

徐 艳,江建敏,国 骏,等. 黄瓜褐斑病菌菌丝蛋白对小麦种子萌发、生长及抗旱性的影响[J]. 江苏农业科学,2014,42(11):159–161.
doi:10.15889/j.issn.1002–1302.2014.11.054

黄瓜褐斑病菌菌丝蛋白对小麦种子萌发、生长及抗旱性的影响

徐 艳^{1,2}, 江建敏², 国 骏², 纪明山¹

(1. 沈阳农业大学植物保护博士后流动站, 辽宁沈阳 110161; 2. 沈阳农业大学生物科学技术学院, 辽宁沈阳 110161)

摘要:通过液体发酵培养获得黄瓜褐斑病菌菌丝,再经反复冻融法获得菌丝蛋白,研究不同浓度菌丝蛋白对小麦种子萌发及生长的影响。结果表明,黄瓜褐斑病菌菌丝蛋白能显著促进小麦种子萌发及幼苗生长,具有激活蛋白的功能。不同浓度菌丝蛋白对小麦种子萌发及幼苗生长的促进作用不同,其中以 0.625 mg/mL 菌丝蛋白对小麦种子萌发及生长的促进作用最明显:种子萌发率从 70% 提高到 85%;处理 5、7、9、11 d 幼苗株高与对照组相比分别提高 25%、50%、58%、45%。小麦抗旱性诱导作用也以 0.625 mg/mL 菌丝蛋白处理的小麦最佳,与对照相比,幼苗存活率提高 21.28 百分点,抗衰度提高 19.58 百分点,苗抗旱综合系数从 35.45 提高到 55.88,是对照的 1.57 倍,根系活力是对照的 2 倍。

关键词:黄瓜褐斑病;菌丝蛋白;激活蛋白;种子萌发;生长;抗旱性;小麦

中图分类号: S512.101 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002–1302(2014)11–0159–02

激活蛋白是一类从真菌中分离的、具有激活子功能的新蛋白质。激活蛋白主要通过激活植物体内分子免疫系统,提高植物自身免疫力,激发植物体内的一系列代谢调控,促进植物根、茎、叶生长和叶绿素含量提高,从而达到提高作物产量的目的^[1]。基因芯片分析结果表明,激活蛋白处理后,水稻一系列与防御和生长相关的基因上调表达^[2]。激活蛋白能诱导多种植物产生系统抗性,促进植物生长,改善作物品质。激活蛋白在交链孢菌(*Alternaria* sp.)、纹枯病菌(*Rhizoctonia solani*)、黄曲霉菌(*Aspergillus* sp.)、稻瘟菌(*Magnaporthe grisea*)、青霉菌(*Penicillium* sp.)、木霉菌(*Trichoderma* sp.)、镰刀菌(*Fusarium* sp.)等多种真菌中都有发现^[3],不同来源的蛋白激活子在理化性质上略有差异,但生物活性相似。为进一步发掘具有我国自主知识产权的新型激活蛋白,本研究以黄瓜褐斑病菌为试验材料,通过液体发酵获得菌丝,低温提取其蛋白,研究其生物功能。

1 材料与方法

1.1 主要材料和仪器

黄瓜褐斑病菌由沈阳农业大学植物保护学院生物农药实验室提供。

离心机,恒温水浴锅,电子天平,旋转蒸发仪,真空干燥箱,培养皿(直径 90 mm),自动恒温箱。

1.2 方法

1.2.1 黄瓜褐斑病菌菌丝体的培养

用接种针挑取少许黄

瓜褐斑病菌菌丝,接种到 PDA 固体培养基上,放置在培养箱中 28 ℃ 恒温培养 7 d 后,取直径 1 cm 的固体培养菌块接种到 200 mL YPD 液体培养基中,于 28 ℃ 恒温振荡培养 4~5 d,真空抽滤收集菌丝体,用双蒸水反复洗涤 4 次,低温干燥。

1.2.2 黄瓜褐斑病菌菌丝蛋白的获得 取黄瓜褐斑病菌菌丝体 10 g,用粉碎机粉碎,置于烧杯中于 -25 ℃ 反复冻融 2 次,在高速冷冻离心机上 12 000 r/min 离心 15 min,收集上清,冷冻干燥,冻存于 -20 ℃ 冰箱中备用。

1.2.3 黄瓜褐斑病菌菌丝蛋白含量的测定 蛋白质含量测定采用考马斯亮蓝法。

蛋白质标准曲线:取牛血清白蛋白,配制成浓度 1 mg/mL,用蒸馏水分别稀释成浓度为 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mg/mL。准确吸取所配各管溶液 0.1 mL,分别放入具塞试管中,加入 5 mL 考马斯亮蓝 G-250 试剂,混匀,放置 2 min 后,在 595 nm 处测定吸光度。

菌丝蛋白含量测定:称取菌丝蛋白,用蒸馏水配制成浓度梯度。分别量取上述溶液 0.1 mL 并放入 20 mL 具塞试管中,加入 5 mL 考马斯亮蓝 G-250 试剂,将试管中溶液缓慢混合均匀,放置 2 min 后,在 595 nm 处测定吸光度。

1.2.4 黄瓜褐斑病菌菌丝蛋白对小麦种子萌发及幼苗生长的影响^[4-5] 取籽粒饱满的小麦种子,消毒后用不同浓度菌丝蛋白浸种 8 h,每处理 20 粒种子,置于铺有滤纸的培养皿中,以蒸馏水为对照,12 h 后记录发芽率,于培养 5、7、9、11 d 时测量株高。

1.2.5 黄瓜褐斑病菌菌丝蛋白对小麦抗旱性诱导作用的影响^[6] 取健康饱满的小麦种子,消毒后用不同浓度菌丝蛋白浸种 8 h,每处理 20 粒种子置于铺有滤纸的培养皿中,然后加入 60 g 石英砂,以蒸馏水为对照,适时补水。小麦生长 14 d 时停止补水,进行干旱胁迫,当 70% 植株萎蔫、叶片卷成针状时复水,再次干旱胁迫后,再复水,1 d 后统计幼苗存活率和叶片抗衰度,计算幼苗抗旱综合系数。各处理均重复 3 次。

收稿日期:2013–12–17

基金项目:辽宁省博士后基金。

作者简介:徐 艳(1973—),女,吉林吉林人,博士,讲师,主要从事天然产物活性成分研究。E-mail:xuyan1001@hotmail.com。

通信作者:纪明山,博士,教授,博士生导师,主要从事生物农药研究。

Tel:(021)88487148;E-mail:jimingshan@163.com。

幼苗存活率 = (第 1 次干旱胁迫后存活株数/第 1 次干旱胁迫前株数 + 第 2 次干旱胁迫后存活株数/第 1 次干旱胁迫后存活株数) × 0.5 × 100% ;

叶片抗衰度 = (叶片绿色段长/叶片全长) × 100% ;

幼苗抗旱综合系数 = (幼苗存活率 + 叶片抗衰度) × 100/2。

1.2.6 黄瓜褐斑病菌菌丝蛋白对小麦植株根系活力的影响^[7] 采用氯化三苯基四氮唑(TTC)法测定根系活力。称取根尖样品 0.5 g,放入小烧杯中,加入 0.4% TTC 溶液和 66 mmol/L pH 值 7.0 的磷酸缓冲液的等量混合液 10 mL,把根充分浸没在溶液内,在 37 ℃ 下暗保温 1 ~ 3 h,此后加入 1 mol/L 硫酸 2 mL,停止反应。与此同时做一空白试验,先加硫酸,再加根样品,其他操作同上。然后把根取出,吸干水分后与乙酸乙酯或丙酮 3 ~ 4 mL 和少量石英砂一起在研钵内磨碎,以提取三苯基甲腈。将红色提取液移入试管,并用少量乙酸乙酯或丙酮把残渣洗涤 3 次,皆移入试管,最后加乙酸乙酯或丙酮使总量为 10 mL,用分光光度计在波长 485 nm 下比色,以空白试验作参比测出吸光度,查标准曲线即可求出 TTC 的还原量。

TTC 还原强度 = TTC 还原量(g)/[根重(g) × 时间(h)]。

标准曲线的制作:取 0.4% TTC 溶液 0.2 mL 放入 10 mL 量瓶中,加少许 Na₂S₂O₄ 粉末摇匀后立即产生红色的三苯基甲腈,再用乙酸乙酯或丙酮定容至刻度,摇匀。然后分别取该液 0.25、0.50、1.00、1.50、2.00 mL 置于 10 mL 容量瓶中,用乙酸乙酯定容至刻度,即得含三苯基甲腈 25、50、100、150、200 μg/mL 的标准比色系列,以空白作参比,在 485 nm 波长下测定吸光度。

2 结果与分析

2.1 黄瓜褐斑病菌菌丝蛋白对小麦种子萌发的影响

由图 1 可以看出,与对照相比,黄瓜褐斑病菌菌丝蛋白能显著促进小麦种子萌发。不同浓度菌丝蛋白浸泡过的小麦种子萌发率均高于对照,其中以 0.625 mg/mL 菌丝蛋白对小麦生长的促进作用最明显,种子萌发率从 70% 提高到 85%。

2.2 黄瓜褐斑病菌菌丝蛋白对小麦生长的影响

由图 2 可知,经菌丝蛋白液处理后,小麦的生长速率也明

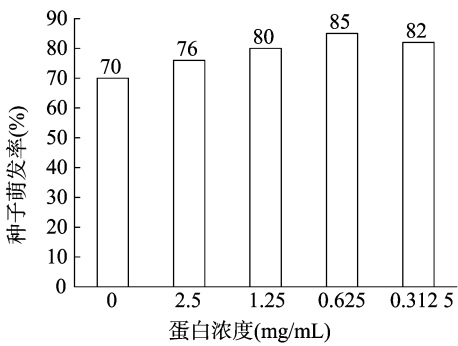


图1 不同浓度黄瓜褐斑病菌菌丝蛋白对小麦种子萌发的影响

显提高,幼苗生长旺盛,株高明显高于对照,其中以 0.625 mg/mL 菌丝蛋白对小麦种子生长的促进作用最显著,处理 5、7、9、11 d 幼苗株高与对照相比分别提高 25%、5%、58%、45%。

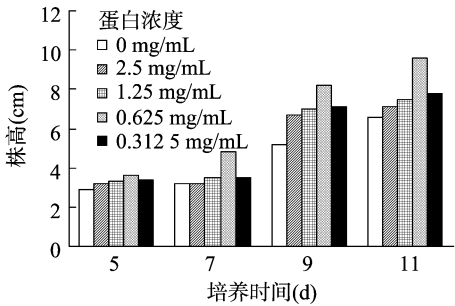


图2 不同浓度黄瓜褐斑病菌菌丝蛋白对小麦生长的影响

2.3 黄瓜褐斑病菌菌丝蛋白对小麦诱导抗旱性及根系活力的影响

对小麦进行干旱胁迫后,对照组的小麦大部分萎焉,而菌丝蛋白组处理的小麦生长良好,保持直立状态。其中以 0.625 mg/mL 菌丝蛋白对小麦抗旱性作用最显著,干旱复水后,0.625 mg/mL 菌丝蛋白处理的小麦幼苗存活率比对照提高 21.28 个百分点,抗衰度比对照提高 19.58 百分点,幼苗抗旱综合系数从 35.45 提高到 55.88,是对照的 1.57 倍,根系活力是对照的 2 倍(表 1),说明黄瓜褐斑病菌菌丝蛋白增强了小麦的抗旱性。

表 1 不同浓度黄瓜褐斑病菌菌丝蛋白对小麦抗旱性的影响

菌丝蛋白浓度 (mg/mL)	叶片抗衰度 (%)	幼苗存活率 (%)	幼苗抗旱综合系数	根系活力 [g/(g·h)]
2.5	32.26 ± 3.39	60.32 ± 3.54	46.29 ± 3.46	0.007 6 ± 0.000 9
1.25	34.48 ± 4.36	63.20 ± 2.89	48.84 ± 3.62	0.008 5 ± 0.000 6
0.625	39.41 ± 2.49	72.35 ± 2.19	55.88 ± 2.34	0.010 8 ± 0.000 6
0.312 5	36.09 ± 3.14	69.72 ± 4.25	52.90 ± 3.69	0.009 1 ± 0.000 7
0	19.83 ± 2.45	51.07 ± 2.43	35.45 ± 2.44	0.005 4 ± 0.000 7

3 结论与讨论

本试验结果表明,黄瓜褐斑病菌菌丝蛋白对小麦种子萌发及生长表现为促进作用,具有激活蛋白的功能。经过 0.625 mg/mL 菌丝蛋白处理过的小麦种子生长最好,并且能够增强小麦的抗旱性。

本试验仅研究了单一的作物小麦,而激活蛋白的应用范

围很广,因此它对其他作物(如黄瓜、番茄等)的影响可作进一步研究。

本试验研究了激活蛋白对小麦种子萌发及幼苗生长的影响,仅仅验证了其促进萌发、促进幼苗生长及抗旱功效,而激活蛋白的功能还很多,可作进一步研究。本研究所用黄瓜褐斑病菌菌丝蛋白仅为粗蛋白,有必要继续对其进行分离纯化获得活性物质并进行进一步研究。

赵丽,王娟,胡吉林,等. 黄褐新园蛛(*Neoscona scylla*)的生物生态学特性[J]. 江苏农业科学,2014,42(11):161-164.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2014.11.055

黄褐新园蛛(*Neoscona scylla*)的生物生态学特性

赵丽,王娟,胡吉林,李超民,史怡雪,汤亚飞,王智

(湖南农业大学生物科学技术学院,湖南长沙 410128)

摘要:运用田间观察和室内外饲养相结合的方法,对稻田蜘蛛优势种黄褐新园蛛(*Neoscona scylla*)的生物生态学特性进行研究。结果表明:每年黄褐新园蛛发生3~4代,第4代不完整,以第2、3代历期最短,第4代(越冬代)历期最长;以成蛛、亚成蛛或幼蛛越冬,其分布图式为聚集分布;属结网型蜘蛛。雌蛛、雄蛛均可多次交配,雌蛛一生最多可产卵12次,卵囊含卵量26~185粒,平均82粒。幼蛛期40~120 d,成蛛期33~176 d。除第2代外,各世代性比均为雌多于雄。

关键词:黄褐新园蛛;生物生态学特性;生活史;耐饥力

中图分类号: Q966 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)11-0161-04

在农田生态系统中,蜘蛛种类繁多,繁殖能力快,捕食能力强,耐饥饿,是农田害虫的重要捕食性天敌,是水稻害虫生态调控的重要生物因子^[1-2]。黄褐新园蛛(*Neoscona scylla*)属结网型蜘蛛,是水稻叶面害虫的重要捕食者^[3-5],是湖南省稻区蜘蛛优势种之一^[6-7],但目前有关黄褐新园蛛生物生态学的研究还未见报道。本研究探讨了黄褐新园蛛生活史和生长发育过程中所表现的生物生态学特性,旨在为田间保护利用该蜘蛛以及为其人工饲养、释放提供参考。

1 材料与方法

1.1 室外饲养

黄褐新园蛛饲养方法参考王智的方法^[8]并稍作改变。在16个直径28 cm的塑料桶内栽2丛禾,制作直径30 cm、高1 m的尼龙窗纱网罩罩上,下面用橡皮筋扎紧,使其中生境类似大田生境,网罩上装上0.6~0.8 m长的拉链以便观察和放置饵料,每个笼箱内放刚孵化的幼蛛5头,每个笼箱内每天定时放40头褐飞虱。每天观察记录其寻食、蜕皮、各蛛态发育

历期、寻偶、交配、产卵、孵化、寿命等生物生态学特性。

1.2 室内饲养

随机挑选刚孵化的幼蛛60头,接入直径2.5 cm的大型量筒内,每量筒1头,进行单头饲养。筒底装1~1.5 cm深的水,水上有3~5个孔的泡沫塑料隔离(与水接触),在泡沫塑料的2~3个孔上有稻谷种子萌发的新苗,每天投喂足量的褐飞虱和果蝇作为食物。每天观察记录其生长、蜕皮、取食、死亡及各龄期形态特征等。

1.3 卵囊含卵量与孵化率统计

待雌成蛛产卵后,将卵囊取出转入指管,卵孵化及幼蛛扩散后,破卵囊检查统计。

1.4 数据处理

采用Excel软件作图,用SPSS软件进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 年生活史

黄褐新园蛛1年发生4代,以成蛛、幼蛛越冬,越冬代历期最长,为91 d;第3代最短,历期57 d。各代平均历期为72.2 d(表1)。

2.2 生活周期

生活周期是指从卵发育生长到性成熟的1个世代。各世代历期为79.0~150.0 d,越冬代最长,历期139.0 d,第1代次之,历期79.0~89.0 d,第2、3代最短,历期70.0~79.0 d。这可能是越冬代蜘蛛大多以幼蛛越冬,停止发育有关。其中卵的

收稿日期:2014-05-21

基金项目:国家自然科学基金(编号:31071943)。

作者简介:赵丽(1989—),女,湖南张家界人,硕士研究生,研究方向为动物发育生物学。E-mail:18229890616@163.com。

通信作者:王智,教授,主要从事环境生态学、生态产品开发、动物发育生物学研究。E-mail:wangzspider@sina.com。

参考文献:

- [1] 邱德文. 植物用多功能真菌蛋白质: 中国, 0112866. 0 [P]. 2002-04-17.
- [2] 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.
- [3] 黄丽俊, 邱德文, 刘 峥, 等. 应用表达谱基因芯片筛选植物激活蛋白处理水稻相关差异基因[J]. 科学技术与工程, 2005, 5(24): 1885-1889.

- [4] 张志刚, 邱德文, 杨秀芬, 等. 新型激活蛋白对棉花种子发芽及幼苗生长的影响[J]. 江西农业学报, 2006, 18(3): 1-5.
- [5] 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.
- [6] 张云华. 灰葡萄孢菌激活蛋白的纯化、基因克隆与功能研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2008.
- [7] 张志良, 瞿 伟. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 高等教育出版社, 2003: 277-278.