

桃褐腐病菌激活蛋白对植物的促生作用研究

陈 柳, 刘正坪, 刘素花, 魏艳敏, 尚巧霞, 赵晓燕*

(北京农学院 植物科学技术学院, 北京 102206)

摘要: 为了解桃褐腐病菌(*Monilinia fructicola*)激活蛋白对植物的促生作用, 采用硫酸铵沉淀法对桃褐腐病菌的总蛋白进行了粗分离, 并分析了各组分对小麦和小白菜种子发芽和生长的影响。结果表明, 硫酸铵饱和度为 60% 时, 桃褐腐病菌蛋白质量浓度最高, 可达 1 403.0 $\mu\text{g/mL}$ 。在各种分离到的蛋白组分中, 饱和度为 40%、50%、60% 的硫酸铵盐析得到的蛋白组分对小麦和小白菜种子的发芽和生长具有促进作用, 说明这些组分中含有能促进小麦和小白菜生长的激活蛋白。

关键词: 桃褐腐病菌; 激活蛋白; 分离; 促生作用

中图分类号: TQ452.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2014)03-0085-04

The Plant Growth-Promoting Effect of Activate Protein Components of *Monilinia fructicola*

CHEN Liu, LIU Zheng-ping, LIU Su-hua, WEI Yan-min, SHANG Qiao-xia, ZHAO Xiao-yan*

(College of Plant Science and Technology, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China)

Abstract: In order to study the plant growth-promoting effect of activate protein components of *Monilinia fructicola*, the total protein of *M. fructicola* was crudely extracted and separated by ammonium sulphate precipitation. Wheat and cabbage seeds were soaked with each protein component precipitated with 30%—100% saturation of ammonium sulphate, and the germination rate, root length and seedling height were measured. Results showed that the protein concentration of component precipitated by 60% saturation of ammonium sulfate was the highest, 1 403.0 $\mu\text{g/mL}$. Among those isolated protein fractions, activate protein was found in protein components precipitated with 40%, 50% and 60% saturation of ammonium sulphate, and could promote the germination and growth of wheat and cabbage seeds.

Key words: *Monilinia fructicola*; activate protein; isolation; growth-promoting effect

近年来, 随着新型环保生物技术的不断研究与发展, 有关激发植物免疫抗病和具有促生增产作用的微生物蛋白农药的研究已引起国内外的广泛关注和重视^[1]。激活蛋白是蛋白质农药的一种, 是一种新型的生物农药, 使用激活蛋白可显著减少化学农药使用次数和使用量, 不仅能增产增收, 增加农产品的附加值, 同时将对生态环境保护、食品安全具有良好的推动作用^[2-3]。

激活蛋白是从多种病原真菌中分离出的具有诱

导植物抗病性、增强植物抗逆能力、促进植物生长等生物活性的蛋白激发子^[4]。它能启动植物体内一系列代谢反应, 激活植物自身免疫系统和生长系统, 从而抵御病虫害的侵袭和不良环境影响, 具有防治病虫害、抗逆、促进植物生长发育、改善作物品质和提高产量的作用^[4]。张云华等^[5]研究表明, 灰葡萄孢菌激活蛋白 PEBC2 能明显提高小麦种子的发芽率, 促进小麦幼苗生长, 增强小麦的抗旱性。徐锋等^[6]研究认为, 稻瘟菌激活蛋白可明显提高丝瓜、番茄等种

收稿日期: 2013-08-12

基金项目: 北京市教委资助项目(KM201110020007); 北京市教委科研基地建设—科技创新平台建设项目(PXM2013_014207_000044); 北京市属高等学校人才强教计划资助项目之学术创新团队计划项目(PHR201107135)

作者简介: 陈 柳(1989-), 女, 北京人, 在读硕士研究生, 研究方向: 植物保护。E-mail: chenliu119@sina.com

* 通讯作者: 赵晓燕(1975-), 女, 湖南益阳人, 副教授, 博士, 主要从事植物病理学研究。E-mail: zhaoxy777@163.com

子的发芽率,促进发芽整齐,同时对促进幼苗生长、壮苗也有明显的作用。

在前期研究中发现,桃褐腐病菌(*Monilinia fructicola*)中也含有对植物具有促生活性的蛋白成分,为此,通过硫酸铵沉淀法,对桃褐腐病菌的蛋白质进行粗分离,提取具有激活蛋白活性的成分,并研究其对植物的促生作用,为进一步明确植物激活蛋白的生物活性提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料

桃褐腐病菌:2011年4月从染病苹果的病健交界处分得到。

植物材料:小白菜种子购自市场;小麦种子由北京农学院农学教研室提供。

1.2 方法

1.2.1 桃褐腐病菌的培养 用无菌接种针挑取纯化的桃褐腐病菌菌丝块,接种在PDA平板上,放在25℃恒温培养箱中培养7d,使菌落长满整个培养皿。吸取3mL的PD培养液注入平板中,用灭菌后的涂布器刮取菌丝片段和分生孢子,得到菌丝和孢子的悬浮液,转入装有100mL PD培养液的三角瓶中,在25℃、160 r/min的恒温振荡培养箱中培养3d。

1.2.2 桃褐腐病菌总蛋白的提取 通过纱布过滤收集桃褐腐病菌菌丝,利用循环真空抽滤泵抽干后,用液氮研磨菌丝块成粉末状,放入离心管中,每克菌丝加入4mL PBS,充分振荡后放入100℃水浴锅中加热20min,冷却至室温,12 000 r/min、4℃离心15min,收集上清液即为桃褐腐病菌总蛋白。

1.2.3 桃褐腐病菌激活蛋白活性成分的粗分离 采用硫酸铵分级沉淀法分离。测量收集的桃褐腐病菌总蛋白溶液的体积,按硫酸铵溶液饱和度计算表(0℃),加入相应克数的固体硫酸铵,使之饱和度达到30%,充分振荡试管,待硫酸铵完全溶解后,将其放入4℃的冰箱中,沉淀4h后,4℃、12 000 r/min离心15min。向离心后的沉淀中加入少量PBS,使沉淀正好溶解,即为桃褐腐病菌蛋白的硫酸铵饱和度为30%的盐析组分。收集上清液放入另一试管中,并测量其体积,加入相应克数的固体硫酸铵,使之饱和度达到40%,充分振荡试管,待硫酸铵完全溶解后,将其放入4℃的冰箱中进行沉淀。按照上述步骤依次使溶液的硫酸铵饱和度达到50%、60%、70%、80%、90%、100%,得到桃褐腐病菌蛋白

在不同硫酸铵饱和度下的盐析组分。

1.2.4 蛋白质质量浓度的测定 采用考马斯亮蓝法。以牛血清白蛋白(BSA)为对照,制成100 μg/mL的标准蛋白质溶液,加入5mL考马斯亮蓝G-250试剂,在595nm处测吸光值,以牛血清蛋白质量浓度为横坐标,吸光值为纵坐标,绘制标准曲线,求出标准方程。将不同硫酸铵饱和度下的盐析蛋白质溶液稀释50倍,加入5mL考马斯亮蓝G-250试剂,在595nm处测定吸光值,将各蛋白质溶液的吸光值代入标准曲线方程中,求出蛋白质溶液的质量浓度。

1.2.5 蛋白成分促生活性的测定 将不同硫酸铵饱和度的盐析蛋白质溶液稀释至100 μg/mL,用于浸泡小麦种子和小白菜种子,以10粒小麦种子或小白菜种子为一个处理单位,3次重复,以无菌水为对照。首先45℃水浴加热0.5h,然后在室温浸泡5h,均匀摆放到铺有湿润滤纸的培养皿中,在25℃下进行发芽试验,期间补水保持滤纸湿润,3、7、10d后测定小麦和小白菜种子的发芽率、根长、芽长和苗高。

2 结果与分析

2.1 桃褐腐病菌蛋白成分粗分离结果

由表1可知,硫酸铵饱和度为60%时,蛋白质溶液质量浓度最高,达到1 403.0 μg/mL;硫酸铵饱和度为100%时,蛋白质溶液质量浓度最低,仅为197.6 μg/mL,说明大多数蛋白质在60%饱和度的硫酸铵中沉淀,当硫酸铵饱和度为100%时,只有少量的蛋白质沉淀下来。

表1 不同硫酸铵饱和度盐析得到的桃褐腐病菌蛋白溶液的质量浓度

硫酸铵饱和度/%	OD ₅₉₅	蛋白质质量浓度/(μg/mL)
30	0.078	708.0
40	0.068	658.0
50	0.128	958.0
60	0.217	1 403.0
70	0.063	633.0
80	0.045	543.0
90	0.200	263.6
100	0.134	197.6

2.2 不同硫酸铵盐析组分对小麦种子发芽和生长的影响

从图1可以看出,第3天,在硫酸铵饱和度为40%、50%、60%时,小麦种子的发芽率明显比对照高,分别是对照的1.36、1.36、1.50倍;第7天和第10天,这3个处理小麦种子的发芽率仍然比对照高,尤其在硫酸铵饱和度为40%和60%时,第7天

小麦种子的发芽率分别是对照的 1.17 和 1.22 倍,第 10 天小麦种子的发芽率均为对照的 1.22 倍。说明饱和度为 40%、50%、60% 的硫酸铵盐析得到的桃褐腐病菌蛋白组分对小麦种子的发芽率有促进作用,尤其是饱和度为 40% 和 60% 的硫酸铵盐析得到的组分对小麦种子发芽率的促进作用更强。

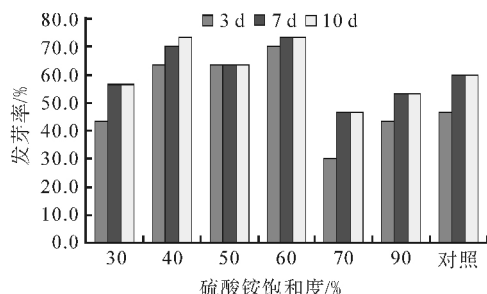


图 1 不同硫酸铵盐析蛋白质溶液对小麦发芽率的影响

从图 2 可以看出,当硫酸铵饱和度为 40%、50%、60% 时,小麦种子的根长明显比对照长,第 3 天分别是对照的 1.69、1.60、1.40 倍,第 10 天分别是对照的 1.36、1.40、1.49 倍,说明饱和度为 40%、50%、60% 的硫酸铵盐析得到的桃褐腐病菌蛋白组分对小麦种子的根长具有促进作用。

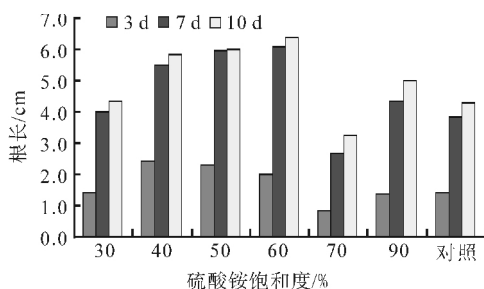


图 2 不同硫酸铵盐析蛋白质溶液对小麦根长的影响

从图 3 可以看出,当硫酸铵饱和度为 40%、50%、60% 时,小麦种子的芽长明显比对照长,第 3 天分别是对照的 1.36、1.39、1.23 倍,第 10 天分别是对照的 1.17、1.15、1.27 倍,说明饱和度为 40%、50%、60% 的硫酸铵盐析得到的桃褐腐病菌蛋白组分对小麦种子的芽长具有促进作用。

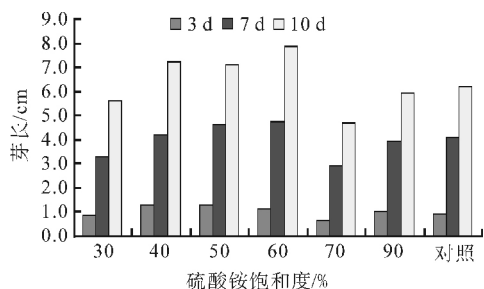


图 3 不同硫酸铵盐析蛋白质溶液对小麦芽长的影响

综上可知,饱和度为 40%、50%、60% 的硫酸铵盐析得到的桃褐腐病菌蛋白组分对小麦种子的发芽和生长具有促进作用,说明在这些蛋白质组分中含有对小麦生长具有促进作用的激活蛋白。

2.3 不同硫酸铵盐析组分对小白菜种子发芽和生长的影响

由图 4 可知,各处理的发芽率和对对照相比没有明显增加,只有 40% 和 70% 饱和度硫酸铵的盐析组分处理后小白菜的发芽率较对照略高,说明桃褐腐病菌蛋白的硫酸铵盐析组分对小白菜的发芽率没有明显促进作用。

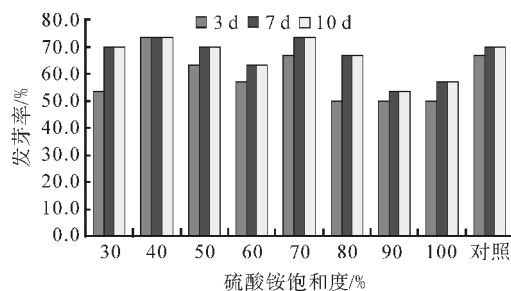


图 4 不同硫酸铵盐析蛋白质溶液对小白菜发芽率的影响

由图 5 可知,第 7 天,桃褐腐病菌蛋白的硫酸铵盐析组分对小白菜种子根长的促进作用比较明显,其中硫酸铵饱和度为 40%、50%、60%、70%、80% 5 个处理小白菜的根长较对照长,尤其是 80% 饱和度硫酸铵处理的小白菜根长是对照的 1.45 倍。第 10 天,有些处理出现了平均根长比第 7 天短的现象,这是因为在统计数据时,有些根被不小心折断的缘故。尽管如此,40%、50%、60%、80% 4 个处理的小白菜根长仍然比对照长。

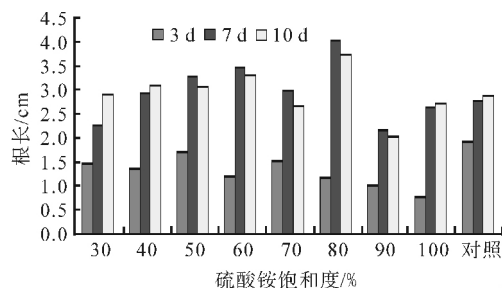


图 5 不同硫酸铵盐析蛋白质溶液对小白菜根长的影响

由图 6 可知,桃褐腐病菌蛋白的硫酸铵盐析组分对小白菜种子苗高的促进作用比较明显,第 7 天,所有处理的小白菜苗高均大于对照,其中,30%、40%、50%、60% 4 个处理的苗高分别是对照的 1.43、1.47、1.49、1.50 倍。第 10 天,这 4 个处理的苗高仍然比对照高,分别是对照的 1.24、1.29、1.31、1.26 倍。

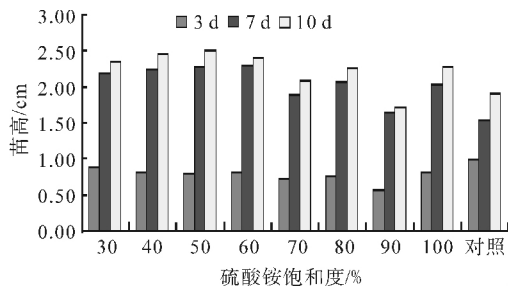


图 6 不同硫酸铵盐析蛋白质溶液对小白菜苗高的影响

综上可知,桃褐腐病菌蛋白的硫酸铵盐析组分中大多数对小白菜的根长和苗高具有较好的促进作用,而对小白菜的发芽率没有明显的促进作用。其中,硫酸铵饱和度为 40%、50%、60% 3 个处理对小白菜根长和苗高的促进作用均比较明显,并且 40% 处理对小白菜的发芽率也有一定的促进作用。说明在饱和度为 40%、50%、60% 的硫酸铵盐析得到的桃褐腐病菌蛋白组分中含有对小白菜生长具有促进作用的激活蛋白。

3 结论与讨论

本试验采用硫酸铵盐析的方法对桃褐腐病菌的总蛋白进行了粗分离,并分析了各盐析组分对小麦和小白菜种子发芽和生长的影响,结果表明:硫酸铵饱和度为 60% 时,桃褐腐病菌蛋白质量浓度最高,可达 1 403.0 $\mu\text{g/mL}$,饱和度为 100% 的硫酸铵盐析得到的桃褐腐病菌蛋白质量浓度最低,仅为 197.6 $\mu\text{g/mL}$ 。

在各种分离到的蛋白组分中,饱和度为 40%、50%、60% 的硫酸铵盐析得到的蛋白组分对小麦和小白菜种子的发芽和生长具有促进作用,说明这些组分中含有对小麦和小白菜生长具有促进作用的激活蛋白。

前人的研究表明,激活蛋白大多为 15~60 kD 的蛋白质或糖蛋白,其通过植物信号转导,引起一系列与植物生长和抗病相关的酶活变化,从而表现抗病增产作用^[7]。因此,为了更好地利用桃褐腐病菌的激活蛋白,还需要对其纯化方法和诱导抗病促生的机制做进一步研究。

参考文献:

- [1] 邱德文,杨秀芬. 蛋白质农药研究与进展[J]. 农药论坛,2007(3):13-15.
- [2] 吴林森. 生物农药发展现状与加大研发力度的探讨[J]. 中国林副特产,2005(3):78.
- [3] 邱德文. 植物免疫与植物疫苗——研究与实践[M]. 北京:科学出版社,2008.
- [4] 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.
- [5] 张云华,邱德文,张立军,等. 灰葡萄孢菌激活蛋白 PE-BC2 的生物功能[J]. 植物保护学报,2008,35(2):123.
- [6] 徐锋,杨勇,谢馥交,等. 稻瘟菌激活蛋白对植物生长及其生理活性的影响[J]. 华北农学报,2006,21(5):1-5.
- [7] Chen M, Zeng H, Qiu D, et al. Purification and characterization of a novel hypersensitive response-inducing elicitor from *Magnaporthe oryzae* that triggers defense response in rice[J]. PLoS ONE, 2012, 7(5):e37654.

(上接第 84 页) 有效分离魔芋体内的全部内生菌,这其中还包括一些不能培养的内生菌。

参考文献:

- [1] 薛婷,李喜宏,陈丽,等. 蒜薹采后灰霉病害及生防拮抗菌的筛选研究[J]. 食品科学,2006,27(6):220-222.
- [2] 姜钰,董怀玉,徐秀德,等. 放线菌在植病生防中的研究进展[J]. 杂粮作物,2005,25(5):329-331.
- [3] Schmeda-Hirschmann G, Hormazabal E, Rodriguez J A, et al. Cycloaspeptide and pseurotin A from the endophytic fungus *Penicillium* [J]. Z Naturforsch, 2008, 63(5/6):383-388.
- [4] Azevedo J L, Araujo W L. Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plant [M] // Ganguli B N, Deshmukh S K. Fungi: Multifaceted microbes. Boca Raton: CRC Press, 2007:189-207.
- [5] 沈萍. 微生物学实验[M]. 北京:高等教育出版社,2005:16-120.
- [6] 张纪忠. 微生物分类学[M]. 上海:复旦大学出版社,1990:60-65.
- [7] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京:科

- 学出版社,2001:265-270.
- [8] 申煌煌,李刚. 分子生物学实验方法与技巧[M]. 广州:中山大学出版社,2010:134-135.
- [9] 刘海军,乐超银,邵伟,等. 一株高产蛋白酶芽孢杆菌的鉴定[J]. 中国酿造,2009(9):18-20.
- [10] 何佳,刘笑洁,赵启美,等. 植物内生真菌分离方法的研究[J]. 食品科学,2009,30(15):180-183.
- [11] Lahlali R, Hijri M. Screening, identification and evaluation of potential biocontrol fungal endophytes against *Rhizoctonia solani* AG3 on potato plants[J]. Research Letter, 2010, 311:152-159.
- [12] Long H H, Sonntag D G, Schmidt D D, et al. The structure of the culturable root bacterial endophyte community of *Nicotiana attenuata* is organized by soil composition and host plant ethylene production and perception[J]. New Phytologist, 2010, 185(2):554-567.
- [13] 何红,蔡学清,洪永聪,等. 辣椒内生细菌的分离及拮抗菌的筛选[J]. 中国生物防治,2002,18(4):171-175.
- [14] 张佳琪,黄灏,吕远平,等. 改性魔芋葡甘聚糖涂膜在果蔬保鲜上的应用研究[J]. 安徽农业科学,2011,39(23):14350-14351,14356.
- [15] 张忠良,鲁周民,李文华. 魔芋葡甘聚糖在板栗保鲜中的应用[J]. 中国农学通报,2005,21(2):83-84.