

• 研究简报 •

# 新型真菌源激活蛋白对豌豆幼苗生理特性影响的初步研究

顾成波<sup>1,2,3</sup>, 邱德文<sup>\*</sup>, 杨秀芬<sup>1</sup>, 李学锋<sup>3</sup>

(1. 中国农业科学研究院 植物保护研究所, 北京 100094 2. 东北林业大学 森林植物生态学教育部重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150040 3. 中国农业大学 理学院, 北京 100094)

**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豌豆幼苗生理特性的影响。结果表明, 经 1、2、5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  激活蛋白处理后第 7 d 豌豆幼苗根系活力比对照分别增加了 46.0%、58.5% 和 21.0%, 硝酸还原酶活性比对照分别增加 64.38%、140.62% 和 35.31%; 处理后第 15 d 植物叶片叶绿素含量比对照分别增加了 13.69%、18.49% 和 6.16%, 可溶性糖含量比对照分别增加 20.68%、32.03% 和 17.28%, 可溶性蛋白含量比对照分别增加 18.59%、32.05% 和 22.10%。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  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的作用效果最好。

**关键词:** 激活蛋白; 根系活力; 硝酸还原酶; 叶绿素; 可溶性糖; 可溶性蛋白

中图分类号: S482.8

文献标识码: A

文章编号: 1008-7303(2006)03-0275-04

## Study on Effects of New Fungal Activator Protein on Physiological Characteristics of Pea Seedlings

GU Cheng-bo<sup>1,2</sup>, QIU De-wen<sup>\*</sup>, YANG Xiu-fen<sup>1</sup>, LIXue-feng<sup>3</sup>

(1. Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100094, China;

2 Key Laboratory of Forest Plant Ecology, Ministry of Education, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China; 3 College of Science, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

**Abstract** In order to approach the mechanism of enhancing plant growth by new fungal activator protein, the influence of activator protein with different concentration on physiological characteristics of pea seedlings was studied. Compared with control after 7 d treatment with 1, 2 and 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  activator protein, root activity of pea seedlings was increased by 46.0%, 58.5% and 21.0%, and nitrate reductase activity was increased by 64.38%, 140.62% and 35.31%, respectively. Compared with control after 15 d treatment with 1, 2 and 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  activator protein, the content of chlorophyll in leaves was increased by 13.69%, 18.49% and 6.16%, the content of soluble sugar was increased by 20.68%, 32.03% and 17.28%, and the content of soluble protein was increased by 18.59%, 32.05% and 22.10%, respectively. In conclusion, after plants were treated with activator protein of different concentration, the physiological indexes related to plant growth were all enhanced in different degree, and the effect of 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  activator protein was of best efficiency to the plant.

**Key words** activator protein; root activity; NA activity; chlorophyll; soluble sugar; soluble protein

收稿日期: 2006-02-28 修回日期: 2006-06-12

作者简介: 顾成波 (1975-), 男, 博士研究生; \* 通讯作者: 邱德文 (1959-), 男, 博士, 研究员, 主要从事蛋白药物研究与开发。联系电话: 010-62139620 E-mail: dewenqi@hotmail.com

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

©1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

近年来,从植物病原菌中提取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<sup>[1]</sup>。1992年,美国 Wei博士等<sup>[2]</sup>首先从梨火疫病病原细菌 *Erwinia amylovora* 中发现一种分子量约 44 kDa 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 Messenger TM,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<sup>[3]</sup>。Harpin 蛋白的研究和 Messenger TM 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<sup>[4]</sup>曾从交链孢菌 *Alternaria* spp、稻瘟病菌 *Pyricularia oryzae* 和镰刀菌 *Fusarium* spp 等多种真菌中提取获得一种具有生物活性的新型蛋白,并将其命名为激活蛋白(activator protein)。与 Harpin 蛋白相似,该激活蛋白也具有促进植物生长和提高植物抗病性的作用,但其核苷酸和氨基酸序列有别于 Harpin 蛋白。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 42 kDa 等电点约为 4.18。

作者以豌豆为生物试材,研究了用激活蛋白处理豌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。结果简报如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

豌豆 *Pisum sativum* 种子为中豌 6 号,由中国农业科学研究院植物保护研究所温室提供。

有效成分质量分数为 3% 的激活蛋白可湿性粉剂,由 2.4 mg/mL 的激活蛋白配制而成,内含硅藻土 55% (质量分数) 及烷基酚类非离子型表面活性剂、硫代硫酸钠、磷酸氢二钠等,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  $\mu\text{g/mL}$  3 个浓度。选取大小均匀、发育正常的豌豆种子,用 10%  $\text{H}_2\text{O}_2$  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<sup>[5]</sup> [ $\text{KNO}_3$

2 mmol/L  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  2.5 mmol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 mmol/L  $\text{MgSO}_4$  1 mmol/L  $\text{H}_3\text{BO}_3$  30 mmol/L  $\text{Fe-K-EDTA}$  50 mmol/L  $\text{MnSO}_4$  10 mmol/L  $\text{ZnSO}_4$  1 mmol/L  $\text{CuSO}_4$  1 mmol/L 和  $(\text{NH}_4)_6\text{M}_2\text{O}_{24}$  30 mmol/L] 培养(光照/黑暗: 16 h/8 h 昼温/夜温: 25/20℃),至豌豆幼苗 6~7 叶龄时,分别用浓度为 1、2、5  $\mu\text{g/mL}$  的激活蛋白溶液喷雾处理,以同龄期喷清水处理为对照,试验重复 3 次。处理后第 1、3、5、7 d 取幼苗根系,分别测定根系活力及硝酸还原酶活性;处理后第 15 d 取幼苗叶片,分别测定叶绿素含量及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<sup>[6]</sup>;硝酸还原酶活性测定参照张志良<sup>[7]</sup>的方法;叶绿素含量测定参照朱广廉等<sup>[8]</sup>的方法;可溶性糖含量采用蒽酮法测定<sup>[9]</sup>;可溶性蛋白测定采用考马斯亮蓝 G-250 染色法<sup>[6]</sup>。数据分析均采用 SPSS 8.0 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 激活蛋白对豌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,豌豆幼苗根系活力变化趋势如图 1 所示。

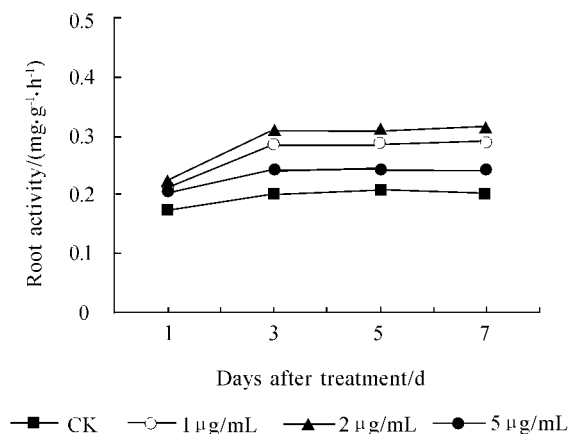


Fig 1 Effect of activator protein on root activity of pea seedlings

从中可以看出,不同浓度激活蛋白处理均可提高豌豆幼苗根系的活力。各浓度处理后 1 d 根系活力即开始迅速提高,至第 3 d 活力提高最显

著, 之后增高幅度渐缓。1、2、5  $\mu\text{g/mL}$  激活蛋白处理后第 7 d 根系活力分别比对照提高 46.0%、58.5% 和 21.0%, 其中以 2  $\mu\text{g/mL}$  激活蛋白处理对根系活力的影响最为显著。

2.2 对豌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豌豆幼苗后的第 1 d 和第 3 d 硝酸还原酶活性呈增加趋势, 其中以 2  $\mu\text{g/mL}$  处理者增加最为显著, 其处理后第 3 d~第 7 d 酶活性仍呈增加趋势; 而 1 和 5  $\mu\text{g/mL}$  处理后第 3 d 酶活性开始呈缓慢降低趋势, 但总的酶活性仍然高于对照; 3 个浓度处理后第 7 d 硝酸还原酶活性分别比对照增加了 64.38%、140.62% 和 35.31%。

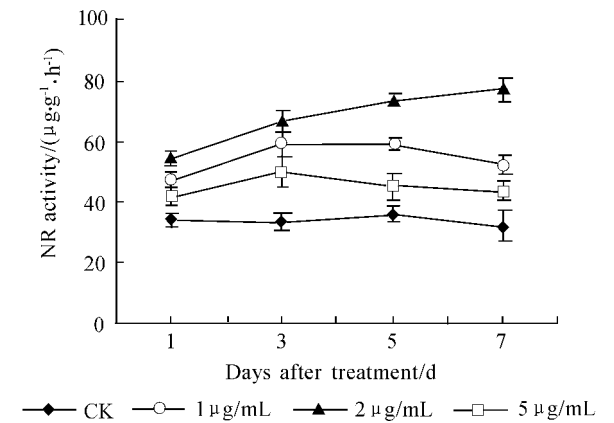


Fig. 2 Effect of activator protein on NR activity of pea seedling

2.3 对豌豆幼苗叶绿素含量的影响

叶绿素是反映植物叶片光合作用能力强弱的重要生理指标, 其含量的多少直接影响植物光合作用的速率。由图 3 可以看出, 各浓度激活蛋白处理后第 15 d 豌豆幼苗中叶绿素的含量均有提高。

经 1、2、5  $\mu\text{g/mL}$  激活蛋白处理后, 豌豆幼苗中叶绿素含量分别比对照组增加了 13.69%、18.49% 和 6.16%, 其中以 2  $\mu\text{g/mL}$  处理者叶绿素含量增加最为明显。

2.4 对豌豆幼苗可溶性糖含量的影响

植物体内可溶性糖含量的变化是碳水化合物代谢的重要指标。由图 4 可以看出, 各浓度激活蛋白处理后第 15 d 豌豆幼苗中可溶性糖的含量均有提高。

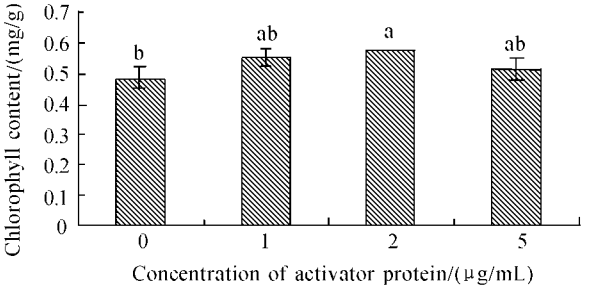


Fig. 3 Effect of activator protein on chlorophyll content of pea seedlings

Note: Each value is the mean of three determinations and the standard error is given by a vertical bar. Different letters above the columns indicate significant differences among the treatments ( $P < 0.05$ ). The same as in the following figs.

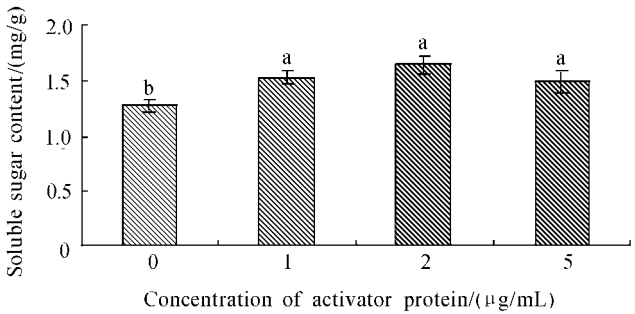


Fig. 4 Effect of activator protein on soluble sugar content of pea seedlings

各浓度激活蛋白处理后, 豌豆幼苗中可溶性糖的含量分别比对照增加了 20.68%、32.03% 和 17.28%, 差异均达显著水平, 其中 2  $\mu\text{g/mL}$  处理对可溶性糖含量的影响最大。

2.5 对豌豆幼苗可溶性蛋白含量的影响

植物体内可溶性蛋白含量的多少可以衡量植物对逆境的适应能力。由图 5 可看出, 各浓度激活蛋白处理后第 15 d 豌豆幼苗中可溶性蛋白的含量均有提高。

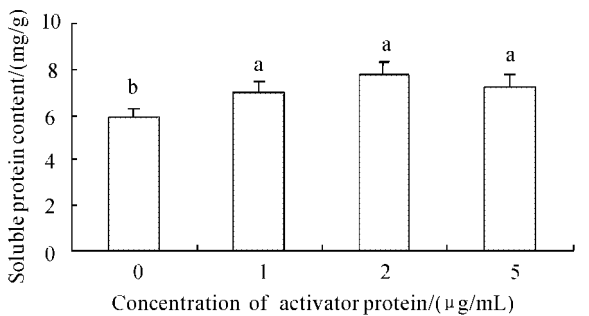


Fig. 5 Effect of activator protein on soluble protein content of pea seedlings

经 1、2、5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  激活蛋白处理后, 豌豆幼苗中可溶性蛋白含量分别比对照增加了 18.59%、32.05% 和 22.10%, 其中 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  处理者可溶性蛋白含量增加最为明显。

### 3 讨论

本研究结果表明, 1、2、5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  激活蛋白处理均可增强豌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  $\mu\text{g}/\text{mL}$  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豌豆幼苗后, 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<sup>[10]</sup>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豌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, Hapin 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<sup>[11]</sup>。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<sup>[10, 12]</sup>。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] GUO Ze-jian(郭泽建), JIANG Dong-hua(蒋冬花). 植物病原菌激发子与信号识别机理 [J]. J Zhejiang Normal Univ (Natural Sciences) [浙江师范大学学报(自然科学版)], 2003 26(1): 1-7
- [2] Wei Z M, Wei Z, Laby R J et al. Hapin elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia Amylovora* [J]. Science, 1992, 257: 85-88
- [3] QIU De-wen(邱德文). 微生物蛋白农药研究进展 [J]. Chin J Biol Control(中国生物防治), 2004, 20(2): 91-94
- [4] QIU De-wen(邱德文). Plant multi-functional fungal protein (植物用多功能真菌蛋白质) [P]. CN 1344727A, 2002-04-17
- [5] Chaoui A, Jamar B, ElFerjani E. Effects of cadmium and copper on peroxidase, NADH oxidase and IAA oxidase activities in cell wall soluble and microsomal membrane fractions of pea roots [J]. J Plant Physiol, 2004, 161: 1225-1234
- [6] ZOU Qi(邹琦), LI He-sheng(李合生). Guide for Plant Physiological Experiment (植物生理学实验指导) [M]. Beijing(北京): China Agriculture Press(中国农业出版社), 2000 173-174
- [7] ZHANG Zhi-liang(张志良), QU Wei-qing(瞿伟菁). Guide for Plant Physiological Experiment(植物生理学实验指导) [M]. Beijing(北京): Higher Education Press(高等教育出版社), 2003. 41-67
- [8] ZHU Guang-lian(朱广廉), ZHONG Hui-wen(钟海文), ZHANG Ai-qin(张爱琴). Plant Physiological Experiment (植物生理学实验) [M]. Beijing(北京): Peking University Press(北京大学出版社), 1990 51-54
- [9] BAI Bao-zhang(白宝璋), JIN Zhan-zhong(靳占忠), LI De-chun(李德春). Testing Techniques for Plant Biochemistry and Physiology (植物生理生化测试技术) [M]. Beijing(北京): China Science and Technology Press(中国科学技术出版社), 1995 34-100
- [10] ZHAO Li-hui(赵利辉), QIU De-wen(邱德文), LU Zheng(刘铮), et al. 植物激活蛋白对水稻抗性相关基因转录水平的影响 [J]. Scientia Agricultura Sinica (中国农业科学), 2005 38(7): 1358-1363
- [11] DUAN Tong-zhao(段同钊). 新型植物生化激活剂-康壮素 [J]. Vegetable(蔬菜), 2003, 12: 40-41
- [12] LI Li(李丽), QIU De-wen(邱德文), LU Zheng(刘铮), et al. 植物激活蛋白对番茄抗病性的诱导作用 [J]. Chin J Biological Control(中国生物防治), 2005 21(4): 265-268

(Ed. TANG J)