

# 松材线虫与拟松材线虫分泌的纤维素酶系研究

马海宾<sup>1,2</sup>, 梁军<sup>1</sup>, 吕全<sup>1</sup>, 张星耀<sup>\*</sup>

(1. 中国林业科学研究院森林生态环境与保护研究所, 国家林业局森林保护学重点实验室, 北京 100091

2. 中国林业科学研究院热带林业研究所 广东 广州 510520)

**摘要:** 采用羧甲基纤维素钠 (CMC)、微晶纤维素 (MC) 和水杨素 (SC) 三种底物, 用刚果红染色法和 DNS 法分别定性和定量分析了松材线虫和拟松材线虫分泌物中纤维素酶系组分和酶活力。结果表明, 松材线虫和拟松材线虫分泌物中存在完全降解纤维素所需的 3 种酶系组分: 内切- $\beta$ -1, 4-葡聚糖酶、外切- $\beta$ -1, 4-葡聚糖酶和  $\beta$ -葡萄糖苷酶, 松材线虫分泌物中三种酶活力明显高于拟松材线虫酶活力。研究结果为更好的解释松材线虫致病机理提供了科学数据。

**关键词:** 松材线虫; 拟松材线虫; 纤维素酶系; 酶活力

中图分类号: S763

文献标识码: A

## Study on Cellulase and Dispersal Ability from *Bursaphelenchus xylophilus* and *B. mucronatus*

MA Hai-bin<sup>1,2</sup>, LIANG Jun<sup>1</sup>, LÜ Quan<sup>1</sup>, ZHANG Xing-yao<sup>1</sup>

(1. Research Institute of Forest Ecology Environment and Protection, CAF, Key Laboratory of Forest Protection, State Forestry Administration, Beijing 100091, China; 2. Research Institute of Tropical Forestry, CAF, Guangzhou 510520, Guangdong, China)

Beijing 100091, China; 2. Research Institute of Tropical Forestry, CAF, Guangzhou 510520, Guangdong, China)

**Abstract** The secretion cellulase of *Bursaphelenchus xylophilus* and *B. mucronatus* was analyzed while CMC, MC and SC were used to be the cellulose resources for the nematodes secretion degrading. The cellulase activities were tested with staining and DNS methods from *Bursaphelenchus xylophilus* and *B. mucronatus*. The results showed that there were 3 cellulase component in both *B. xylophilus* and *B. mucronatus* secretion: endo- $\beta$ -1, 4-glycanase, exo- $\beta$ -1, 4-glycanase and  $\beta$ -glucosidase. The cellulase activity from *B. xylophilus* was higher than that from *B. mucronatus*. It was inferred that the pathogenicity of *B. xylophilus* was more serious than that of *B. mucronatus* for the reason of the cellulase activity.

**Key words** *Bursaphelenchus xylophilus*; *Bursaphelenchus mucronatus*; cellulose; enzyme activity

松材线虫病, 又称松树萎蔫病、松树枯萎病, 是由松材线虫 (*Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner & Buhner) Nickle) 引起的一种毁灭性松林病害。该病最早于 1905 年在日本发现。20 世纪 80 年代初, 我国在南京中山陵首次发现松材线虫病, 迄今成为我国最为严重的林业外来有害生物<sup>[1]</sup>, 给松材线虫发

生区造成了严重的经济损失和生态环境压力。松材线虫病系统存在复杂的互作关系, 包括松材线虫、寄主松树、媒介天牛、伴生细菌、树栖真菌及环境因素, 目前尚无有效的病害控制措施。松材线虫病体内的病程反应和致病机理尚不清楚, 存在“酶学说”、“毒素”和“空洞化”等致病机理的争议<sup>[2]</sup>。其

收稿日期: 2008-05-04

基金项目: 国家“十一五”科技支撑项目 (2006BAD08A191), 科技部国际合作项目 (2007DFB30270), 国家重点基础研究发展计划 (2002CB111404)

作者简介: 马海宾 (1976—), 男, 回族, 助理研究员, 博士, 研究方向为分子生态森林病理学。

\* 通讯作者: 张星耀, 男, 研究员, 博士生导师。E-mail: yxzhang@caf.ac.cn

中,对纤维素酶在松材线虫病害发生中的作用研究报道较多<sup>[3-5]</sup>,松材线虫分泌蛋白和纤维素酶免疫学检测以区别近似种拟松材线虫(*B. mucronatus* Maniḡa & Kijohera)也取得进展<sup>[6-7]</sup>。上述松材线虫的研究,均把松材线虫分泌的纤维素酶作为一种致病相关酶对待,而纤维素的完全降解,需要多种酶系组分共同作用<sup>[8]</sup>,以往的研究未见报道。

本研究在此前松材线虫纤维素酶定性检测方法的基础上,分别用不同酶系组分对应的底物,检测松材线虫分泌物中的纤维素酶系组分酶活力,意图为解释纤维素酶在松材线虫病害中的作用提供科学证据。

表 1 供试线虫株系

编号	种名	采集地	寄主树种
Bx01	<i>B. xylophilus</i>	浙江	黑松( <i>Pinus thunbergii</i> Parl)
Bx02	<i>B. xylophilus</i>	浙江舟山	马尾松( <i>P. massoniana</i> Lamb)
Bx03	<i>B. xylophilus</i>	广东	马尾松( <i>P. massoniana</i> Lamb)
Bx04	<i>B. xylophilus</i>	广州	马尾松( <i>P. massoniana</i> Lamb)
Bx05	<i>B. xylophilus</i>	台湾	木质包装
Bx06	<i>B. xylophilus</i>	云南晚町	思茅松( <i>P. kesya</i> Royle ex Gordn var <i>langbianensis</i> Gausson)
Bm 01	<i>B. mucronatus</i>	安徽	马尾松( <i>P. massoniana</i> Lamb)
Bm 02	<i>B. mucronatus</i>	广州花都	马尾松( <i>P. massoniana</i> Lamb)
Bm 03	<i>B. mucronatus</i>	辽宁大连	木质包装
Bm 04	<i>B. mucronatus</i>	法国	木质包装

### 1.3 试验方法

1.3.1 线虫及真菌准备 供试菌株选用本研究室分离保存的灰葡萄孢接种在马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)平板培养基上,待菌丝长满平板后备用。供试线虫选用本研究室收集保存的松材线虫和拟松材线虫株系。用混合消毒法对线虫进行表面消毒<sup>[2]</sup>,贝尔曼漏斗法分离,2 000 r·min<sup>-1</sup>离心 5 min或静止 3~4 h弃上清,浓缩收集线虫;以无菌水为介质配成松材线虫液。线虫纯化后于室内用真菌培养繁殖。用无菌水调整线虫液浓度为 1.0×10<sup>6</sup>条·mL<sup>-1</sup>,5℃保存备用。

1.3.2 线虫分泌物纤维素酶液制备及测定 取上述调整好浓度的线虫液,室温下放置 48 h,期间不时摇动,置于 4℃下冰箱保存备用。用 0.1 mol·L<sup>-1</sup>的乙酸-乙酸钠缓冲液(pH 值 4.6)制备分别含有 0.1%羧甲基纤维素钠(CMC)、0.1%微晶纤维素(MC)和 0.1%水杨素(SA),0.5%琼脂糖的平板培养基,凝固后分别滴加松材线虫和拟松材线虫悬液上清液 25 μL,25℃下放置 3 h,恒温培养箱中 45℃温育 6 h,用 0.1%刚果红溶液染色 30 min,再分别

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验材料

松材线虫和拟松材线虫来源见表 1,线虫繁殖用灰葡萄孢(*Botrytis cinerea* Pers)菌株 CXY1201,线虫和真菌菌株保存在中国林科院森环森保所病理室。

### 1.2 主要试剂

羧甲基纤维素钠(CMC,汕头西泷化工厂),微晶纤维素(MC,进口分装),水杨素(SA,北京天佑达生物工程公司)3,5-二硝基水杨酸(DNS,进口分装),其他试剂均为分析纯。

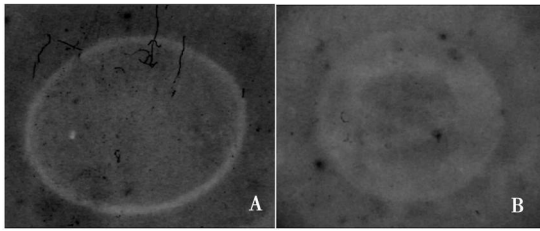
用 1 mol·L<sup>-1</sup>氯化钠漂洗 15 min,5%乙酸漂洗 15 min,自然晾干,拍照观察<sup>[9]</sup>。

吸取待测酶液 200 μL于 2 mL离心管中,分别以 1%的羧甲基纤维素钠(CMC)、微晶纤维素(MC)和水杨素为底物(均用乙酸缓冲液(pH 值 4.6)配制),加入底物 400 μL,50℃水浴保温 1 h,再加入 3 mol·L<sup>-1</sup> NaOH 溶液 400 μL,DNS 试剂 800 μL。颠倒混匀,置沸水浴中 8 min,设空白对照,每处理重复 3 次,取平均值。490 nm 下测定吸光度,并计算还原糖的含量。在以上反应条件下,以每分钟每毫升酶液产生 1 μg 葡萄糖的量为一个酶活性单位<sup>[9]</sup>。

## 2 结果与分析

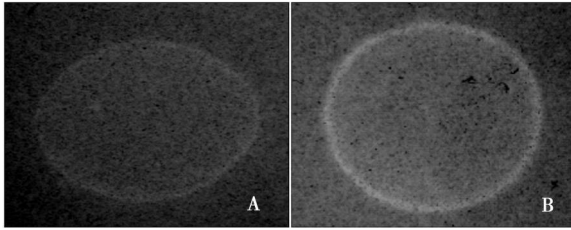
### 2.1 松材线虫和拟松材线虫分泌物中纤维素酶系组分

分别以 0.1%羧甲基纤维素钠(CMC)、0.1%微晶纤维素(MC)和 0.1%水杨素(SA)为底物,定性检测内切-β-1,4-葡聚糖酶、外切-β-1,4-葡聚糖酶和 β-葡萄糖苷酶。酶促反应后刚果红染色 0.5%琼脂糖平板培养基,漂洗后观察拍照,结果如图 1、2、3 所示。



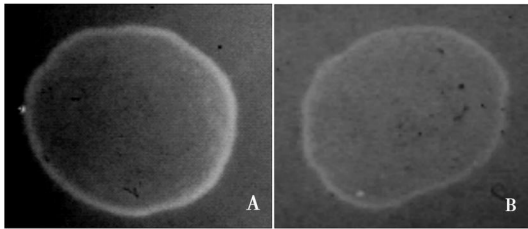
A: 松材线虫 B 拟松材线虫

图 1 松材线虫和拟松材线虫分泌内切-β-1,4-葡聚糖酶的染色图



A: 松材线虫 B 拟松材线虫

图 2 松材线虫和拟松材线虫分泌外切-β-1,4-葡聚糖酶的染色图



A: 松材线虫 B 拟松材线虫

图 3 松材线虫和拟松材线虫分泌外切-β-葡萄糖苷酶的染色图

结果表明,松材线虫和拟松材线虫在人工培养条件下,其分泌物在三种底物上反应后,经刚果红染色后均出现典型的透明圈,说明松材线虫和拟松材线虫均能分泌纤维素酶的三种组分:内切-β-1,4-葡聚糖酶、外切-β-1,4-葡聚糖酶和β-葡萄糖苷酶。

### 2.2 松材线虫和拟松材线虫分泌物中纤维素酶活力

供试的 6 个松材线虫株系分泌物中三类酶活性检测结果见图 4。结果表明, Bx01 株系的内切-β-1,4-葡聚糖酶活性为供试 6 个松材线虫株系中最高,为  $9.36 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ , Bx03 株系内切-β-1,4-葡聚糖酶活性最低,为  $6.76 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ; 外切-β-1,4-葡聚糖酶活性分析结果, Bx01 株系酶活性最高,达到  $6.67 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ , Bx04 株系酶活性最低,为  $4.10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ; 在 β-葡萄糖苷酶活性中, Bx02 株系酶活性最高,为  $7.35 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

$\text{min}^{-1}$ ,酶活性最低的松材线虫株系是 Bx06,仅为  $3.61 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 。酶活性方差分析和多重比较结果见表 2 和表 3,结果表明部分松材线虫株系间酶活性达到极显著差异。

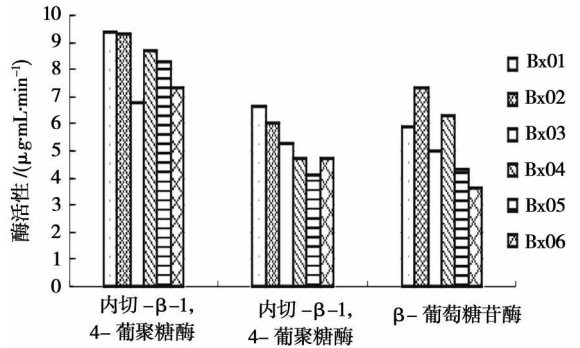


图 4 松材线虫分泌物中纤维素酶活性

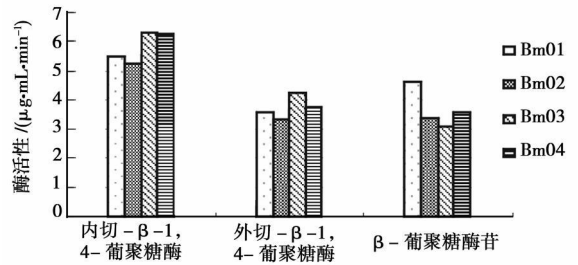


图 5 拟松材线虫分泌物中纤维素酶活性

供试的 4 个拟松材线虫株系分泌物中三类酶活性检测结果见图 5。结果表明,酶活性总体趋势同松材线虫相近,内切-β-1,4-葡聚糖酶活性最高,外切-β-1,4-葡聚糖酶和β-葡萄糖苷酶活性低于前者。其中 Bm03 株系的内切-β-1,4-葡聚糖酶活性是供试 4 个拟松材线虫株系中最高, Bm02 株系内切-β-1,4-葡聚糖酶活性最低,为  $5.25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ; 外切-β-1,4-葡聚糖酶活性分析结果, Bm03 株系酶活性最高,达到  $4.22 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ , Bm02 株系酶活性最低,为  $3.32 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ; 在 β-葡萄糖苷酶活性中, Bm01 株系酶活性最高,为  $4.63 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ,酶活性最低的松材线虫株系是 Bm03 仅为  $3.10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 。酶活性方差分析和多重比较结果见表 2 和 3 结果表明,仅拟松材线虫株系 Bm02 内切-β-1,4-葡聚糖酶活性同 Bm03 和 Bm04 间达到显著差异,外切-β-1,4-葡聚糖酶和β-葡萄糖苷酶活性各拟松材线虫株系间差异均不显著。

表 2 不同线虫株系分泌纤维素酶活性的方差分析

比较指标	变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	显著水平
内切-β-1,4-葡聚糖酶	处理间	0.126 1	9	0.014 1	22.62	< 0.01
外切-β-1,4-葡聚糖酶	处理间	0.048 1	9	0.005 4	5.31	< 0.01
β-葡萄糖苷酶	处理间	0.096 2	9	0.010 7	11.13	< 0.01

表 3 不同线虫株系分泌纤维素酶活性的多重比较

线虫株系	酶活性 ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ )			5% 显著水平			1% 显著水平		
	内切- $\beta$ -1, 4- 葡聚糖酶	外切- $\beta$ -1, 4- 葡聚糖酶	$\beta$ -葡萄糖 苷酶	内切- $\beta$ -1, 4- 葡聚糖酶	外切- $\beta$ -1, 4- 葡聚糖酶	$\beta$ -葡萄糖 苷酶	内切- $\beta$ -1, 4- 葡聚糖酶	外切- $\beta$ -1, 4- 葡聚糖酶	$\beta$ -葡萄糖 苷酶
Bx01	9.36	6.67	5.86	a	a	bc	A	A	ABC
Bx02	9.29	6.02	7.35	ab	a	a	A	A	A
Bx03	6.76	5.27	5.02	cd	ab	cd	CD	AB	BCD
Bx04	8.68	4.72	6.29	ab	abc	ab	A	ABC	AB
Bx05	8.30	4.10	4.34	b	bcd	de	AB	BC	CD
Bx06	7.33	4.74	3.61	c	abc	e	BC	ABC	D
Bm 01	5.48	3.60	4.63	ef	cd	cde	DE	BC	BCD
Bm 02	5.25	3.32	3.36	f	d	e	E	C	D
Bm 03	6.32	4.22	3.10	de	bcd	de	CDE	ABC	D
Bm 04	6.26	3.75	3.59	de	cd	e	CDE	BC	D

注: 平均值后带有相同字母表示差异不显著。

### 3 讨论

纤维素是植物细胞壁的主要成分, 对植物具有支持和保护作用, 在木材中大约占 40% ~ 45%<sup>[10]</sup>。前期研究表明, 松材线虫可向体外分泌多种酶, 其中纤维素酶作为导致松树萎蔫的重要酶, 在松材线虫致病过程中发挥重要作用, 并且曾经有对松材线虫组织提取液中纤维素酶研究报道<sup>[5, 11]</sup>。纤维素的完全降解, 需要内切- $\beta$ -1, 4-葡聚糖酶、外切- $\beta$ -1, 4-葡聚糖酶和  $\beta$ -葡萄糖苷酶三类酶的协同作用。以往研究集中于对松材线虫分泌的纤维素酶定性分析, 没有对纤维素完全降解所需的三类酶组分分别进行分析。本研究是建立在线虫离体培养基基础上的初步结果, 是否在罹病松树体内松材线虫分泌纤维素酶的特征同离体条件下完全一致, 有待于今后进一步研究。

传统观点一度认为动物自身不能产生纤维素酶, 而是依赖于与其共生的微生物产生纤维素酶, 降解食物中的纤维素<sup>[12]</sup>。然而, 随着白蚁和线虫可以分泌内源性的内切- $\beta$ -1, 4葡聚糖酶的报道, 及相关基因的分离和克隆, 上述问题已被科学家重新认识<sup>[13-14]</sup>。因此, 作者提出类似的问题: 松材线虫分泌的纤维素酶是否是完整降解纤维素的酶系呢? 从试验结果来看, 一方面证实了前人研究松材线虫和拟松材线虫均能分泌纤维素酶, 另一方面说明松材线虫和拟松材线虫分泌的纤维素酶包括了完整的三类酶, 不过拟松材线虫分泌的纤维素酶活力低于松材线虫的纤维素酶活力。这为合理解释拟松材线虫弱性提供了科学依据。

### 参考文献:

- [1] 张星耀, 骆有庆. 中国森林重大生物灾害 [M]. 北京: 中国林业出版社, 2003
- [2] 杨宝君, 潘宏阳, 汤 坚, 等. 松材线虫病 [M]. 北京: 中国林业出版社, 2003
- [3] Odani K, Sasaki S, Nishiyama Y, et al. Early symptom development of the pine wilt disease by hydrolytic enzymes produced by the pine wood nematode cellulase as a possible candidate of the pathogen [J]. Journal of Japan Forestry Science 1985, 67(9): 366-372
- [4] Kojima K, Kamijyo A, Masumori M, et al. Cellulase activities of pine wood nematode isolates with different virulences [J]. Journal of Japan Forestry Science 1994 76(3): 258-262
- [5] 严东辉, 杨宝君. 松材线虫体外酶组成分析 [J]. 林业科学研究, 1996, 10(3): 265-269
- [6] Lawler C, Joyce P, Hamley M. Immunological differentiation between *B. xylophilus* and *B. mucronatus* [J]. Nematologica 1993 39: 536-546
- [7] 曹 宇, 李海燕, 马洪周, 等. 免疫磁性捕获 ELISA 技术在松材线虫检测中的应用 [J]. 林业科学研究, 2005 18(5): 585-589
- [8] Béguin P, Aubert J. The biological degradation of cellulose [J]. FEMS Microbiol Rev. 1994, 13: 25-58
- [9] 索凤梅, 林长春, 王浩杰, 等. 松墨天牛纤维素酶的研究 I 纤维素酶性质研究 [J]. 林业科学研究, 2004, 17(5): 583-589
- [10] 戈进杰. 生物降解高分子材料及其应用 [M]. 北京: 化学出版社, 2002
- [11] 张 奇, 李海燕, 白 钢, 等. 松材线虫纤维素酶的免疫学分析 [J]. 林业科学, 2007, 43(2): 64-67
- [12] Watanabe H, Noda H, Tokuda G. A cellulase gene of termite origin [J]. Nature, 1998, 394: 330-331
- [13] Wang Ji, Ding Ming, Li Yi, et al. Isolation of a Multifunctional Endogenous Cellulase Gene from *Mollusc, Ampullaria crosseana* [J]. Acta Biochimica et Biophysica Sinica 2003 35(10): 941-946
- [14] Snant G, Stokkeman J, Yan Y, et al. Endogenous cellulases in animals: isolation of  $\beta$ -1, 4-endoglucanase genes from two species of plant parasitic cyst nematodes [J]. Proc Natl Acad Sci, USA, 1998 95: 4906-4911