

新型真菌源激活蛋白对大豆幼苗生理特性的影响

武广衍¹, 邱德文^{1,2}, 杨秀芬², 武广繁³, 赵胜英⁴

(1. 福建农林大学植保学院, 福州 350000; 2. 中国农业科学研究院植物保护研究所, 北京 100094; 3. 河海大学土木学院, 南京 210000; 4. 济南仕邦农化有限公司, 济南 250100)

摘要 为探讨真菌源激活蛋白在促进植物生长和增产方面的作用机理, 研究了不同浓度激活蛋白处理对大豆幼苗生理特性的影响。结果表明, 经 1、2、5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 激活蛋白处理后 7 d, 大豆幼苗根系活力比对照分别增加了 44.2%、54.5% 和 19.8%, 硝酸还原酶活性比对照分别增加了 61.33%、138.37% 和 53.2%; 处理后 12 d, 植物叶片叶绿素含量比对照分别增加了 12.56%、17.32% 和 5.32%, 可溶性糖含量比对照分别增加了 18.56%、31.02% 和 18.69%, 可溶性蛋白含量比对照分别增加了 17.36%、31.96% 和 23.10%。不同浓度激活蛋白均能促进与植物生长相关的生理指标的提高, 其中以 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 的作用效果最好。

关键词 大豆; 激活蛋白; 叶绿素; 可溶性糖; 可溶性蛋白

中图分类号 S565.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-9841(2007)05-0691-04

EFFECTS OF NEW FUNGAL ACTIVATOR PROTEIN ON PHYSIOLOGICAL CHARACTERS OF SOY-BEAN

WU Guang-yan¹, QIU De-wen^{1,2}, YANG Xiu-fen², WU Guang-fan³, ZHAO Sheng-ying⁴

(1. Fujian Forest and Agricultural University, Fuzhou 350000; 2. Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100094; 3. Hehai University, Nanjing 210000; 4. Jinan Shibang Agrochemicals. CO. LTD, Jinan 250100)

Abstract In order to approach the mechanism of enhancing plant growth by new fungal activator protein, the effect of activator protein with different concentration on physiological characteristics of soybean was studied. Compared with control after 7 d treatment with 1, 2 and 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ activator protein, root activity of soybean was increased by 44.2%, 54.5% and 19.8%, and nitrated reductase activity was increased by 61.33%, 138.37% and 53.2%, respectively. Compared with control after 15 d treatment with 1, 2 and 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ activator protein, the content of chlorophyll in leaves was increased by 12.56%, 17.32% and 5.32%, the content of soluble sugar was increased by 18.56%, 31.02% and 18.69%, and the content of soluble protein was increased by 17.36%, 31.96% and 23.10%, respectively. In conclusion, after plants were treated with activator protein of different concentration, the physiological indexes related to plant growth were all enhanced to different degree, and the effect of 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ activator protein was of best efficiency to the plant.

收稿日期: 2007-05-20

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(“973”计划)(2003CB114204); 国家高技术研究发展计划(“863”计划)(2003AA241130)

作者简介: 武广衍(1981-), 男, 硕士研究生, 主要从事农药剂型与开发方面的研究。Tel: 13665318512; E-mail: wfguodong@126.com

通讯作者: 邱德文, 博士, 研究员, 主要从事蛋白药物研究与开发。

Key words Soybean; Activator protein; Chlorophyll; Soluble sugar; Soluble protein

植物与病原菌的相互作用包括两种类型：一种是亲和性互作 (compatible interaction)；另一种为非亲和性互作 (incompatible interaction)。植物与病原菌之间的非亲和性互作常会引发植物体一系列的生理生化反应,这些反应会进一步诱发植物的抗性。非亲和性互作的分子机制假设是:1)植物体识别病原菌分子,2)细胞传导途径的激活,3)植物体发生一系列的生理生化反应以诱导抗性^[1~3]。在植物与病原菌非亲和性互作过程中,能够诱导引发防御反应的某种特定的微生物或植物分子即称为激发子^[4~6]。近年来,具有生物活性的蛋白类激发子已逐渐成为生物源农药研究领域的热点^[7]。1992 年,美国 Wei 博士等^[8]首先从梨火疫病病原细菌 *Erwinia amylovora* 中发现一种分子量约 44kDa、能激发植物过敏性反应的 Harpin 蛋白,该蛋白具有促进植物生长、诱导植物获得抗病性的作用。2001 年,美国 Cornell 大学和 EDEN 生物公司联合将 Harpin 蛋白开发成为抗病生防农药 MessengerTM,这是迄今为止国际上利用高新技术手段开发生物农药最成功的例子^[9]。Harpin 蛋白的研究和 MessengerTM 的成功开发促进了新型微生物蛋白农药研究的兴起。

邱德文^[10]从葡萄孢菌 (*Botrytis*)、交链孢菌 (*Alternaria*)、黄曲霉菌 (*Asporgillus*)、稻瘟菌 (*Pyricularia*)、青霉菌 (*Penicillium*)、纹枯病菌 (*Rhizoctonia solani*)、木霉菌 (*Trichoderma*)、镰刀菌 (*Fusarium*) 等多种真菌中筛选、分离、纯化出一种新型的蛋白质。氨基酸和核酸序列分析表明其氨基酸和基因的序列完全不同于过敏蛋白和隐地蛋白,与蛋白质数据库中已知的蛋白序列均无同源性,属于一种全新的蛋白。邱德文博士根据其作用机理将此蛋白命名为真菌激活蛋白 (Activator)。激活蛋白是一种主要存在于真菌孢子和菌丝体中的热稳定性蛋白,其分子质量为 42kDa、等电点约为 4.18。作者以大豆为生物试材,研究了用激活蛋白处理大豆幼苗后对根系活力和硝酸还原酶活性、叶绿素含量及可溶性糖和可溶性蛋白含量的影响,着重探讨了激活蛋白促进植物生长及提高作物产量的生理基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

大豆种子由福建农林大学植物保护学院生物防治研究所提供。有效成分质量分数为 3% 的激活蛋

白可湿性粉剂,由中国农业科学院植物保护研究所蛋白药物工程研究室提供。

1.2 试验方法

先用蒸馏水将 3% 激活蛋白可湿性粉剂稀释成 1、2、5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 3 个浓度。选取大小均匀、发育正常的大豆种子,用 10% H_2O_2 消毒 20 min,清水冲洗 3~5 遍,再用蒸馏水浸种 24 h 后置于直径为 15 cm 的平皿中(每皿 100 粒种子),25℃ 黑暗条件下萌发 2 d 后用 pH 为 5.7 的营养液^[11]培养(光照/黑暗:16 h / 8 h,昼温/夜温:25℃/20℃),至大豆幼苗 5~6 叶龄时,分别用浓度为 1、2、5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 的激活蛋白溶液喷雾处理,以同龄期喷清水处理为对照,重复 3 次。处理后第 1、3、5、7 天取幼苗根系,分别测定根系活力及硝酸还原酶活性;处理后 15 d 取幼苗叶片,分别测定叶绿素、可溶性糖和可溶性蛋白的含量。

1.3 生理指标测定方法

根系活力测定用 TTC 法^[12];硝酸还原酶活性测定参照张志良^[13]的方法;叶绿素含量测定参照朱广廉等^[14]的方法;可溶性糖含量采用蒽酮法测定^[15];可溶性蛋白测定采用考马斯亮蓝 G-250 染色法^[12]。数据分析均采用 SPSS8.0 软件,不同处理之间差异显著性分析和平均数比较分别用 ANOVA 和 Duncan 氏方法完成。

2 结果与分析

2.1 激活蛋白对大豆幼苗根系活力的影响

根系活力是反映植物根系生长发育状况的重要生理指标,不同浓度激活蛋白处理后,大豆幼苗根系活力变化趋势如图 1 所示。

从中可以看出,不同浓度激活蛋白处理均可提高大豆幼苗根系的活力。各浓度处理后 1 d,根系活力即开始迅速提高,至第 3 天活力提高最显著,之后增高幅度渐缓。1、2、5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 激活蛋白处理后第 7 d,根系活力分别比对照提高 44.2%、54.5% 和 19.8%,其中以 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 激活蛋白处理对根系活力的影响最为显著。

2.2 对大豆幼苗硝酸还原酶活性的影响

硝酸还原酶活性是评价植物对氮素吸收和同化能力强弱的一项重要生理指标。由图 2 可以看出,在各浓度激活蛋白处理大豆幼苗后的第 1 天和第 3 天,硝酸还原酶活性呈增加趋势,其中以 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$

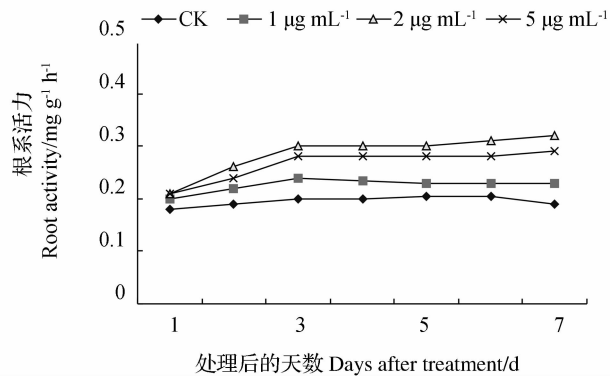


图 1 激活蛋白对大豆幼苗根系活力的影响

Figure 1 Effect of activator protein on root activity of soybean seedlings. The graph shows that root activity increases over time for all treatments. The 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ treatment shows the highest root activity by day 7, followed by the 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ treatment. The 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and CK treatments show lower root activity compared to the other two treatments.

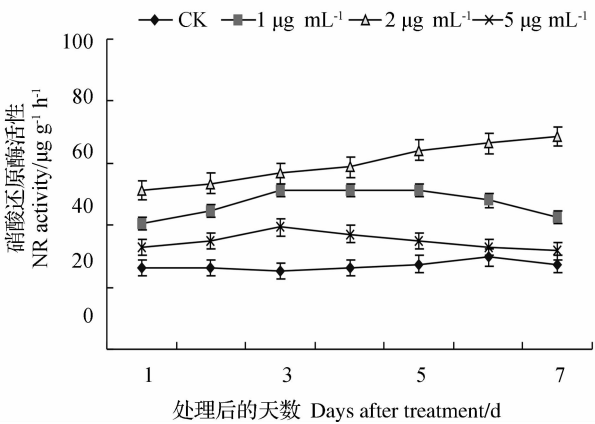


图 2 激活蛋白对大豆幼苗硝酸还原酶活性的影响

Figure 2 Effect of activator protein on NR activity of soybean seedling. The graph shows that NR activity increases over time for all treatments. The 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ treatment shows the highest NR activity by day 7, followed by the 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ treatment. The 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and CK treatments show lower NR activity compared to the other two treatments.

2.3 对大豆幼苗叶绿素含量的影响

Chlorophyll is a key indicator of photosynthetic capacity in plant leaves. The content of chlorophyll directly affects the rate of photosynthesis. As shown in Figure 3, the content of chlorophyll in soybean seedlings increased after treatment with different concentrations of activator protein for 15 days. The 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ treatment showed the highest chlorophyll content, followed by the 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ treatment. The 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and CK treatments showed lower chlorophyll content compared to the other two treatments.

After treatment with 1, 2, and 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of activator protein, the chlorophyll content in soybean seedlings increased compared to the control group. The increases were 12.56%, 17.32%, and 5.32%, respectively. The 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ treatment showed the most significant increase in chlorophyll content.

2.4 对大豆幼苗可溶性糖含量的影响

The change in soluble sugar content in plant tissue is an important indicator of carbohydrate metabolism. As shown in Figure 4, the content of soluble sugar in soybean seedlings increased after treatment with different concentrations of activator protein for 15 days. The 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ treatment showed the highest soluble sugar content, followed by the 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ treatment. The 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and CK treatments showed lower soluble sugar content compared to the other two treatments.

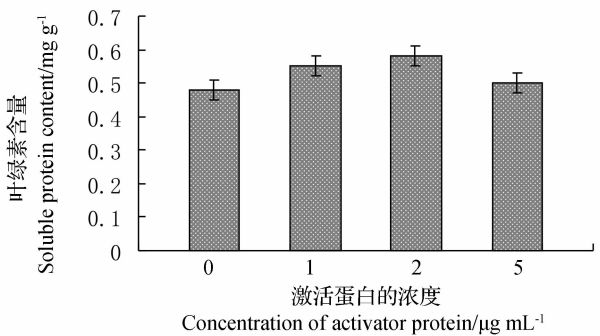


图 3 激活蛋白对大豆幼苗叶绿素含量的影响

Fig. 3 Effect of activator protein on chlorophyll content of soybean

After treatment with different concentrations of activator protein, the content of soluble protein in soybean seedlings increased compared to the control group. The increases were 18.56%, 31.02%, and 18.69%, respectively. The differences were all significant, and the 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ treatment showed the greatest effect on soluble protein content.

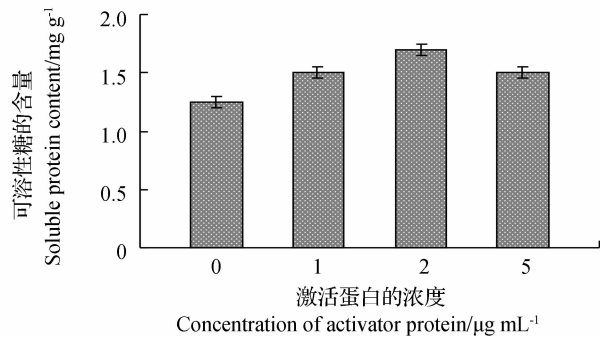


图 4 激活蛋白对大豆幼苗可溶性糖含量的影响

Fig. 4 Effect of activator protein on soluble sugar content of soybean

2.5 对大豆幼苗可溶性蛋白含量的影响

The amount of soluble protein in plant tissue can be used to measure the plant's ability to adapt to stress. As shown in Figure 5, the content of soluble protein in soybean seedlings increased after treatment with different concentrations of activator protein for 15 days. The 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ treatment showed the highest soluble protein content, followed by the 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ treatment. The 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and CK treatments showed lower soluble protein content compared to the other two treatments.

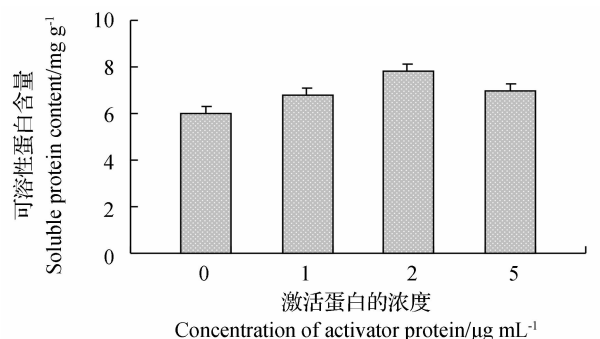


图 5 激活蛋白对大豆幼苗可溶性蛋白含量的影响

Fig. 5 Effect of activator protein on soluble protein content of soybean

均有提高。

经1、2、5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 激活蛋白处理后,大豆幼苗中可溶性蛋白含量分别比对照增加了17.36%、31.96%和23.10%,其中2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 处理者可溶性蛋白含量增加最为明显。

3 讨论

本研究表明,1、2、5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 激活蛋白处理均可增强大豆幼苗根系活力和硝酸还原酶活性,提高叶片叶绿素含量及可溶性糖、可溶性蛋白的含量,并且随激活蛋白浓度的增加各生理指标的活性或含量呈先上升后下降的趋势,其中以2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 的处理效果最好。

根系活力泛指根系的吸收能力、合成能力、氧化和还原能力等,能较客观地反映根系生命活动的状况。而硝酸还原酶是氮代谢过程中的关键酶,不仅能反映植物利用硝酸根吸收和转化氮素能力的强弱,而且对植物的光合作用、碳代谢和能量代谢也具有重要的影响。不同浓度的激活蛋白处理大豆幼苗后,均能明显增强植物根系活力和硝酸还原酶活性。植物根系活力的增强可使其吸收水分、养分的能力加强;而硝酸还原酶活性的提高则可提高氮素的利用率,促进植物氨基酸和蛋白质的合成,以利于植物的生长发育。

赵利辉等^[16]研究发现,激活蛋白可诱导植物的防卫反应。在本研究中,适宜浓度的激活蛋白显著提高了大豆幼苗叶绿素含量及可溶性糖、可溶性蛋白的含量。激活蛋白可能首先通过提高叶绿素含量来增强植物的光合作用,使植物合成更多的碳水化合物,进而提高可溶性糖的含量。可溶性糖是一种渗透调节性物质,在植物受胁迫后产生,可调节植物细胞内的渗透压,改善细胞质浓度,降低质膜透性,提高膜的完整性,以保证细胞正常生理活动的进行。同时,因可溶性蛋白具有很强的持水力,其含量的适当增加,可有效缓解不良环境对植物的胁迫和伤害。据报道,Harpin蛋白可以打通植物体内多条信号传导途径,从而促进有利于植物正常生长的生物活性物质的合成,并诱导植物抗病相关酶类的产生^[17]。本课题组的前期研究表明,激活蛋白的作用通常是几种因素相互协同的结果^[16,18]。有关激活蛋白作用的分子机理及其在植物体内的信号传导途径还需

要进一步深入研究。

参 考 文 献

- [1] Dixon R A, Lamb C J. Molecular communication in interactions between plants and microbial pathogens[J]. *Annu Rev of Plant Physiol and Plant Mol Biol*, 1990, 40: 347–364.
- [2] Ebel J, Scheel D. Elicitor recognition and signal transduction. In: Boller T, Meins F, eds, *Plant Gene Research* [M]. Vienna: Springer Verlag, 1990.
- [3] Lamb C J, Lawton M A, Dron M, Dixon R A. Signals and transduction mechanisms for activation of plant defenses against microbial attack[J]. *Cell*, 1989, 56: 215–224.
- [4] Anderson A J. The biology of glycoproteins elicitors. in: T Kosuge E W Nester, eds. *Plant-Microbe Interactions III* [M]. New York: McGraw Hill, 1989, 87–130.
- [5] Darvill A G, Albersheim P. Phytoalexins and their elicitors A defense against microbial infection in plants[J]. *Annu Rev of Plant Physiol*, 1984, 35: 243–293.
- [6] Templeton M D, Lamb C J. Elicitors and defense gene activation[J]. *Plant Cell Environ*, 1988, 11: 395–401.
- [7] 郭泽建, 蒋冬花. 植物病原菌激发子与信号识别机理[J]. *浙江师范大学学报(自然科学版)*, 2003, 26(1): 1–7.
- [8] Wei Z M, Wei Z, Laby R J, et al. Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia*. *Amylovora*[J]. *Science*, 1992, 257: 85–88.
- [9] 邱德文. 微生物蛋白农药研究进展[J]. *中国生物防治*, 2004, 20(2): 91–94.
- [10] 邱德文. 植物用多功能真菌蛋白质[P]. CN1344727A, 2002–04–17.
- [11] Chaoui A, Jarrar B, ElFerjani E. Effects of cadmium and copper on peroxidase, NADH oxidase and IAA oxidase activities in cell wall, l soluble and microsomal membrane fractions of pea roots [J]. *J Plant Physiol*, 2004, 161: 1225–1234.
- [12] 邹琦, 李合生. *植物生理学实验指导* [M]. 北京: 中国农业出版社, 2000: 173–174.
- [13] 张志良, 瞿伟菁. *植物生理学实验指导* [M]. 北京: 高等教育出版社, 2003: 41–67.
- [14] 朱广廉, 钟海文, 张爱琴. *植物生理学实验* [M]. 北京: 北京大学出版社, 1990: 51–54.
- [15] 白宝璋, 靳占忠, 李德春. *植物生理生化测试技术* [M]. 北京: 中国科学技术出版社, 1995: 34–100.
- [16] 赵利辉, 邱德文, 刘铮, 等. 植物激活蛋白对水稻抗性相关基因转录水平的影响[J]. *中国农业科学*, 2005, 38(7): 1358–1363.
- [17] 段同钊. 新型植物生化激活剂—康壮素[J]. *蔬菜*, 2003, 12: 40–41.
- [18] 李丽, 邱德文, 刘铮, 等. 植物激活蛋白对番茄抗病性的诱导作用[J]. *中国生物防治*, 2005, 21(4): 265–268.