

几种氨基酸铜对大丽轮枝菌产生毒素蛋白的影响

张进霞¹, 袁洪水², 王士英², 单耀军¹, 韩继刚¹, 朱宝成^{1,2*}

(1. 河北大学生命科学学院, 保定 071002; 2. 河北农业大学生命科学学院, 保定 071001)

摘要:用几种氨基酸铜溶液处理大丽轮枝菌, 阴离子交换层析分离培养液中的毒素蛋白, 并进行棉苗的致萎实验, 比较了各氨基酸铜制剂对大丽轮枝菌毒素蛋白产生的影响。实验表明, 丙氨酸铜、甘氨酸铜、谷氨酸铜和复合氨基酸铜都在一定程度上抑制了大丽轮枝菌微菌核的形成和毒素蛋白的分泌, 而苏氨酸铜促进了毒素蛋白的分泌。说明复合氨基酸铜的抑菌作用是各成分协同作用的结果。

关键词:大丽轮枝菌; 黄萎病; 毒素蛋白; 致萎活性; 微菌核; 蛋白液相色谱

中图分类号:S435.621 **文献标识码:**A

文章编号:1002-7807(2006)02-0079-04

Effect of Cupric Complexes of Amino Acid on Secreted Toxic Protein from *Verticillium dahliae*

ZHANG Jin-xia¹, YUAN Hong-shui², WANG Shi-ying², SHAN Yao-jun¹, HAN Ji-gang¹, ZHU Bao-cheng^{1,2*}

(1. College of Life Science, Hebei University, Baoding 071002, China; 2. College of Life Science, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China)

Abstract: *Verticillium* wilt of cotton plant which infected by *Verticillium dahliae* is a kind of plant fungal disease in the vascular bundle. In this research, we used cupric complexes of alanine, cupric complexes of glycine, cupric complexes of glutamic acid, cupric complexes of threonine and cupric complexes of mixed amino-acid to test the inhibition on the *Verticillium dahliae*. These five fungicides were developed by our laboratory as new kinds of antiseptic. *Verticillium dahliae* was cultured in the Czapeck's culture solution which added the cupric complexes of amino-acid at 25°C, and the control added aseptic water. After 20 days we extracted the secreted protein of *Verticillium dahliae* cultured in the solution, then isolated the protein by anion-exchange chromatography, and the area of the chromatographic peak can indicate the amount of every collection. At the same time, we collected every isolated parts, respectively, to test the activity. In the wilt-test, we cultured the cotton seedlings in a certain nutrition solution, after they grew out four pieces of leaves, we selected the healthy seedlings as the wilt-test materials. the phytotoxic protein was added in the nutrition solution culturing cotton seedlings, then we observed the growth of the seedlings in 24~72 h. By analyzing the chromatographic peak and the wilt-test accordingly, it showed that cupric complexes of alanine, cupric complexes of glycine, cupric complexes of glutamic acid and cupric complexes of mixed amino-acid could inhibit the formation of microsclerotia and reduce the secretion of the phytotoxic protein of *Verticillium dahliae*, but cupric complexes of threonine increased the secreted protein. Furthermore, neither of the wilt-tests showed that the five fungicides could inhibit the activity of the phytotoxic protein. All results indicated that the inhibition of the five cupric complexes of amino-acid antiseptic on the *verticillium* wilt of cotton plant by the decrease of the amount of the phytotoxicprotein. But the reason that cupric complexes of threonine increased the secreted pro-

收稿日期: 2005-09-23 作者简介: 张进霞(1977-), 女, 在读硕士; * 通讯作者, zhu2222@126.com

基金项目: 河北省自然科学基金资助项目(398152)

tein is not clear. To compare the inhibiting effect of cupric complexes of mixed amino-acid and the four single ingredient fungicides, it showed that all kinds of cupric complexes of amino-acid had different effects on the *Verticillium dahliae*, so the ingredients in the cupric complexes of mixed amino-acid interacted cooperatively to inhibit *Verticillium dahliae*.

Key words: *Verticillium dahliae*; *Verticillium* wilt; phytotoxic protein; wilt activity; microsclerotium; protein liquid chromatography

大丽轮枝菌(*Verticillium dahliae* Kleb.)是引起棉花黄萎病的病原菌。国内外报道认为,棉花黄萎病在代谢活动中产生的毒素为分泌型蛋白,是一种酸性蛋白质-脂多糖的复合体,是棉花致萎的主要因子^[1-3]。

近年来,复合氨基酸铜作为一种新型的杀菌剂已有很多报道^[4-6],本实验室最早把它用于防治棉花黄萎病的研究^[7]。复合氨基酸铜成分复杂,为了对其抑菌机理作进一步探讨,本实验用复合氨基酸铜、丙氨酸铜、甘氨酸铜、谷氨酸铜、苏氨酸铜处理大丽轮枝菌,结合蛋白分离和致萎实验比较它们对大丽轮枝菌微菌核的形成以及毒素蛋白产量的影响,来研究氨基酸铜对大丽轮枝菌的抑制作用。

1 材料和方法

1.1 材料

大丽轮枝菌(*Verticillium dahliae* Kleb.)。

1.2 培养基

查氏培养基($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$): NaNO_3 2、 $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 1、 KCl 0.5、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01、蔗糖 30,用于培养大丽轮枝菌。

棉苗培养液($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$): KNO_3 81、 $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 12、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 96、 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 98、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2.8(用 $3.7 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 EDTA-Na_2 络合 Fe^{2+}),用于棉苗培养。

1.3 试剂

甘氨酸铜、谷氨酸铜、苏氨酸铜、丙氨酸铜、复合氨基酸铜,本实验室制备。

1.4 实验方法

1.4.1 大丽轮枝菌的培养及其分泌蛋白的提取。每 98 mL 查氏培养液中加入 2 mL 氨基酸铜溶液,然后接种大丽轮枝菌菌块,25℃摇床振荡培养 20 d 左右,将培养基用无菌纱布过滤,滤液用 80% 硫酸沉淀,置于 4℃ 静置过夜,9600 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 30 min 后,弃上清液,将沉淀溶于 PBS 缓冲

液(pH7.0),透析过夜。将透析液冷冻干燥成干粉,备用。

1.4.2 毒素蛋白的分离。将粗蛋白干粉用 PBS 缓冲液溶解,经 DEAE 阴离子交换层析,0.1 mol $\cdot \text{L}^{-1}$ Tris, 2 mol $\cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, 0.1 mol $\cdot \text{L}^{-1}$ HCl 梯度洗脱,分离大丽轮枝菌分泌的毒素蛋白,收集组分,冷冻干燥。

1.4.3 致萎实验。水培棉苗,待棉苗长至有 2 片真叶时,选择根系生长良好的棉苗作为检测苗,将分离后的蛋白组分进行致萎实验,24~72 h 内观察致萎情况。

2 结果与分析

2.1 大丽轮枝菌的培养

大丽轮枝菌在查氏培养液中培养 10 d 后,对照培养物变黄、混浊,并开始出现黑色微菌核,而用氨基酸铜处理的培养液中仅仅是浑浊,没有黑色微菌核产生。分析表明,氨基酸铜抑制了微菌核的形成。

2.2 毒素蛋白的分离

在大丽轮枝菌的培养中,所用查氏培养基为化学培养基,不含任何添加蛋白,故培养液中的蛋白来自大丽轮枝菌。

将冷冻干燥的毒素蛋白干粉用 PBS 溶液溶解,经 DEAE 阴离子层析后得到各个处理的色谱图(图 1)。

2.3 毒素致萎试验

用分离后的毒素蛋白组分溶液($20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)处理棉苗,对照、丙氨酸铜、谷氨酸铜、甘氨酸铜、苏氨酸铜及复合氨基酸铜处理的第 8、9 组分(峰)有明显的致萎活性。表明氨基酸铜处理仅影响了大丽轮枝菌毒素蛋白的产量,而对毒素蛋白的致萎活性没有影响。

棉苗萎蔫的症状:24 h 时子叶下垂,倒挂,但不发黄;48 h 的叶片发黄,叶边缘卷曲,表现黄萎症状;72 h 有叶片枯萎脱落;对照处理的棉苗正常。

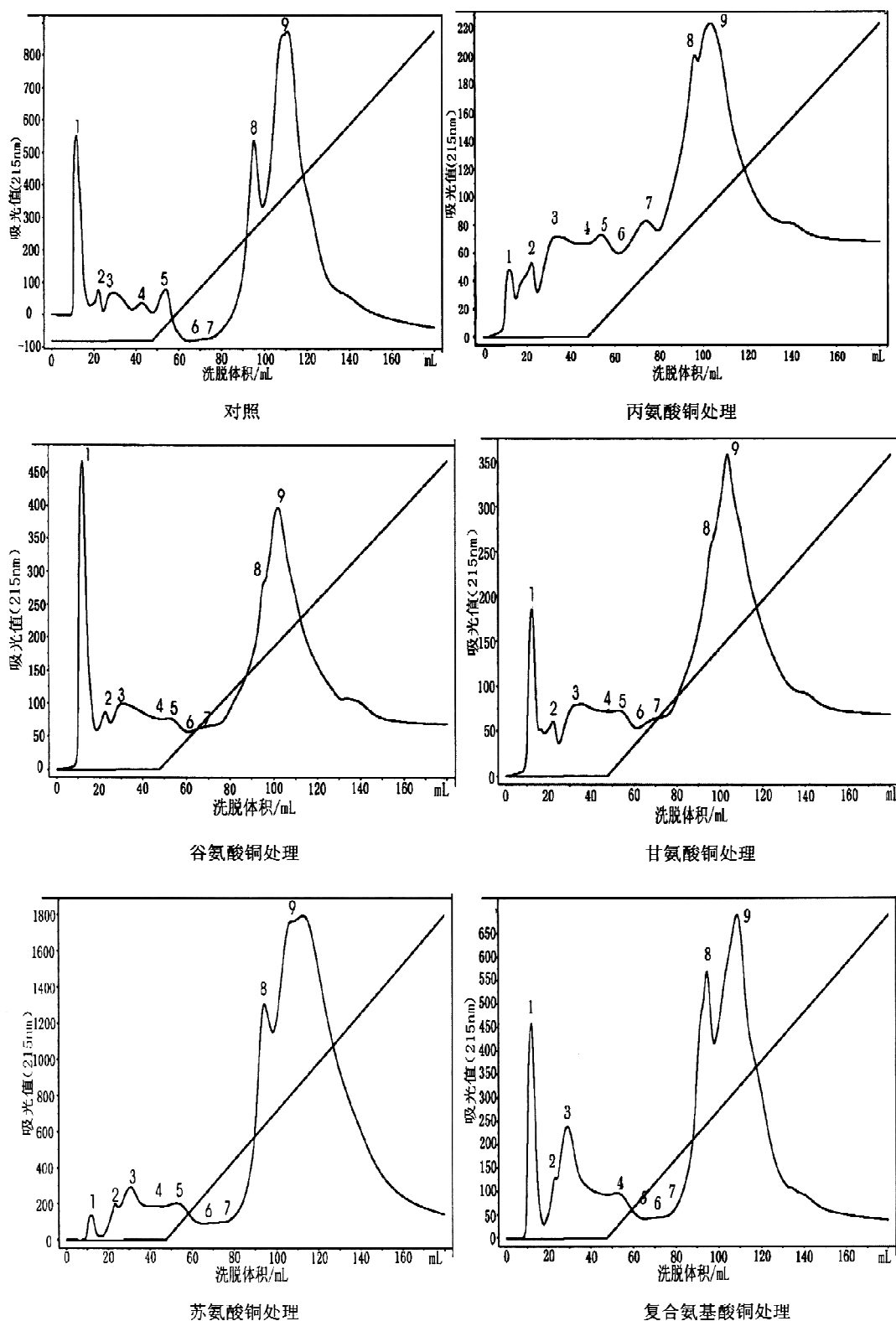


图 1 大丽轮枝菌毒素蛋白的阴离子交换色谱图

Fig. 1 The anion-exchange chromatography map of secreted toxic protein from *Verticillium dahliae*

2.4 氨基酸铜处理对毒素蛋白产生的影响

结合蛋白分离实验以及致萎实验,可以看出除苏氨酸铜外,各种氨基酸铜都能不同程度的减少大丽轮枝菌分泌蛋白总量以及致萎毒素蛋白的

量。其中,丙氨酸铜对蛋白总量及毒素蛋白量的抑制效果分别达 86.8%和 87.2%。而苏氨酸铜处理非但没有抑制反而增加了蛋白产量,即苏氨酸铜对大丽轮枝菌没有抑制作用。

表 1 氨基酸铜对大丽轮枝菌毒素蛋白产生的影响(蛋白色谱峰面积分析)

Table 1 Effect of cupric complexes of amino acid on secreted toxic protein from *Verticillium dahliae*

组分	对照	丙氨酸铜	谷氨酸铜	甘氨酸铜	苏氨酸铜	复合氨基酸铜
1	2335.4	120.2	1905.8	780.8	401.5	1770.4
2	451.8	156.2	352.6	254.8	683.2	349.5
3	1125.3	450.1	1586.1	1690.2	3691.9	3045.6
4	690.2	—	—	—	—	—
5	953.3	57.8	—	—	1753.1	—
6	—	—	2.4	—	—	—
7	—	43.3	118.3	286.2	112.1	—
8	4702.1	886.6	—	—	10705.1	4059.8
9	19439.3	2203.7	7568.8	8239.0	56807.4	11193.4
总面积	29697.4	3917.9	11532.0	11251.0	74154.3	20418.7
总蛋白抑制率/%	—	86.8	61.2	62.1	-149.7	31.2
致萎组分总面积	24141.4	3090.3	7568.8	8239.0	67512.5	15253.2
毒素蛋白抑制率/%	—	87.2	68.6	65.9	-179.6	36.8

—:表示没有该峰或该数值。

3 讨论

多年来,许多学者已经对大丽轮枝菌毒素蛋白进行了研究,包括毒素蛋白的分离,其特性及氨基酸成分的研究^[1-2,8],多糖及脂肪组分对棉花致萎活性的研究^[9-10],毒素蛋白对棉花细胞膜的作用^[3]等。本实验通过氨基酸铜对毒素蛋白的产量分析,从另一角度研究氨基酸铜制剂对大丽轮枝菌的抑制作用。

本实验室已经研究了喷施甘氨酸铜后,棉花病株的过氧化物酶、多酚氧化酶、过氧化氢酶及苯丙氨酸解氨酶的活性的变化,实验表明氨基酸铜对棉花抗黄萎病有一定的诱导作用^[11]。进一步对丙氨酸铜、甘氨酸铜、谷氨酸铜、苏氨酸铜和复合氨基酸铜进行研究,发现在复合氨基酸铜中,各组分对大丽轮枝菌的抑制效果不同,实验中丙氨酸铜、甘氨酸铜、谷氨酸铜和复合氨基酸铜都在一定程度上抑制了大丽轮枝菌微菌核的产生,减少了分泌蛋白的产量,而苏氨酸铜却促进了毒素蛋白的分泌,原因有待于进一步研究。分析认为复合氨基酸铜的抑菌作用是各成分协同作用的结果,因此其他成分的作用有待进一步研究。

工业生产的复合氨基酸粉价格较低,适合氨基酸铜的工业化生产,通过对其中的单一氨基酸铜组分抑菌作用分析,可以进一步了解其抑菌机理。在杀菌剂的生产中,可以通过适量添加价格便宜且抑菌效果显著的氨基酸铜,在增加少量成本的基础上可提高抑菌效果。

参考文献:

- [1] 章元寿,王建新,刘经芬,等. 大丽轮枝菌毒素的分离、提纯及生物测定[J]. 真菌学报,1989,8(2):140-147.
- [2] 吕金殿,甘 莉,牛淑贞,等. 棉花黄萎病菌致萎毒素的初步研究[J]. 西北农业大学学报,1988,16(1):17-20.
- [3] HAR N G, Harish C D. Effect of ouabain and phytotoxic metabolites from *Verticillium dahliae* on the cell membranes of cotton plants[J]. Physiological Plant Pathology,1985,27:109-118.
- [4] 康湛莹,韩文瑞,刘英丽,等. 混合氨基酸铜络合物杀菌作用的研究[J]. 哈尔滨电工学院学报,1996,19(2):275-278.
- [5] 陶仲侃. 迅速发展的氨基酸农药[J]. 化学通报,1984(3):43-45.
- [6] 范镇基. 氨基酸农药的新进展[J]. 氨基酸杂志,1992(3):14-16.
- [7] 朱宝成,韩继刚,张元亮,等. 一种吸收型杀菌剂的制备方法及其用途:中国, CN03123793. 2 [P]. 2004-02-11. <http://211.157.104.67/sipoasp/zljs/hyjs-yx-new.asp?recid=CN03123793.2&leixin=0&title=一种吸收型杀菌剂的制备方法及其用途&ipc=A01N59/04>.
- [8] 吕金殿,甘 莉,阎龙飞. 棉花黄萎病菌毒素的纯化与特性研究[J]. 植物病理学报,1991,21(2):129-132.
- [9] 章元寿,王建新,周明国. 大丽轮枝菌毒素的多糖组分对棉花致萎作用的研究[J]. 真菌学报,1991,10(2):155-158.
- [10] 章元寿,王建新,方中达. 大丽轮枝菌毒素的脂肪组分对棉花致萎活性的研究[J]. 真菌学报,1992,11(3):229-233.
- [11] 李晓宇,胡 明,朱宝成,等. 氨基酸铜对棉花黄萎病株几种酶活性的影响[J]. 棉花学报,2004,16(3):152-155.