

# 天麻中一种凝集素类似蛋白对植物病原真菌的抑制作用

王晓晨 徐庆 刘颖 陈章良

(北京大学生命科学学院蛋白质工程及植物基因工程国家重点实验室 北京 100871)

**摘要** 从人工栽培黄天麻(*Gastrodia elata* Bl. f. *flavida* S. Chow)皮层部分分离得到一种 10kD 的凝集素类似蛋白(GAFP-1),在体外对绿色木霉(*Trichoderma viride*),梨黑腐皮壳(*Valsa ambiens*),立枯丝核菌(*Rhizoctonia salani*),小麦赤霉菌(*Gibberella zeae*)的多个生理小种如 F-34, F-11, JF-10, H-28, 紫芝菌(*Ganoderma lucidum*)及灰葡萄孢(*Botrytis cinerea* Persoon)等 9 种真菌的生长具有明显的抑制作用;对绿色木霉(*Trichoderma viride*)的孢子萌发和菌丝延伸有显著抑制效果,抑制率分别为 30% 和 59.7%;加入 0.8 $\mu$ L 浓度为 0.6mg/mL 的 GAFP-1 可造成梨黑腐皮壳(*Valsa ambiens*),绿色木霉(*Trichoderma viride*)菌丝生长形态异常:菌丝扭曲,分支加剧,菌丝内部细胞质分布不均,发生聚集。

**关键词** 天麻,凝集素类似蛋白,植物病原真菌,抑制作用

**分类号** Q939.95 **文献标识码** A **文章编号** 0253-2654(1999)-04-0256-05

## INHIBITION OF PLANT PATHOGENIC FUNGI BY A LECTINLIKE PROTEIN FROM *GASTRODIA ELATA* BL.

Wang Xiaochen, Xu Qing, Liu Ying, Chen Zhangliang

(National laboratory of protein engineering and plant genetic engineering, College of Life Science, Peking University, Beijing 100871)

**Abstract** A 10 kD lectin-like protein with antifungal activity named GAFP-1 was isolated and purified from the

1998-06-26 收稿, 1998-11-05 修回

terminal corm of *Gastrodia elata* BL. F. *flavida* S. Chow. It can inhibit the hyphal growth of nine pathogenic fungi in vitro including *Trichoderma viride*, *Valsa ambiens*, *Rhizoctonia solani* Kuhn, *Gibberella zeae* F-34, F-11, JF-10, H-28, *Botrytis cinerea* Persoon and *Ganoderma lucidum*. Further study shows such inhibition can occur on both spore germination and hyphal elongation of the *T. Viride*. The abnormal morphology such as hyphae twisting and cytoplasm condensation of *T. viride* and *V. Ambiens* caused by GAFF-1 was also observed.

**Key words** *Gastrodia elata* BL. F. *Flavida* S. Chow, Lectin-like protein, Antifungal activity, Pathogenic fungi

真菌病害是造成农作物减产的主要原因之一<sup>[1]</sup>。利用丰富的植物及微生物资源,分离纯化具抗真菌活性的蛋白质,将其基因导入植物,以提高受体植物的抗病性已被证明是一种实用而有效的方法。天麻是一种重要的药用植物,它在长期与蜜环菌的寄生与反寄生的斗争中形成一套有效的抑制及消化真菌的机制<sup>[2]</sup>。1988年,胡忠等首先从天麻中分离得到一种14kD的抗真菌蛋白,命名为GAFF (Gastrodia Antifungal Protein),在体外对绿色木霉及羊肚菌有明显的抑制作用<sup>[3]</sup>。1993~1994年陆续有关于这种抗真菌蛋白的诱导,积累,检测及定位方面的研究报道<sup>[4-5]</sup>。但有关天麻中的抗真菌蛋白在体外对真菌的抑制作用方面的工作还未见报道。本实验从天麻次生球茎中分离得到了一种具抗真菌活性的凝集素类似蛋白(GAFF-1)<sup>[6]</sup>,并对它在体外的抑菌作用进行了研究,以探讨其抑制作用机制,从而有助于将这种抗真菌蛋白应用于植物抗真菌基因工程。

## 1 材料与方 法

### 1.1 植物材料

人工栽培黄天麻购自丹东农业科学院。

### 1.2 菌种

被测试的真菌中绿色木霉 (*Trichoderma viride*)、灵芝菌 (*Ganoderma lucidum*)、棉花枯萎病菌 (*Fusarium oxysporum f. vasinfectum*) 和灰葡萄孢 (*Botrytis cinerea*) 购自中国科学院微生物所;立枯丝核菌 (*Rhizoctonia solani*) 购自中国农业科学院植保所;梨黑腐皮壳 (*Valsa ambiens*)、玉蜀黍赤霉菌 (*Gibberella zeae*) 为本室保存。

### 1.3 培养基

真菌固体培养均采用马铃薯琼脂培养基 (PDA)。

液体培养采用马铃薯液体培养基 (PDB)。

### 1.4 蛋白质的分离纯化

新鲜天麻球茎取皮层部分,切碎,匀浆,用磷酸钠缓冲液 (20mmol/L, pH6.0, 0.2mmol/L 氯化钠) 抽提,离心,上清液加硫酸铵至 80% 饱和度,过夜沉淀。离心取沉淀溶于适量醋酸钠缓冲液 (50mmol/L, pH5.0), 依次经过 Sephadex G-25, DEAE-Cellulose 52 柱层析分离, 所得活性峰经超滤浓缩后通过 Sephadex G-50 和 CM-Sephrose Fast Flow 柱层析分离, 得到纯化蛋白。此蛋白样品经 Tris-Tricine 缓冲系统 SDS-PAGE 电泳和 PAG-IEF 鉴定为单一组分, 超滤浓缩后用于抑菌实验。

### 1.5 抑菌实验

平板抑菌实验: 指示真菌接种于含 PDA 培养基的 9cm 平板中, 28℃ 培养至菌落大小为 3cm 左右, 在菌落前方 0.5cm 处滴加 5μL 0.36mg/mL 的溶于 50mmol/L 醋酸钠缓冲液 (pH5.0) 的 GAFF-1, 同时以 50mmol/L 醋酸钠缓冲液 (pH5.0), 无菌水及 BSA (1mg/mL) 为对照, 28℃ 继续培养 8~2h, 观察抑菌圈的形成。

对真菌孢子萌发的抑制: 参照 Willem F. Broekaert 等人的方法<sup>[7]</sup>, 指示真菌接入 PDA 平板, 28℃ 培养 2~3d, 收集孢子, 用无菌水悬浮, 调整浓度后接入 PDB 培养基中, 使终浓度为  $10 \sim 15 \times 10^4$  个/mL, 20℃~22℃ 培养 9~10h, 镜检, 将即将萌发的孢子接入 96 孔板, 每孔加 20μL 孢子悬液, 20μL  $3 \times$  PDB 培养基, 20μL GAFF-1 至终浓度为 0.1mg/mL。对照以 50mmol/L 醋酸钠缓冲液 (pH5.0) 代替蛋白样品, 同一样品重复 3

孔。20~22℃继续培养,每隔1h将其置于倒置显微镜下观察,取3孔平均值计算萌发率。

对真菌菌丝延伸的抑制:按上述悬浮孢子,在20~22℃培养10~15h,镜检,待萌发芽管长至40μm时,接入96孔板,每孔加20μL萌发孢子,20μL3×PDB培养基,20μLGAFF-1至终浓度为0.1mg/mL。对照以20μL 50mmol/L醋酸钠缓冲液(pH5.0)代替蛋白样品,相同样品重复3孔。20℃~22℃继续培养,每隔1~2h镜检,计算菌丝长度,每孔计算50根菌丝,取3孔平均值,直至对照长至500μm。

对真菌菌丝形态的影响:指示真菌接种于含PDA培养基的3.5cm透明培养皿中,28℃培养至菌落大小为1~1.5cm,在菌落前方0.5cm处滴加0.8μL浓度为0.6mg/mL的GAFF-1,同时以50mmol/L醋酸钠缓冲液(pH5.0)为对照。28℃继续培养,至开始出现抑菌圈时,将平皿置于倒置显微镜下观察菌丝形态。

## 2 结果

### 2.1 蛋白的分离纯化

从天麻次生球茎的皮层部分分离化得到一蛋白质,经Tris-Tricine缓冲系统SDS-PAGE电泳和Superose12柱层析确定其分子量为10kD(图1),等电聚焦结果证明其等电点为

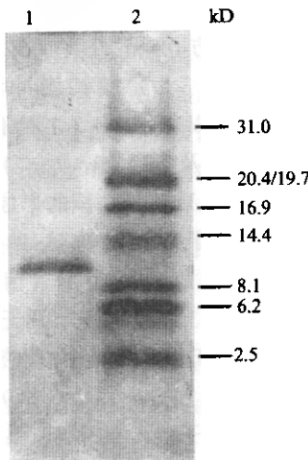


图1 GAFF-1的Tricine SDS-PAGE分析  
1 GAFF-1 纯品, 2 低分子量标准蛋白

8.45。该蛋白在体外对多种植物病原真菌具有较强的抑制作用。由于此蛋白与胡忠等报道的天麻抗真菌蛋白均在体外表现明显的抗真菌活性,因此命名为GAFF-1<sup>[6]</sup>。该蛋白N-端部分氨基酸序列与兰科其他几种植物:二叶兰(*Listera ovata*),建兰(*Cymbidium hybrid*),火烧兰(*Epipactis helleborine*),以及石蒜科的雪花莲(*Galanthus nivalis*)中的凝集素具有很高的同源性,其可与甘露糖可逆结合,不具凝血活性,因此认为它是天麻中的一种具抗真菌活性的凝集素类似蛋白。

### 2.2 GAFF-1 对植物病原真菌的平板抑制作用

选择10种植物病原真菌做为测试菌,对GAFF-1的抗真菌活性进行检测。结果表明,GAFF-1对其中9种真菌具有较强的抑制作用(表1,图2),抑菌结果最好的是梨黑腐皮壳

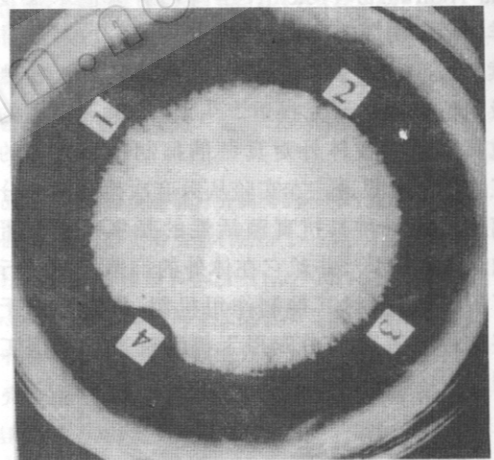


图2 GAFF-1 对绿色木霉菌丝生长的抑制作用

1 50mmol/L醋酸钠缓冲液(pH5.0), 2 无菌水,  
3 小牛血清蛋白(1mg/mL), 4 GAFF-1(0.36mg/mL)

(*Valsa ambiens*), 抑菌圈直径大于25mm,另外其对于绿色木霉(*Trichoderma viride*)、立枯丝核菌(*Rhizoctonia salani*),小麦赤霉病菌(*Gibberella zeae*)的多个小种,以及灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*)等几种主要的植物病原真菌均有明显的抑制作用,抑菌圈直径在10~20mm之间;对棉花枯萎病菌(*F. oxysporium f. vasinfectum*)的生长没有表现出明显的抑制。

表1 GAFF-1抗菌谱

真菌名称	抗菌活性*
绿色木霉( <i>Trichoderma viride</i> )	++++
梨黑腐皮壳( <i>Valsa ambiens</i> )	+++++
立枯丝核菌( <i>Rhizoctonia salani</i> )	++
小麦赤霉菌 F-34( <i>Gibberella zeae</i> )	+++
小麦赤霉菌 F-11( <i>Gibberella zeae</i> )	+++
小麦赤霉菌 JF-10( <i>Gibberella zeae</i> )	++
小麦赤霉菌 H-28( <i>Gibberella zeae</i> )	++
紫芝菌( <i>Ganoderma lucidum</i> )	++
灰葡萄孢( <i>Botrytis cinerea</i> )	++
棉花枯萎病菌( <i>Fusarium oxysporum</i> f. <i>Vasinfectum</i> )	-

\* 抗菌活性的强弱用抑菌圈的直径表示,+: 5~10mm,

++: 10~15mm, +++: 15~20mm, ++++: 20~25mm,

+++++: 大于25mm

GAFF-1 的浓度: 0.36mg/mL

### 2.3 对指示真菌孢子萌发的抑制

以绿色木霉为指示菌,测定 GAFF-1 对孢子萌发的抑制效果。发现 GAFF-1 对绿色木霉的孢子萌发具有显著的抑制作用。在观察至 12h 时,对照组绿色木霉孢子的萌发率已达到 100%,而加入 0.1mg/mL GAFF-1 处理的绿色木霉孢子,其萌发率只有 65%, 13.5h 时萌发率为 70%(图 3),再继续观察至 24h,孢子萌发率也不再提高。

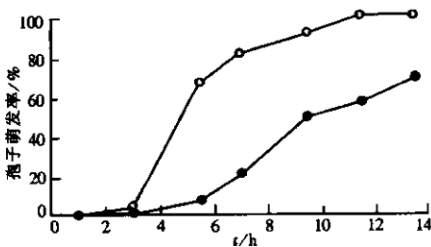


图3 GAFF-1对绿色木霉孢子萌发的抑制曲线

□ Control    ■ GAFF-1

### 2.4 对指示真菌菌丝延伸的抑制

在平板抑菌实验中,已经观察到了明显的抑菌圈,表明指示真菌菌丝生长受到了明显的抑制。该实验利用显微观察的方法测定 GAFF-1 对真菌菌丝延伸的抑制作用。以绿色

木霉为指示菌,当萌发孢子芽管长度达到 40 $\mu$ m 时将其接入 96 孔板,5h 后,对照组的菌丝平均长度为 60 $\mu$ m,加入 0.1mg/mL GAFF-1 的绿色木霉菌丝平均长度为 50.3 $\mu$ m,抑制率为 27.1%;至 11h 时,对照组菌丝平均长度已达到 500 $\mu$ m,而加 GAFF-1 的绿色木霉菌丝平均长度只有 201.6 $\mu$ m,抑制率为 59.7%。

### 2.5 对指示真菌菌丝生长形态的影响作用

在接有绿色木霉和梨黑腐皮壳的平板上,各加入 0.8 $\mu$ L 0.6mg/mL 的 GAFF-1,同时用 0.8 $\mu$ L 50mmol/L 醋酸钠缓冲(pH5.0)作为对照,待抑菌圈刚出现时,与对照相比,受 GAFF-1 处理的两种真菌菌丝生长形态发生异常:部分菌丝扭曲,分支加剧;菌丝顶端变得细长,弯曲;梨腐烂病菌部分菌丝出现内部细胞质分布不均匀,发生聚集的现象(图 4)。

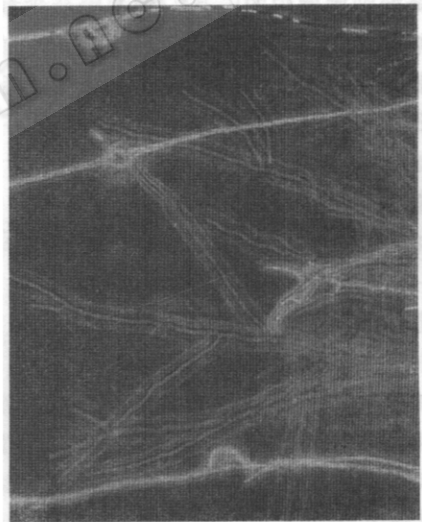


图4 GAFF-1对梨腐烂病菌菌丝生长形态的影响作用

## 3 讨论

植物凝集素是一类可结合单糖或多糖,具凝血活性的蛋白质。目前有许多间接的和直接的证据表明植物凝集素在植物防御反应中占有重要位置<sup>[8]</sup>。Broekaert 等人在 1989 年从苕麻中分离得到一个可专一结合几丁质的分子量为 8.5KD 的凝集素 UDA,在体外对多种植物病原

真菌具有明显抑制作用<sup>[7]</sup>。Parijs 等人在 1991 年从橡胶树中分离得到一个可专一结合几丁质,但不具凝血活性的蛋白质 Hevein,在体外可抑制 8 种植物病原真菌的生长<sup>[10]</sup>。这两种抗真菌蛋白的抑菌机理都被认为与其专一结合几丁质的活性密切相关。由于几丁质是多种真菌细胞壁的主要成分,UDA 和 Hevein 的分子量又比较小,因此它们的作用位点很可能是在细胞壁上,通过作用于几丁质而破坏真菌细胞壁的合成。与 UDA 和 Hevein 相似,GAFP-1 分子量较低,对多种植物病原真菌具有较广谱的抑制作用,对孢子萌发、菌丝延伸都有显著影响,并可在抑制部位造成部分菌丝生长形态异常。我们在实验中发现,GAFP-1 可与甘露糖可逆结合,同时可与 L-山梨糖协同作用而抑制菌丝生长。而 L-山梨糖可通过影响 $\beta$ -1,3-葡萄糖苷酶活性而降低细胞壁中的 $\beta$ -1,3-葡萄糖苷含量,从而影响细胞壁的完整性<sup>[9]</sup>。至于 GAFP-1 的抑菌机制是否确实与它的甘露糖结合活性相关,它的作用位点是否在细胞壁上,还需要进一步

的实验证实。

## 参 考 文 献

- [1] Ben J C, Leo S M. *Plant Physiology*, 1993, **101**: 709~712.
- [2] 周铎,杨兴华,梁汉兴等. 天麻形态学. 北京: 科学出版社, 1987, 76~97.
- [3] 胡忠,杨增明,王钧. 云南植物研究, 1988, **10**(4): 373~380.
- [4] 胡忠,黄清藻. 云南植物研究, 1994, **16**(2): 169~177.
- [5] 江流,徐锦堂,王贺等. 植物学报, 1993, **35**(8): 593~599.
- [6] Xu, Qing Liu, Ying Wang Xiaochen *et al.* *Plant Physiology and Biochemistry (PPB)*, 1998, **36**(12). (Accepted).
- [7] Willem F B, Jan V P, Frederik L *et al.* *Science*, 1989, **245**: 1100~1102.
- [8] Willy J P, Els J M, Van D. *Plant Physiology*, 1995, **109**: 347~352.
- [9] Lorito M, woo S L, Ambrosio M D *et al.* *Mol. Plant-Microbe Interact*, 1996, **3**: 206~213.
- [10] Jan V P Willem G B, Irwin J G *et al.* *Planta*, 1991, **183**: 258~264.