 说明对几丁质酶活性具有促进作用; 当草酸浓度高于4 mmol L^{-1} 时, 酶液中几丁质酶的相对活性均小于1, 说明对几丁质酶的活性具有抑制作用。

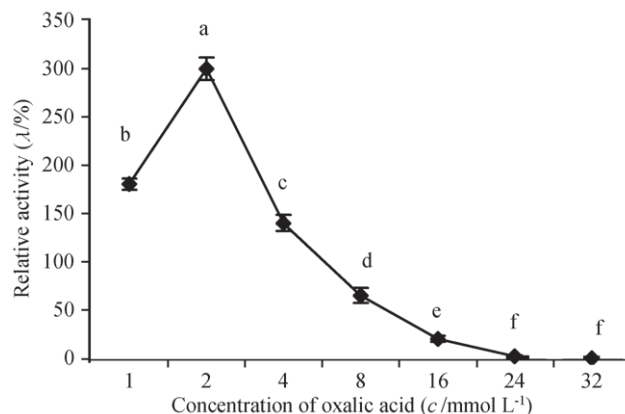


图5 草酸对盾壳霉几丁质酶活性的影响
Fig. 5 Effect of oxalic acid on the activity of chitinase produced by *C. minitans*

2.7 硼酸对几丁质酶活性的影响

如图6所示, 当硼酸浓度为25~75 mmol L^{-1} 时, 相对酶活性均大于1, 其中50 mmol L^{-1} 硼酸处理的酶相对活性最高, 说明对盾壳霉几丁质酶的活性发挥具有促进作用; 而当硼酸浓度低于25 mmol L^{-1} 或高于75 mmol L^{-1} 时, 酶液中几丁质酶相对活性均小于1, 说明对盾壳霉几丁质酶的活性具抑制作用。

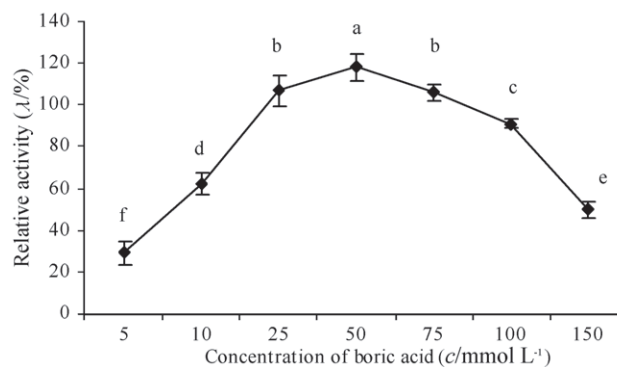


图6 硼酸对盾壳霉几丁质酶活性的影响
Fig. 6 Effect of boric acid on the activity of chitinase produced by *C. minitans*

3 讨论

盾壳霉降解核盘菌细胞壁几丁质的过程是几丁质酶参与的酶促反应。本文研究表明, 反应体系的温度、pH值、一些金属离子、硼酸和草酸等对这一酶促反应均具有影响。前人的研究表明大多数微生物几丁质酶的最适反应温度都在40~50 °C之间, 高温会引起酶的变性, 从而丧失活性^[13, 14]。我们发现盾壳霉几丁质酶的最适反应温度为50 °C。这一特征与研究过的大多数微生物的几丁质酶相似。

本文研究表明, 盾壳霉几丁质酶的适宜pH是8.0, 说明弱碱环境有利于盾壳霉降解几丁质。李国庆等的研究表明, 酸

性基质适宜于盾壳霉菌丝体的生长和几丁质酶的产生^[11]. 说明盾壳霉产生几丁质酶的适宜酸碱环境与这种酶活性发挥的适宜酸碱环境不同. 这可能与这两种过程所在的环境不同有关. 盾壳霉产生几丁质酶发生在菌丝细胞内, 一般pH环境是较为恒定的. 而作为胞外酶, 几丁质酶降解几丁质的反应发生在菌丝外, 盾壳霉菌丝生长后基质的pH值为7.0~8.0, 正有利于几丁质酶发生酶解反应.

本文研究结果表明, Mg^{2+} 和 Fe^{2+} 都能促进盾壳霉几丁质酶发挥酶解活性, 而 Cu^{2+} 和 Zn^{2+} 则抑制盾壳霉几丁质酶发挥酶解活性. 唐亚雄等的研究表明, Mg^{2+} 、 Hg^{2+} 和 Co^{2+} 对产气肠杆菌(*Enterobacter aerogenes*)几丁质酶活性的发挥具有明显的抑制作用^[15]. 陈述等^[13]报道 Cu^{2+} 和 Fe^{2+} 对黄蓝状菌(*Talaromyces flavus*)几丁质酶活性的发挥也具有抑制作用. 因此, 金属离子对不同微生物产生的几丁质酶的活性影响是不同的.

草酸是核盘菌代谢产生的毒素^[16, 17]. 盾壳霉在寄生核盘菌菌丝体时不可避免地会遇到这种毒素. 本文研究结果表明, 低浓度的草酸($<4 \text{ mmol L}^{-1}$)对盾壳霉几丁质酶的活性具有促进作用, 说明盾壳霉的几丁质酶可以忍耐低浓度的草酸. 由此推测, 即使在草酸毒素存在的条件下, 盾壳霉的几丁质酶仍能正常发挥活性. 事实上, 盾壳霉具有分解草酸毒素的能力^[18], 因而, 核盘菌的草酸毒素不会对盾壳霉的重寄生构成威胁.

硼酸浓度为 $25\sim 75 \text{ mmol L}^{-1}$ 时对几丁质酶活性有促进作用, 说明盾壳霉几丁质酶可以忍耐一定浓度的硼酸. 在使用盾壳霉作为生防因子防治菌核病时, 可以考虑和硼肥混用^[19]. 这样既达到了防治菌核病的效果, 又可能解决油菜缺硼的问题.

References

- Huang XL (黄秀梨), Xiang BH (项伯衡). Chitinase of the fungus *Beauveria bassiana*. *J Beijing Norm Univ Nat Sci* (北京师范大学学报自然科学版), 1981, **25** (2): 91~94
- Pechenare A. Production of toxins and wall degrading enzymes by *Gladiolus roseum*. *Trans Br Mycol Soc*, 1980, **74** (3): 561~566
- Ordentlich A. The role of *Serretia marcescens* in biocontrol of *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology*, 1988, **78** (1): 84~88
- Chen SF (陈三凤), Li JL (李季伦), Qiu WF (裘维蕃). Studies on the mycopathogen-inhibiting chitinase: Isolation and identification of *Flavobacterium* sp. with strong inhiting activity. *Acta Phytopathol Sin* (植物病理学报), 1992, **22** (4): 323~327
- Mclaren DL, Huang HC, Rimmer SR. Control of apothecial production of *Sclerotinia sclerotiorum* by *Coniothyrium minitans* and *Talaromyces flavus*. *Plant Dis*, 1996, **80**: 1373~1378
- McQuilken MP, Mitchell SJ, Budhe SP, Whipps JM, Fenlon JS, Archer SA. Effect of *Coniothyrium minitans* on sclerotial survival and apothecial production of *Sclerotinia sclerotiorum* in field-grown oilseed rape. *Plant Pathol* (London), 1995, **44**: 883~896
- Li GQ, Huang HC, Acharya SN, Erickson RS. Effectiveness of *Coniothyrium minitans* and *Trichoderma atroviride* in suppression of *Sclerotinia blossom blight* of alfalfa. *Plant Pathol*, 2005, **54**: 204~211
- de Vrije T, Antoine N, Buitelaar RM, Bruckner S, Dissevelt M, Durand A, Gerlagh M, Jones EE, Lüth P, Oostra J, Ravensberg WJ, Renaud R, Rinzema A, Weber FJ, Whipps JM. The fungal biocontrol agent *Coniothyrium minitans*: Production by solid-state fermentation, application and marketing. *Appl Microbiol & Biotechnol*, 2001, **56**: 58~68
- Giczey G, Kerényi Z, Fülöp L, Hornok L. Expression of *cmg1*, an α -glucanase gene from *Coniothyrium minitans*, increases during sclerotial parasitism. *Appl & Environ Microbiol*, 2001, **67**: 865~871
- Hu YM (胡燕梅), Yang L (杨龙), Li GQ (李国庆). Characterization of factors affecting production of chitinase by the mycoparasite *Coniothyrium minitans*. *J Wuhan Bioengin Inst* (武汉生物工程学院学报), 2006, **2** (2): 81~84
- Li GQ (李国庆), Wang DB (王道本), Zhang SH (张顺和). Characterization of the sclerotial parasite *Coniothyrium minitans* I. Biological characteristics and natural distribution in Hubei Province. *J Huazhong (Central China) Agric Univ* (华中农业大学学报), 1995, **14** (2): 125~129
- Reissing JL, Strominger JL, Leloir LF. A modified colorimetric method for the estimation of N-acetylamin sugars. *J Biol Chem*, 1955, **217**: 959~966
- Zhang SH (张世宏), Li DC (李多川), Wei Y (魏毅), Liu KQ (刘开启). Purification, properties and antifungal activity of an extracellular chitinase produced by *Trichothecium roseum*. *Acta Phytopathol Sin* (植物病理学报), 2002, **32** (3): 262~266
- Huang XH (黄小红), Chen QX (陈清西), Wang J (王君), Sha L (沙莉), Huang ZP (黄志鹏), Guan X (关雄). Isolation, purification and properties of the chitinase from *Bacillus thuringiensis*. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 2004, **10** (6): 771~773
- Tang YX (唐亚雄), Zhao J (赵建), Ding SH (丁诗华). Purification and properties of chitinase from *Enterobacter Aerogens*. *Acta Microbiol Sin* (微生物学报), 2001, **41** (1): 82~86
- Wei SJ (韦善君), Li GQ (李国庆), Jiang DH (姜道宏), Wang DB (王道本). Effect of oxalic acid on spore germination and mycelial growth of the mycoparasite *Coniothyrium minitans*. *Acta Phytopathol Sin* (植物病理学报), 2004, **34** (3): 199~203
- Budges SP, Whipps JM. Glasshouse trials of *Coniothyrium minitans* and *Trichoderma* species for the biocontrol of *Sclerotinia sclerotiorum* in celery and lettuce. *Plant Pathol*, 1991, **40**: 59~66
- Ren L, Li GQ, Han YC, Jiang DH, Huang HC. Degradation of oxalic acid by *Coniothyrium minitans* and its effects on production and activity of β -1, 3-glucanase of this mycoparasite. *Biol Control*, 2007, **43**: 1~11
- Lin RX (林荣新), Yang YA (杨玉爱), He NZ (何念祖). Effect of organic fertilizer in controlling oilseed rape boron deficiency. *J Zhejiang Agric Sci* (浙江农业科学), 1985, **2**: 88~91