

研究报告

玉米大斑病菌 HT-毒素与玉米细胞的膜脂过氧化研究*

董金泉 韩建民 张利辉

(河北农业大学植物病理学系 保定 071001)

摘要: 以土培玉米幼苗为材料, 通过测定玉米大斑病菌 HT-毒素处理后玉米叶片细胞膜透性和细胞内丙二醛 (MDA) 含量变化及其与细胞内过氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化物酶 (POD) 活性之间的关系来研究玉米细胞膜脂过氧化的程度。结果表明, HT-毒素胁迫后, 亲和组合 MDA 含量上升, POD 活性受到刺激, SOD 活性受抑制较强; 非亲和组合 POD 活性受到抑制, SOD 活性受抑制较弱。HT-毒素对玉米叶片细胞膜有强烈的破坏作用, 而且这种作用与毒素的浓度和毒素处理的时间呈正相关。试验结果初步推测在抗、感玉米的细胞膜上可能都有 HT-毒素的结合位点, 但毒素作用后由于它们的活性氧代谢程度不同而导致了 HT-毒素敏感性的差异。

关键词: 玉米大斑病菌, HT-毒素, 膜脂过氧化, MDA, SOD, POD

中图分类号: S435.131 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2001) 05-001-05

HT-TOXIN PRODUCED BY *EXSEROHILUM TURCICUM* AND SUPEROXIDATION OF MEMBRANE LIPID IN CORN CELL

DONG Jin-Gao HAN Jian-Min ZHANG Li-Hui

(Dept. of Plant Pathology, Hebei Agricultural University, Baoding 071001)

Abstract: Superoxidation of membrane lipid in corn leaf cells has been studied by researching the relationship between membrane permeability, the content of MDA, and the activity of POD and SOD under HT-toxin stress. The experimental results showed that the content of MDA ascended, the POD activity was stimulated and SOD activity was inhibited in compatible combination, but POD activity was inhibited in incompatible combination. HT-toxin strongly destroyed the permeability of cell membrane of corn, and there were positive correlation between toxin effect and toxin concentration and time exposure to toxin. It was conclusion that there may be toxin-binding site in both resistant and susceptible cell membrane, and the difference in sensitivity of resistant and susceptible cells to toxin may result from their active oxygen metabolism.

Key words: *Exserohilum turcicum*, HT-toxin, Superoxidation of membrane lipid, MDA, SOD, POD

玉米大斑病 (*Exserohilum turcicum*) 是一种世界性玉米病害, 常造成严重的经济损失。近年来该病在我国北方玉米产区日趋严重, 已引起人们普遍关注。

研究表明, 玉米大斑病菌对玉米的致病作用主要是产生某些酶类物质和致病毒素 (HT-毒素), 毒素在寄主玉米叶片上可引起典型的大斑病症状。尽管最近有不少关于 HT-毒素分离、提纯和结构鉴定方面的报道^[1-3], 但病原菌对玉米致病的机理以及毒素

* 河北省自然科学基金重点项目 (No.397131, No.398098)

河北农业大学科技重点资助项目 (9816 计划)

收稿日期: 2000-04-14, 修回日期: 2000-09-21

在致病中的作用尚无人问津。现已明确, HT-毒素对玉米叶片的细胞膜有很强的破坏作用^[4], 但这种作用是毒素的直接破坏结果还是间接效应并不十分清楚。本研究的目的是: (1) 明确 HT-毒素处理后玉米叶片细胞膜脂过氧化产物——丙二醛 (MDA) 含量的变化趋势及其与活性氧 (AO) 代谢有关酶类 (SOD、POD) 活性变化的关系; (2) 探讨毒素影响后玉米膜透性变化与细胞内 MDA 含量变化之间在时间进程上的差异。为深入研究玉米大斑病菌的致病机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试菌种

玉米大斑病菌 (*Exserohilum turcicum*) 2号小种 (381菌株), 由丹东农科所吴纪昌先生提供。

1.2 供试玉米品种

自交系 OH43, (感1号小种)、OH43Ht1 (感2号小种); 杂交种: 掖单4号。

1.3 供试 HT-毒素

粗毒素: 由2号小种产生 (含组分 I、II、IV); 毒素组分 I: 由硅胶 G 柱分离获得; 标准毒素: 5-羟甲基-2-呋喃甲醛, 购自美国 Sigma 公司。

1.4 试验组合

亲和组合: OH43 × 毒素组分 I、OH43 × 标准毒素、OH43 × 2号小种粗毒素; OH43Ht1 × 2号小种粗毒素; 掖单4 × 2号小种粗毒素、掖单4 × 组分 I、掖单4 × 标准毒素。

非亲和组合: OH43Ht1 × 标准毒素、OH43Ht1 × 毒素组分 I。

1.5 毒素的分离和纯化

粗毒素的制备: 在 250mL 锥形瓶中定量盛装 100mL 改良 Fries 培养基, 接入 4 片玉米大斑病菌 2号小种菌盘, 置 25℃ 培养箱内培养 21d, 然后在无菌条件下用 Whatman 1 号滤纸过滤, 得培养滤液。将其加热浓缩为原体积的 1/5, 离心去沉淀, 再加等体积丙酮 2 次沉淀, 取上清液用等体积乙酸乙酯萃取 3 次, 将上层液在 40℃ 下减压蒸发去除有机溶剂, 即得棕褐色的粗毒素。

毒素组分 I 的制备: 将乙酸乙酯提取液装入 2.7 × 67cm 的硅胶 G 柱, 以丙酮 (1/3) 和氯仿 (2/3) 为洗脱液, 以 16.7mL/h 的速度洗脱, 可以获得组分 I 的纯品。

1.6 玉米幼苗的培养和处理

每个供试玉米品种分别播 10 盆, 每盆播 5 株, 于温室内培养, 播种 20d 后进行处理。在干净的指形管中分别加入 10mL 供试的粗毒素 (10 μ g/mL)、组分 I (10 μ g/mL)、标准毒素 (10 μ g/mL), 以蒸馏水为对照。将健康的玉米幼苗从相同部位 (近地面处) 剪下, 分别插入相应处理的指形管中, 置光照培养箱内培养, 处理时间分别为 0, 6h, 12h, 24h, 36h, 48h, 然后定时取样。

1.7 酶液及丙二醛提取

参考文献 [5] 的方法进行。

1.8 生理指标的测定

丙二醛含量测定参考文献 [5] 的方法进行; SOD 活性测定参考文献 [6] 的方法进行; POD 活性测定参考文献 [7] 的方法进行; 膜透性测定参考文献 [4] 的方法进

行。以上试验均重复3次。

2 结果与分析

2.1 HT-毒素对玉米叶片细胞膜脂过氧化产物 MDA 含量的影响

图1为HT-粗毒素、毒素组分I、5-羟甲基-2-呋喃甲醛对玉米叶片细胞MDA含量的影响。可以看出,①HT-粗毒素处理后,品种OH43的MDA含量尽管在处理早期(0~6h),与CK处理一样呈下降趋势,一直到24h以前仍低于CK;但在24h后,MDA含量逐渐上升,而此时的CK处理却迅速下降,二者差距越来越大。品种掖单4从处理早期一直到48h,其MDA含量都明显高于CK处理。②毒素组分I处理后,供试2个品种的MDA含量从处理早期到48h一直都高于CK。③标准毒素处理后,MDA含量基本上表现了与组分I处理一致的变化趋势。以上结果说明,HT-毒素处理玉米幼苗后,明显刺激了叶片细胞内MDA的含量。

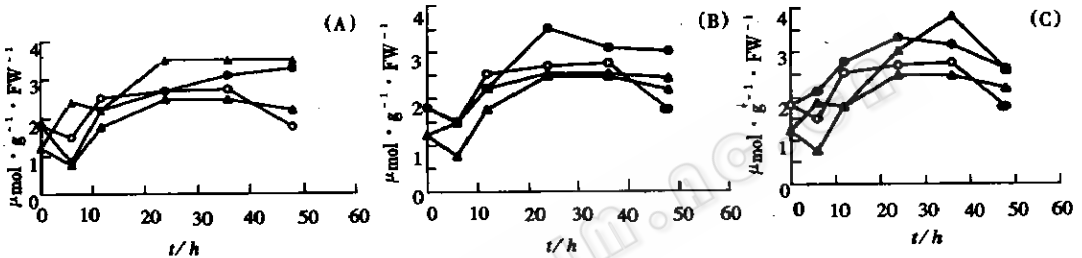


图1 HT-毒素对玉米叶片细胞MDA含量的影响

A:粗毒素(10 μ g/mL), B:毒素组分I(10 μ g/mL), C:5-羟甲基-2-呋喃甲醛(10 μ g/mL)

—○— CK-OH43, —●— 毒素处理-OH43, —△— CK-掖单, —▲— 毒素处理-掖单

2.2 HT-毒素对玉米叶片细胞内产生AO的酶-POD活性的影响

图2为HT-粗毒素、毒素组分I、5-羟甲基-2-呋喃甲醛对玉米叶片细胞POD活性的影响。可以看出,①HT-粗毒素处理后,品种OH43的POD活性在处理的早期(24h以前)明显高于CK处理,24h以后POD活性下降;品种OH43Ht1的POD活性在整个处理的48h内一直高于CK处理。②毒素组分I处理后,品种OH43的POD活性与粗毒素处理基本一致,在36h以前一直高于CK处理,36h以后活性下降;而品种OH43Ht1的POD活性在36h之内却一直低于CK处理。③5-羟甲基-2-呋喃甲醛处理后,供试2个品种的POD活性与毒素组分I处理的表现了基本一致的趋势。

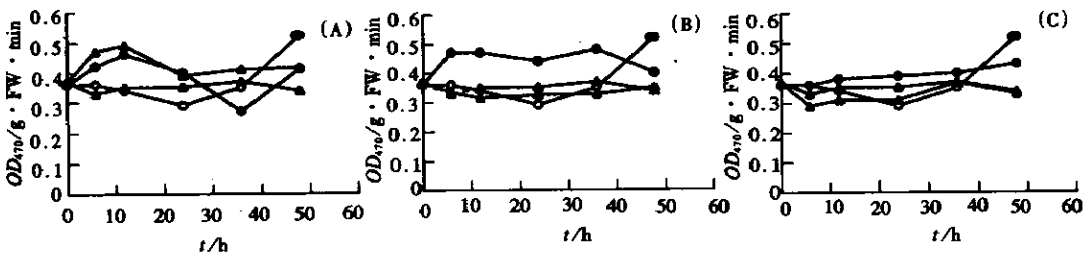


图2 HT-毒素对玉米叶片细胞内PO活性的影响

A:粗毒素(10 μ g/mL), B:毒素组分I(10 μ g/mL), C:5-羟甲基-2-呋喃甲醛(10 μ g/mL)

—○— CK-OH43, —●— 毒素处理-OH43, —△— CK-OH43Ht1, —▲— 毒素处理-OH43Ht1

2.3 HT-毒素对玉米叶片细胞内清除AO的酶-SOD活性的影响

从试验结果可以看出，①HT-粗毒素处理后，品种OH43的SOD活性在处理的早期(12h以前)明显低于CK处理(两者均有一明显的低谷)，12h和之后SOD活性开始升高，24至36h SOD活性又呈降低趋势(第二个低谷)，36h以后SOD活性再次升高；OH43Ht1的SOD活性在处理的前期(12h以前)一直处于下降趋势(第一个低谷)，12h之后SOD活性开始升高，24h至36h之间SOD活性又出现第二个低谷，6h以后SOD活性再次升高。虽然两品种的变化趋势相同，但OH43的变化幅度大于OH43Ht1。②毒素组分I处理后，OH43的SOD活性变化与粗毒素处理基本一致，即有二个低谷(12h和36h)；且SOD活性在整个处理期间基本上一直低于CK处理。而OH43Ht1的SOD活性的变化趋势虽与OH43基本一致，但上升或下降的幅度大于OH43。③5-羟甲基-2-呋喃甲醛处理后，供试2个品种的POD活性与毒素组分I处理的表现了基本一致

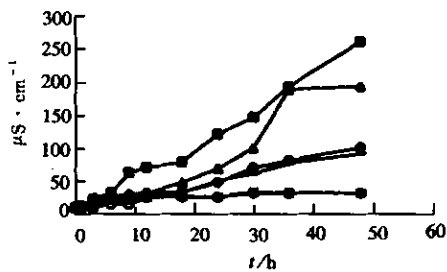


图3 HT-毒素对玉米叶片细胞膜透性的影响

—○— CK-OH43, —■— 组分I-OH43,
—▲— 标-OH43, —◆— CK-OH43Ht1,
--- 组分I-OH43Ht1, —●— 标-OH43Ht1

2.4 HT-毒素对玉米叶片细胞膜透性影响

图3为毒素组分I、5-羟甲基-2-呋喃甲醛对玉米叶片细胞膜透性的影响。可以看出，HT-毒素组分I和标准5-羟甲基-2-呋喃甲醛处理后，品种OH43叶片细胞内的电解质在处理的12h以前就大量外渗，且电导率增长迅速；而OH43Ht1叶片细胞内的电解质在处理24h之后才有所上升，且上升的幅度较慢，说明HT-毒素对感病的玉米叶片细胞膜有较强的破坏作用。

3 讨论

众多研究表明，植物病原真菌毒素对寄主的破坏作用首先是影响了它的细胞质膜系统，导致电解质大量渗漏。如，HV-毒素(引起北美燕麦维多利亚疫病)、HC-毒素(引起玉米圆斑病)、HS-毒素(引起甘蔗眼斑病)、AK-毒素(引起日本梨黑斑病)、ACT-毒素(引起粗皮柠檬褐斑病)、AF-毒素(引起草莓黑斑病)和AM-毒素(引起苹果斑点落叶病)等寄主选择性毒素(HSTs)中的原初作用位点都在寄主的细胞质膜上。早在1971年Samadder和Scheffer研究发现，HV-毒素主要引起感病燕麦原生质体的迅速裂解，首先提出了原生质膜是HV-毒素的初期作用位点，以及蛋白质是毒素受体的观点。Strobel和Hess试验证明，来自甘蔗感病无性系叶片的膜制品能与¹⁴C标记的HS-毒素相结合，而来自抗病无性系叶片的膜制品则不能与¹⁴C标记的HS-毒素相结合，此外结合的程度还随抗病、感病的类群不同而异。Kohmoto等(1987)建立的AK-毒素对感病日本梨品种细胞的作用体系中，提出在梨细胞膜上具有毒素受体位点(一种含-SH基的蛋白质)，AK-毒素与受体位点(-SH基)蛋白结合后，首先破坏质膜的透性引起电解质向外渗漏，进而抑制细胞mRNA和蛋白质的新合成，使细胞中Cu和Fe的含量增加，以致于质膜凹陷，最后促使梨叶脉坏死^[8]。

根据近年来的研究结果，在质膜上存在毒素作用位点(结合蛋白)的证据有：①电解质外渗会超前于病害症状的产生，且与症状的产生有着密切的关系；②毒素处理

会诱发感病植株的质膜结构发生变化。如, Park 等 (1994) 就发现用 AK-毒素处理后在感病叶片中有大量的膜碎片, 说明毒素破坏了膜的结构^[9]; ③带有感病基因的植株或组织细胞与具有抗病基因的细胞相比更能吸收或结合毒素; ④膜的功能(吸收性能、特异通透性的维持)会因毒素的影响而发生变化。

尽管多数研究认为细胞质膜作为毒素受体与毒素结合后, 膜的结构会发生变化, 进而导致电解质外渗, 最后使寄主出现受害症状; 但也有一些报道认为, 膜的损伤和电解质外渗与病害症状形成及抗病性无关。细胞的致死机制可能存在于细胞内, 即毒素与细胞表面识别, 随后输入细胞内与细胞质发生反应。还有人在研究 HV-毒素、PC-毒素、AAL-毒素和 HMT-毒素对相应寄主细胞的影响时发现, 在毒素作用的初期, 寄主细胞膜的形态结构并未发生变化, 仅在细胞器受到很大干扰情况下膜才发生变化。前期试验发现, HT-毒素处理玉米后, 叶片细胞膜透性增加, 而且这种作用与毒素浓度和处理时间呈正相关^[4], 说明 HT-毒素对玉米的叶片细胞具有一定的破坏作用。

生物体内的 AO 包括超氧自由基 (O_2^-)、羟基自由基 (OH^-)、过氧化氢 (H_2O_2)、过氧羟基自由基 (HO_2^-) 和单线态氧 (1O_2) 等。这些 AO 在生物体内相互转化。现已明确, SOD 酶是清除 AO 的主要酶类, POD 酶在产生 AO 和清除 AO 方面起着双重重要作用。作者前期试验发现 HT-毒素对清除 AO 的 CAT 酶、VC 氧化酶都有一定的抑制作用, 说明 HT-毒素可能作用于玉米细胞的 AO 代谢系统^[10]。本研究发现 HT-毒素胁迫后, 玉米叶片细胞 MDA 含量上升 (图 1), 说明 HT-毒素确实破坏了寄主的细胞膜系统, 但这种破坏作用是毒素直接结果还是间接的效应? 从本试验 HT-毒素对玉米细胞影响的时间进程来看, 毒素处理后随即刺激感病玉米细胞内的 POD 活性和抑制抗病玉米叶片细胞 POD 活性; 毒素处理后对感病玉米 SOD 活性的抑制高于对抗病玉米细胞 SOD 活性, 毒素的作用也在处理后马上表现出来; 毒素对玉米细胞膜透性的影响比较缓慢, 感病品种的电解质明显渗漏出现在 9h, 抗病品种的电解质渗漏则在 24h。基于以上的结果可以得出初步结论, HT-毒素对寄主玉米的致病机理可能是毒素首先影响了体内的活性氧代谢, 感病玉米叶片细胞内 AO 大量积累的结果使膜脂发生过氧化, 最后导致外部形态的异常。即玉米大斑病菌对玉米的致病机制可能是: 大斑病菌→HT-毒素→毒素与叶片细胞膜的某一蛋白受体相识别→影响寄主的 AO 代谢→破坏细胞膜的结构→导致外部异常。

参 考 文 献

- [1] Cuq F, Herrmann-Gorline S, Klæbe A, *et al.* *Phytochemistry*, 1993, 34: 1265 ~ 1270.
- [2] Bashan B, Levy R S, Cojocaru M, *et al.* *Physiol. Mol. Pl. Pathol.*, 1995, 47: 225 ~ 235.
- [3] 董金皋, 李正平, 王瑞通, 等. *植物病理学报*, 1997, 27 (3): 257 ~ 261.
- [4] 董金皋, 韩建民, 阎淑娟, 等. *河北农业大学学报*, 2000, 23 (3): 59 ~ 64.
- [5] Han J M, Dong J G, Li Wenfeng, *et al.* *J Hebei Agric Univ*, 1995, 18 (4): 6 ~ 11.
- [6] 华东师范大学生物系. *植物生理学实验指导*. 北京: 人民教育出版社, 1986.
- [7] 李柏林, 梅慧生. *植物生理学报*, 1989, 15 (1): 6 ~ 12.
- [8] Kohmoto K. *Korean J. Plant Pathol.*, 1987, 3 (4) 43 ~ 53.
- [9] Park P, Ohno T, Nishimura S, *et al.* *Annu Phytopathol Soc Japan*, 1994, 60 (4): 431 ~ 440.
- [10] 董金皋, 阎淑娟, 杨 娟, 等. *植物病理学报*, 1999, 29 (4): 372 ~ 373.