

玉米大斑病菌 HT—毒素对玉米细胞膜透性和 Vc 氧化酶、PPO 活性的影响

董金皋 韩建民 李 竹

(河北农业大学, 保定 071001)

Influence of Ht—toxin Produced by *Helminthosporium turcicum* on Membrane Leakage, Vc Oxidenzyme and PPO Activity

Dong Jingao Han Jianmin Li zhu

(Hebei Agricultural University, Baoding 071001)

Abstract: The changes of leakage of membrane and activity of Vc oxidenzyme and PPO in maize seedling under crude Ht—toxin and 5—hydroxymethyl—2—furancarboxaldehyde (Standard Ht—toxin I) stress have been studied. The experimental results indicated that the activity of Vc oxidenzyme decreased, but increased in PPO after 12 hour under Ht—toxin stress, and the extent of decrease and increase showed positive correlation to conc. of Ht—toxin. Both of above enzymes could be returned to normal after 24 hour under Ht—toxin stress. Moreover, the leakage of membrane of corn cell had increased while corn leaves exposed to Ht—toxin.

Key words Corn; *Helminthosporium (Exserohilum) Turcicum*; Ht—toxin; Vc oxidenzyme; PPO; Membrane leakage

摘要 本文以土培盆栽玉米幼苗为试材,研究了玉米大斑病菌粗毒素和标准毒素(5—羟甲基—2—呋喃甲醛)胁迫下,玉米幼苗叶片细胞膜透性和叶片内 Vc 氧化酶、PPO 活性的变化。结果表明,毒素处理 12 小时,玉米幼苗叶片内 Vc 氧化酶活性下降, PPO 活性升高,而且升高和降低的程度与毒素浓度呈正相关;毒素处理 24 小时,两种酶活性均不同程度在恢复。试验结果还发现, HT—毒素处理玉米叶片后,细胞膜透性增大。

关键词 玉米 玉米大斑病菌 HT—毒素 Vc 氧化酶 PPO 细胞膜透性

玉米大斑病 (*Exserohilum turcicum* = *Helminthosporium turcicum*) 是玉米上一种重要的叶斑类病害,世界各地冷凉种植区均有发生,流行年份常造成大面积减产,有时还会加重其他病害的发生和危害。自从 Murphy 和 Meehan 1946~1948 年发现维克多利亚长蠕孢毒素以来,人们对病原真菌毒素的研究不断深入,特别是近年来毒素分子生物学研究方面的惊人进展,使人们逐渐认识到

病原真菌毒素在许多毁灭性病害中的重要作用^[3]。新的研究表明,玉米大斑病菌可以产生寄主专化性毒素 (HT—毒素)^[1], TLC 分析发现,2 号小种产生的 HT—毒素有 3 种毒性组分 (I、II、IV), 1 号小种有 2 种毒性组分 (I、II)^[2], 经结构鉴定,组分 I 结构为 5—羟甲基—2—呋喃甲醛^[14]。

众所周知,当病原微生物侵入寄主或寄主植物受到不良条件的胁迫后,寄主体内某些酶类活性会发生变化。Kohmoto 通过研究提出了 AK—毒素对梨致病的新体系即首先是作用于寄主的膜系统,导致膜透性的改变,进而使寄主出现其他异常^[12]。本研究的目的旨在探讨 HT—毒素胁迫下,玉米叶片内某些酶活性变化情况,以明确 HT—毒素和标准毒素(5—羟甲基—2—呋喃甲醛)致病力的差异,为深入研究 HT—毒素的致病机理奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

供试玉米大斑病菌 HT—毒素为粗毒素(380 菌株产生),由河北农大植物免疫室提供,供试玉米大斑病菌标准毒素由美国 sigma 公司提供,供试玉米品种为丹玉 13。

1.2 方法

1.2.1 玉米幼苗的培养与处理

玉米种子首先浸种 12h, 25℃ 下催芽,播种于温室花盆中,每盆 12 棵,共 10 盆。20d 后(约 4 叶期),将健康玉米幼苗从基部(膜透性试验则从分蘖处)剪下。事先配好 HT—粗毒素 0.1mg/mL、1mg/mL,标准毒素 0.01mg/mL、0.1mg/mL,以蒸馏水作对照。取 5 个 250mL 干净的烧杯,每杯分别加入上述溶液各 50mL,将剪下的玉米幼苗(膜透性试验为叶片)均分成 5 份,同时放入烧杯中,避光放置。于不同的处理时间,取第 3 片叶进行测定。

1.2.2 Vc 氧化酶、PPO 活性测定

取 3 片第 3 叶,称出 1g,剪碎,加少量 pH6.0 磷酸缓冲液迅速研磨成匀浆,全部材料用缓冲液洗入 25mL 容量瓶中,用缓冲液定容,置室温(18~20℃)下浸提 30min,期间摇动数次,将上清液倾入干净的三角瓶中备用。取 6 个洗净干燥的 50mL 三角瓶,编号 1~6,在各瓶中加入缓冲液(1~3 号瓶加 4mL,4~6 号瓶加 3mL),抗坏血酸 1mL,焦儿茶

酚 1mL(仅在 4~6 号瓶加该药品);此外,3 号和 6 号瓶另加 1mL 偏磷酸。最后,各瓶分别依次加入酶液 2mL,反应 3min 后,加入 1mL 偏磷酸中止反应(保证每瓶反应 3min)。然后,加 4 滴淀粉溶液作指示剂,用微量滴定管以 0.005N 碘液进行滴定至出现浅蓝色,记录滴定值^[4]。

1.2.3 细胞膜透性测定

取 10 个 50mL 小烧杯,重蒸馏水洗净,每个处理取 4 片叶,剪成 2cm 长的小段,共剪 16 段分装到 2 个烧杯中,加 10mL 重蒸馏水,减压 40min,然后放置 10min,并不断搅拌,用 DDS—11A 型电导仪测电导值^[4]。

2 结果与分析

2.1 玉米大斑病菌 HT—粗毒素和 5—羟甲基—2—呋喃甲醛对玉米叶片细胞膜透性的影响。

表 1 为不同浓度的 HT—粗毒素和标准毒素处理玉米叶片后不同时间对细胞膜透性的影响。

表 1 说明,HT—毒素处理后,细胞膜透性基本上高于对照,且随处理时间的延长,细胞膜透性增大,这说明 HT—毒素对细胞膜有伤害作用。

2.2 玉米大斑病菌 HT—粗毒素和 5—羟甲基—2—呋喃甲醛对玉米叶片 Vc 氧化酶活性的影响。

表 2 和图 1 为不同浓度的 HT—粗毒素和标准毒素处理玉米叶片后不同时间对玉米叶片内 Vc 氧化酶活性的影响。

从表 2 和附图可以看出,玉米叶片用毒素处理后到 6h 时,HT—粗毒素、5—羟甲基—2—呋喃甲醛与 CK 相比其 Vc 氧化酶活性无明显差异,均在 1.0mg(氧化 Vc)·g⁻¹·min⁻¹左右;但在 6h~12h 的区段内,供试各处理的叶片内 Vc 氧化酶的活性均显著低于对照,处理/对照值分别由 6h 的 74.22%、78.13%、89.07%、90.62%下降到 35.20%、24.24%、44.24%、24.85%;在 12h~24h 的

区段内,各处理 Vc 氧化酶活性迅速恢复,处理/对照值分别由 12h 的 35.20%、24.24%、44.24%、24.85% 升高到 55.97%、88.45%、83.33%、92.13%,但仍低于对照;24h~48h

这个区段内,各处理 Vc 氧化酶的活性继续增加,基本接近于对照。对照的酶活性在各时间区段内平缓上升,之间变化不大。

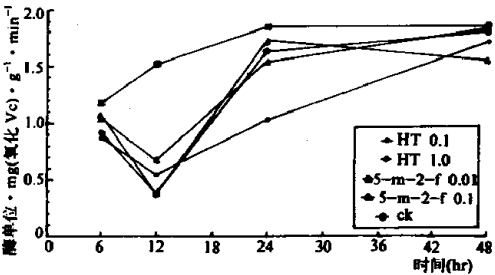
表 1 玉米大斑病菌毒素处理玉米叶片对细胞膜透性的影响

处 理	浓度 (mg/mL)	电导值 ($\mu\Omega$) ⁻¹	
		12h	24h
HT—粗毒素	0.1	36.7	45.7
	1.0	37.2	46.3
5—羟甲基—2—呋喃甲醛	0.01	37.7	34.2
	0.1	45.7	42.2
ck (蒸馏水)		32.2	37.2

表 2 玉米大斑病菌毒素处理叶片对 Vc 氧化酶活性的影响

处 理	浓 度 (mg/mL)	6h		12h		24h		48h	
		活性	处理/对照 %	活性	处理/对照 %	活性	处理/对照 %	活性	处理/对照 %
HT—粗毒素	0.1	0.8708	74.22	0.5324	35.20	1.0313	55.97	1.7188	92.31
	1.0	0.9167	78.13	0.3667	24.24	1.6296	88.45	1.8047	96.92
5—羟甲基—2—呋喃甲醛	0.01	1.045	89.07	0.6692	44.24	1.5354	83.33	1.8333	98.46
	0.1	1.0633	90.62	0.3758	24.85	1.7290	92.13	1.5584	83.69
CK (蒸馏水)		1.1733		1.5125		1.8425		1.8620	

注: 活性单位·mg (氧化 Vc) ·g⁻¹·min⁻¹



附图 HT—毒素胁迫对玉米叶片 Vc 氧化酶的影响

从表 2 和附图还可看出,在 6~12h 这个区段内,1mg/mL 的 HT—粗毒素处理过的幼苗叶片内 Vc 氧化酶的活性比 0.1mg/mL 处理的酶的活性下降要快,但在 12~24h 区段内 1mg/mL 粗毒素处理过的叶片内 Vc 氧化酶的活性比 0.1mg/mL 处理的酶活性上升要快。同样,标准毒素在 6~12h 和 12~24h 两个区段内,幼苗叶片内 Vc 氧化酶的活性下降或上升与浓度也呈正相关。可见,Vc

氧化酶的活性下降或升高的程度与 HT—毒素浓度密切相关。

从附图还可看出,在 6~12h 和 12~24h 区段内,粗毒素 1mg/mL 和标准毒素 0.1mg/mL 呈大致平行的趋势,粗毒素 0.1mg/mL 和标准毒素 0.01mg/mL 也有类似情况。可见,标准毒素的毒性比粗毒素的毒性要高 10 倍。

2.3 玉米大斑病菌 HT—粗毒素和 5—羟甲基—2—呋喃甲醛对玉米叶片 PPO 活性的影响

表 3 为不同浓度的 HT—粗毒素和标准毒素处理玉米叶片后不同时间对叶片内 PPO 活性的影响。

从表 3 可以看出,HT—毒素处理玉米幼苗后 12h,叶片 PPO 活性均显著高于对照,毒素处理 24h,PPO 活性继续增加,说明 HT—毒素胁迫后,玉米叶片细胞内 PPO 活性上升。

表 3 玉米大斑病菌毒素处理叶片后 PPO 活性的变化

处 理	浓 度 (mg/mL)	12h		24h	
		活 性	处理/对照%	活 性	处理/对照%
HT—粗毒素	0.1	0.2017	137.49	0.5620	359.56
5-羟甲基—2-呋喃甲醛	0.01	0.1925	131.22	0.3209	205.97
	0.1	0.5042	343.69	0.2120	136.07
ck (蒸馏水)		0.1467		0.1558	

3 讨 论

目前，在代谢途径与抗逆关系的众多研究中，大多集中在生物体内活性氧代谢系统方面^[5]，Han 和 Dong 等(1995)报道了HT—毒素胁迫后，玉米细胞内 DOS、POD 活性变化^[10]，本试验在此基础上，对 HT—毒素胁迫后，玉米叶片细胞内 Vc 氧化酶、PPO 的活性变化及细胞膜透性等许多方面作了初步研究。

Vc 氧化酶和 PPO 是线粒体外的两种末端氧化酶，前者存在于细胞质中或与细胞壁相结合；后者主要存在于质体或微体中，当植物遭受病原物侵染时，该酶可将细胞内的酚类物质转化成醌类，对病原菌而言，醌类物质比酚类有更大的毒性^[6]。PPO 在抗逆性中的作用表现在酚类物质的氧化聚合增大抗菌能力；参与木质素前体物质的聚合作用，以起到细胞壁木质化，提高防御能力；外源蛋白的聚合交联作用实现排除异己^[13]。质膜透性是反映膜结构完整性的一个指标，一定意义上反映了膜结构受损伤程度^[7]，病原菌侵染引起细胞内的电解质等内容物外渗，通常认为这是质膜透性改变的标志^[11]。本研究结果表明，HT—毒素处理过的玉米叶片细胞膜透性增大，这与前人研究的在多种逆境条件下均观察到膜透性增大结论一致^[8,9]。

本研究还表明，HT—毒素处理后玉米叶片细胞内，Vc 氧化酶和 PPO 活性比质膜透性更加敏感，因此，HT—毒素的致病作用是直接作用于玉米的代谢过程，还是直接破坏质膜的结构尚有待于进一步研究明确。

参 考 文 献

- 1 董金皋. 玉米大斑病菌 HT—毒素寄主专化性研究. 全国科技论文精选, 1994, 郑州: 河南科技出版社, 67—71
- 2 董金皋等. 玉米大斑菌毒素组分分析. 植物病理学报, 1996, 26 (2): 139—144
- 3 高卫东等. 玉米大斑病研究的新进展. 植物病理学报, 1993, 23 (3): 193—195
- 4 河北农业大学编. 植物生理学实验指导, 1992, 90—92, 150—151
- 5 王建华等. SOD 在植物逆境和衰老生理中的作用. 植物生理学通讯, 1989, (2): 12—16
- 6 王雪征. 酚类物质等在小麦抗叶锈中的作用. 河北农业大学硕士研究生论文, 1990, PP4
- 7 王智烁等. 叶锈菌侵染对小麦叶细胞膜透性的影响. 河北农业大学学报, 1987, 10 (专刊). 145—158
- 8 王洪春. 植物抗性生理. 植物生理学通讯, 1981, (6): 72—81
- 9 胡荣海等. 用质膜透性鉴定玉米苗期抗寒性. 植物生理学通讯, 1981, (6) 35—37
- 10 Han, JM, Dong JG et al. The changes on activity of some protective enzymes in maize seeding under Ht—toxin Stress. J. of Agric. Univ. of Hebei, 1995, 18 (4): 6—11
- 11 Hanchey P, Wheeler H. In Daly J. M Uritani I ed. Recognition and specificity in plant host—pathogen interactions. 1979, 193—210. Univ. Park Press, Baltimore.
- 12 Kohmoto et al. In “Molecular Determinants of r’ Disease.” Nishimura et al, (eds) Japan Sci, Press, Tokyo Springer—Verlag, Berlin, PP. 127—143
- 13 Leonarb F J et al. Study of phennloxidase activity during the reproduction cycle in schizophyllum. commune. J. Bacterial, 1973, 114, 7—10
- 14 Li, Z. P et al. Separation and chemical structure identification of Ht—toxin produced by Helminthosporium turcicum. phytopathology. 1996. (in press)