

稻瘟菌激活蛋白对植物生长及其生理活性的影响

徐 锋¹, 杨 勇², 谢馥交², 刘 铮¹, 邱德文¹, 杨秀芬¹

(1. 中国农业科学院农业环境与可持续发展研究所, 北京 100081; 2. 湖南农业大学 生物安全科技学院, 湖南 长沙 410128)

摘要: 本研究发现, 稻瘟菌激活蛋白可明显提高丝瓜、番茄等发芽率, 促进种子发芽整齐, 同时对促进植物幼苗生长、健壮也有明显的作用。处理水稻后, 控制稻瘟菌效果达 50.68%; 抗旱综合指数也从 55 提高到 92。经激活蛋白处理后, 植物的纤维素酶和醇脱氢酶活性增强, 过氧化氢和脯氨酸的含量提高, 这些酶和活性物质在促进植物生长抗逆方面能发挥重要作用。

关键词: 激活蛋白; 发芽率; 抗逆性

中图分类号: S432.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7091(2006)05-0001-05

Effect of the Activator Protein from *Magnaporthe grisea* on Plant Growth and Physiological Activities

XU Feng¹, YANG Yong², XIE Fu_jiao², LIU Zheng¹, QIU De_wen¹, YANG Xiu_fen¹

(1. Institute of Environment and Sustainable Development in Agriculture, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China;

2. College of Bio_Safety Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract: The activator protein from *Magnaporthe grisea* could significantly promote seed germination and young seedling growth; it also could improve the disease resistance with the defensive efficiency of 50.68% and drought resistance of rice with the drought resistance integrated index increased from 55 to 92. The activities of cellulose and alcohol dehydrogenase, and the contents of hydrogen peroxide and proline of plant were enhanced after treatment, which play important roles in promoting plant growth and improving stress tolerance.

Key words: Activator protein; Germination rate; Stress tolerance

自 Eden 公司利用 *Ewinia amylovora* 中提取的 harpin 蛋白激发子成功开发出 Messenger^[1], 用于多种病虫害的防治以来, 激发子成为抗病性研究的热点问题。笔者所在研究室首次从多种病原真菌中分离出具有良好抗病防虫、增强抗逆能力、促进植物生长生物活性的蛋白激发子, 称之为激活蛋白(Activator protein)^[2]。该类蛋白在国际上首次发现, 拥有中国自主知识产权, 能诱导植物产生系统抗性, 促进植物生长, 改善作物品质, 可作为一种新型的广谱、高效、多功能的生物农药^[3]。目前此类新型蛋白的研究工作尚处于起步阶段, 鲜见报道。本研究通过测定激活蛋白对植物生理生化生长等方面的影响, 探

讨激活蛋白的作用机理, 为激活蛋白在农业生产上的应用提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料

水稻(*Oryza sativa*)品种中花 10 号, 由中国农业科学研究院作物所提供。烟草珊西烟、“绿嫩”早熟棒丝瓜种子、中蔬 6 号番茄种子、中农 12 号黄瓜种子等其他试验种子由中国农业科学院蔬菜花卉研究所提供。稻瘟菌(*Magnaporthe grisea*)菌株北 124, 由中国农业科学院农业环境与可持续发展研究所朱昌雄研究员惠赠。

收稿日期: 2006-07-20

基金项目: 国家“863”计划(2003AA241130); 国家“973”计划(2003CB114204)

作者简介: 徐锋(1978-), 男, 江西九江人, 博士, 主要从事生化和分子生物学研究; 邱德文为通讯作者。

1.2 稻瘟菌激活蛋白的制备

根据邱德文方法^[3],从稻瘟菌中制备植物激活蛋白母液 2 mg/mL,保存于-20℃冰箱中,使用前配成 1 μ g/mL。

1.3 激活蛋白对植物发芽的影响

把番茄和丝瓜种子分别用 1 μ g/mL 的蛋白浸种 6 h,以水为对照,浸种后的种子用清水洗涤 2 次后播到营养钵中,每处理 50 粒种子,于 25℃培养,分别于 7 d 和 9 d 检查出苗率,各处理均重复 3 次。

1.4 激活蛋白对植物生长的影响

取健康饱满的豌豆种子分别用 10, 1.0, 0.5 μ g/mL 激活蛋白和蒸馏水浸种 6 h,每处理各 60 粒种子,用清水洗涤种子 2 次后催芽 24 h,然后置于铺有吸水海绵的培养皿中,于 25℃培养 5 d 后测量苗高,各处理均重复 3 次。

取水稻种子分别用 10, 1.0, 0.5 μ g/mL 激活蛋白和蒸馏水浸种 6 h,每处理 300 粒种子,用清水洗涤种子 2 次后催芽 3 d,然后置于营养钵中,于 25℃培养 24 d 后,测量苗高,各处理均重复 3 次。

1.5 激活蛋白对水稻抗性的诱导作用

稻瘟菌孢子悬浮液的制备和对水稻的接种采用赵利辉的方法进行^[4]。1 μ g/ μ L 纯化蛋白喷雾处理水稻幼苗 3 d 后接种稻瘟菌孢子悬浮液,保湿 48 h,置于温室培养,以同龄期清水处理的水稻幼苗接种稻瘟菌为对照,7 d 后调查病情指数,计算防治效果,各处理均重复 3 次。

1.6 激活蛋白对植物植株及悬浮细胞纤维素酶的影响

用 1 μ g/mL 的激活蛋白液,喷雾处理三叶一心的黄瓜幼苗,以蒸馏水为对照,1 h 后取叶片参照刘国生的方法测定叶片纤维素酶活性^[5],各处理均重复 3 次。

用 10, 1.0, 0.5 μ g/mL 浓度的激活蛋白液喷雾处理豌豆幼苗,以蒸馏水处理为对照,1 h 后取叶片参照刘国生的方法测定叶片纤维素酶活性^[5],每处理 3 次重复。

参照陈浩明的方法^[6],将烟草 (*Nicotiana tabacum* L.) 悬浮细胞(诱导愈伤的外植体为子叶)接种于 MS 基本培养基(添加 0.6 mg/L 2, 4-D),在 26℃, 120 r/min 下振荡培养,每 7 d 传代 1 次。将 1 μ g/mL 的滤灭后的稻瘟菌植物激活蛋白加入含有烟草悬浮培养细胞的培养液中,对照同时用无菌水处理,置于 25℃, 120 r/min 的水平旋转摇床上培养

一定时间后,各取 1 mL 培养液于 1.5 mL 离心管中,5 000 r/min 离心 4 min 后取细胞沉淀,加醋酸缓冲液(pH 4.8) 1 mL 在冰浴中用组织研磨器研磨均匀后,在 4℃、5 000 r/min 离心 10 min,取上清液 100 μ L,参照刘国生的方法测定叶片纤维素酶活性^[5]。

1.7 激活蛋白对烟草悬浮细胞过氧化氢含量的影响

将 1 μ g/mL 的滤灭后的稻瘟菌植物激活蛋白加入含有烟草悬浮培养细胞的培养液中,孵育 30 min 后,取 1 mL 至 1.5 mL 离心管中,以相应缓冲液为对照,测定过氧化氢含量。过氧化氢含量测定参照 Sergiev 方法进行^[7],略有改动。悬浮细胞中加入 20 μ L 10% TCA 在冰浴中用组织研磨器研磨,4℃、12 000 xg 离心 20 min,取 0.5 mL 上清液,加入 0.5 mL 10 mmol/L 磷酸缓冲液(pH 7.8)和 1 mL 1 mol/L 碘化钾,45℃水浴保温 30 min 后,室温静置 20 min,测定 OD₃₉₀值。以相应缓冲液为对照,计算过氧化氢含量。过氧化氢含量(以鲜重计)以 ng/g 表示。

1.8 激活蛋白对水稻幼苗脯氨酸含量的影响

将 10, 1 μ g/mL 的稻瘟菌植物激活蛋白液喷施生育期为 24 d 的水稻幼苗,对照喷施提取稻瘟菌植物激活蛋白的缓冲液,3 d 后,参照邱德文的方法^[8]分别称取处理和对照水稻叶片 0.2 g 加入 5 mL 3% 磺基水杨酸,加盖,沸水浴提取 10 min,自然冷却至室温后离心,得到的上清液即为脯氨酸提取液。用茚三酮法测定水稻叶片脯氨酸含量^[9]。

1.9 激活蛋白对豌豆幼苗醇脱氢酶活性的影响

用 1 μ g/mL 的激活蛋白液喷雾处理豌豆幼苗,以蒸馏水为对照,1 h 后取样,称取 0.2 g 的新鲜豌豆叶片,用液氮研磨后,全部转入离心管中,加酶抽提液 0.8 mL 摇匀,4℃ 15 000 r/min 离心 20 min,上清液为酶提取液。参照初燕侠的方法^[10],反应缓冲液(0.15 mol/L Tris, 3 mmol/L NAD⁺) 2.85 mL 加酶提取液 200 μ L,混匀后加 95% 的乙醇 30 μ L 启动反应,用分光光度计测定 5 min 内的 OD₃₄₀值的变化。以每分钟 Δ A₃₄₀ 增加 0.001 为一个酶活性单位(U),酶活性用 U/mg 表示。

2 结果与分析

2.1 激活蛋白对植物发芽的影响

播种 5 d 后稻瘟菌植物激活蛋白处理种子的发芽率为 88%,对照种子发芽率为 20%,两者差异极显著;播种后 7 d 处理种子的出苗率为 100%,对照

出苗率仅为 55. 33%, 两者差异极显著。说明稻瘟菌植物激活蛋白能显著促进丝瓜种子的发芽。

番茄种子处理 7 d 时处理种子出苗率为 90%, 对照种子出苗率为 38. 67%, 两者差异极显著; 9 d 处理种子的出苗率为 100%, 对照种子出苗率为 89. 33%, 两者差异极显著, 而且激活蛋白处理的幼苗比对照长得健壮(表 1)。

2. 2 激活蛋白对植物幼苗生长的促进作用

用 10, 1, 0. 5 $\mu\text{g/mL}$ 的激活蛋白处理的豌豆和

水稻幼苗高度均高于对照, 达极显著水平(表 2)。说明稻瘟菌植物激活蛋白对幼苗的生长有明显的促进作用, 且浓度较低时仍有较好的作用。

表 1 激活蛋白对番茄种子出苗率的影响

Tab. 1 Effect of activator protein on tomato germination		
处理 Treatment	发芽率(%) Germination rate	
	7d	9d
激活蛋白(1 $\mu\text{g/mL}$) Activator	90. 00 \pm 3. 46 A	100. 00 \pm 0. 00 A
对照 ck	38. 67 \pm 6. 11 B	89. 33 \pm 5. 03 B

表 2 激活蛋白对植物幼苗生长的影响

Tab. 2 Effect of activator protein on growth of plant seedlings				
蛋白浓度 ($\mu\text{g/mL}$) Protein concentration	豌豆苗高(cm) Height of pea seedlings		水稻苗高(cm) Height of rice seedlings	
	激活蛋白 Activator	对照 ck	激活蛋白 Activator	对照 ck
10	18. 68 \pm 0. 91A	16. 72 \pm 1. 09B	28. 87 \pm 0. 62A	26. 98 \pm 0. 90B
1	18. 38 \pm 0. 98A	16. 83 \pm 1. 66B	28. 41 \pm 1. 06a	27. 13 \pm 1. 41b
0. 5	17. 94 \pm 0. 88A	16. 78 \pm 1. 39B	28. 10 \pm 1. 09a	26. 99 \pm 1. 50b

表 3 激活蛋白对水稻抗病性及抗旱性的诱导效果

Tab. 3 Resistance to rice blast and drought resistance induced by activator protein						
处理 Treatment	诱导抗病性 Resistance to rice blast			诱导抗旱性 Drought resistance		
	病叶率(%) Illness leaves rate	病指 Disease index	防效(%) Defensive effect	苗存活率(%) Survival rate of seedling	叶片抗衰度(%) Degree of leaves decline resistance	抗旱综合系数 Drought resistance integrated index
激活蛋白(10 $\mu\text{g/mL}$) Activator	75 \pm 9. 33A	20. 46 \pm 8. 86 A	50. 68	24 \pm 7. 63A	86 \pm 9. 36A	55
对照 ck	85 \pm 10. 56B	41. 85 \pm 9. 43 B		93 \pm 8. 45B	91 \pm 6. 95B	92

2. 3 激活蛋白对水稻抗病性及抗旱性的诱导作用

激活蛋白能显著诱导水稻幼苗对稻瘟病的抗性, 激活蛋白处理的幼苗病指明显低于对照, 控制效果达 50. 68% (表 3), 说明激活蛋白叶面喷雾处理水稻幼苗 3 d 后, 能够增强水稻对稻瘟病的抗病性。此外, 激活蛋白能诱导水稻的抗旱性, 干旱复水后幼苗的存活率比对照提高 69%, 叶片抗衰度提高 5%, 抗旱综合系数提高 37%, 说明激活蛋白增强了水稻的抗旱性。

2. 4 激活蛋白对植物植株及悬浮细胞纤维素酶的影响

用激活蛋白处理的黄瓜幼苗, 纤维素酶活性明显增强, 激活蛋白处理与对照差异达极显著水平(表 4)。

表 4 激活蛋白对黄瓜纤维素酶活性的影响

Tab. 4 Effect of activator protein on cucumber cellulase	
处理 Treatment	纤维素酶活性(U/mg) Activity of cellulase
激活蛋白(10 $\mu\text{g/mL}$) Activator	5 433 \pm 57. 73 A
对照 ck	5 166 \pm 57. 73 B

10, 1, 0. 5 $\mu\text{g/mL}$ 3 个不同浓度稻瘟菌植物激活蛋白处理豌豆幼苗纤维素酶活性明显增强, 10 $\mu\text{g/mL}$ 激活蛋白处理与对照差异达极显著水平(表 5)。

表 5 激活蛋白对豌豆幼苗纤维素酶活性的影响

Tab. 5 Effect of activator protein on pea cellulase			
处理 Treatment	纤维素酶活性(U/mg) Activity of cellulase		
	10 $\mu\text{g/mL}$	1 $\mu\text{g/mL}$	0. 5 $\mu\text{g/mL}$
激活蛋白 Activator (10 $\mu\text{g/mL}$)	3 219. 29 \pm 484. 45 A	2 559. 92 \pm 232. 72 A	2 909. 00 \pm 707. 79 A
对照 ck	2 210. 84 \pm 0. 00 B	2 055. 69 \pm 67. 18 B	2 133. 26 \pm 177. 74 B

用激活蛋白处理烟草悬浮细胞, 纤维素酶活性比对照提高(图 1)。说明稻瘟菌植物激活蛋白处理烟草悬浮细胞, 具有提高其纤维素酶活性的作用。

2. 5 激活蛋白对水稻幼苗脯氨酸含量的影响

10, 1 $\mu\text{g/mL}$ 稻瘟菌植物激活蛋白液处理的水稻幼苗脯氨酸含量比对照明显提高, 证明稻瘟菌植

物激活蛋白有利于提高植物的抗逆性(表6)。

2.6 激活蛋白对碗豆幼苗醇脱氢酶活性的影响

1 $\mu\text{g/mL}$ 的稻瘟激活蛋白处理碗豆幼苗 1 h 后,醇脱氢酶活性单位平均值比对照有所提高,说明稻瘟菌植物激活蛋白能够诱导碗豆幼苗组织内的醇脱氢酶活性的升高(表7)。

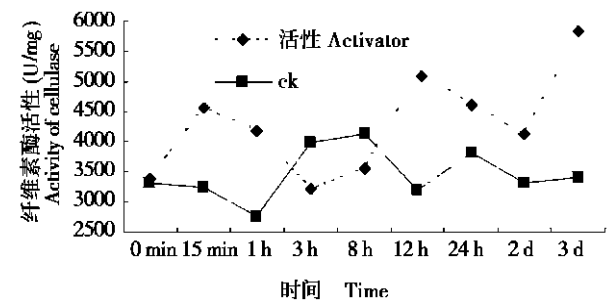


图1 激活蛋白对烟草悬浮培养细胞纤维素酶活性的影响

Fig. 1 Effect of activator protein on cellulase of tobacco suspension cell

表6 激活蛋白对水稻幼苗脯氨酸的影响

Tab. 6 Effect of activator protein on proline of rice seedling

处理 Treatment	脯氨酸含量($\mu\text{mol/g}$) Protein content
激活蛋白(10 $\mu\text{g/mL}$) Activator	232.96 \pm 12.3 A
对照 ck	163.80 \pm 9.8 B
激活蛋白(1 $\mu\text{g/mL}$) Activator	176.54 \pm 10.5 A
对照 ck	147.42 \pm 8.6 B

表7 激活蛋白对碗豆幼苗醇脱氢酶活性的影响

Tab. 7 Effect of activator protein on alcohol dehydrogenase of pea seedling

处理 Treatment	醇脱氢酶活性(U/mg) Dehydrogenase activity
激活蛋白(1 $\mu\text{g/mL}$) Activator	9.55 \pm 0.53 A
对照 ck	8.23 \pm 0.46 B

表8 激活蛋白对烟草悬浮细胞过氧化氢含量的影响

Tab. 8 Effect of activator protein on hydrogen peroxide content in tobacco suspension cell

处理 Treatment	悬浮细胞过氧化氢含量(ng/g) Hydrogen peroxide content of suspension cell
激活蛋白(0.5 $\mu\text{g/mL}$) Activator	8.65 \pm 0.89A
对照 ck	4.96 \pm 0.53B

2.7 激活蛋白对烟草悬浮细胞过氧化氢含量的影响

终浓度 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 的激活蛋白处理烟草悬浮细胞 30 min 后,过氧化氢含量增加,与对照相比差异极显著(表8)。

3 讨论

过敏蛋白(Harpin)和隐地蛋白(Elicitin)等具有诱导激活植物自身的生长和防御系统的功效,并已得到普遍的认同^[11~13],它们都是胞外的分泌蛋白,其来源分别是原核生物与属于低等真菌的卵菌纲。植物激活蛋白是从丝状真菌中分离得到的一种胞内可溶性蛋白。另外笔者已经得到来源稻瘟菌的激活蛋白的氨基酸序列,与 harpin_{Ea} 的序列相似性极低(小于 4%),表明该蛋白是完全不同于 harpin 和 elicitin 的新型蛋白激发子。本研究发现稻瘟菌激活蛋白能明显促进植物的发芽、生长、抗逆,作用机理上可能与过敏蛋白和隐地蛋白有异曲同工之效。

纤维素酶能分解植物细胞的细胞壁,促进细胞的生长和分离,在整体植株上表现出生长快速^[14]。在逆境条件下(旱、盐碱、热、冷、冻),植物体内脯氨酸的含量显著增加,因此植物体内脯氨酸含量在一定程度上反映了植物的抗逆性^[15]。本研究发现,经稻瘟菌激活蛋白处理后,植物中的纤维素酶和脯氨酸含量都增加,故激活蛋白能促进植物的生长和抗逆。另外土壤渍水危害植物是渍水造成的缺氧环境使植物根系和地上部的有氧呼吸受到抑制和无氧呼吸得到加强所致,作为植物对渍水(或缺氧)胁迫的一种反应,常表现为醇脱氢酶(ADH)活性的显著上升,同时其同工酶谱也会发生明显变化。测定发现处理后豌豆幼苗的醇脱氢酶活性增强,这暗示稻瘟菌激活蛋白也可能促进植物的抗涝性。

目前国内外大多数激发子的定性检测方法是注射烟草叶片,然后检测是否产生强烈的过敏性坏死反应^[16~18]。然而笔者在对稻瘟菌激活蛋白的研究过程中发现这种蛋白诱导形成烟草叶片坏死斑的作用不很显著。本研究发现,烟草悬浮细胞经稻瘟菌激活蛋白处理后,半小时内过氧化氢含量的就明显增加,这是细胞对激发子应急反应的先兆^[19]。许多激发子都能引发烟草、水稻、番茄细胞产生大量的过氧化氢^[19~22],相比较烟草叶片坏死斑的出现,检测过氧化氢含量可以更快更灵敏地检测到激活蛋白的存在,可用于纯化鉴定。

本研究初探稻瘟菌激活蛋白诱导植物抗性,促进生长发育等生物学功能的机理,为开发一种广谱、高效、多功能的新型生物农药奠定了基础。

参考文献:

- [1] Wei Z M, Laby R J, Zumoff C H, *et al.* Haplin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora*[J]. *Science*, 1992, 257(5066): 85– 88.
- [2] 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.
- [3] 邱德文. 植物用多功能真菌蛋白质: 中国, 0112866. 0 [P] 2002– 04– 17.
- [4] 赵利辉, 邱德文, 刘 峥, 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.
- [5] 刘国生, 王 琳, 李学梅, 等. 纤维素酶 CMC 糖化力测定方法的改进[J]. *饲料研究*, 1999, 1: 20– 22.
- [6] 陈浩明, 颜长辉, 姜晓芳, 等. 热诱导烟草悬浮细胞的凋亡[J]. *科学通报*, 1999, 44(2): 196– 200.
- [7] Sergievi, Alexievav, Karanove. Effect of spermine, atrazine and combination between them on some endogenous protective systems and stress markers in plants[J]. *Compt Rend Acad Bulg Sci*, 1997, 51: 121– 124.
- [8] 邱德文, 肖友伦, 姚 庆, 等. 植物激活蛋白对黄瓜的促生诱抗相关酶的影响[J]. *中国生物防治*, 2005, 21(1): 41– 44.
- [9] 西北农业大学植物生理生化教研组编著. 植物生理学实验指导[M]. 西安: 陕西科学技术出版社, 1987.
- [10] 初燕侠, 林维秀, 路培新, 等. 人血清醇脱氢酶活性及其与肝炎的关系[J]. *青岛医学院学报*, 1994, 30(3): 217– 219.
- [11] Dewen Qiu, Clayton K, Wei Z M. Effects of Messenger on plant growth & disease resistance in cucumber and strawberry [J]. *Phytopathology*, 2002, 92(6): 67– 69.
- [12] Kamoun S, Young, Mglasco C B, *et al.* Extracellular protein elicitors from *Phytophthora*: host specificity and induction of resistance to bacterial and fungal phytopathogens [J]. *Mol Plant Microbe Interact*, 1993, 6: 15– 25.
- [13] Milat M L, Ricci P, Blein J P, *et al.* Capsidiol and ethylene production by tobacco cells in response to cryptogein [J]. *Phytochemistry*, 1991, 30: 2171– 2173.
- [14] 任 平, 刘成更, 阮祥稳. 纤维素酶对油松种子发芽及幼苗生长的影响[J]. *西北林学院学报*, 2005, 20(1): 78– 79.
- [15] 彭志红, 彭克勤, 胡家金, 等. 渗透胁迫下植物脯氨酸积累的研究进展[J]. *中国农学通报*, 2002, 18(4): 80– 83.
- [16] Matthieu H A J Joosten, Ton J Cozijnsen, Pierre J G M De Wit. Host resistance to a fungal tomato pathogen lost by a single base pair change in an avirulence gene[J]. *Nature*, 1994, 367(27): 384– 386.
- [17] Kamoun S, Young M, Glascock C B, *et al.* Extracellular protein elicitors from *Phytophthora*: host specificity and induction of resistance to bacterial and fungal phytopathogens[J]. *Mol Plant Microbe Interact*, 1993, 6: 15– 25.
- [18] Nümberger T. Signal perception in plant pathogen defense [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 1999, 55: 167– 182.
- [19] Levine A, Tenhaken R, Dixon R, *et al.* H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response[J]. *Cell*, 1994, 79: 583– 593.
- [20] Auh C K, Murphy T M. Plasma membrane redox enzyme is involved in the synthesis of O₂⁻ and H₂O₂ phytophthora elicitor stimulated rose cell[J]. *Plant Physiol*, 1995, 107: 1241– 1247.
- [21] Baker C J, Orlandi E W, Deahl K L. Oxidative metabolism in plant/ bacteria interaction: characterization of a unique oxygen uptake response of potato suspension cell[J]. *Physiol Mol Plant Pathol*, 2001, 59: 25– 32.
- [22] Allan A C, Fluhr R. Two distinct source of elicited reactive oxygen species in tobacco epidermal cell[J]. *Plant Cell*, 1997, 9: 15559– 15572.