

## 木霉生防耐药因子的诱导及其生化特性研究

袁素贤<sup>1</sup>, 阚国仕<sup>2</sup>, 陈红漫<sup>2</sup> (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** 为了研究以含药(施佳乐)培养基筛选和诱导生防木霉菌株 T21 产生耐药性生防蛋白因子——几丁质酶的效果。利用含药(施佳乐)培养基筛选诱导生防木霉菌株 T21 产生几丁质酶, 通过 DEAE-32 纤维素柱层析法进行分离纯化, 用 SDS-PAGE 测定其分子量, 并分析温度和 pH 值对酶活力的影响以及耐药酶对灰霉菌的抑制作用。生防木霉菌株 T21 对化学农药施佳乐具有一定的抗性, 浓度达 1 000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  时生长及产孢情况良好。通过分离纯化的几丁质酶, 其分子量为 45 kD, 其最适反应温度为 50 $^{\circ}\text{C}$ , 最适 pH 值为 5.0, 对灰霉菌有明显抑制作用。生防木霉菌株 T21 产生的几丁质酶, 可与化学杀菌剂混合使用, 以增强田间的防治效果、减少化学农药的用量, 进而减少化学农药对农作物的污染及残留。

**关键词** 木霉; 施佳乐; 耐药性; 几丁质酶; 生化特性

**中图分类号** Q936 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2007)24-07523-02

Studies on the Induction of Biocontrol Drug-resistant Factor from *Trichoderma* and its Biochemical Characteristics

YUAN Su-xian et al (Department of State-owned Assets Administration, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110161)

**Abstract** The research was constructed to investigate the effects of producing biocontrol protein factor-chitinase from biocontrol *Trichoderma* strain T-21 which was screened and induced on medicated medium with pyri netharil. Chitinase was produced from biocontrol *Trichoderma* strain T-21 on medicated medium with pyri netharil, separated and purified by DEAE cellulose column chromatography. Its molecular weight was determined by SDS-PAGE and the effects of temperate and pH value on the enzyme activity and the inhibition effect of drug-resistance enzyme on *Btrytis cinerea* were analyzed. Biocontrol *Trichoderma* strain T-21 had certain resistance to chemical pesticide pyri netharil. When the concentration of pyri netharil reached 1 000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , the growth of strain and the sporulation were good. The purified chitinase had the molecular weight of 45 kD. Its optimum reaction temperature and pH value of chitinase were 50 $^{\circ}\text{C}$  and 5.0 respectively and had an obvious inhibition effect on *Btrytis cinerea*. Chitinase produced by biocontrol *Trichoderma* strain T-21 could be used with chemical germicide to strengthen the control effect and reduce the dosage of chemical pesticides so as to decrease the pollution and residue of chemical pesticides in crops.

**Key words** *Trichoderma*; Pyri netharil; Drug-resistance; Chitinase; Biochemical characteristic

木霉是一类重要的生防菌, 其抗病机制主要是能够产生一系列胞壁降解酶, 如葡聚糖酶、几丁质酶、蛋白酶和纤维素酶等。木霉几丁质酶对植物病原真菌的拮抗作用具有以下特点: 广谱性, 对 *Btrytis*、*Aternaria*、*Pythium*、*Verturia* 等植物病原真菌均具有拮抗作用; 对真菌细胞壁的降解作用, 不仅能降解病原成熟的菌丝顶端, 还可降解几丁质-葡聚糖复合结构的老熟细胞壁及菌核; 协同增效作用, 与化学杀菌剂协同使用, 可提高对病原真菌的抑制作用<sup>[1]</sup>。该研究以灰葡萄胞为作用靶标, 利用含药(施佳乐)培养基筛选诱导生防木霉菌株 T21 产生耐药性生防蛋白因子——几丁质酶, 并对其酶学性质进行了研究。

## 1 材料与方 法

**1.1 材料** 菌株: 哈茨木霉(*Trichoderma harzianum*) T21、灰霉病菌(*Btrytis cinerea*) B<sub>101</sub> 由沈阳农业大学化学保护实验室提供。

**主要试剂:** 40% 施佳乐(Phi netharil) 悬浮剂为德国艾格福公司产品; -葡聚糖、N 乙酰氨基葡萄糖、DEAE-32 和 Sephadex G 100 为 Sigma 公司产品。发酵培养基配制:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  680 ng,  $\text{KCl}$  200 ng,  $\text{FeSO}_4$  2 ng,  $\text{ZnSO}_4$  2 ng,  $\text{MnSO}_4$  2 ng, 胶体几丁质 42 g, 蔗糖 2 g, 施佳乐 1 g。

## 1.2 方 法

**1.2.1 耐药性几丁质酶的诱导。** 施佳乐 10~1 000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的 PDA 平板上, 接种直径 1.0 cm 的木霉菌片, 观察菌落生长情况。以不含农药的 PDA 培养基上的木霉菌落生长情况作对照。将以上不同处理的木霉菌株取直径为 1 cm 的菌块接种

于产酶培养基中, 28 $^{\circ}\text{C}$  培养 3 d, 4 000 r/min 离心 20 min, 取上清液用于几丁质酶活力测定。几丁质酶活力测定: 采用 DNS 法<sup>[2]</sup>。1.5 ml 醋酸缓冲液(0.1 mol/L, pH 值 5.0), 0.5 ml 酶液, 45 $^{\circ}\text{C}$  保温 1 h, DNS 法测定上清液中还原糖含量。以 1 h 分解胶体几丁质产生 1  $\mu\text{g}$  N 乙酰氨基葡萄糖的酶量为 1 个活力单位 U。

**1.2.2 耐药性生防因子的分离纯化。** 将木霉菌株 T21 的孢子悬液( $10^6$  个/ml) 接种于含施佳乐浓度为 1 000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  产酶培养基中恒温振荡培养 3 d, 8 000 r/min 冷冻离心 20 min, 取其上清液经硫酸铵盐析、透析后备用。

**DEAE-32 纤维素( DE32) 柱层析<sup>[2]</sup>:** 透析后的样品加入到经上述缓冲液平衡过的 DEAE-32 纤维素层析柱(1.5 cm $\times$ 18 cm) 上端, 流速 0.2 ml/min, 用该缓冲液洗至  $A_{280}$  不变; 改用 pH 值 4.0 0.1 mol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  - 0.05 mol/L 柠檬酸缓冲液, 流速 0.5 ml/min, 洗至  $A_{280}$  不变; 再用 0.5 mol/L  $\text{NaCl}$  洗脱, 流速 0.5 ml/min, 洗至  $A_{280}$  不变。

**1.2.3 分子量测定。** 采用 SDS-PAGE 电泳法<sup>[3]</sup>。

**1.2.4 生化特性检测。** 温度的影响: 设置温度 30、40、50、60、70、80、90 $^{\circ}\text{C}$ , 在不同温度下按常规法测定酶活力。pH 值对酶活力的影响: 分别以不同 pH 值的缓冲液配制底物和稀释酶液, 在 pH 值为 3、4、5、6、7、8、9 按常规法测酶活力。

**1.3 生防因子对番茄灰霉病原菌细胞壁的降解<sup>[4-5]</sup>** 用发酵 7 d 的 T21 木霉菌发酵酶液(此酶液中含施佳乐浓度为 1 000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 经稀释后, 均匀喷洒在 PDA 培养基上培养 7 d 的番茄灰霉病原菌菌丝上, 6 h 后挑取菌丝, 镜检, 并称取 0.05 g 菌丝, 加入 0.5 ml 蒸馏水, 以 DNS 法测定其中 N 乙酰氨基葡萄糖的含量。

## 2 结果与分析

**2.1 化学农药对木霉产酶的影响** 生防木霉菌株 T21 对化

基金项目 辽宁省博士启动基金(001045)。

作者简介 袁素贤(1969), 女, 辽宁沈阳人, 硕士, 助理研究员, 从事植物保护及相关仪器设备研究。

收稿日期 2007-04-20

学农药施佳乐具有一定的抗性,在其浓度达1 000  $\mu\text{g/ml}$  时,生长及产孢情况良好,且在此浓度下产几丁质酶的能力基本不受影响(图1)。

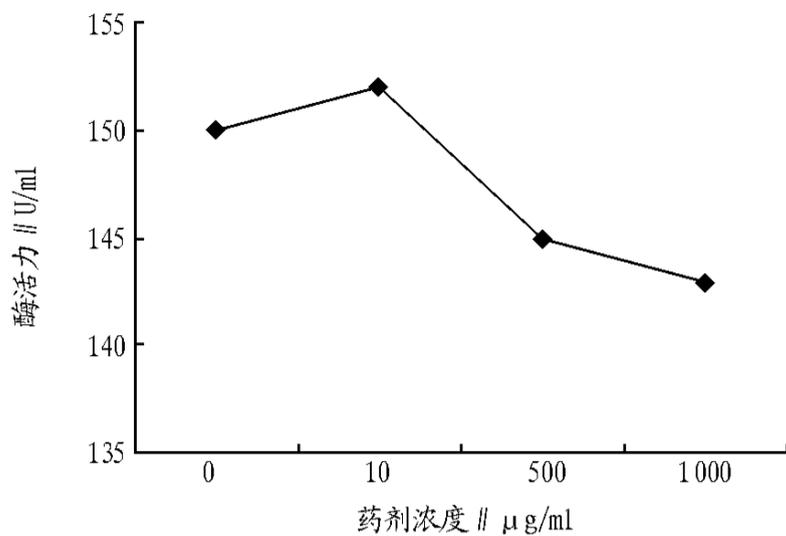


图1 施佳乐对T21产酶能力的影响

**2.2 生防因子的分离纯化** 以盐析后的蛋白粗提液经DEAE32纤维素柱层析后出现5个峰(图2),将以上3峰洗脱液收集后经PEG浓缩进行PAGE非变性电泳发现峰4具有几丁质酶活性。

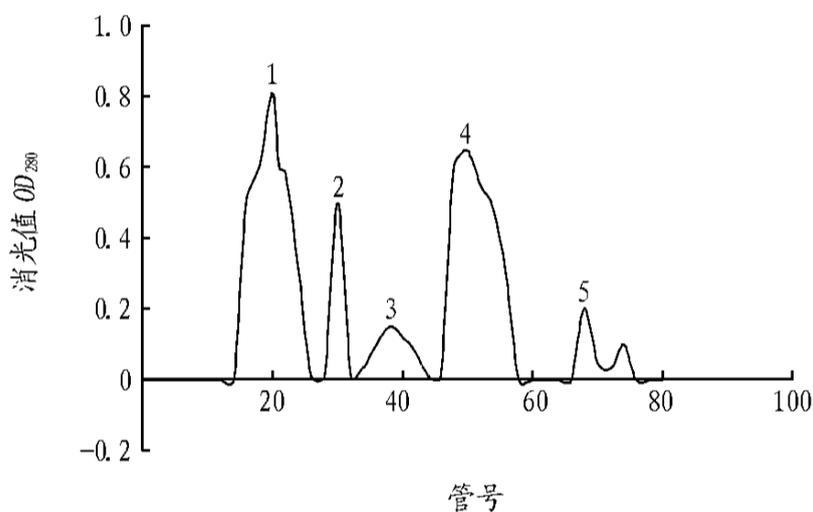
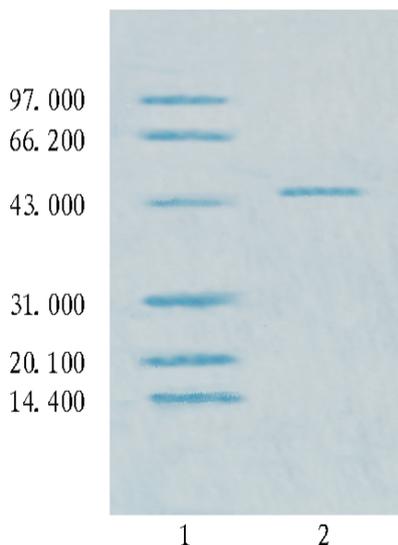


图2 DEAE32纤维素柱层析分离T21几丁质酶

**2.3 生防蛋白因子分子量检测** 经SDS PAGE电泳后,从图3可以看出,该酶蛋白呈一条带,其分子量为44 kD。



注:1. Marker; 2. Chitinase。

图3 生防蛋白因子SDS PAGE电泳

## 2.4 酶学特性测定

**2.4.1 温度对酶活力的影响。** 将酶经梯度温度测试后,结果表明,酶最适反应温度为50 (图4)。当温度高于50 时,酶开始失活。

**2.4.2 pH值对酶活力及稳定性的影响。** 实验结果表明,酶的最适pH值为5.0;pH值高于6时酶活力开始下降;pH值高于8时,酶活力丧失至30%以下;pH值低于3时,酶活性几乎完全丧失(图5)。

## 2.5 耐药酶对灰霉菌的抑制作用

在显微镜下观察,与对照灰霉菌丝相比,处理6 h的灰

霉菌丝有大量的内含物外渗。挑去0.05 g处理后的菌丝,加入0.5 ml蒸馏水溶解,用DNS法测定其中N-乙酰氨基葡萄糖的含量可达150  $\mu\text{g/ml}$ ,说明灰霉菌丝壁已被酶液分解。

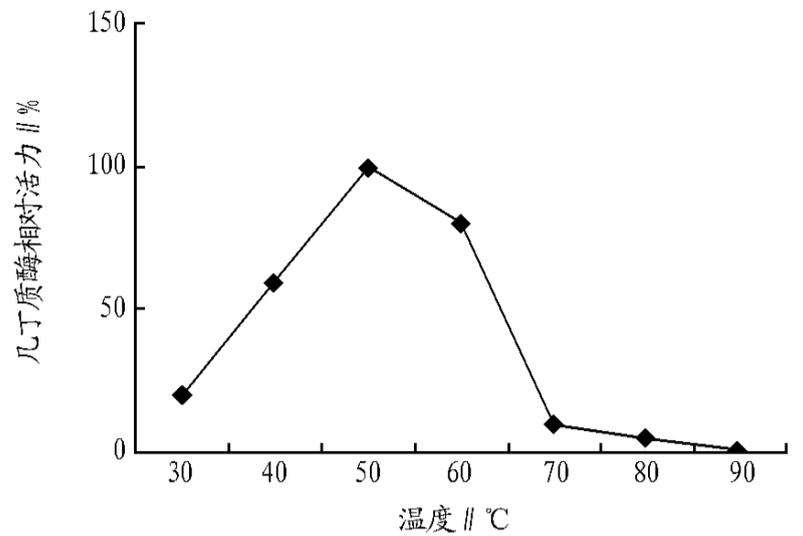


图4 温度对酶活力的影响

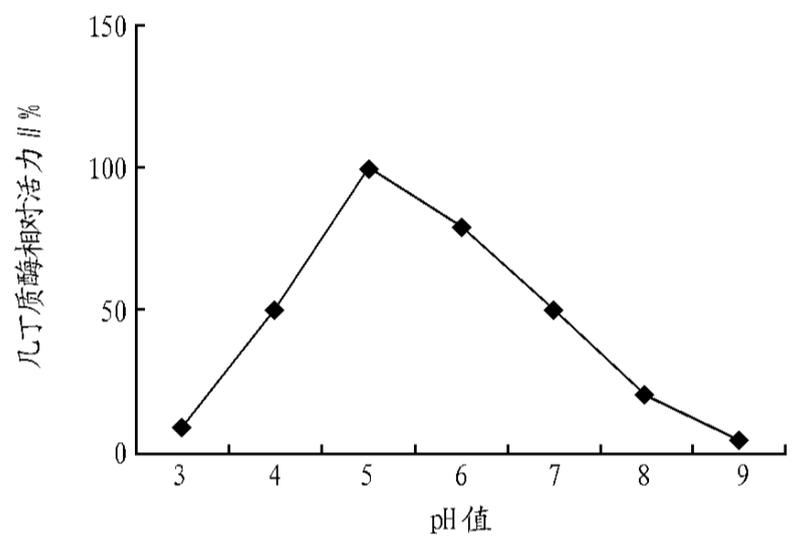


图5 pH值对几丁质酶活力影响

## 3 讨论

目前,大多数生防制剂在大田中防效的稳定性与持久性不理想,所以在病害综合治理中,需要提倡化学农药与生防制剂的协调使用,既可以减少农药的使用,又可以维持生防制剂的稳定性。该项研究表明,在有化学农药存在时,生防木霉菌株T21可以产生几丁质酶,与对照相比其酶学性质基本不受影响,这预示几丁质酶可以作为协同增效因子,与化学杀菌剂混合使用,以增强田间的防治效果,减少化学农药的用量,进而减少化学农药对农作物的污染及残留。

## 参考文献

- [1] 丁中,刘峰,慕立义.紫外光诱导哈茨木霉产生腐霉利抗性菌株的研究[J].中国生物防治,2002,18(2):75-78.
- [2] TSUKAMOTO T, KOGA D, IDE A, et al. Purification and some properties of chitinase from *Dothidea opposita* Thunb[J]. Agric Biol Chem, 1984, 48: 931-939.
- [3] 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.
- [4] 徐作廷,李林,于建雷,等.蔬菜灰霉病菌对腐霉利抗药性变异及其治理[J].植物保护学报,2001,28(1):33-38.
- [5] 屈海泳,罗曼,蒋立科,等.T901木霉菌的筛选和对草莓灰霉病菌作用机制的研究[J].微生物学报,2004,44(2):244-247.