

# 抗逆生防木霉筛选及其相关因子诱导

袁素贤, 阚国任, 陈红漫 (1. 沈阳农业大学国有资产管理处, 辽宁沈阳110161; 2. 沈阳农业大学生物科技学院, 辽宁沈阳110161)

**摘要** 对供试各木霉菌株经30、35、40、45、50 ℃保温24 h后,于28 ℃培养6~7 d,进行耐高温菌株筛选。结果表明,耐高温生防木霉菌株T30经热激后可产生抗逆蛋白,且表达量较大。对高温抗逆蛋白进行DEAE32及Sephadex G100柱层析得到单一蛋白洗脱峰。SDS-PAGE电泳发现该抗逆蛋白含有2个亚基,分子量分别为30和42 kD。酶学检测发现,该高温抗逆蛋白有几丁质酶活力,其最适pH值为5.0,最适温度为50 ℃,Km值为0.91 ng/ml,对Na<sup>+</sup>有较强的耐受性。

**关键词** 木霉; 抗逆蛋白; 几丁质酶

中图分类号 Q935 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)16-04716-03

## Screen of Stress Tolerance Biocontrol Trichoderma Strain and Inducement of Its Relative Factors

Yuan Su-xian et al (Management of National Asset, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110161)

**Abstract** The tested Trichoderma strains were first thermal-kept for 24 h at 25, 35, 40, 45, 50 ℃, then cultivated at 28 ℃ for 6 d to 7 d for screening fire-resistant bacterial strain. The result showed that the fire-resistant biocontrol strain could produce more stress-tolerant protein after thermal shock, with great expression. The eluting peak of single protein was obtained from fire-resistant stress-tolerant protein through the DEAE 32 and G 100 column chromatography. In SDS-PAGE electrophoresis it was found the fire-resistant stress-tolerant protein contained two subunits, with the molecular weights being 30 and 42 kD. The enzymological detect showed that the protein had the activity of chitinase. Its optimum pH was 5.0, temperature was 50 ℃, Km was 0.91 ng/ml, and it was more tolerant to Na<sup>+</sup>.

**Key words** Trichoderma; Stress tolerant protein; Chitinase

在田间或大棚施用过程中,生防木霉都不可避免地受到一些逆境因子的干扰,而木霉本身会通过逆境相关基因的诱导表达产生抗逆境物质。这些抗性物质可能是木霉的次生代谢产物,如寡糖、蛋白质、氨基酸等。笔者系统地研究了木霉在高温诱导下所产生的抗逆蛋白的变化规律,并对高温抗逆蛋白的理化性质进行了分析。

## 1 材料与方 法

**1.1 材料** 供试菌株 Trichoderma harzianum T21、Trichoderma aureoviride T16、Trichoderma viride T19、T25 由沈阳农业大学植物保护学院提供; Trichoderma viride T30 由实验室分离获得。供试药剂: N-乙酰氨基葡萄糖、Sephadex G100、DEAE纤维素32 购于Sigma公司。

**1.2 耐高温菌株的筛选** 活化供试木霉菌株,取直径为1 cm的菌片接种于PDA培养基中,经30、35、40、45、50 ℃保温24 h后,于28 ℃培养6~7 d,记录菌落直径,同时以未经温度处理的为对照。

## 1.3 木霉相关酶系酶活的测定

**1.3.1 几丁质酶活力测定。** 1.5 ml 醋酸缓冲液(0.1 mol/L, pH5.0), 0.5 ml 酶液,45 ℃保温1 h,采用DNS法测定上清液中还原糖含量<sup>[2]</sup>。以每小时分解胶体几丁质产生1 μg N-乙酰氨基葡萄糖的酶量为1个活力单位(U)。

**1.3.2 -1,3 葡聚糖酶活力测定。** 取0.4 ml 昆布多糖,溶于pH4.8的乙酸缓冲液,加入0.1 ml 酶液,于37 ℃保温15 min,立即加入0.5 ml 铜试剂,混匀,100 ℃水浴10 min,冷却后加入0.5 ml 砷钼酸试剂,显色后加入蒸馏水3.5 ml,660 nm处比色,对照标准曲线求出样品液中还原糖的含量。以每秒产生1 nmol -1,3 葡聚糖的酶量为1个酶活力单位<sup>[3]</sup>。

**1.3.3 苯丙氨酸解氨酶(PAL)活力测定。** 将酶粗提液用0.1 ml pH8.8的硼酸缓冲液稀释2倍后,以L-苯丙氨酸为底物,

参照KOGEL等方法测定。以OD<sub>290</sub>值变化0.01为1个酶活力单位<sup>[4]</sup>。

**1.3.4 超氧化物歧化酶(SOD)活力测定。** 采用NBT光还原法<sup>[5]</sup>。以抑制NBT光化还原的50%为1个酶活性单位。

## 1.4 木霉耐高温抗逆相关蛋白的诱导与分离

**1.4.1 诱导。** 将木霉菌株T-30的孢子悬液(10<sup>6</sup>个/ml)经50 ℃处理12 h后,接种于液体发酵培养基中,恒温振荡培养3 d,8 000 r/min冷冻离心20 min,取上清液,经硫酸铵盐析、透析后备用。

## 1.4.2 分离纯化。

**1.4.2.1 DEAE纤维素(DE32)柱层析。** 透析后的样品加入经缓冲液平衡过的DEAE纤维素层析柱(1.5 cm×18 cm)上端,流速0.2 ml/min,用该缓冲液洗至A<sub>280</sub>不变,改用pH4.0的0.1 mol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·0.05 mol/L柠檬酸缓冲液,流速0.5 ml/min,洗至A<sub>280</sub>不变,再用0.5 mol/L NaCl洗脱,洗脱速度0.5 ml/min,分部收集。

**1.4.2.2 Sephadex G100柱层析<sup>[6]</sup>。** 将分部收集得到的峰洗脱液用聚乙二醇浓缩至1 ml,经pH6.0的0.1 mol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·0.05 mol/L柠檬酸缓冲液透析后,加至预先用该缓冲液平衡过的Sephadex G100层析柱(1.3 cm×50 cm)上端,用同样的缓冲液洗脱,洗脱速度0.1 ml/min,分部收集,测定各管A<sub>280</sub>。

## 1.5 木霉耐高温抗逆相关蛋白酶学性质的检测

**1.5.1 动力学常数值测定<sup>[7]</sup>。** 在pH5.0的0.1 mol/L NaAc-HAc缓冲液中,以不同浓度几丁质为底物,测定其酶活力。采用Lineweaver-Burk作图法,求出该酶对底物的Km值。

**1.5.2 温度的影响。** 在30、40、50、60、70、80、90 ℃温度条件下,按常规法测定酶活力。

**1.5.3 热稳定性。** 酶液在上述温度下保温30 min后,按常规法测定酶活力。

**1.5.4 pH对酶活力的影响。** 分别以不同pH值的缓冲液配制底物,并且稀释酶液。设pH值为3、4、5、6、7、8、9,按常规

基金项目 辽宁省博士启动基金。

作者简介 袁素贤(1969-),女,辽宁锦州人,助理研究员,从事植物保护及相关仪器设备研究。

收稿日期 2007-04-06

法测定酶活力。

**1.5.5 酶的pH 稳定性。**用上述不同pH 值的缓冲液在50 下保温6 h 后,按常规法测定酶活力。

**1.5.6 离子强度对酶活力的影响<sup>8)</sup>。**向pH5.0 的0.01 ml/L HAc- NaAc 缓冲液中加入不同量 Na<sup>+</sup> (0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0 ml/L), 分别测定不同 NaCl 浓度下的酶活力。

## 2 结果与分析

**2.1 木霉菌株的耐高温能力** 从图1 可以看出,木霉 T-30 的耐热能力最好,经50 高温处理后,其生长抑制率仍接近100%;而T-21、T-19、T-16 的抗高温能力次之,经50 高温处理后,其生长抑制率可维持在60% 以上;以T-25 的耐高温能力最差,经50 高温处理后,几乎没有再恢复生长能力。

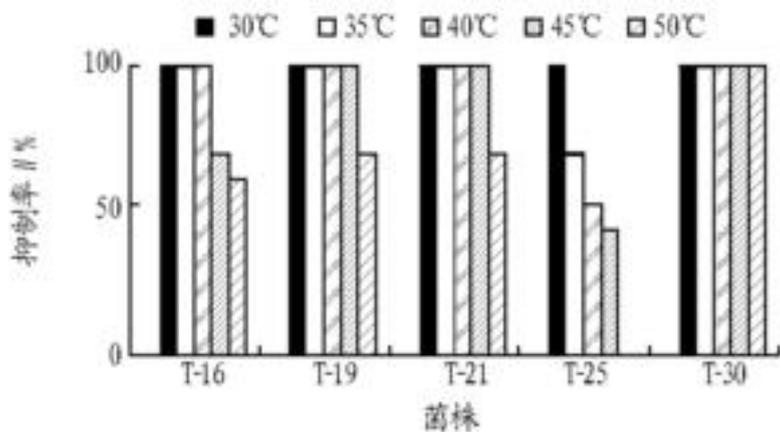


图1 木霉菌株的抗高温能力比较

**2.2 温度对木霉相关酶系酶活的影响** 从图2~5 可以看出,在不同温度条件下,木霉菌株胞外酶系的酶活性表现出明显差异。当温度升高至40 时,酶活性开始下降,当温度继续升高至50 时,则只有几丁质酶活性略有升高,而PAL 酶和-1,3 葡聚糖酶活性略有下降,SOD 活性下降幅度较大。这说明T-30 菌株中,几丁质酶抗高温特性较好。

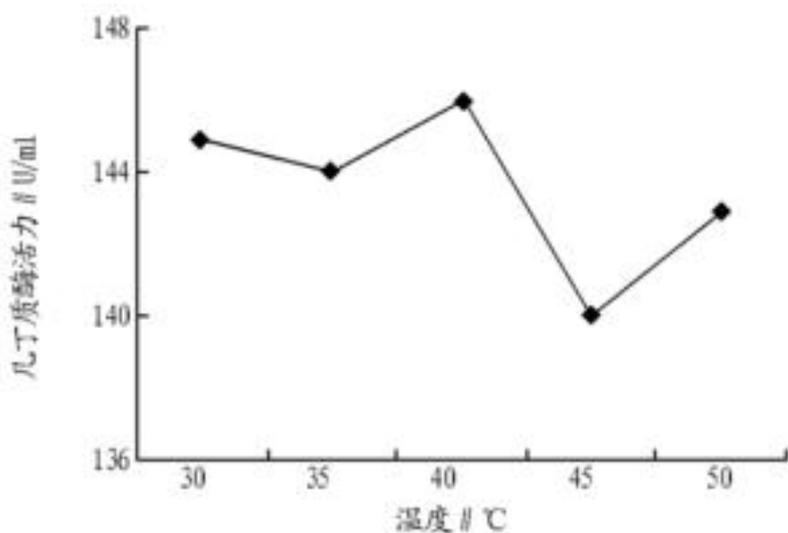


图2 温度对木霉几丁质酶活力的影响

**2.3 木霉耐高温抗逆相关蛋白的诱导** 经50 处理的T-30 发酵液浓缩后,进行可溶性蛋白聚丙烯酰胺凝胶电泳。从图6 可以看出,热激前T-30 发酵液中有9 条谱带,热激后T-30 发酵液中有10 条谱带;电泳图谱中R<sub>f</sub> 为0.67 的蛋白谱带是热处理后产生的特异性谱带,且表达量较大。

**2.4 木霉耐高温抗逆相关蛋白的分离纯化** 从图7 可以看出,以盐析后的蛋白粗提液经DEAE 纤维素( DE32) 柱层析后出现3 个峰。将以上3 个峰洗脱液收集后经PEG 浓缩进行PAGE 非变性电泳,发现峰II 为抗逆蛋白峰。收集峰II,进行Sephadex G100 柱层析。洗脱曲线(图8) 表明,该抗逆蛋白已基本得到纯化。

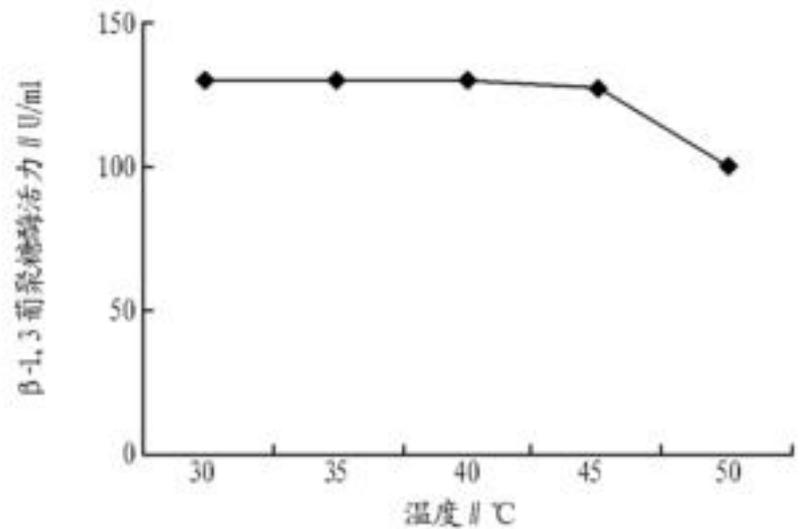


图3 温度对木霉-1,3 葡聚糖酶活力的影响

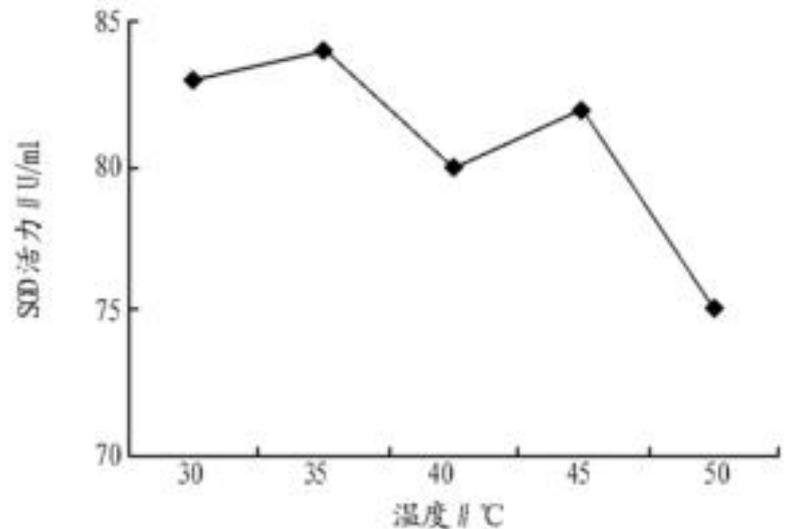


图4 温度对木霉SOD 活力的影响

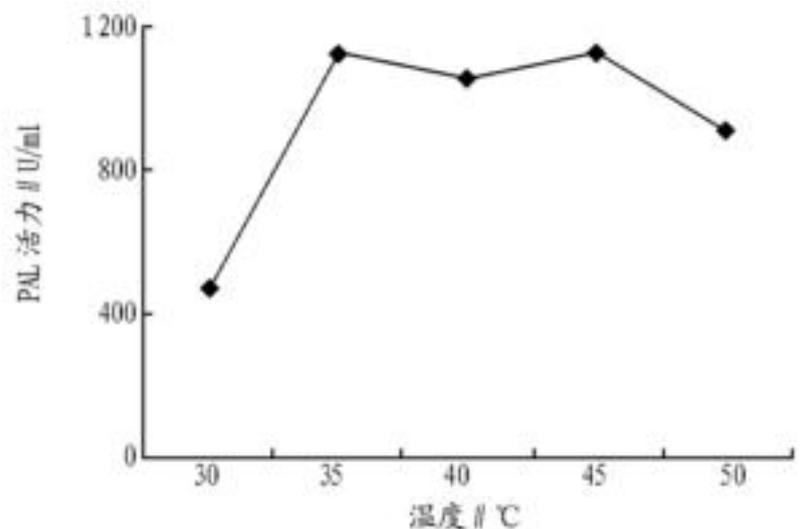


图5 温度对木霉PAL 活力的影响

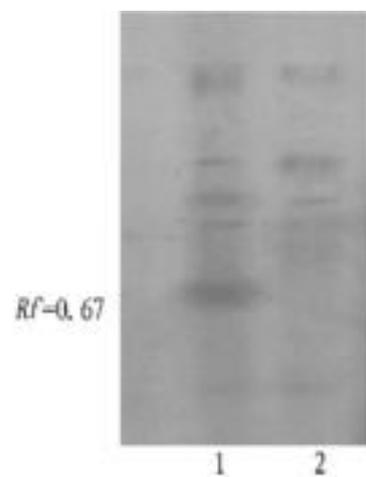


图6 热激处理前后T-30 蛋白谱带变化

从图9 可以看出,经 SDS-PSGE 电泳后该蛋白呈2 条带,表明该蛋白含有2 条亚基,用标准的不同蛋白质分子量对数对 R<sub>f</sub> 值作图,该样品分子量分别为30、66 kDa。

**2.5 木霉耐高温抗逆相关蛋白酶学性质**

**2.5.1 几丁质酶活性。**研究表明,经Sephadex G100 纯化后的高温抗逆蛋白具有较高的几丁质酶活力,比活力达200 U/ng,进一步对其动力学性质作出测定。采用Lineweaver-Burk 作图法,求得胶体几丁质酶的 K<sub>m</sub> 值为0.91 ng/ml, V<sub>max</sub> 为252.13 μmol/(min·ng)。

**2.5.2 温度对几丁质酶活力及其稳定性的影响。**从图10 可以看出,经梯度温度测试后,几丁质酶最适反应温度为50

。从图11 可以看出,经30~80 梯度保温30 min 后,几丁质酶在30~50 的稳定性最佳。当温度高于50 时几丁质酶开始失活,当温度升至60 时几丁质酶失活10%,说明该酶对高温不敏感。

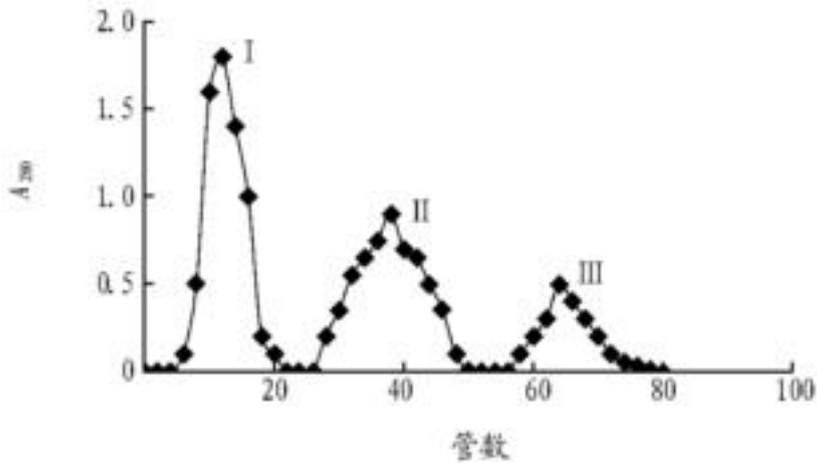


图7 DEAE 纤维素柱层析分离T30 耐高温抗逆相关蛋白

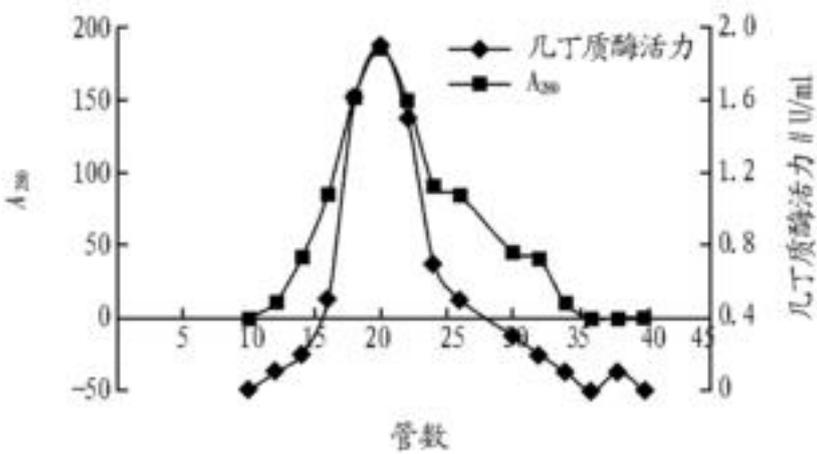
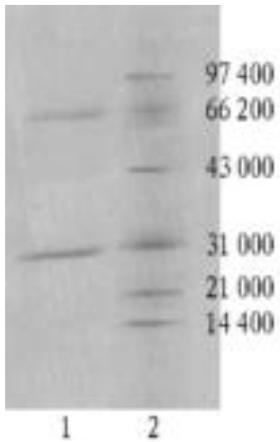


图8 Sephadex G-100 柱层析分离T30 耐高温抗逆相关蛋白



注:1,2 分别为高温抗逆蛋白,分子量标准。

**2.5.3 pH 值对几丁质酶活力及稳定性的影响。**从图12、13 可以看出,几丁质酶的最适pH 值为5.0。当pH 值高于6 时,几丁质酶活力开始下降;当pH 值高于8 时,几丁质酶活力降至30% 以下;当pH 值低于3 时,几丁质酶活性几乎完全丧失。

**2.5.4 离子强度对几丁质酶活力的影响。**从图14 可以看出,在NaCl 浓度为0.1 mol/L 时,几丁质酶活力保持不变;随着离子强度的增加,几丁质酶活力呈递减趋势;但在0.75 mol/L NaCl 环境中,几丁质酶仍可保持50% 的酶活性。这说明该酶对高浓度的NaCl 有较强的耐受性。

图9 抗逆蛋白SDS - PAGE 电泳

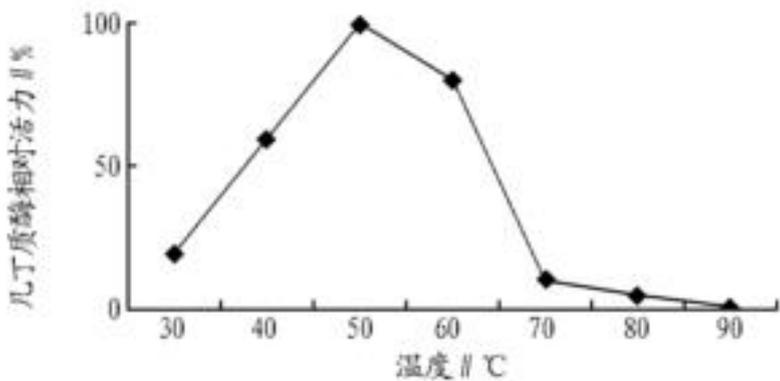


图10 温度对几丁质酶活力的影响

3 讨论

木霉菌是一类普遍存在并具有重要经济意义的生防菌。它不仅可用于防治土传病害,而且可在叶面、花器和果实病害的防治中发挥作用。但田间逆境因子(如高温等)是限制

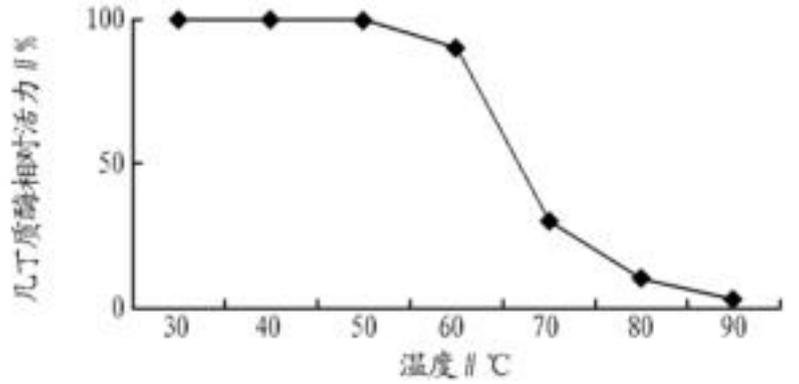


图11 温度对几丁质酶活力稳定性的影响

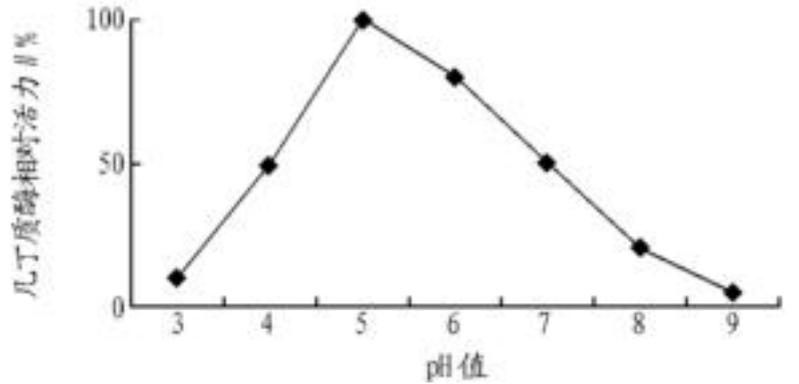


图12 pH 值对几丁质酶活力的影响

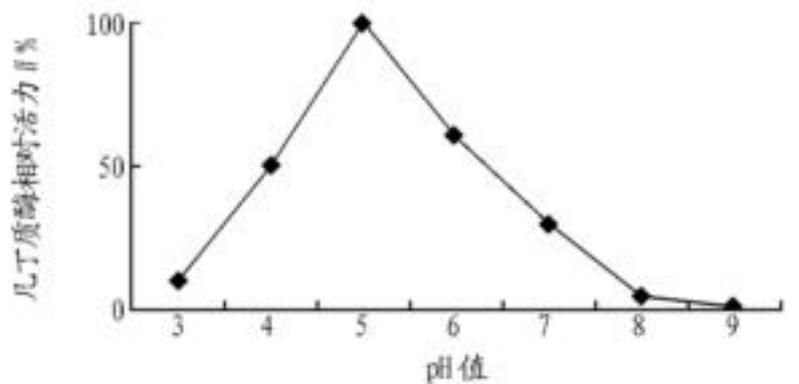


图13 pH 值对几丁质酶稳定性的影响

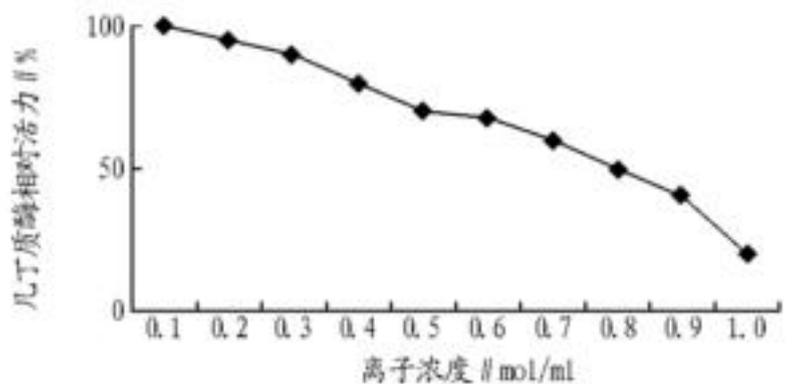


图14 Na<sup>+</sup> 浓度对几丁质酶活力的影响

木霉菌剂在大田,尤其是在保护地中发挥防效的主要因素,因此筛选耐高温的生防木霉菌株具有重要意义。随着现代生物技术的不断发展,在生化和分子水平上已对拮抗木霉的生防及抗逆机制进行了研究。该试验从筛选抗高温生防木霉菌株入手,诱导出木霉耐高温抗逆蛋白。研究表明,生防木霉T30 经热激后产生的抗逆蛋白含有2 个亚基,分子量分别为30、66 kDa。而且该耐高温相关蛋白具有几丁质酶活性。几丁质酶是木霉拮抗机制中最重要的胞壁降解酶<sup>[9]</sup>,而T30 菌株产生的抗逆蛋白具有抗高温、胞壁降解双重特性。这无疑将在提高木霉菌剂的生防效果及持效性方面起到重要作用。

该试验研究了不同温度条件下几种木霉胞外酶活性。研究发现,当温度升高至50 时几丁质酶活性略有增加。苯丙氨酸解氨酶和几丁质酶在高等植物中均为防御酶。据报道,水稻、小麦的苯丙氨酸解氨酶具有一定耐热能力;在低浓度化学农药可以促使高等作物细胞内苯丙氨酸解氨酶和

(上接第4718页)

几丁质酶活性的增加。但在微生物中这2种酶的抗逆能力尚未见报道。

#### 参考文献

- [1] 郭润芳, 刘晓光, 高克祥, 等. 拮抗木霉菌在生物防治中的应用与研究进展[J]. 中国生物防治, 2002, 18(4): 180 - 184.
- [2] TSUKAMOTO T, KOGA D, IDE A, et al. Purification and some properties of chitinase from yam, *Dioscorea opposita* thurb [J]. Agric Biol Chem, 1984, 48: 931 - 939.
- [3] 杜良成, 王筠. 稻瘟菌诱导的水稻几丁质酶、-1,3 葡聚糖酶活性及分

布[J]. 植物生理学报, 1992, 18(1): 29 - 36.

- [4] 张江涛, 段光明, 于泽英. 苯丙氨酸解氨酶与水稻抗稻瘟病的关系[J]. 植物生理学通讯, 1987(6): 34 - 37.
- [5] 王建华, 刘鸿先, 徐同. SOD 在植物逆境和衰老生理中的作用[J]. 植物生理学通讯, 1989(1): 1 - 7.
- [6] 张龙翔, 张庭芳, 李令媛. 生化实验方法和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 1981.
- [7] 张树政. 酶学研究技术[M]. 北京: 科学出版社, 1987.
- [8] 杨文博, 冯波, 佟树敏. 链霉菌S01 菌株几丁质酶的纯化及性质[J]. 微生物学通报, 1997, 24(2): 84 - 87.
- [9] 徐同, 柳良好. 木霉几丁质酶极其对植物病原真菌的拮抗作用[J]. 植物病理学报, 2002, 32(2): 97 - 101.