

香蕉枯萎病菌 2 个生理小种 多聚半乳糖醛酸酶活性的比较

董章勇^{1,2} 王振中²

1. 仲恺农业工程学植物保护系, 广州 510225; 2. 华南农业大学植物病理生理学研究室, 广州 510642

摘要 用香蕉枯萎病菌 4 号生理小种(*Foc 4*)接种巴西香蕉, 香蕉枯萎病菌 1 号生理小种(*Foc 1*)接种粉蕉, 均能检测到 PG、PMG、PGTE、PMTE 和 Cx 5 种细胞壁降解酶活性, 其中 PG 活性均最高。在 7 种不同碳源培养条件下, *Foc 4* 的菌丝干质量都比 *Foc 1* 的大, 说明 *Foc 4* 的生长更快, 能更适应多种营养条件。在 PG 诱导方面, 有柑桔果胶或 PGA 存在时, 2 个生理小种的 PG 活性明显加强。在葡萄糖或 CMC 作为唯一碳源时, 2 个生理小种的 PG 活性很低。以香蕉维管束组织培养 2 个生理小种后发现, *Foc 4* 的 PG 活性比 *Foc 1* 高。以粉蕉维管束组织培养 2 个生理小种后发现, *Foc 1* 的 PG 活性比 *Foc 4* 高。以柑桔果胶作为碳源, 并改变不同的氮源, 在 7 种氮源培养条件下, *Foc 1* 和 *Foc 4* 均能产生 PG 活性, 但所产生的 PG 活性比不加氮源所产生的 PG 活性低。

关键词 香蕉; 香蕉枯萎病; 细胞壁降解酶; 多聚半乳糖醛酸酶

中图分类号 S 432.4⁺4; S 668.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2012)02-0204-04

香蕉枯萎病是破坏维管束导致植株死亡的毁灭性病害, 其病原菌是尖孢镰刀菌古巴专化型(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*), 又称香蕉枯萎病菌^[1]。该菌有 4 个生理小种, 其中 1 号生理小种(*Foc 1*)和 4 号生理小种(*Foc 4*)分布较广, 危害较重, 对香蕉产业影响较大^[2-3]。在合适的环境条件下, 病原菌对寄主植物的致病能力往往取决于它们所具有的致病因子的多少以及活性的强弱。植物病原菌主要通过产生一系列的降解酶分解寄主植物的组织屏障, 完成侵入过程。一般情况下, 寄主植物主要有两道屏障阻止病菌的侵入, 即表皮角质层和细胞壁多糖。多数病原菌可以通过产生角质酶分解寄主植物表皮的角质物质, 通过产生一系列细胞壁降解酶分解寄主植物细胞壁果胶、纤维素和半纤维素, 完成侵入过程。细胞壁降解酶包括果胶酶、半纤维素酶、纤维素酶以及某些蛋白酶, 其中果胶酶是使组织浸解的主要因素, 除浸解组织外, 果胶酶还引起细胞的死亡。研究结果表明, 细胞壁降解酶在香蕉枯萎病致病过程中具有重要作用^[4]。

果胶酶是一组复合酶, 主要包括多聚半乳糖醛酸酶(PG)、果胶甲基半乳糖醛酸酶(PMG)、多聚半乳糖醛酸反式消除酶(PGTE)和果胶甲基反式消除

酶(PMTE)等, 其中 PG 是通过水解作用分解果胶物质 α -1,4 糖苷键, 优先作用于果胶酸。果胶酶引起的细胞死亡是果胶酶降解中胶层和多糖组分后, 初生细胞壁松弛, 壁压下降, 原生质膜在低渗透压下胀裂, 导致细胞死亡, 引起植物软腐、枯萎、叶斑等症状, 说明病菌的致病因子很可能包括细胞壁降解酶。笔者观察并比较了香蕉枯萎病菌 2 个生理小种 *Foc 1* 和 *Foc 4* 产生的 PG 活性差异, 旨在为进一步探索 PG 的致病机制提供科学依据。

1 材料与方 法

1.1 供试材料和主要试剂

供试香蕉枯萎病菌 1 号生理小种 *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 1(*Foc 1*)和香蕉枯萎病菌 4 号生理小种 *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4(*Foc 4*)均由笔者所在实验室分离, 并通过致病性鉴定后保存备用; *Musa* 栽培品种粉蕉(AAB)和 Cavendish 栽培品种巴西香蕉(AAA)均购买自广东省农业科学院。

柑桔果胶(citrus pectin)、果胶酸(polygalacturonic acid, PGA)、羧甲基纤维素钠(carboxymethyl, CMC)为 Sigma 公司产品; D-半乳糖醛酸为

收稿日期: 2011-06-27

基金项目: 国家自然科学基金项目(30671349)和公益性行业(农业)科研专项(200903049-05)

董章勇, 博士研究生。研究方向: 分子植物病理学。E-mail: dongzhangyong@hotmail.com

通讯作者: 王振中, 教授。研究方向: 植物病理学。E-mail: zzwang@scau.edu.cn

Fluka 公司产品;考马斯亮蓝 G-250 为 BioRad 公司产品;其他生化试剂为国产分析纯。

1.2 活体内细胞壁降解酶的提取

用病原菌接种 4~5 叶的巴西香蕉或粉蕉幼苗 30~35 d 后,剪取发病的假茎组织,每克鲜组织加入 5 mL 组织提取液,在 4 °C 下加液氮研磨后,于 4 °C 下 16 000 r/min 离心 20 min,留上清液。上清液采用 PM-10 膜超滤浓缩 20 倍,-20 °C 下保存备用。以健康的蕉苗组织提取液为对照。

1.3 细胞壁降解酶活性的测定

PG、PMG 和 Cx 活性测定参照文献[5]中的方法,在 520 nm 处测定反应混合物消光值,根据酶反应所释放的还原糖量计算它们的活性,设 3 次重复。所用的底物分别为 1% 果胶酸、1% 果胶和 1% CMC。PMG、PG 以 45 °C 下每分钟每毫克酶蛋白催化底物释放 1 μ mol 的 D-半乳糖醛酸为 1 个酶活力单位(U₁);Cx 以 45 °C 下每分钟每毫克酶蛋白催化底物释放 1 μ mol 的葡萄糖为 1 个酶活力单位(U₂)。

PGTE 和 PMTE 活性测定参考文献[6]中的方法,在 232 nm 处测定反应混合物消光值,计算 PGTE 和 PMTE 的活性,设 3 次重复。PGTE 和 PMTE 都以 30 °C 下每分钟每毫克酶蛋白催化底物释放 1 μ mol 的不饱和醛酸为 1 个酶活力单位(U₃)。

1.4 PG 活性的测定

PDA 平板培养 7 d 的 *Foc 1* 和 *Foc 4*,用打孔器在菌落边缘打菌片,每个三角瓶盛液体培养基 100

mL,加 4 个菌片,25 °C 下 110 r/min 振荡培养 5 d。PG 活性测定同本文“1.3”中的方法。

1.5 菌丝干质量的测定

将培养好的菌液用定性滤纸过滤,再经微孔滤膜抽滤,滤液作为 PG 粗酶液供 PG 活性测定及香蕉组织浸解作用测定。将收集的菌丝烘干称质量,原滤纸的质量设为空白对照。

2 结果与分析

2.1 细胞壁降解酶的活性

用 *Foc 4* 接种巴西香蕉,然后测定香蕉组织提取液中细胞壁降解酶的活性,结果能检测到 PG、PMG、PGTE、PMTE 和 Cx 5 种细胞壁降解酶活性,说明 *Foc 4* 可在寄主体内产生多种细胞壁降解酶(表 1)。在活体内,酶的活性高低依次为 PG、PMG、PGTE、PMTE 和 Cx,说明在 *Foc 4* 侵染香蕉的过程中,PG 的活性是最高的,PG 可能是 *Foc 4* 的重要致病酶类。

用 *Foc 1* 接种粉蕉,然后测定香蕉组织提取液中细胞壁降解酶的活性,结果也能检测到 PG、PMG、PGTE、PMTE 和 Cx 5 种细胞壁降解酶活性,说明 *Foc 1* 可在寄主体内产生多种细胞壁降解酶(表 1)。在活体内,酶的活性高低依次为 PG、PGTE、PMG、PMTE 和 Cx,说明在 *Foc 1* 侵染粉蕉的过程中,PG 的活性也是最高的,可能是重要的致病酶类。

表 1 *Foc 4* 和 *Foc 1* 在香蕉体内细胞壁降解酶活性

Table 1 Enzyme activity produced by tissue infected with *Foc 4* and *Foc 1*

生理小种 Race	PMG/U ₁	PG/U ₁	Cx/U ₂	PGTE/U ₃	PMTE/U ₃
<i>Foc 4</i>	1.700±0.058	2.200±0.058	0.500±0.027	1.200±0.060	1.000±0.058
<i>Foc 1</i>	1.600±0.076	3.400±0.035	0.320±0.015	2.200±0.025	1.200±0.047

2.2 碳源中多聚半乳糖醛酶活性

测定结果表明,在 7 种碳源培养条件下,*Foc 1* 和 *Foc 4* 均能产生 PG(表 2)。以 1% 葡萄糖作为碳源时,产生的 PG 活性最低,可能是因为葡萄糖不能诱导 PG 的表达,但试验中依然能检测到 PG 活性,可能是 2 个生理小种在生长过程中会有少量构成型表达的 PG。以 1% CMC 作为碳源时,PG 活性也很低,可能是因为 CMC 主要作为纤维素酶(Cx)的底物,以诱导 Cx 的产生为主,对 PG 的诱导效果不明显。有柑桔果胶或 PGA 存在时,2 个生理小种的 PG 活性得到明显诱导,尤其以 1% 柑桔果胶为碳源

时所产生的 PG 活性最高,2 个生理小种分别是 7.511 U₁ 和 7.561 U₁。以粉蕉和香蕉维管束组织作为碳源时,2 个生理小种的 PG 都被诱导表达。其中,以粉蕉维管束组织作为碳源时,*Foc 1* 的 PG 活性比 *Foc 4* 高;以香蕉维管束组织作为碳源时,*Foc 1* 的 PG 活性明显比 *Foc 4* 低,分别为 2.821 U₁ 和 3.645 U₁。

在 7 种碳源培养条件下,*Foc 4* 的生长都比 *Foc 1* 快,菌丝干质量比 *Foc 1* 略大(表 3)。2 个生理小种的菌丝干质量由大到小依次为 1% 柑桔果胶、0.5% 柑桔果胶+0.5% CMC、1% PGA、1% 葡萄

表 2 病原菌在不同碳源培养液中的多聚半乳糖醛酸酶(PG)活性¹⁾

Table 2 PG activity of pathogens in mediums with different carbon sources

U₁

生理小种 Race	G	P	C	P+C	PGA	MVT	CVT
<i>Foc 1</i>	0.502±0.004	7.511±0.055	1.524±0.017	6.504±0.019	7.483±0.095	3.773±0.023	2.821±0.017
<i>Foc 4</i>	0.530±0.019	7.560±0.017	1.797±0.017	6.574±0.018	7.511±0.012	3.668±0.015	3.645±0.027

1)G:1% 葡萄糖 Glucose; P:1% 柑桔果胶 Citrus pectin; C:1% 羧甲基纤维素钠 CMC; PGA:1% 多聚半乳糖醛酸 Polygalacturonic acid; P+C:0.5% 柑桔果胶 Citrus pectin + 0.5% 羧甲基纤维素钠 CMC; MVT:2.5% 粉蕉维管束组织 *Musa* AAB vascular tissue; CVT:2.5% 香蕉维管束组织 Cavendish AAA vascular tissue (表 3 同 The same as Table 3).

表 3 病原菌在不同碳源培养液中的菌丝干质量

Table 3 Dry weight of mycelium from pathogens in mediums with different carbon sources

g

生理小种 Race	G	P	C	P+C	PGA	MVT	CVT
<i>Foc 1</i>	0.441±0.021	0.572±0.010	0.142±0.003	0.527±0.022	0.496±0.003	0.092±0.001	0.090±0.003
<i>Foc 4</i>	0.464±0.027	0.577±0.008	0.144±0.001	0.557±0.007	0.523±0.003	0.099±0.002	0.096±0.002

葡萄糖、1% CMC、2.5% MVT 和 2.5% CVT。由此可见,液体培养基中有柑桔果胶或 PGA 存在时,2 个生理小种的菌丝生长很快。而以葡萄糖作为碳源时,2 个生理小种的菌丝生长也很快,但它们的 PG 活性很低,说明菌丝的生长与 PG 酶活性不存在相关性。

2.3 氮源中多聚半乳糖醛酸酶的活性

以 1% 柑桔果胶作为碳源,改变不同的氮源,结果表明,在 7 种氮源培养条件下,*Foc 1* 和 *Foc 4* 均能产生 PG 活性(表 4)。当以甘氨酸作为氮源时,它们所产生的 PG 活性最高,2 个生理小种的 PG 酶活性分别为 7.400 U₁ 和 7.350 U₁,比不加氮源所产生的 PG 活性低(*Foc 1* 为 7.510 U₁,*Foc 4* 为 7.560 U₁)。这可能是加入氮源后,对 PG 的产生或其活性

起到抑制作用。以甘氨酸和尿素作为氮源时,*Foc 1* 的 PG 活性比 *Foc 4* 的高,而在其余 5 种氮源中则反之。总的来说,加入氮源对 PG 的诱导可能起到反作用,但 7 种氮源的抑制作用也不是很明显,以硝酸钾作为氮源时,*Foc 1* 和 *Foc 4* 的 PG 活性最低,活性分别为 7.090 U₁ 和 7.180 U₁。

以 1% 柑桔果胶作为基础碳源,改变不同的氮源。以蛋白胨作为氮源时,2 个生理小种的菌丝干质量都是 0.570 g,比没有加氮源的小(*Foc 1* 为 0.572 g,*Foc 4* 为 0.577 g),其余 6 种氮源存在的条件下,菌丝干质量都比没有加氮源的大,说明 2 个生理小种的菌丝生长加快,其中尤以甘氨酸存在时,*Foc 1* 和 *Foc 4* 菌丝干质量最大,分别为 0.800 g 和 0.790 g。

表 4 病原菌在不同氮源培养液中的多聚半乳糖醛酸酶(PG)活性

Table 4 PG activity of pathogens in mediums with different nitrogen sources

U₁

生理小种 Race	硝酸铵 Ammonium nitrate	尿素 Urea	甘氨酸 Glycocol	组氨酸 Histidine	蛋白胨 Peptone	L-天冬氨酸 L-Aspartic acid	硝酸钾 Nitrate
<i>Foc 1</i>	7.200±0.042	7.310±0.029	7.400±0.127	7.120±0.017	7.250±0.023	7.150±0.066	7.090±0.040
<i>Foc 4</i>	7.250±0.042	7.290±0.032	7.350±0.070	7.240±0.027	7.280±0.035	7.240±0.025	7.180±0.035

3 讨论

本研究发现,用 *Foc 4* 接种巴西香蕉,能检测到 PG、PMG、PGTE、PMTE 和 C_x 5 种细胞壁降解酶活性,说明 *Foc 4* 可在寄主体内产生多种细胞壁降解酶。在活体内,酶的活性高低依次为 PG、PMG、PGTE、PMTE 和 C_x,说明在 *Foc 4* 侵染香蕉的过程中,PG 的活性是最高的,PG 可能是 *Foc 4* 的重要致病酶类。另外,通过 *Foc 1* 接种粉蕉,也能检测到 PG、PMG、PGTE、PMTE 和 C_x 5 种细胞壁降解酶活性。在活体内,酶的活性高低依次为 PG、PGTE、

PMG、PMTE 和 C_x,说明在 *Foc 1* 侵染粉蕉的过程中,PG 的活性最高,可能是重要的致病酶类。

目前已经有不少病原菌的 PG 被证明与致病相关。Mann^[5]使用紫外诱变的方法产生番茄枯萎病菌(*F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*)的 PG 活性缺失突变菌株,发现其对番茄的致病力大大减弱。Oeser 等^[6]将麦角菌(*Claviceps purpurea*)的 2 个 PG 基因 *cppg1* 和 *cppg2* 敲除后,发现该菌株基本上丧失了对黑麦的致病力。

在 7 种不同的碳源培养条件下,*Foc 4* 的菌丝干生物量都比 *Foc 1* 的大,说明 *Foc 4* 的生长更快,能更适应多种营养条件,可能这也是目前该菌更具

有破坏力的一个原因。在 PG 诱导方面,有柑桔果胶或 PGA 存在时,2 个生理小种的 PG 活性得到明显的诱导。在葡萄糖或 CMC 作为唯一碳源时,2 个生理小种的 PG 活性很低,可能是因为这 2 类碳源都不是 PG 的理想底物,对 PG 的诱导效果不明显或者没有诱导,而依然能记录到 PG 活性的存在,可能是有少量 PG 进行构成型表达。以香蕉维管束组织培养 2 个生理小种后发现,*Foc 4* 的 PG 活性比 *Foc 1* 高,说明香蕉果胶类物质更适合于诱导 *Foc 4* 的 PG 产生。而以粉蕉维管束组织培养 2 个生理小种后发现,*Foc 1* 的 PG 活性比 *Foc 4* 高,说明尽管 *Foc 4* 也能侵染粉蕉,但是粉蕉的果胶可能更适合于诱导 *Foc 1* 的 PG 产生。

以柑桔果胶作为碳源,改变不同的氮源,在 7 种氮源培养条件下,*Foc 1* 和 *Foc 4* 均具有 PG 活性,但是它们所产生的 PG 活性比不加氮源所产生的 PG 活性低。这可能是加入氮源后,对 PG 的产生或其活性起到抑制作用。除了以蛋白胨作为氮源的培养基外,其他 6 种氮源培养条件下,2 个生理小种的菌丝生长量都有所提升。这说明在氮源存在的情况下,对 2 个生理小种的生长是有利的,但对 PG 的产

生却不利。植物细胞壁是植物病原物侵染植物的天然屏障,也是植物病原物侵染植物过程中主要的底物。植物病原真菌能分泌一系列与致病密切相关的细胞壁降解酶。香蕉枯萎病产生典型的组织降解症状,显然与病菌分泌的组织降解酶有关。

参 考 文 献

- [1] PLOETZ R C. *Fusarium* wilt of banana is caused by several pathogens referred to as *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* [J]. *Phytopathology*, 2006, 96(6): 653-656.
- [2] 黄永辉,李瑜婷,范家平,等.香蕉枯萎病菌 4 号生理小种产生毒素条件的优化[J]. *华中农业大学学报*, 2011, 30(5): 594-598.
- [3] 代易,纪春艳,王振中.香蕉多聚半乳糖醛酸酶抑制蛋白的分离纯化[J]. *华中农业大学学报*, 2011, 30(6): 707-711.
- [4] 董章勇,王琪,秦世雯,等.香蕉枯萎病菌 1 号和 4 号生理小种细胞壁降解酶的比较[J]. *植物病理学报*, 2010, 40(5): 463-468.
- [5] MANN B. Role of pectic enzymes in the *Fusarium* wilt syndrome of tomato [J]. *Trans Br Mycol Soc*, 1962, 45: 169-178.
- [6] OESER B, HEIDRICH P M, MULLER U, et al. Polygalacturonase is a pathogenicity factor in the *Claviceps purpurea* interaction [J]. *Fungal Genet Biol*, 2002, 36: 176-186.

Comparison of polygalacturonase produced by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 1 and race 4

DONG Zhang-yong^{1,2} WANG Zhen-zhong²

1. *Departement of Plant Protection, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225, China;*

2. *Laboratory of Physiological Plant Pathology, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China*

Abstract All of the five cell wall-degrading enzymes, including PG, PMG, PGTE, PMTE and Cx, could be found in Brazil banana inoculated by banana wilt fusarium race 4 and Chinese banana inoculated by banana wilt fusarium race 1. PG activity was the highest. Under the condition of being cultured with seven different carbon sources, the dry weight of mycelium biomass from *Foc 4* was larger than that from *Foc 1*, which means *Foc 4* grows more quickly and is more adaptable. With the presence of citrus pectin or PGA, the two strains significantly induced PG activity. When using CMC or glucose as the sole carbon source, the PG activity of the two strains was very low. The PG activity of *Foc 4* was higher than that of *Foc 1* in the musa vascular tissue culture, while the PG activity of *Foc 4* was lower than that of *Foc 1* in the Chinese banana vascular tissue culture. With citrus pectin as a carbon source, both *Foc 1* and *Foc 4* can produce PG activity, but they produced lower PG activity than they did without nitrogen source.

Key words banana; *Fusarium* wilt of banana; cell wall degrading enzymes; polygalacturonase