

张海萍,马前程,麻浩,等.黄萎病菌激活蛋白的提取及对棉花发芽的影响[J].江苏农业科学,2017,45(5):96-98.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.05.026

# 黄萎病菌激活蛋白的提取及对棉花发芽的影响

张海萍<sup>1</sup>,马前程<sup>1</sup>,麻浩<sup>2</sup>,哈那提别克<sup>1</sup>,顾爱星<sup>1</sup>

(1.新疆农业大学农学院/新疆维吾尔自治区高校农林有害生物监测与安防重点实验室,新疆乌鲁木齐 830052;

2.南京农业大学农学院,江苏南京 210093)

**摘要:**为探索棉花黄萎病的生物防治方法,对棉花黄萎病菌激活蛋白的提取方法及活性进行了研究。将从感染黄萎病的棉花组织中分离培养的棉花黄萎病菌置于不同温度、不同转速条件下进行培养,对棉花黄萎病菌的激活蛋白进行提取,用 1 000 倍、1 500 倍、2 000 倍激活蛋白稀释液分别处理 2 个棉花品种(新陆中 11 号、新陆中 50 号)的种子,检测激活蛋白对棉花种子发芽率的影响。结果表明,获得该菌最佳发酵条件为 26 ℃、200 r/min、72 h,在此条件下,菌丝干质量达 5.88 g/L。经 SDS-PAGE 电泳检测发现,在分子量为 25 ku 附近有 1 条集中的电泳谱带;激活蛋白稀释液能够提高这 2 种棉花种子的发芽率,其中稀释 1 500 倍时效果最明显。结果表明,棉花黄萎病菌激活蛋白具有高效的诱导激活活性,可为研制低成本的蛋白生物农药提供理论依据。

**关键词:**棉花;黄萎病菌;激活蛋白;发芽率

**中图分类号:** S435.621.2<sup>+</sup>4

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1002-1302(2017)05-0096-03

棉花黄萎病是一种世界性病害,其危害大、持续时间长、可导致巨大经济损失。棉花黄萎病的发生是因为土壤含大量菌,病原菌产生分化,缺乏抗棉花黄萎病的优良品种,温湿度适宜条件不好,缺乏对棉花黄萎病严格的检疫制度和有效快速的检疫手段等。1935 年棉花黄萎病从美国传入我国,在陕西泾阳、山西运城、山东高密和河南安阳等地区相继发生<sup>[1]</sup>。1970 年以后,我国 12 个省(市、区)均发生了棉花黄萎病,主要集中在黄河流域棉区。据统计,2000 年棉花黄萎病发病面积已经达到 300 万  $\text{hm}^2$ <sup>[2]</sup>,种子交流使病原菌的种类越来越多,形成了复合种群(基因型)<sup>[3]</sup>。有研究表明,棉花黄萎病菌的致病力均存在分化和变异,造成棉花黄萎病逐年加重的主要原因之一是强致病力菌系的出现<sup>[4]</sup>。农药对农业生产做出了巨大贡献,但是副作用很多,如环境污染、生态破坏、病虫抗药性和农产品安全性等问题,为解决这些问题出现了生物农药、生物肥料,使用生物农药、生物肥料是确保现代农产品安全生产、保护环境的关键技术措施,用生物肥料代替农药已经成为一种趋势。美国康奈尔大学韦忠民博士提出了过敏蛋白具有抗病性功能<sup>[5]</sup>。2001 年美国 Cornell 大学和 E-DEN 生物科技公司从过敏反应蛋白中共同开发和研制了具有抗病防虫功能的蛋白质分子生物新农药 Messenger<sup>[6]</sup>。这种产品在多种大田作物、经济作物上效果十分明显,对多种病虫防治效果达 50%~80%,增产 10%~20%,是一种较为理想的环境友好型生物农药。目前,具有代表性的微生物蛋白农药有过敏蛋白(harpin)、隐地蛋白(crypogein)<sup>[7]</sup>和激活蛋白(ac-

tivator)<sup>[8]</sup>等几种类型。激活蛋白的作用机理在性质上类似动物免疫的一种抗病机制,无毒,在植物体内和土壤中易分解、无残留,是一种适合农业需求和环境友好的生物农药<sup>[9]</sup>。

黄萎病菌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;通过激发植物体内的一系列代谢调控,促进植物根、茎、叶生长和提高叶绿素含量,从而提高作物产量。

本试验为探索棉花黄萎病的生物防治方法,对棉花黄萎病菌激活蛋白的提取及活性进行了初步研究。从感染黄萎病的棉花组织中分离培养棉花黄萎病菌,置于不同温度下以不同转速进行培养,对棉花黄萎病菌的激活蛋白进行提取,用激活蛋白处理棉花种子,检测激活蛋白对棉花种子发芽的影响,探明棉花黄萎病菌激活蛋白是否具有诱导激活活性,为研制低成本的蛋白生物农药提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料、仪器与试剂

1.1.1 菌种 棉花黄萎病菌,采自石河子棉田的带病棉花植株上,病原菌在新疆农业大学实验楼生物技术实验室进行分离培养,经鉴定为棉花黄萎病菌。

1.1.2 棉花种子 棉花品种为新陆中 11 号、新陆中 50 号,均由新疆农业大学农学院作物遗传育种实验室提供。

1.1.3 仪器 立式压力蒸汽灭菌器,购自上海博讯实业有限公司;1-15K 高速冷冻离心机,购自德国 SIGMA 公司;HH.SY11-N 单列两孔水浴锅,购自金坛市医疗仪器厂;FM100 雪花制冰机,购自美国 GRANT 公司;FM2004 电子天平,购自上海精密科学仪器有限公司。

1.1.4 试剂 Tris-HCl、丙烯酰胺、甘氨酸、N,N'-亚甲基双丙烯酰胺、过硫酸铵、四甲基乙二胺、考马斯亮蓝 R-250、二硫苏糖醇、十二烷基硫酸钠(SDS)、溴酚蓝、甘油、甲醇、乙酸等,均为国产分析纯。

收稿日期:2016-01-06

基金项目:棉花生物学国家重点实验室开放课题项目(编号:CB2014A05)。

作者简介:张海萍(1989—),女,山西朔州人,硕士研究生,研究方向为分子微生物。E-mail:1326637001@qq.com。

通信作者:顾爱星,博士,教授,主要从事作物转基因、微生物资源利用和抗病虫分子克隆的研究。E-mail:guai\_xing@sina.com。

## 1.2 试验方法

1.2.1 棉花黄萎病菌发酵条件的优化<sup>[10]</sup> 将棉花黄萎病菌接种在 PDA 固体培养基上培养,打 3 个菌饼置于装有 100 mL PDA 液体培养基的三角瓶(250 mL)中,设 9 个重复,进行振荡培养,记录菌丝干质量。振荡温度为 24、26、28 ℃;转速为 160、180、200 r/min;振荡时间为 24、48、72 h。

1.2.2 棉花黄萎病菌激活蛋白的提取及原液的设定 激活蛋白的提取参照文献[11]中的方法进行。依次用无菌水和 0.5 mol/L Tris-HCL 缓冲液冲洗菌体去除孢子,抽滤得菌丝体;将菌丝体研磨(冰上操作),每次研磨 5 min;在 4 ℃下,以 15 000 r/min 离心 15 min,取上清液于沸水中加热 10~15 min,取出置于冰上冷却 5 min;再于 4 ℃下,15 000 r/min 离心 15 min,上清液即为激活蛋白粗提液原液,然后对其进行 SDS-PAGE 分析。

1.2.3 棉花黄萎病菌激活蛋白对棉花种子发芽的影响<sup>[12]</sup>

将棉花黄萎病菌激活蛋白粗提液原液依次用水稀释 1 000 倍、1 500 倍、2 000 倍,分别对 2 个棉花品种的种子浸泡处理 8 h,以清水浸泡作对照。每个处理浸泡种子 20 粒,重复 3 次。取出后用滤纸吸干滤液,将种子放在垫有滤纸(用蒸馏水润湿)的培养皿中,置于人工模拟气候箱中培养。每隔 24 h 检测 1 次种子发芽率和幼根生长情况。

## 2 结果与分析

### 2.1 棉花黄萎病菌培养条件的优化结果

图 1、图 2、图 3 分别表示不同发酵时间的 1 L PDA 液体培养基中棉花黄萎病菌菌丝的干质量,菌丝在温度为 26 ℃、转速为 200 r/min、时间为 72 h 的发酵条件下生长量最大,菌丝干质量可达 5.88 g/L(图 3),这为大量提取棉花黄萎病菌激活蛋白奠定了基础。

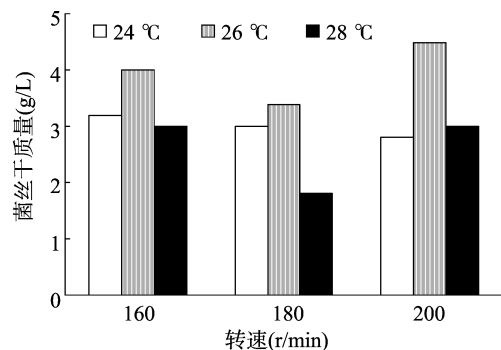


图1 棉花黄萎病菌菌丝 24 h 生长量

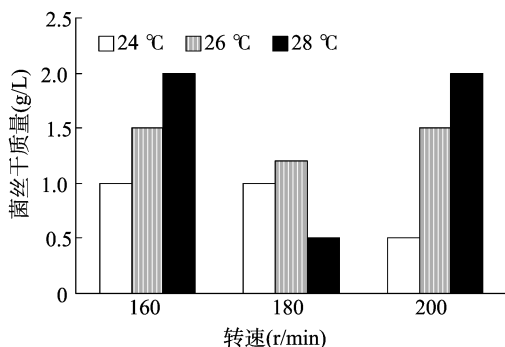


图2 棉花黄萎病菌菌丝 48 h 生长量

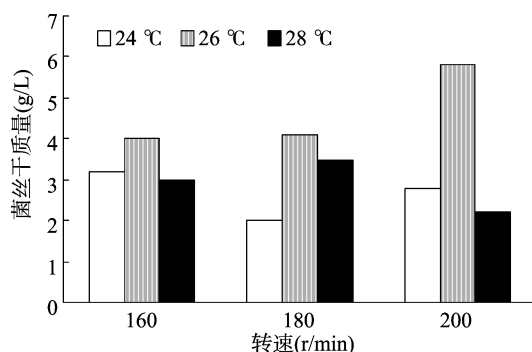
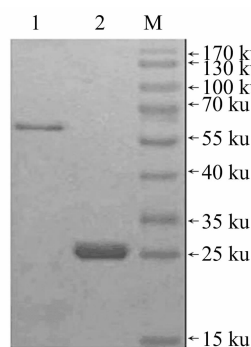


图3 棉花黄萎病菌菌丝 72 h 生长量

### 2.2 棉花黄萎病菌激活蛋白的提取结果

电泳检测结果显示,提取蛋白分子量大小分布范围较广,其中最为明显的是在分子量为 25 ku 附近有 1 条较为集中的电泳谱带(图 4)。



M—分子标记考马斯亮兰R-250; 1—石河子134黄萎病菌激活蛋白粗提液1号; 2—石河子134黄萎病菌激活蛋白粗提液2号

图4 棉花黄萎病菌激活蛋白粗提液 SDS-PAGE 电泳图谱

### 2.3 棉花黄萎病菌激活蛋白对棉花种子发芽的影响

2.3.1 发芽率 从图 5、图 6 可知,在培养 2 d 后,经激活蛋白 1 500 倍稀释液处理的种子发芽率明显高于其他处理,发芽率高达 95%。对于新陆中 50 号,激活蛋白稀释液处理的种子发芽率均高于对照,其中 1 500 倍稀释液处理的种子发芽率最高,在培养 2 d 后其发芽率可达 95%。

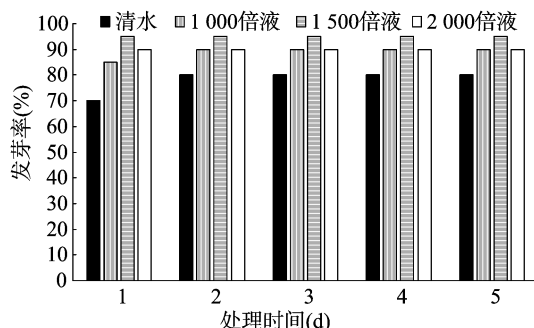


图5 不同稀释度激活蛋白处理后新陆中 50 号种子的发芽率

2.3.2 胚根生长情况 棉花黄萎病菌激活蛋白对棉花种子的胚根长、胚根鲜质量、胚根干质量均有一定的影响,用 SPSS 18.0 软件处理结果如表 1 所示。与对照相比,激活蛋白 1 000 倍稀释液和 1 500 倍稀释液对棉花种子的胚根长、胚根鲜质量、胚根干质量均有提升作用。其中稀释 1 500 倍时,激活蛋白对棉花种子胚根生长的促进作用最强,且均达到显著

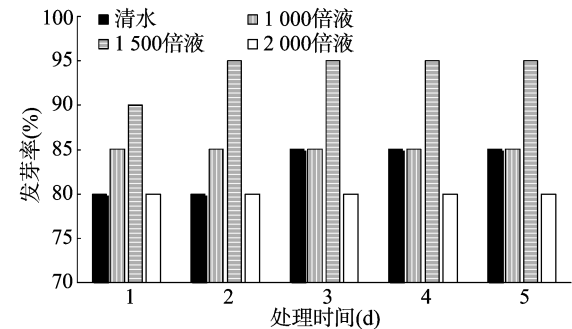


图6 不同稀释度激活蛋白处理后新陆中 11 号种子的发芽率

表 1 2 个品种棉花种子胚根生长情况

处理	胚根长 (cm)		胚根鲜质量 (mg)		胚根干质量 (mg)	
	新陆中 11 号	新陆中 50 号	新陆中 11 号	新陆中 50 号	新陆中 11 号	新陆中 50 号
清水	4.37Bc	4.17Bc	62.75Cc	61.29AC	5.49Ab	5.33Ab
1 000 倍液	5.28Ab	5.03Ab	78.23Ab	73.06Ab	7.23Ab	6.76Aa
1 500 倍液	5.36Aa	5.12Aa	80.56Aa	75.67Aa	7.45Aa	7.13Aa

注:同列数据后不同大写字母、小写字母分别表示在 0.01、0.05 水平上差异极显著、显著。

72 h 时活性最高。从真菌中提取的植物激活蛋白是一种高效、多功能、广谱性、无污染的能诱导植物对病虫害产生免疫抗性的新型植物诱导物质<sup>[14]</sup>。

本试验结果表明,棉花黄萎病病菌的最佳发酵条件为 26 ℃、200 r/min、72 h,在此条件下,菌丝干质量可达 5.88 g/L,这与前人的研究结论<sup>[15]</sup>相同,同时提供了最佳培养温度和最佳培养转速,为棉花黄萎病病菌激活蛋白的批量生产提供了技术依据。

4 结论

真菌蛋白的产量取决于其发酵条件。采用液体摇瓶培养法,就棉花黄萎病病菌的发酵条件即培养温度、转速、培养时间对产菌量的影响进行了单因素试验,得到最佳发酵条件为 26 ℃、200 r/min、72 h,为棉花黄萎病病菌激活蛋白的批量生产提供了技术依据。

对棉花黄萎病病菌激活蛋白提取液进行电泳检测,结果表明,提取蛋白分子量大小分布范围较广,其中在分子量为 25 ku 附近有 1 条较为集中的电泳谱带,说明本试验采用的方法适用于提取棉花黄萎病病菌激活蛋白。

激活蛋白对 2 个不同品种棉花种子的胚根长、胚根鲜质量、胚根干质量均有一定的影响。激活蛋白 1 000 倍液和 1 500 倍液对棉花种子的胚根长、胚根鲜质量、胚根干质量均有一定的促进作用,当稀释 1 500 倍时,激活蛋白对棉花种子胚根生长的促进作用最大,此结果表明棉花黄萎病病菌激活蛋白在稀释 1 500 倍时具有高效的诱导激活活性。

参考文献:

[1] Liu R J. Effect of vesicular - arbuscular mycorrhizal fungi on *Verticillium wilt* of cotton[J]. Mycorrhiza,1995,5(4):293 - 297.  
[2] 潘光照,何旭平,张敏健,等. 我国棉花黄萎病研究进展[J]. 中

水平,新陆中 11 号胚根长 5.36 cm,胚根鲜质量 80.56 mg,胚根干质量 7.45 mg;新陆中 50 号胚根长 5.12 cm,胚根鲜质量 75.67 mg,胚根干质量 7.13 mg。表明棉花黄萎病病菌激活蛋白具有一定的诱导激活活性。

3 讨论

近年来,从植物病原菌中研究发现了具有诱导植物广谱抗性和促进植物生长的多功能植物激活蛋白,称为微生物蛋白农药<sup>[13]</sup>。该农药可通过诱导植物本身的抗病基因表达而起到抗病防虫、促进生长的作用,对多种作物有效。激活蛋白从培养 8 h 时产生,到 72 h 时最多;在培养 24 h 时出现活性,

国棉花,1999,26(3):9 - 10.  
[3] 李金华,王俊红,孙岩国. 棉花黄枯萎病发病规律及防治措施[J]. 现代农业科技,2011(21):197.  
[4] Sibel D, Latife E, Soner S, et al. Vegetative compatibility groups in *Verticillium dahliae* isolates from olive in western Turkey [J]. European Journal of Plant Pathology, 2007, 119(4):437 - 447.  
[5] Wei Z M, Beer S V. Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora* [J]. Science, 1992, 257(5066):85 - 88.  
[6] 邱德文. Messenger 生物活性筛选技术的开发[C]//美国植物病理学会年会论文集. Minnesota Minneapolis: The American Phytopathological Society, 2001.  
[7] 袁肖寒,顾成波,邱德文,等. 新型真菌源激活蛋白诱导水稻抗病性及其生理机制[J]. 植物研究, 2013, 33(2):220 - 224.  
[8] 武广衍,邱德文,吴珍泉,等. 新型激活蛋白对多种作物种子发芽的影响[J]. 华北农学报, 2007, 22(增刊 1):21 - 24.  
[9] 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.  
[10] 滕立平. 激活蛋白提高番茄对早疫病抗病性作用的初步研究[D]. 长春:吉林农业大学, 2007.  
[11] Johnson D A, Baker R, Boydston R A. Field evaluation of mutant and hybrid lines of mint for resistance to *Verticillium wilt* and yield [J]. Crop Protection, 2013, 43(1):1 - 6.  
[12] 王 宏,项时康,陈建华,等. 棉花种子发芽过程中生理生化变化及赤霉素的调节[J]. 棉花学报, 1997, 9(2):95 - 101.  
[13] 杨培岭,罗远培. 用粒径的重量分布表征的土壤分形特征[J]. 科学通报, 1993, 38(20):1896 - 1899.  
[14] 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.  
[15] 滕立平,王 兰,但红霞. 棉花枯萎病菌激活蛋白的提取及其对棉花种子发芽的影响[J]. 河南农业科学, 2012, 41(4):82 - 85.