

柞蚕杀菌肽对桉树青枯病假 单胞菌的杀菌作用*

张景宁¹ 张清杰^{2**} 黄自然² 谭石慈⁵ 郭周仪³ 戴祝英⁴

(1华南农业大学林学院; 2华南农业大学蚕桑系, 广州, 510642; 3华南师范大学; 4南京师范大学)

摘要 桉树、木麻黄青枯病是广东省林业主要病害, 近年为害猖獗导致严重损失。本文报道柞蚕杀菌肽D对桉树、木麻黄青枯病假单胞菌(*Pseudomonas solanacearum*)的杀菌作用。以荧光黄染料偶联的杀菌肽作用于青枯病假单胞菌, 用电镜及激光共焦扫描显微镜观察, 发现杀菌肽能迅速地将菌体包围, 作用于细胞膜, 造成许多小孔并进入胞内, 尔后损伤的小孔扩大形成喇叭口, 内含物由此泄出胞外, 最后菌体变成空囊而死亡。

关键词 柞蚕; 杀菌肽; 桉树; 青枯病; 假单胞菌

中图分类号 S885.1

桉树、木麻黄是我国南方主要造林树种, 对沿海防护林带建设及生态环境的改善有重要作用, 桉树又是高产速生的造纸原料。近年由于青枯病的猖獗为害, 大量幼林青枯死亡, 造成严重损失。木麻黄青枯病也威胁着沿海防护林带。当前, 已通过桉树抗青枯病品种的选育并依靠微繁大量繁殖苗木供生产种植, 这些品种对青枯病菌虽有一定抗病力, 但仍未能解决栽培过程中感染为害。为此探索抗病基因转导技术, 以图通过基因工程获得抗青枯病的桉树品种。

柞蚕杀菌肽是一类广谱性的杀菌多肽。注射大肠杆菌于柞蚕(*Antheraea pernyi*)蛹, 诱导免疫产生杀菌肽, 对113种细菌有杀灭作用(黄自然等, 1986; 李文楚等, 1991)。本文研究柞蚕杀菌肽对桉树、木麻黄青枯病假单胞菌的杀灭作用。为今后将杀菌肽基因导入桉树培育抗病品种打下基础。

1 材料与方法

1.1 菌种及柞蚕品种

大肠杆菌(*Escherichia coli*) K12D31。由瑞典斯德哥尔摩大学 Boman 教授赠送, 华南农业大学蚕桑系保存。桉树青枯病假单胞菌(*Pseudomonas solanacearum*) E109、E77、E125 及 E88 均自湛江地区病树分离而得; 木麻黄青枯病假单胞菌(*P. solanacearum*) 木 4。均由华南农业大学林学院森林保护教研室保存及供用。

柞蚕品种青黄一号, 由河南省南召县河南蚕业试验场供应。

1.2 方法

1.2.1 柞蚕蛹免疫血淋巴制备及杀菌肽 D 的分离纯化

柞蚕滞育蛹, 每头注射大肠杆菌

1994-06-20 收稿

*国家自然科学基金资助项目。

**现在广东省生物技术研究所有工作。

K12 D31 50 μL 。内含 1×10^7 个活菌,置 $25 \sim 28^\circ\text{C}$ 诱导 3 d。从蛹头部剪开收集血淋巴,同时加入 0.02% 苯基硫脲。置沸水浴中加热 30 min,速冷至 4°C , 12 000 r/min 离心 30 min,取上清液,即为含杀菌肽血淋巴。杀菌肽 D 的分离纯化和鉴定按戴祝英等(1988)的方法进行。冷冻干燥保存作为杀菌肽 D 制剂。用 15% 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测其纯度。按 Hultmark 等(1980)方法检测其杀菌活力。

1.2.3 杀菌肽 D 与荧光黄染料偶联 荧光黄(Fluorescent Yellow)染料溶解于 pH9.5、0.025 mol/L 碳酸盐缓冲液中,每 1 mL 加入 1 mg 杀菌肽 D 或等体积免疫血淋巴,混匀,室温下电磁搅拌 1 h 以充分偶联标记。然后移入预先用 pH9.5、0.025 mol/L 碳酸盐缓冲液饱和的 Sephadex G-50 层析柱中,用同一缓冲液洗脱,收集活性分部,用 Hultmark(1980)方法测定杀菌肽活力。在荧光显微镜下以 490 nm 激发光,观察杀菌肽对细菌的作用。

1.2.4 柞蚕杀菌肽对青枯病假单菌的杀菌作用的观察 桉树青枯病及木麻黄青枯病菌,供试浓度为 1×10^{10} 个/L。待测菌液中分别加入 $2 \sim 40 \mu\text{g/mL}$ 杀菌肽 D,对照菌加入无菌水, 28°C 下温育,每隔一定时间取出菌液测定残余活菌数。同时制成电镜及临时标本供观察用。

荧光显微镜为日本 Olympus 厂制品,激发光 490 nm,用黄色滤光目镜;电镜为日本 JEM-100CXII 型,按常规方法固定及制样。激光共焦扫描显微镜(Laser Scanning Confocal Imaging Microscopy, BIO-RAD Co 产品:氦离子激光波长为 514.5 nm,由华南师范大学激光生命科学研究所提供使用。

2 结果

2.1 柞蚕杀菌肽的纯化及荧光黄偶联

注射大肠杆菌于滞育柞蚕蛹,收集血淋巴,用平板孔穴法测定其杀菌活力,每孔穴注入 5 μL 免疫血淋巴,对大肠杆菌及桉树青枯病假单胞菌均形成 13 ~ 14 mm 的抑菌圈。

用 CM Sepharose CL 6B 凝胶层析及洗脱,收集活性分部,见图 1。将杀菌肽粗提物通过 Phenyl Sepharose CL 4B 凝胶层析,收集活性分部,见图 2。收集活性物透析除盐,用 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳,获得单一区带,测定其分子质量为 4000 u,见图 3。

杀菌肽 D 与荧光黄染料偶联后,用 Sephadex G-50 除去未标记的游离染料,经 Hultmark 法测定其对大肠杆菌抑菌圈直径为 13 mm 以上,说明荧光黄染料偶联的杀菌肽并不影响其杀菌活力。

2.2 柞蚕杀菌肽 D 对桉树青枯病菌杀菌的动力学规律

供试青枯病假单胞菌的浓度为 10^{10} 个/L。在 1 mL 菌液中分别加入 $2 \sim 40 \text{ mg/L}$ 的杀菌肽 D,在不同的作用时间分别取样以检测其残留的活菌数,以了解杀菌肽 D 杀菌活力的动力学进程,结果见图 4。提示杀菌肽 D 对青枯病菌的有效浓度为

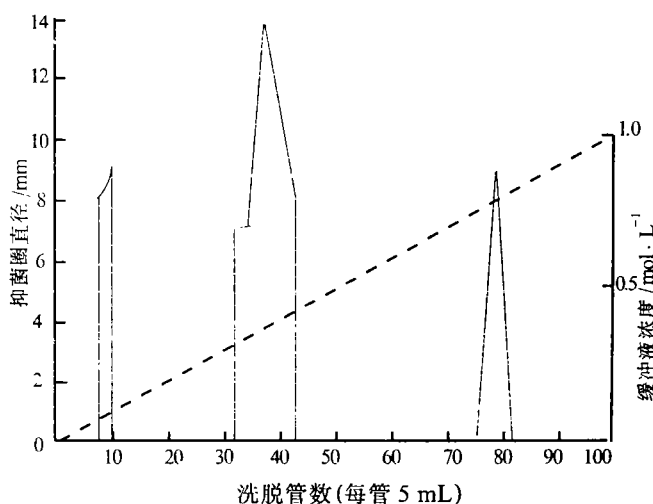


图1 柞蚕免疫血淋巴中杀菌肽 D 的分离图
将第 32 ~ 44 管合并为杀菌肽 D 组份,抑菌圈直径 13mm

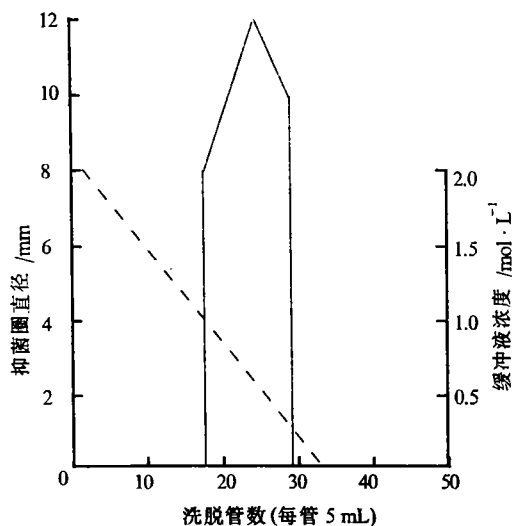


图 2 柞蚕免疫血淋巴中杀菌肽 D 的纯化图
将第 18 ~ 30 管合并为纯化杀菌肽 D,
抑菌圈直径 14 mm.

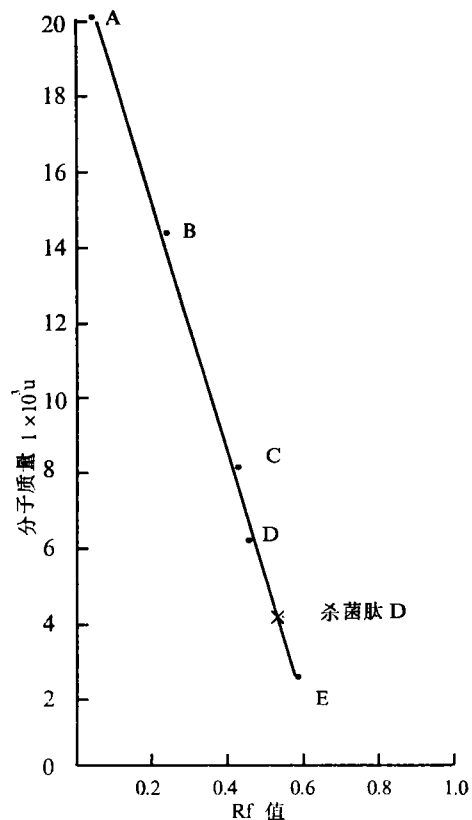


图 3 柞蚕杀菌肽分子质量 D 的分子质量测定
A: 肌红蛋白 MW 19649 u; B: 肌红蛋白
I + II, 14404; C: 肌红蛋白 I 8659; D: 肌红蛋白
II, 6214; E: 肌红蛋白 III, 2512. X: 柞蚕杀菌肽 D.
分子质量 4 000 u.

10 mg/L. 在有效浓度的前提下随着作用时间的延长, 杀菌效果愈佳. 在 100 ~ 120 min 范围内达到完全杀灭的效果. 将杀菌肽 D 的有效浓度 (mg/L), 杀菌持续时间 (min) 及残存活菌数 (个/L) 等 3 个因子的动力学进程计算机模拟. 结果提示对桉树青枯病菌的效果 (残存活菌数) 的相关函数为:

$$Z = 9.445 - 0.032X - 0.096Y + 0.0002Y^2$$

Z: 残存活菌数 (对数); X: 杀菌肽 D 浓度 (mg/L);

Y: 杀菌肽 D 作用时间 (min).

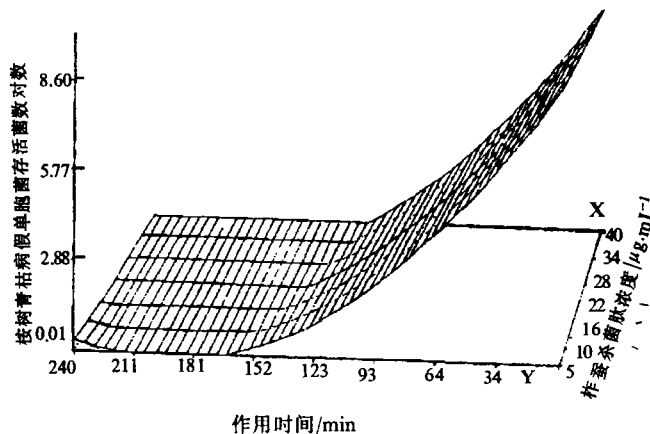


图 4 柞蚕杀菌肽 D 对桉树青枯病假单胞菌作用
的动力学立体图

X: 杀菌肽浓度 (mg/L)

Y: 作用时间 (min)

Z: 残存活菌数 (个/L · 对数)

2.3 柞蚕杀菌肽 D 对桉树青枯病假单胞菌的杀菌机理

用扫描电镜观察结果: 对照菌呈杆状或短杆状, 两端钝圆, 胞膜边缘清晰, 内含物分布均匀, 图版 I-1 杀菌肽 D 作用 10 ~ 20 min, 菌体周缘出现不规则的凹陷, 进而形成分布不均匀的小孔. 尔后, 损伤的小孔扩大局部形成缺口, 内含物从缺口中泄出, 见图版 I~2, 3. 当作用 30 min 后损伤的孔口加大内含物大量泄出, 菌体变成空囊乃至崩坏而死亡.

见图版 I~4。以上结果与李文楚等(1991)对番茄青枯病菌及董春等(1992)对水稻白叶枯病菌的作用相似。说明杀菌肽 D 对革兰氏阴性细菌作用的靶组织首先是造成细胞膜的损伤。

用激光共焦扫描显微镜观察结果:对照菌胞膜完整,内含物均匀,层次清晰,图版 I~5。荧光黄染料偶联的杀菌肽 D 作用 10 min 后,可见黄色荧光物质包围于菌体周缘,少数进入菌体内部。通过调节激光焦点,清晰地看到杀菌肽 D 对青枯病菌细胞膜有强的亲和作用。它是先从胞膜上造成小孔,并使胞膜变薄、凹陷,造成伤口而渗入,尤以菌体两端为多;当小孔损伤扩大后内含物从此喇叭处泄出胞外,菌体遂变成空囊而死亡,见图版 I~6。

3 讨论

柞蚕杀菌肽族是一种由 35~37 个氨基酸残基组成的多肽,具有广谱杀菌作用,除已报道之外(黄自然,1986),最近对发现对 15 种热带作物病原细菌(李文楚,1994)及柑桔溃疡病黄单胞菌及黄龙病类细菌(Bacterial Like Organism)均有杀灭作用;韩爱萍等(1993)对妇科病阴道毛滴虫(*Trichomonas vaginalis*)及宫颈癌细胞有杀伤作用和抑制生长效应。说明柞蚕杀菌肽除细菌外,对原生动物及癌细胞均有作用。

本试验用荧光黄染料偶联杀菌肽 D,结合激光共焦扫描显微镜直接连续观察到杀菌肽将细菌包围,作用的靶子是细胞膜,在短时间内(5~10 min)造成胞膜凹陷、穿孔,荧光标记的杀菌肽进入膜内,进而受损的小孔扩大,内容物泄出而造成死亡。而杀菌肽如何将菌体细胞膜破坏,应作进一步的观察与研究。

杀菌肽 D 对桉树、木麻黄青枯病假单胞菌有明显的杀灭作用的基础上,我们正用人工合成的杀菌肽 D 基因(徐飞等,1988)及新近由柞蚕蛹分离的杀菌肽 B 基因以建立适合的载体系统,对桉树外植体如叶盘等作转基因试验,以图获得抗青枯病的新品系,为本植物转基因技术开辟新途径。

参 考 文 献

- 李文楚,卢铿明,黄自然,等.1991.柞蚕抗菌肽 D 杀菌机理研究.蚕业科学,17(3):163~168
- 李文楚,张家明,温刘发,等.1994.柞蚕抗菌肽对热带作物病原细菌的杀菌作用.热带作物学报,15(1):97~102
- 徐 飞,施 文,王启松,等.1988.柞蚕抗菌肽 D 基因的合成.科学通报,21:165~59
- 董 春,何汉生,王润华,等.1992.柞蚕抗菌肽对水稻白叶枯病菌的抑菌作用.华南农业大学学报,13(4):58~62
- 黄自然,郑庭辉,梁怡章,等.1986.柞蚕抗菌肽的抑菌效应.科学通报,14:1107~1109
- 韩爱萍,涂 冰,彭朝晖,等.1993.柞蚕杀角肽 D 对宫颈癌细胞及阴道毛滴虫生长的抑制作用.生物化学杂志:全国第 8 届生物化学学会年会论文集,83
- 戴祝英,张双全.1988.大肠杆菌诱导家蚕蛹免疫血淋巴中抗菌物质的分离、纯化与鉴定.南京师范大学学报(自然科学版), (1):88~93
- Hultmark D, Steiner H, Rasmuson H, et al. 1980. Insect immunity: Purification and properties of three inducible bactericidal proteins from haemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*. Eur J Biochem.106:7~16

THE BACTERICIDAL EFFECT OF ANTIBACTERIAL PEPTIDE FROM CHINESE OAK SILKWORM, *Antheraea pernyi* ON THE BACTERIAL WILT OF EUCALYPTUS

Zhang Jingning¹ Zhang Qingjie² Huang Ziran²
Tan Shici³ Guo Zhouyi³ Dai Zhuying⁴

(1 College of Forestry; 2 Dept. of Sericulture, South China Agr. Univ.,
Guangzhou, 510642; 3 South China Normal Univ., 4 Nanjing Normal Univ.)

Abstract

The bacterial wilt (*Pseudomonas solanacearum*) of eucalyptus (*Eucalyptus tereticornis*) and equisetum (*Casuarina equisetifolia*) are important diseases in South China. This paper reports the bactericidal effect of antibacterial peptide from the Chinese oak silkworm (*Antheraea pernyi*) on the pathogens of bacterial wilt of eucalyptus and equisetum. Antibacterial peptide was induced in Chinese oak silkworm pupae by injecting *Escherichia coli* K12D31. Antibacterial peptide was purified from the haemolymph with CM-Sephrose CL-B6 and phenyl sepharose 4B. The purified antibacterial peptide had a molecular mass of a substance of 4000 u and was labelled with fluorescent yellow. The pathogens were treated with 10 mg/L of antibacterial peptide and observed under the scanning electron microscopy and laser scanning confocal imaging system to study how the antibacterial peptide inhibited and killed the bacteria. The result showed that the primary target was the cell membrane. the fluorescent substances aggregated surrounded and embraced the surface of the bacterial membrane. then permeated into the cell and destroyed the membrane. Some small channels were found on the surface of the cell, the intracellular substances were forced out of the cell and finally the cell became empty and died.

Key words Chinese oak silkworm; bacterial wilt; eucalyptus; bactericidal effect;
Pseudomonas solanacearum

