

蜂毒肽对农作物生理指标及防御系统酶影响的研究

王关林 邢 卓 潘凌子 方宏筠

(辽宁师范大学生命科学学院, 辽宁大连 116029)

摘 要: 系统研究了蜂毒肽对玉米、番茄、大豆、大白菜等农作物生长发育过程中生理指标的影响及对玉米防御系统酶的作用。结果表明, 蜂毒肽对农作物的影响具有普遍性, 对细胞中的叶绿素、可溶性糖、核酸及蛋白质含量, 低浓度有一定促进作用, 高浓度有抑制作用, 但影响都很微弱 (t 检验 $P > 0.05$)。蜂毒肽对植物防御系统酶具有诱导效应, 5 mg/L 蜂毒肽使其活性快速增加, 其中 PAL、PPO 在喷药后 48 h 达到峰值, 分别比对照提高 178% 和 9.8%; 而 SOD 在 6 h 即可达到峰值, 比对照提高 31.5%; 只有 POD 在喷药 50 mg/L 蜂毒肽后 48 h 达到最大值。玉米 POD 同工酶谱的研究进一步表明蜂毒肽对有的酶谱带 (品种 1 的 P11 谱带) 有很强的诱导作用, 有的甚至诱导出 1 条新带 (品种 2 的 P4 谱带); 而对有的谱带有抑制作用, 而且对不同品种 POD 酶的作用不尽相同, 但喷药后 2 个品种 POD 酶总体含量均高于对照, 与酶活测定结果相同。

关键词: 蜂毒肽; 农作物; 生理指标; 防御系统酶; 同工酶谱
中图分类号: Q945

Effects of Melittin on the Physiological Indices and Defensive Enzymes in Crops

WANG Guan-Lin, XING Zhuo, PAN Ling-Zi and FANG Hong-Jun

(Life Science Department of Liaoning Normal University, Dalian 116029, Liaoning, China)

Abstract: The content levels of chlorophyll, soluble sugar, nucleic acid and protein of four crops (maize, tomato, soybean and Chinese cabbage) were promoted by the low concentration (5 mg/L) of melittin, and inhibited by the higher (50 mg/L) one, although the effects were not significant (t -test, $P > 0.05$) in four crops. Their PAL and PPO activities were reached the maximal levels 48 hours after spraying the solution of melittin (5 mg/L), which were increased by 178% and 9.8% respectively as compared with the control, while the activity of SOD was increased by 31.5% after 6 hours. The activity of POD was reached the maximal levels under the treatment of 50 mg/L melittin. The land pattern of POD isoenzyme in maize elucidated further that there were strong induction to some zymogram bands (eg P11) while inhibition to others, and different effects on the different cultivars showing the particularity of cultivars.

Key words: Melittin; Crops; Physiological index; Defensive enzyme; Zymogram of isoenzyme

蜂毒肽不仅是一种重要的清热抗湿、消炎解毒中药, 也是一种天然抗微生物肽, 具有抗细菌、真菌的作用^[1-2]。近来研究发现它还能抑制病毒 HIV 的复制^[3]。现在蜂毒肽主要作为医药研究的对象。本实验室在蜂毒肽基因工程药物研究时发现, 转蜂毒肽基因的工程菌一旦表达, 细菌即发生自杀, 表明蜂毒肽对细菌有速效毒杀作用^[4]。目前的生物农药多具缓效性, 在生产应用中受到一定的制约。本研究室研究表明, 蜂毒肽能抑 (杀) 白菜软腐病、黄瓜角斑病等常见农作物细菌病原菌和玉米茎腐病、番茄叶霉病等 9 种真菌病原菌, 盆栽病原菌接种实验进一步证明蜂毒肽对农作物多种病害有防治作用^[5]。但是蜂毒肽对植物细胞是否也有抑 (杀) 作用, 对生理代谢有什么影

响, 其防治作用的机理是什么, 目前尚无报道。本实验旨在系统研究蜂毒肽对植物生理指标、防御系统酶的影响及其作用机理, 为蜂毒肽能够作为新型生物农药在防治植物病害上的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料及药剂

为体现作物的普遍性, 本实验选择不同科有代表性的主要作物玉米、番茄、黄豆和大白菜为试材, 购自大连种子公司。大白菜软腐病菌等购于中国农业科学院菌种库。蜂毒肽购自大连医药公司白云山制药厂, 为针剂包装, 单位 0.25 mg/mL。

1.2 研究方法

1.2.1 蜂毒肽稀释液喷施及浸种 将各作物种子用清水浸泡,催芽,栽种。待长至4片叶时,在每片叶片正反面喷施浓度为5 mg/L、50 mg/L、100 mg/L的蜂毒肽稀释液,以蒸馏水作对照。喷施6 h、8 h、24 h、48 h、72 h及120 h后取样分析。用同样浓度的蜂毒肽浸种,计算种子萌发率,测定生理指标。

1.2.2 植物生理指标的测定 分光光度法测定叶绿素含量,蒽酮比色法测定可溶性糖含量,紫外分光法测定蛋白质含量,核酸含量及呼吸强度测定均参考文献[6]。

1.2.3 几种防御系统酶的提取及其活性测定 PAL(Phenylalanine ammonia-lyase)、POD(Peroxidase)、PPO(Polyphenol oxidase)及SOD(Superoxide dismutase)酶的提取及活性测定,按文献[7]进行。PAL在290 nm处进行紫外吸收测定。以每小时 A_{290} 吸收变化0.01所需酶为一个单位;POD以每分钟 A_{470} 变化0.01为一个酶活性单位;PPO以每分钟 A_{390} 变化值

0.01表示一个酶活性单位;SOD按邻苯三酚法测定,按照酶活公式计算酶活力($U \cdot g^{-1} \cdot FW \cdot min^{-1}$)。

1.2.4 POD同工酶电泳分析 按照Leammli^[8]系统配胶及同工酶染色,浓缩胶4%,分离胶10%。采用美国冷泉港P41G凝胶成像系统的Gel-Pro Analyzer(Version 3.1)蛋白分析软件,定量分析玉米POD同工酶含量的变化。上述实验均进行3次重复,将统计数据应用Microsoft Visual FoxPro软件进行t检验等处理,并进行显著性分析。

2 结果

2.1 喷施蜂毒肽稀释液对作物幼苗生理指标的影响

表1显示,喷施幼苗叶片5 d之后作物的生理指标有一定的变化,蜂毒肽对叶绿素含量在低浓度有一定的促进作用,高浓度略有抑制;而对溶性糖则是高浓度促进,低浓度抑制。核酸和蛋白质含量与蜂毒肽浓度,在一定范围内随着浓度增加略有提高。该结果表明,蜂毒肽对4种幼苗生理指标无大影响,有时有一定促进作用。

表1 蜂毒肽稀释液喷施叶片及浸种对农作物生理指标的影响

Table 1 Effects of spraying and seed soaking with melittin solution on physiological indices of crops ($\bar{x} \pm s, n=3$)

生理指标 Physiological index	作物 Crop	CK		5 mg/L		50 mg/L	
		喷施 Spraying	浸种 Seed soaking	喷施 Spraying	浸种 Seed soaking	喷施 Spraying	浸种 Seed soaking
		叶绿素含量 Content of chlorophyll (mg/g)	番茄 Tomato	1.262 ± 0.015	1.399 ± 0.744	1.290 ± 0.300	1.113 ± 0.534
	大豆 Soybean	1.651 ± 0.141	1.552 ± 0.263	1.816 ± 0.148	1.721 ± 0.332	1.601 ± 0.042	1.565 ± 0.471
	大白菜 Cabbage	0.630 ± 0.070	0.762 ± 0.624	0.649 ± 0.025	0.876 ± 0.172	0.668 ± 0.070	0.829 ± 0.307
	玉米 Maize	1.726 ± 0.144	1.730 ± 0.279	1.755 ± 0.074	1.766 ± 0.194	1.677 ± 0.188	1.522 ± 0.126
可溶性糖含量 Content of soluble sugar (%)	番茄 Tomato	3.759 ± 0.187	3.763 ± 0.696	3.280 ± 0.242	4.566 ± 0.583	4.280 ± 0.568	3.926 ± 0.574
	大豆 Soybean	3.565 ± 0.118	3.986 ± 0.231	3.153 ± 0.511	3.664 ± 0.512	3.759 ± 0.210	4.002 ± 0.419
	大白菜 Cabbage	10.922 ± 0.930	9.593 ± 0.603	6.280 ± 2.138	7.256 ± 1.193	10.328 ± 0.647	10.494 ± 1.132
	玉米 Maize	5.832 ± 0.886	4.995 ± 0.571	4.244 ± 1.077	4.674 ± 0.326	4.823 ± 1.376	5.043 ± 0.502
核酸含量 Content of nucleic acid (μg/mL)	番茄 Tomato	103.056 ± 13.014	100.036 ± 17.576	104.522 ± 5.992	101.004 ± 13.585	115.468 ± 12.791	107.776 ± 26.206
	大豆 Soybean	191.128 ± 13.014	199.877 ± 15.264	202.428 ± 17.346	205.569 ± 16.447	195.396 ± 9.177	200.289 ± 17.462
	大白菜 Cabbage	61.084 ± 12.768	62.504 ± 20.864	62.016 ± 17.346	68.464 ± 11.673	64.688 ± 6.271	65.564 ± 12.874
	玉米 Maize	89.480 ± 10.345	87.966 ± 12.743	90.824 ± 19.012	94.328 ± 13.281	93.800 ± 7.587	91.820 ± 15.102
蛋白质含量 Content of Protein (mg/mL)	番茄 Tomato	0.783 ± 0.309	1.011 ± 0.319	0.636 ± 0.323	0.924 ± 0.408	0.965 ± 0.078	1.514 ± 0.197
	大豆 Soybean	1.943 ± 0.326	2.005 ± 0.365	2.877 ± 0.384	3.147 ± 0.551	2.308 ± 0.506	2.661 ± 0.236
	大白菜 Cabbage	2.069 ± 0.482	2.430 ± 0.308	1.941 ± 0.199	2.273 ± 0.528	1.945 ± 0.614	2.500 ± 0.316
	玉米 Maize	3.040 ± 0.152	3.658 ± 0.123	3.158 ± 0.539	2.930 ± 1.291	4.536 ± 0.936	3.828 ± 0.983

2.2 蜂毒肽稀释液浸种对作物种子萌发幼苗生理指标及呼吸强度的影响

蜂毒肽稀释液浸种对4种农作物种子萌发及其幼苗的生理指标影响不大(表1),与喷施处理类似,t检验结果 $P > 0.05$ 。但是4种作物的种子萌发率平均提高10%左右,高浓度时表现出抑制作用(图1)。种子萌发后的呼吸强度均有较大提高,随着蜂毒肽稀释液浓度的提高而增强,高浓度时有抑制作用(图2),这与蜂毒肽促进种子萌发一致。

2.3 蜂毒肽稀释液对玉米防御系统酶的影响

2.3.1 PAL 从图3可见,对照组(CK)表现了4

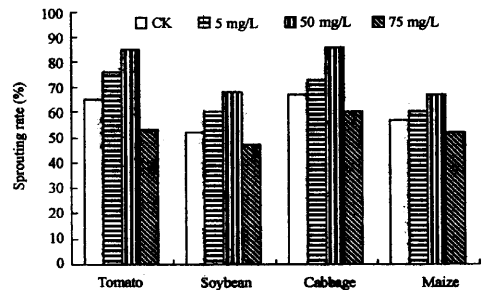


图1 蜂毒肽稀释液浸种对农作物萌发率的影响
Fig.1 Effects of seed soaking in melittin solution on sprouting rate of crops

叶龄玉米正常生长发育 5 d 过程中 PAL 活性的动态变化。喷药后玉米叶片 PAL 活性提高,并且随着浓度和时间明显增加,5 mg/L 处理 48 h 的活性比对照提高 178%,但处理浓度 > 100 mg/L,时间长于 120 h 时与 CK 组相比无明显差异,甚至降低。

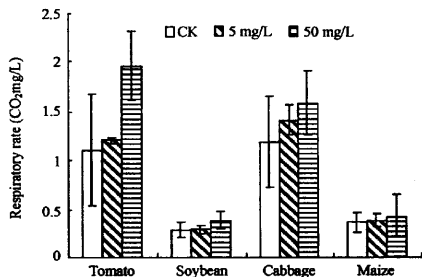


图 2 蜂毒肽稀释液浸种对农作物呼吸强度的影响
Fig. 2 Effects of seed soaking in melittin solution on respiratory rate of crops

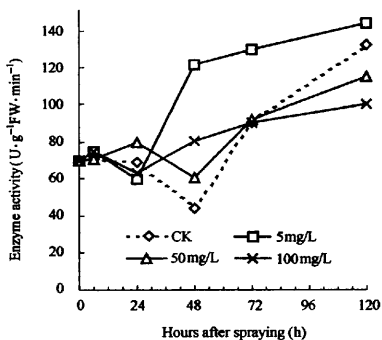


图 3 蜂毒液喷施后玉米 PAL 活性的变化
Changes of PAL activity of maize spraying with melittin

2.3.2 POD 从图 4 可以看出,喷药组 POD 活性变化趋势与对照组相似,6h 后喷药组活性则一

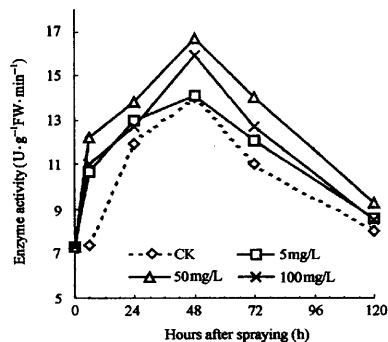


图 4 蜂毒液喷施后玉米 POD 活性的变化

Fig. 4 Changes of on POD activity of maize with spraying melittin

直高于对照,8 h 达到峰值,其中 50 mg/L 作用最为明显,第 5 天时各处理的活性则较为接近。

2.3.3 PPO 由图 5 可见,喷药对玉米 PPO 活性有不同程度的影响;在喷药 6 h 后喷 100 mg/L 蜂毒液的开始表现出活性较对照高;而喷药 24 h 后各浓度喷药组 PPO 活性明是对照的 110.6%;但随时间延长 > 72 h 呈下降趋势,在喷药 120 小时后的活性则均低于对照。

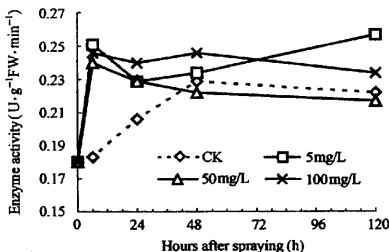


图 5 蜂毒液喷施后玉米 PPO 活性的变化图

Fig. 5 Changes of PPO activity of maize with spraying melittin solution

2.3.4 SOD 从图 6 中可见蜂毒肽对 SOD 活性的活力变化速度非常快,敏感性高于前 3 种酶,喷药 6 h SOD 活性是对照的 131.5%,表明蜂毒肽对 SOD 有明显的促活化作用,但随喷药时间的延长,这作用下降,到 48 h 后其数据与对照比较接近。

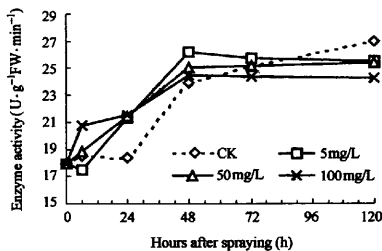


图 6 蜂毒液喷施后玉米 SOD 活性的变化

Fig. 6 Changes of SOD activity of maize with spraying melittin

2.4 蜂毒肽对玉米不同品种 POD 同工酶谱的影响

从图 7 和表 2 可见,蜂毒肽对 2 个玉米品种的 POD 同工酶谱带均有明显影响,莲丰 1 号中 P11 谱带的强度明显大于对照组的谱带含量,从 15.902 提高到 22.108,表现了很强的诱导作用。P5、6、7 谱带则表现了高浓度蜂毒肽的轻度抑制。东丹 60 中 P3 谱带也表现出高浓度蜂毒肽的促进作用,谱带含量从 15.190 提高到 21.925, P4 谱带则是高浓度蜂毒肽诱导出一条新带,其值为 21.061。同时图中的谱带也表现出品种间的差异(谱带不相同,且品种 2 有新带出现)。喷药后 2 个品种 POD 总体含量均高于对照,与酶活测定结果相同。