

植物内生菌醇提取物对大豆凝集素的作用

陈 珣, 杨 镇, 肖 军, 龚 娜, 王 娜, 王 红, 肇 莹, 杨 涛

(辽宁省农业科学院 微生物工程中心, 辽宁 沈阳 110161)

摘 要: 豆科植物凝集素在豆科植物和根瘤菌的相互识别和共生关系的建立上起着重要作用。利用血凝法快速检测 R(人参)、S(沙棘)、D(越橘)3种植物内生菌的 $S_{0.25}D_{50}$ 、 $S_{0.25}$ 、 $R_{25}D_{25}$ 和 $R_{50}D_{50}$ 共4种处理对大豆根部凝集素含量的影响。结果表明:经过 $S_{0.25}D_{50}$ 、 $S_{0.25}$ 、 $R_{50}D_{50}$ 3种处理的大豆根部凝集素含量均高于对照,而经过 $S_{0.25}$ 处理的大豆根部凝集素的含量最高,为 $0.288 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。说明沙棘内生菌醇提取物有利于大豆根瘤菌的形成。

关键词: 大豆;凝集素含量;植物内生菌;血凝法

中图分类号: S565.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841(2012)03-0501-03

Effects of Endophytes Alcohol Extraction on Soybean Agglutinin Contents

CHEN Xun, YANG Zhen, XIAO Jun, GONG Na, WANG Na, WANG Hong, ZHAO Ying, YANG Tao

(Research Center of Microbiology Engineering, Liaoning Academy of Agricultural Sciences, Shenyang 110161, Liaoning, China)

Abstract: Legume agglutinins play important roles in mutual recognition and establishment of the symbiotic relationship between legumes and rhizobium. In this study, soybean agglutinin contents under four treatments ($S_{0.25}D_{50}$, $S_{0.25}$, $R_{25}D_{25}$ and $R_{50}D_{50}$) were rapid detected using hemagglutination method. R, S and D were three endophytes from ginseng, sea-buckthorn and cowberry, respectively. The results showed that agglutinin contents in soybean roots under $S_{0.25}D_{50}$, $S_{0.25}$ and $R_{50}D_{50}$ treatments were higher than the control. The highest root agglutinin content was $0.288 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ under $S_{0.25}$ treatment which indicated that alcohol extract of endophyte from sea-buckthorn contributed to the formation of soybean Rhizobium.

Key words: Soybean; Agglutinin content; Endophytes; Hemagglutination method

生物固氮在自然界氮循环中具有非常重要的意义,目前研究最多的生物固氮体系是豆科植物和根瘤菌的共生固氮体系。根瘤菌感染对宿主植物有专一性。根据根瘤菌在豆科植物上形成根瘤的专一性,构成了“互接种族”关系。在同一互接种族内的植物可以互相利用其根瘤菌结瘤。根瘤菌与宿主豆科植物之间建立的特有的共生关系中,凝集素对根瘤菌具有识别作用^[1]。

凝集素是一类广泛存在于自然界中的一大类非免疫来源的蛋白质或糖蛋白,它能与糖专一地、非共价地可逆结合,并且有凝集血细胞的作用。凝集素可作为植物与微生物的共生介质,豆科植物根产生的凝集素正是宿主植物对根瘤菌的重要识别因子^[2]。特定的植物内生菌醇提取液处理大豆种子具有明显促进根瘤发育的作用,为探索植物内生菌醇提取液对增加大豆根瘤的机制,对大豆种子进行不同植物内生菌醇提取液处理,并利用血凝法快

速检测大豆根部凝集素含量。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 仪器与药品 低速大容量多管离心机、低温冷冻离心机、旋涡混合器、微型植物材料粉碎机、96孔微量“V”型血凝板、20 μL 移液器,凝集素标准品(购自 Sigma 公司),其它试剂均为分析纯,试验兔子自购。

1.1.2 实验材料 R、S、D 分别为人参、沙棘、越橘根部分离得到的内生菌,对其进行液体培养到对数生长期后,将菌丝体滤出,烘干,研磨后用乙醇浸提3次,合并滤液,并测定其菌丝体醇提取物的浓度,即得到 R、S、D 醇提取液。

将得到的一定浓度的 R、S、D 菌丝体醇提取物用水稀释,进行 $S_{0.25}D_{50}$ 、 $S_{0.25}$ 、 $R_{25}D_{25}$ 、 $R_{50}D_{50}$ 4种处理(0.25、25、50 分别代表每粒大豆种子吸收的干物

收稿日期:2012-02-25

基金项目:辽宁省科技攻关项目(2011215005)。

第一作者简介:陈珣(1979-),女,硕士,助理研究员,主要从事生物技术研究。E-mail:chenxun_82_ren@126.com。

通讯作者:杨涛(1964-),男,博士,研究员,主要从事生物技术研究。E-mail:smkxzx@sina.com。

质量分别为 0.25、25 和 50 ng)。大豆种子在稀释液中浸泡 30 min,充分吸收。盆栽种植,三叶期时取 $S_{0.25}D_{50}$ 、 $S_{0.25}$ 、 $R_{25}D_{25}$ 、 $R_{50}D_{50}$ 4 种处理植株和对照植株,并将根剪下,烘干备用。

1.2 方法

1.2.1 红细胞悬液的制备 兔心脏采血后,血液注入装有玻璃珠的三角瓶中快速摇动 10 min,以脱去纤维。取脱纤维血液 5 mL,加入 10~15 mL 生理盐水混匀,常温离心($3\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$,5 min),倒去上部液体,反复几次直至上部液体澄清。取 1 mL 洗过血液用血球缓冲液($0.02\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PBS,pH 7.2)配制成 2.5% 浓度的红细胞悬液,置于 4℃ 备用,可保存 7 d^[3]。

1.2.2 凝集素提取与检测 参考杨明亮等^[4]的方法进行凝集素的提取和检测。

$$\text{凝集素含量}(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1})=\frac{S_0\times H\times V}{H_0\times M\times 1000}$$

式中 S_0 —标准样品溶液的质量浓度($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)

H—待测样品溶液的凝集活力

V—待测样品溶液的体积(mL)

H_0 —标准样品溶液的凝集活力

M—待测样品的质量(g)

1.2.3 凝集素效价测定 根据凝集程度以“#、++++、++、+、-”记录结果。“#”为全凝集,“++++”为多半凝集,“++”为半凝集,“+”为少凝集,“-”为不凝集。凝集效价的判定以“++”作为终点。

2 结果与分析

2.1 大豆凝集素效价测定

根据凝集程度以“#、++++、++、+、-”记录结果。根据结果,凡是样品稀释度最高而有显著凝集现象“++”的孔的凝集效价,即可判定为该样品的凝集效价,记录为 2ⁿ,其中 n 为血凝板上该样品产生凝集现象的最大稀释倍数^[5]。对照和 $S_{0.25}D_{50}$ 、 $S_{0.25}$ 、 $R_{25}D_{25}$ 、 $R_{50}D_{50}$ 4 种处理大豆根部凝集素效价测定结果见表 1。

表 1 大豆凝集素效价测定

Table 1 Soybean agglutinin titer determination

处 理 Treatment	血凝板孔数 Hole number of hemagglutination plate							
	1	2	3	4	5	6	7	8
$S_{0.25}D_{50}$	#	#	+++	+++	++	++	+	-
$S_{0.25}$	#	+++	+++	+++	+++	++	+	-
$R_{25}D_{25}$	#	+++	+++	++	++	++	++	+
$R_{50}D_{50}$	#	+++	+++	+++	++	++	++	+
CK	#	+++	+++	++	++	++	++	++

由表 1 可知, $R_{25}D_{25}$ 处理的凝集素活力与对照相同,均为 2⁴。而 $S_{0.25}D_{50}$ 、 $S_{0.25}$ 、 $R_{50}D_{50}$ 3 种处理的凝集素活力均高于对照,分别为 2⁵、2⁶、2⁵,其中 $S_{0.25}$ 处理的凝集素活力最强。凝集素活力与凝集素含量成正比关系, $S_{0.25}D_{50}$ 、 $S_{0.25}$ 、 $R_{50}D_{50}$ 3 种处理的凝集素活力均高于对照,说明经过这 3 种处理的大豆根部的凝集素含量高于对照。而 $S_{0.25}$ 处理的凝集素活力最强,说明经过 $S_{0.25}$ 处理的大豆根部的凝集素含量明显提高。

2.2 大豆凝集素含量测定

对照和 $S_{0.25}D_{50}$ 、 $S_{0.25}$ 、 $R_{25}D_{25}$ 、 $R_{50}D_{50}$ 4 种处理大豆根部凝集素含量结果见图 1。经过 $R_{25}D_{25}$ 处理的凝集素含量与对照持平,均为 $0.072\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。

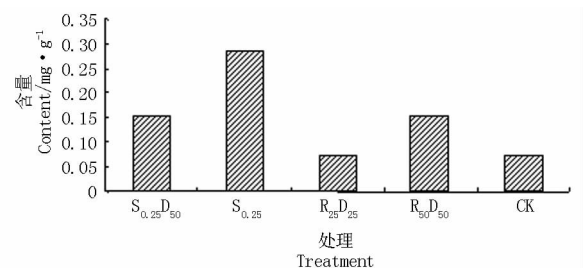


图 1 大豆凝集素含量

Fig. 1 Soybean agglutinin content

$S_{0.25}D_{50}$ 、 $S_{0.25}$ 、 $R_{50}D_{50}$ 3 种处理的凝集素含量均高于对照,其中 $S_{0.25}$ 处理的凝集素含量最高,为 $0.288\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。说明利用植物内生菌 R、S、D 醇提取液一定浓度的稀释液处理大豆种子,能明显提高

大豆根部的凝集素的含量,而以植物内生菌 S 醇提取液的效果更加显著。

3 结论与讨论

大豆凝集素的检测方法很多,如:用放射性同位素标记糖复合物法、火箭免疫电泳检测、酶联免疫吸附法(ELISA)和放射免疫分析法(RIA)等^[6]。但这些方法大都比较麻烦,且费用高昂,该实验采用血凝法进行凝集素含量的测定。虽然血凝法能够简捷、快速测定凝集素含量,但对所选择的红细胞有严格要求,具有种属特异性,如对兔和人红细胞的凝集反应最敏感,如所选择红细胞不当,则会导致所测大豆凝集素活性偏低。该实验选择兔心脏血进行红细胞凝集反应,实验效果良好。

豆科植物根表面的凝集素能增强根周围根瘤菌的聚集,从而诱导形成根瘤,将空气中的氮气转化为自身生长所需的氮源。该实验对大豆种子进行植物内生菌 R、S、D 醇提取液的 $S_{0.25}$ 、 $S_{0.25}D_{50}$ 、 R_{25} 、 $R_{50}D_{50}$ 4 种组合处理。结果表明 $S_{0.25}D_{50}$ 、 $S_{0.25}$ 和 $R_{50}D_{50}$ 3 种处理的大豆根部凝集素的含量均高于对照,并以 $S_{0.25}$ 处理的大豆根部的凝集素含量最高。结果表明植物内生菌 R、S、D 醇提取液的一定浓度的稀释液处理大豆种子有利于大豆根部根瘤的形成,而以植物内生菌 S 醇提取液处理的效果最为显著。但植物内生菌醇提取物的成分非常复杂,活性成分种类也比较多,在对大豆根瘤菌刺激作用上是哪种有效成分起作用还有待进一步研究。

参考文献

- [1] 熊维全,万群.植物凝集素及其在生物固氮中的作用[J].热带农业科技,2005,28(2):21-26,29. (Xiong W Q, Wan Q. The lectins of plant and its roles in biological nitrogen fixation[J]. Tropical Agricultural Science & Technology, 2005, 28(2): 21-26, 29.)
- [2] 殷爱华,韩素芬.豆科树种凝集素和根瘤菌胞外多糖结合反应与结瘤的关系[J].南京林业大学学报(自然科学版),2005,29(5):88-90. (Yin A H, Han S F. Relationship of nodulation with reactions of lectins of leguminous trees with EPS of rhizobium[J]. Journal of Nanjing Forestry University(Natural Sciences Edition), 2005, 29(5): 88-90.)
- [3] 杨明亮,王继安.大豆凝集素含量测定及聚类分析[J].大豆科技,2009(5):20-23. (Yang M L, Wang J A. Determination of soybean lectin and cluster analysis[J]. Soybean Science & Technology, 2009(5): 20-23.)
- [4] 戴大章,陈妙月,叶均安,等.血凝法测定饲料中植物凝集素含量[J].中国兽医报,2005,25(4):438-440. (Dai D Z, Chen M Y, Ye J A, et al. Quantification of lectins in feed by hemagglutination[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2005, 25(4): 438-440.)
- [5] 季建刚,姜在祥,王洪新,等.7种菜用豆中凝集素活性的比较[J].安徽农业科学,2007,35(15):4620-4621,4625. (Ji J G, Lou Z X, Wang H X, et al. Comparison of the activity of phytohemagglutinin in seven kinds of kidney beans[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2007, 35(15): 4620-4621, 4625.)
- [6] 杨明亮,宋雯雯,康明,等.大豆凝集素含量测定方法的改进与种质资源分析[J].大豆科学,2008,27(2):310-314. (Yang M L, Song W W, Kang M, et al. An improved method for determining SBA content and screening for soybean germplasms[J]. Soybean Science, 2008, 27(2): 310-314.)

国际学术前沿摘编

绿肥大豆的饲料产量、化学成分和青贮品质

Shyh-Rong Chang, Chi-Hsin Lu, Huu-Sheng Lur, and Fu-Hsing Hsu

摘要:在南亚地区,由于高额的降雨量,生产常规的优质豆科牧草已很困难,而当地的豆科绿肥作物可以考虑作为牧草的重要替代品。为明确绿肥大豆是否可以作为牧草和青贮饲料,将2个绿肥大豆品种在2个生长季种植并在不同时期收获。结果台南4号在始粒期收获,台南7号在始熟期收获的牧草产量最高,分别为9.3和13.0 t·hm⁻²。对于粗蛋白含量,台南4号在始粒期最高,而台南7号在始熟期最高。台南7号春秋两季种植时粗蛋白含量无差异,而台南4号的粗蛋白含量春季种植较秋季种植增加了5%~8%。从始粒期到始熟期,台南7号的酸洗纤维(ADF)含量增加,而台南4号无这种变化。在单独大豆、大豆与尼罗草混合(*Acroceras macrum* Stapf.)、大豆与玉米混合3种贮存处理下,青贮饲料的平均Fleig氏评分点分别为26.5, 50.7和56.1。在始荚期、始粒期和始熟期收获时,青贮饲料的平均Fleig氏评分点分别为38.4, 47.5和47.3。因此,绿肥大豆在始粒期采收可以获得高产优质的牧草,并且与尼罗草或玉米混合青贮可以改善青贮饲料的品质。

宋显军 摘译自 Agronomy Journal, 2012, 104: 130-136