

文章编号: 1005-0906(2005)03-0112-02

# 禾谷镰刀菌产生的细胞壁降解酶的特性研究

高洪敏<sup>1</sup>, 陈捷<sup>2</sup>, 何晶<sup>1</sup>, 宁家林<sup>1</sup>, 于兵<sup>1</sup>, 刘君<sup>1</sup>, 哈娟<sup>1</sup>

(1. 丹东农业科学院, 辽宁 凤城 118109; 2. 沈阳农业大学, 沈阳 110161)

**摘要:** 禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*)是引起玉米茎腐病、穗腐病的主要病原菌之一。该病原菌在活体外能产生 PG、PMG、PGTE 和 PMTE 四种细胞壁降解酶, 这些酶都具有酶的典型性动力学特性。细胞壁降解酶是 *F. graminearum* 致病的一个重要因子。

**关键词:** 禾谷镰刀菌; 细胞壁降解酶; 酶活; 特性

**中图分类号:** S432.4

**文献标识码:** A

## The Character of Cell Wall Degradation Enzyme Produced by *Fusarium graminearum*

GAO Hong-min<sup>1</sup>, CHEN Jie<sup>2</sup>, HE Jing<sup>1</sup>, et al.

(1. Dandong Academy of Agricultural Sciences, Fengcheng 118109, China;

2. Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China)

**Abstract:** *Fusarium graminearum* is one of the pathogens causing corn stalk rot and ear rot. It can produce four cell wall degradation enzyme of PG, PMG, PGTE and PMTE. These enzymes all have the typical dynamics characters of enzyme. Cell wall degradation enzyme is one of the important pathogen factors of *F. graminearum*.

**Key words:** *Fusarium graminearum*; Cell wall degrading enzyme; Enzyme activity; Character

禾谷镰刀菌(*F. graminearum*)是引起玉米茎腐病、穗腐病的主要病原菌之一。关于此病原菌的侵染规律方面, 目前国内外研究较多, 但在致病机制方面研究较少。本文对 *F. graminearum* 活体外产生的细胞壁降解酶进行研究, 以讨论该病原菌侵染的生理机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞壁降解酶的提取

按 G.C.Papavizas 和 W.A.Ayers(1965)的方法, 在 10 cm 直径的培养皿中倒入 15 mL PDA 培养基, 接种病菌 *F. graminearum*, 并在 25℃ 恒温条件下培养, 30 d 后在菌落边缘处用打孔器(0.75 cm)打下菌片, 每个三角瓶(250 mL)盛液体培养基 100 mL, 加 4 个菌片, 25℃ 下培养 4~8 d, 每天用手振荡一次。液体培养基采用 Marcus 等(1986)的培养基。当病菌在液体培养基中生长到一定时间后, 过滤除去菌丝和孢子, 在 4℃ 和 5 000 r/min 下离心 15 min, 弃去沉淀,

留上清液。

### 1.2 细胞壁降解酶的纯化

向病菌培养液和组织提取液中加入硫酸铵到 60% 饱和度(25℃), 在 4℃ 下静置 30 min 后, 在 4℃、15 000 r/min 下离心 20 min, 弃去上清液, 用 50 mM 醋酸-醋酸钠缓冲液(pH5.0)或 50 mM 甘氨酸-氢氧化钠缓冲液(pH 9.0)分别溶解沉淀物, 在同样的缓冲液中于 4℃ 下透析 48 h, 每 12 h 换一次透析液, 纯化的酶在-20℃ 下保存备用。

### 1.3 细胞壁降解酶活性的测定

(1)紫外-可见光光度法。利用 DNS(3,5-二硝基水杨酸)方法在岛津 uv-120-02 分光光度计 520 nm 处测反应混合液的消光值, 根据酶反应所释放的还原糖量计算 PG(多聚半乳糖醛酸酶)、PMG(聚甲基半乳糖醛酸酶)和 Cx( $\beta$ -1,4-内切葡聚糖酶)的活性。反应混合液为 1.0 mL 酶液, 1.0 mL 底物(1% 果胶酸钠或 1% 果胶或 1% 羧甲基纤维素, pH5.0), 1.0 mL 醋酸-醋酸钠缓冲液(50 mM, pH5.0)。以 100℃ 下煮沸 15 min 的酶液为对照。PG、PMG、Cx 酶活单位为 30℃ 下每分钟毫克酶蛋白催化底物释放 1  $\mu$ g 还原糖所需的酶量(U/mg)。

(2)按 Hoffman(1982)的方法。在 232 nm 处测定

收稿日期: 2004-06-17; 修稿日期: 2004-07-26

作者简介: 高洪敏(1967-), 男, 硕士, 副研究员, 副所长, 从事玉米育种工作。Tel: 0415-8295030 13841508985

E-mail: ghmdaas@163.net

反应混合液的消光值,计算 PGTE(多聚半乳糖醛酸反式消除酶)和 PMTE(果胶甲基反式消除酶)的活性。反应混合液为 1.0 mL 酶液,1.0 mL 底物(1%果胶酸钠或 1%果胶,pH9.0),1.0 mL 甘氨酸-氢氧化钠缓冲液(50 mM,pH 9.0),1.0 mL 的 3 mM CaCl<sub>2</sub>。30℃下每分钟毫克酶蛋白催化底物释放 1 μg 不饱和醛酸为一个酶活单位(U/mg)。

(3)连续滴定法。按 J. Marcus 和 A. Schejter(1983)的方法测定 PE(果胶甲基酯酶)的活性。在 pH6.5 下连续用 0.01N NaOH 滴定酶作用后所释放的羧基。反应混合液为 1.2 mL 酶液,6.0 mL 底物 (1%果胶)。30℃下每分钟毫克酶蛋白催化底物释放 1 μg 当量羧基为一个酶活单位(U/mg)。

所有的酶活测定均重复 3 次,酶蛋白浓度按 Lowry(1951)的方法测定。

## 2 结果与分析

### 2.1 温度与酶活的关系

分别在 10、20、30、40 和 50℃恒温条件下测定 *F. graminearum* 产生的 PG、PMG、PGTE、PMTE 和 C<sub>x</sub> 的活性,找出酶活最适温度。温度对细胞壁降解酶有不同程度的影响,其中,PGT 和 PGTE 酶活随温度的变化波动性较大,表现为典型的钟型曲线。酶活最适温度分别为 50℃和 30℃。C<sub>x</sub> 只有在温度高于 20℃时才表现出活性,在 20~50℃酶活波动程度较大,酶活最适温度为 40℃。PMTE 最适酶活温度在 20℃和 30℃之间。

### 2.2 pH 与酶活的关系

以磷酸二氢钾-磷酸氢二钠为缓冲体系,分别在 pH5.0、6.0、7.0、8.0、9.0 条件下测定 *F. graminearum* 在活体外产生的 PG、PMG、PGTE、PMTE 和 C<sub>x</sub> 的活性,找出不同酶最高酶活的 pH 值。

pH 对细胞壁降解酶的活性有不同程度的影响。PG 受 pH 的影响最为明显,呈现典型的钟型曲线,最适酶活的 pH 值为 6.0。PMG 最适酶活 pH 值为 5.0,pH 大于 5.0 时,酶的活性逐渐降低,当 pH 为 8.0 时,PMG 的活性完全丧失。C<sub>x</sub> 随 pH 的变化亦呈典型的钟型曲线,酶活最适 pH 值为 6.0,在 pH8.0 和 9.0 之间,酶的活性变为最低。在 pH5.0 和 9.0 范围内,PGTE 和 PMTE 活性随着 pH 值的增大而逐渐增大,在 pH9.0 时表现最大。

### 2.3 反应时间与酶活的关系

在其它条件都相同时,分别测定与底物反应 10、20、30、40、50、60 和 70 min 时 *F. graminearum* 在活体外产生的 PG 的活性,找出 PG 最高酶活的反应

时间。

随着反应时间的延长,PG 的活性逐渐增大,当反应时间为 60 min 时,酶活达到最大值,反应时间超过 60 min 后,酶的活性不再增大并维持最大值。由此看来,PG 酶活与反应时间有密切的联系,最大酶活反应时间为 60 min。

### 2.4 底物浓度与酶活的关系

配制 5%的果胶酸钠(缓冲液为 50 mM 醋酸-醋酸钠,pH 5.0),然后依次稀释成 5、10、15、20 和 25 倍。用 DNS 方法测定 PG 与上述各浓度底物在 30℃下反应 30 min 时还原糖的产量,再计算出不同底物浓度下的反应速度(单位时间产物浓度的变化)。

由试验结果可知,在底物浓度为 0~5%的范围内,随着底物浓度的增加,*F. graminearum* 产生的 PG 的活性(反应速度)不断增加,符合 Michaelis-Menten 理论。

## 3 结论

*F. graminearum* 在活体外能产生 PG、PMG、PGTE 和 PMTE 4 种细胞壁降解酶,国内外也有这类的报道(陈捷,1991,1995,2001;毛存贵等,1993;Marcus 等,1986;Hershenhorn 等,1990)。这些酶都具有酶的典型性动力学特性。这些酶的作用,使玉米幼苗茎基部的细胞壁降解,导致苗根部褐变和腐烂,以致枯萎和死亡;使成株茎基部维管束组织的细胞溶解,输导组织堵塞,造成茎基部湿腐和地上部分枯萎;使子粒的表皮细胞壁降解,导致子粒腐烂。因此,细胞壁降解酶是 *F. graminearum* 致病的一个重要因子,应对其致病机制进行进一步的研究。

### 参考文献:

- [1] 陈捷. 黄瓜腐霉菌苗期猝倒病侵染机制的研究[D]. 沈阳农业大学博士学位论文,1991.
- [2] 杨典洱,等. 玉米茎基腐研究进展[J]. 玉米科学,2002,10(1):88-90.
- [3] 李春霞,等. 玉米茎腐病接种方法的研究[J]. 玉米科学,2001,9(2):72-74.
- [4] 陈捷. 玉米茎腐病菌致病因子的初步研究[J]. 植物病理学报,1995,25(1):77.
- [5] 毛存贵,等. 棉花枯萎病菌聚半乳糖醛酸酶(PGAUase)的部分性质研究[J]. 生物化学与生物物理学报,1993,25(2):151-157.
- [6] Hershenhorn J, et al. Polygalacturonases associated with infection of valencia orange by *Penicillium italicum*[J]. Physiology and Biochemistry, 1990, 80: 1374-1376.
- [7] Lory O H, et al. Protein measurements with the folin phenol reagent [J]. J. Biol. Chem, 1951, 193: 265-275.
- [8] Marcus L, et al. Purification and characterization of pectolytic enzymes produced by virulent and hypovirulent Isolates of *Rizoctonia solani* Kuhn[J]. Physiol. and Mol. Plant Pathology, 1986, 29: 325-336.