

酚(天津北联精细化学)、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (天津市盛奥化学)、 $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (天津市百世化工)、无水亚硫酸钠(天津市盛奥化学)、3,5-二硝基水杨酸(天津市光复精细化工)、柠檬酸钠(天津永晟精细化工)、羧甲基纤维素钠(上海阿拉丁生化科技股份有限公司)。

1.1.3 培养基 KB 培养基: K_2HPO_4 1.5 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5 g、甘油 10.0 g、蛋白胨 20.0 g、蒸馏水 1.0 L(KBA 培养基再加入琼脂 10.0 g)。

1.1.4 仪器 恒温水浴锅、UV-1800 紫外可见分光光度计、高压灭菌锅、移液枪、电热恒温干燥箱、数显控温振荡器、离心管、25 mL 比色管、烧杯、三角瓶、容量瓶、离心机。

1.2 方法

1.2.1 哈密瓜细菌性果斑病生长曲线测定 哈密瓜细菌性果斑病在 KBA 固体平板上进行活化,28 ℃ 培养 48 h 后,用无菌水稀释配置菌悬液,吸取 1 mL 菌悬液接入 100 mL 的 KB 培养液中,重复 3 次,在 28 ℃,220 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 条件下培养,分别测定 20、24、28、32、36、40、44、48、52、56、60、64、68 和 72 h 的 OD_{600} 值,以时间为横坐标, OD_{600} 为纵坐标,绘制生长曲线。

1.2.2 果胶酶活力测定 按 1.2.1 的方法配置、培养菌悬液,分别测定培养 20、24、28、32、36、40、44、48、52、56、60、64、68 和 72 h 菌悬液中果胶酶。

在甲、乙两支 25 mL 刻度试管中先分别加入 5 mL 果胶底物,50 ℃ 水预热 5 min,然后分别加 4 mL 磷酸-柠檬酸缓冲液,甲管中加入 1 mL 在 KB 培养基中培养的细菌悬浮液,摇匀后立即放入 50 ℃ 水浴中准确反应 30 min,取出后立即沸水浴 5 min,然后冷却;在乙管中加 1 mL 细菌培养液,摇匀后立即放入沸水浴中 5 min,终止反应,冷却;分别吸取甲、乙两管中的反应液各 2 mL,放入另外两支 25 mL 刻度试管中,分别加入 2 mL 蒸馏水,5 mL 的 DNS 试剂,充分混匀后,在沸水浴中煮沸 5 min 后,立即冷却,并用蒸馏水定容至 25 mL,3 600 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 8 min,取上清液,在 540 nm 处测吸光度,以 5 mL 的 DNS 加蒸馏水定容 25 mL 基准调零^[8]。

酶活力计算:在适宜条件下,1 mL 菌悬浮液分解果胶 1 h 产生 1 mg 半乳糖醛酸为一个酶活

单位,即 U。

$$X = [(A_{\text{甲}} - A_{\text{乙}}) \times Dr \times 5] / [K \times t]$$

式中, $A_{\text{甲}}$ 为处理吸光度; $A_{\text{乙}}$ 为空白对照的吸光度; K 为标准曲线斜率;5 为所测体积占反应液总体积的 1/5; Dr 为稀释倍数; t 为反应时间(h)。

1.2.3 纤维素酶活性测定 取 1 mL 在 KB 培养基中培养的细菌悬浮液,沸水浴 5 min,冷却加 3 mL 0.5% 的 CMC,作为空白管。另取一支比色管,依次加入 0.5% 的 CMC 3 mL,1 mL 细菌悬浮液,混匀后与空白管同时放于 50 ℃ 水浴锅中水浴 30 min 后,立即沸水浴煮沸 10 min,冷却后加入 3 mL 显色液,再沸水浴煮沸 10 min,冷却后用蒸馏水定容至 25 mL 刻度处,测 OD_{540} 值^[8]。

酶活力:在上述条件下,纤维素水解 1 min 生成 1 μg 葡萄糖的酶量定为一个活力单位($\mu\text{g} \cdot (\text{mL} \cdot \text{min})^{-1}$)。

$$\text{纤维素酶活力单位} = \frac{N \times \text{OD 值对应的葡萄糖量}}{30 \times 1}$$

式中: N 为酶液的稀释倍数;30 为酶样反应时间;1 为反应酶液毫升数。

2 结果与分析

2.1 生长曲线的变化

细菌性果斑病在 20 h 的 OD_{600} 值达到 1.659,44 h 时细菌生长达到高峰的 OD_{600} 值达到 2.210,说明从接种到 44 h 过程中细菌生长呈明显的上升趋势,细菌生长处于生长期,44 h 过后,细菌生长明显呈下降趋势,但细菌数量 OD_{600} 值仍然稳定在 2.060 以上,说明 44~72 h 处于细菌生长的衰退期。

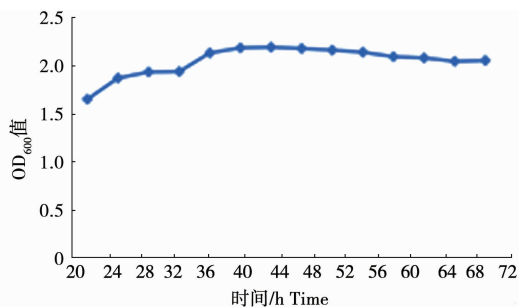


图 1 生长曲线变化

Fig. 1 The change diagram of growth curve

2.2 果胶酶的变化

果胶酶活性在 20~72 h 总体呈上升趋势,在 44 h 果胶酶活性达到最高 12.79 $\text{U} \cdot (\text{mg} \cdot \text{h})^{-1}$,在

28 h 果胶酶活性最低,为 $3.36 \text{ U} \cdot (\text{mg} \cdot \text{h})^{-1}$,在 20~28 h、44~52 h、64~72 h 三个时间段出现果胶酶活性下降的趋势,28~44 h 呈爬坡式上升趋势,52~72 h 果胶酶活性呈震荡趋势。

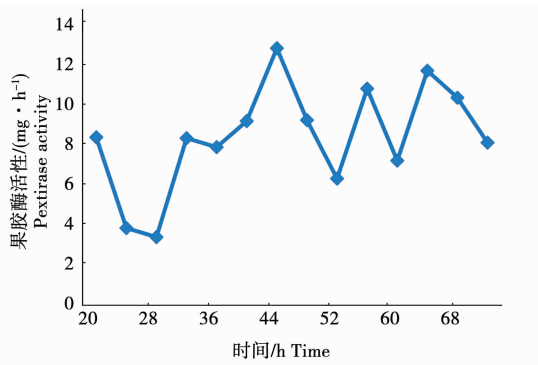


图2 果胶酶活性的变化

Fig. 2 Change of pectinase activity

2.3 纤维素酶的变化

纤维素酶活性在 20~72 h 总体呈上升趋势,在 72 h 纤维素酶活性达到最高,为 $23.96 \mu\text{g} \cdot (\text{mL} \cdot \text{min})^{-1}$,在 20~60 h 出现纤维素酶活性的次高峰 17.33 和 $17.06 \mu\text{g} \cdot (\text{mL} \cdot \text{min})^{-1}$;在 24 h 果胶酶活性最低 $13.06 \mu\text{g} \cdot (\text{mL} \cdot \text{min})^{-1}$,次低峰出现在 48 h 果胶酶活性达到 $13.37 \mu\text{g} \cdot (\text{mL} \cdot \text{min})^{-1}$,纤维素酶测定时间段在 20~44 h 呈现震荡上升趋势,44 h 达到最大,在 44~48 h 出现果胶酶活性下降的趋势,随后在 48~72 h 呈爬坡式上升趋势。

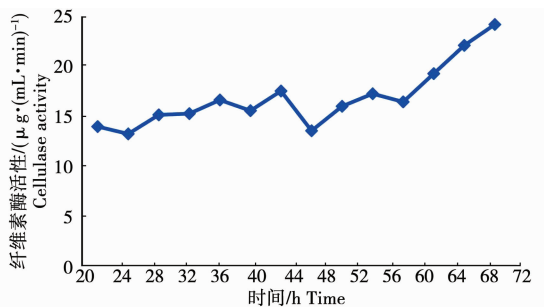


图3 纤维素酶活性变化

Fig. 3 Change of cellulase activity

3 结论与讨论

植物细胞壁由纤维素、半纤维素和果胶质等物质组成,前二者是细胞壁的主要成分,果胶位于细胞的外部,是细胞壁连接的成分^[9]。果胶酶和纤维素酶对于离析和降解细胞具有重要作用,现有研究表明细菌性病菌所产生的纤维素酶会影响病害发展速度,果胶酶是病菌迅速侵入植物根系和体内定植所必需的^[10]。

本试验研究表明哈密瓜果斑病病菌会产生果胶酶和纤维素酶,说明该病菌在侵染初期的致病力跟这两个酶活性有关。结合病菌生长曲线和两个酶活性曲线走势来看,随着时间增长,病菌快速生长,但果胶酶未呈现明显增长趋势,而纤维素酶随细菌的生长进入衰退期后活性逐渐增加,这一研究结论与罗焕亮^[9]和朱圣杰^[10]的研究一致,说明在病害侵入植物后,在侵染初期果胶酶和纤维素酶联合作用,在侵染 44 h 后果胶酶和纤维素酶同时出现有波峰,而后期 44~72 h 果胶酶再没有出现大幅增大趋势,但纤维素酶呈明显上升趋势,说明病害后期扩展纤维素酶起到了主要作用,这与人工接种法盆栽试验 3 d 后会发现叶片有明显水浸状、细胞坏死症状相佐证。因此,纤维素酶是在哈密瓜细菌性果斑病对哈密瓜侵染过程中的一个重要因子。本试验仅对病菌胞外酶、果胶酶和纤维素酶进行了 3 d 测定,然而哈密瓜细菌性果斑病致病力不仅仅与纤维素酶和果胶酶有关,还与其它胞外酶以及纤维素酶相关因子有关,其它方面都有待于进一步深入研究。

参考文献:

- [1] 2015 年全国各地蔬菜、西瓜、甜瓜、草莓、马铃薯播种面积和产量[J]. 中国蔬菜, 2017 (1): 18.
- [2] 陈功友,王金生. 植物病原细菌致病性决定因子[J]. 植物病理学报, 2002, 32(1): 1-7.
- [3] Lund B M. Symposium on microbial changes in foods. Bacterial spoilage of vegetables and certain fruits[J]. Appl Bacteriol, 1971, 34(1): 9-20.
- [4] 张菊,薛永常. 细菌果胶酶的研究进展[J]. 生物技术通报, 2011(2): 56-60.
- [5] 陈冠军,杜宗军,高培基. 耐碱性真菌纤维素酶生产菌的筛选及酶学性质的初步研究[J]. 工业微生物, 2000, 30(4): 23-27.
- [6] 赵其龙. 西瓜细菌性果斑病菌突变文库的构建及纤维素酶活性突变体的筛选[D]. 福州: 福建农林科技大学, 2013.
- [7] 朱圣杰,赵亚兰,王学东. 青枯菌胞外酶活性与致病性之间的关系初探[J]. 河套大学学报, 2008, 5(4): 13-15.
- [8] 王玉琴. 甘肃省番茄细菌性叶斑病的研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2015.
- [9] 罗焕亮,王军,张景宁. 青枯菌胞外酶对木麻黄的致病作用研究[J]. 森林病虫害通讯, 1998(3): 1-2.
- [10] 朱圣杰. 番茄抗青枯病生理生化机制的研究[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2004.

苯酚对小白菜幼苗株高及生理特性的影响

刘挺君,李君昭,洪若晖,张建民
(山东大学 海洋学院,山东 威海 264209)

摘要:为了探究苯酚富集的危害,以小白菜为材料,用不同浓度(0、10、20、30、40、50、60 mg·L⁻¹)苯酚溶液浇灌小白菜幼苗,分析由此产生的各种生物学效应。结果表明:苯酚会抑制蛋白质的合成;低浓度苯酚溶液会刺激可溶性糖的合成,当苯酚溶液浓度为 30 mg·L⁻¹时最明显;苯酚能抑制核酸的合成,在浓度为 30 mg·L⁻¹时细胞内核酸含量明显降低;同样,苯酚也能够抑制叶绿素的合成,从而使小白菜光合作用减弱,从而表现出随着苯酚浓度的升高,小白菜幼苗株高逐渐降低。

关键词:苯酚;小白菜;幼苗株高;生物学效应

中图分类号:S634.3 文献标识码:A 文章编号:1002-2767(2017)11-0033-04 DOI:10.11942/j.issn1002-2767.2017.11.0033

苯酚用途很广,但有毒,易与细胞原浆中的蛋白质反应,使细胞变性甚至凝固。对鱼类、植物、人类具有三致(致畸、致癌、致死)效应^[1]。由于其危害性严重,美国试验材料环保署将其列入优先污染物和 65 种有毒污染物名单,同时也被我国列入中国环境优先污染物名单^[2]。苯酚及苯酚衍生物在水体和土壤中的大量排放,污染了水体和土壤,对农作物造成严重危害。并且农作物的富集作用将苯酚危害扩大到生物链与食物链中,最终影响人类的生存、健康、繁衍。苯酚对人体的局部损害主要是可深入内部组织,刺激脊髓,侵犯神经中枢,最终导致全身中毒^[3-4]。小白菜作为一种叶菜类蔬菜^[5],具有很高的营养价值,本文以小白菜为试验材料研究苯酚对小白菜幼苗早期生长及生理特性的影响。

收稿日期:2017-09-14
第一作者简介:刘挺君(1997-),女,辽宁省丹东市人,在读学士,从事分子生物学研究。E-mail:792896550@qq.com。
通讯作者:张建民(1958-),男,山东省单县人,教授,从事分子生物学研究。E-mail:zhangjianmin@sdu.edu.cn。

Determination of Extracellular Enzyme Activity of Hami Melon Bacterial Fruit Blotch

MAO Liang¹, WU Jiu-yun², JI Yan-ling¹, PAN Wei-ping¹, ZHANG Yi-he¹, WANG Xiao-dong³
(1. Xinjiang Turpan Agricultural Technology Promotion Center, Turpan, Xinjiang 838000; 2. Turpan Research Institute of Agricultural Sciences, Xinjiang Academy of Agricultural Sciences, Turpan, Xinjiang 838000; 3. Key Laboratory of Oasis Crop Disease Control and Prevention, Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832000)

Abstract: In order to prevent the initial Hami melon bacterial fruit spot infection, through the determination of pathogen bacteria growth curve of melon bacterial fruit blotch, extracellular enzymes pectinase change, extracellular cellulase change, the law of extracellular enzyme pectinase and cellulose was mastered in the early stages of infection of melon bacterial fruit blotch. The results showed that pectinase and cellulase were produced by bacterial fruit blotch of melon, which indicated that pathogenicity of the pathogen was related to the activities of these two enzymes at the initial stage of infection. With the growth curve of bacteria, the pectinase did not show obvious trend, but the activity of cellulase increased gradually after the growth of bacteria entered the recession period. Both pectinase and cellulase appeared peaks at the same time in 44 h, but there was no significant increase in pectinase in the late 44 h to 72 h, cellulase showed an obvious upward trend, indicating that cellulase plays a major role in the late growth of the disease.

Keywords: Hami melon; bacterial fruit blotch; enzyme activity; pathogenicity