

文章编号:1005-0906(1999)04-0067-06

玉米大斑病菌 HT-毒素对玉米细胞 CAT 酶活性的影响^{*}

董金皋, 闫淑娟, 杨 娟

(河北农业大学植保系, 河北 保定 071001)

摘 要: HT-毒素可抑制玉米叶片细胞 CAT 酶活性。粗毒素(含组分 IV)处理后, 供试 2 个玉米自交系叶片细胞的 CAT 酶活性虽都受到抑制, 但毒素处理 6 h 时自交系 Oh43Ht1 受抑制极其明显; 而此时用毒素组分 I 和标准毒素 I 处理后 Oh43 的相对酶活性又明显低于 Oh43Ht1。即 HT-毒素对不同 Ht 基因玉米叶片细胞 CAT 酶活性的抑制作用表现了一定的寄主选择活性。试验发现, 标准毒素补加 H₂O₂ 后, Oh43 的 CAT 酶活性在 12 h 内急剧上升(12 h 达最大值: 11.056 8 mg/g·FW·min), 之后又迅速下降; 相反, Oh43Ht1 的 CAT 酶活性却急剧下降(12 h 达最小值: 1.700 0 mg/g·FW·min), 之后活性上升, 可见毒素处理早期, H₂O₂ 可刺激 Oh43 玉米细胞 CAT 酶的活性, 却抑制 Oh43Ht1 玉米细胞 CAT 酶的活性。此外, 玉米幼茎细胞受 HT-毒素胁迫后, 各处理的 CAT 酶活性基本类似, 即活性早期下降, 后期上升。

关键词: 玉米; 玉米大斑病; HT-毒素; CAT 酶

中图分类号: S 435.131.4

文献标识码: A

玉米大斑病菌在活体外培养可以产生对热稳定的毒素^[13]; 其液体培养物经氯仿提取可获得一种低分子量, 带有 -OH 基团的化合物, 它可诱导玉米产生典型的大斑病症状^[11]。考虑到玉米对大斑病菌的抗性是显性单基因遗传控制, 曾有人推测 HT-毒素应该具有寄主选择性^[12]。作者早期研究发现, 玉米大斑病菌 2 号小种毒素对带 Ht1 基因玉米根冠细胞的死亡、种子根的伸长、叶片的致萎具选择性的致毒作用; 硅胶 GTLC 分析发现玉米大斑病菌 2 号小种毒素中的组分 IV 可选择性的诱致带 Ht1 基因玉米产生萎蔫症状, 认为它是一种特异性的致病因子, 并提出由 2 号小种产生的 HT-毒素中有寄主选择性的毒性组分^[4,5]; 硅胶 G 柱分析获得了组分 I 的纯品, GC 检测证实其纯度^[2]; 经 GC-MS、HRMS、NMR 的 ¹H 和 ¹³C 等分析已鉴定出组分 I 的化学结构为 5-羟甲基-2-呋喃甲醛, 经与标准样品进行 NMR ¹H 比较, 确证了它的结构^[6]。但长期以来, 从病菌的致病因子—HT-毒素, 尤其是从不同小种的毒素构成与 Ht 基因玉米之间特异性互作的角度来深入探讨大斑病菌对玉米的致病机理却少见报道。本试验研究了不同 HT-毒素制剂胁迫后, 不同 Ht 基因玉米细胞内 CAT 酶活性的变化情况, 为深入探讨 HT-毒素作用的分子机理奠定基础。

1 材料与方 法

收稿日期: 1998-11-30

作者简介: 董金皋(1963-), 男, 河北农业大学植保系教授, 从事植物病理研究。

^{*} 本研究得到河北省自然科学基金和河北农业大学重点科技项目“9816”计划资助

1.1 HT-毒素制剂和玉米自交系

HT-粗毒素由菌株 381 产生(乙酸乙酯提取物,含组分 I、II 和 IV),HT-毒素组分 I 由二次硅胶 G 柱层析获得,5-羟甲基-2-呋喃甲醛购自美国 Sigma 公司,供试玉米自交系为 Oh43 和 Oh43Ht1。

1.2 酶液的提取

称取生长 5~6 叶期的玉米第 3~4 叶片 1g,剪碎后于研钵中加 0.2 g CaCO_3 和去离子水 2 mL 研成匀浆,移入 100 mL 容量瓶中,用去离子水稀释至刻度,振荡片刻,静止后取上清液 10 mL 再移入 100 mL 容量瓶中定容,摇匀备用。

1.3 CAT 酶活性测定^[3]

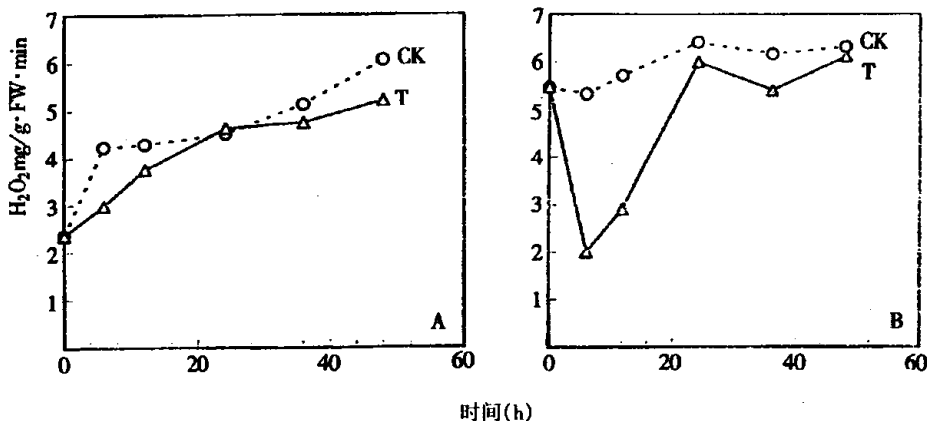
取酶液 10 mL 于 50 mL 锥形瓶内,加入 5 mL 0.1N H_2O_2 摇匀后置 20℃ 恒温条件下充分反应 5 min,加入 5 mL 3.6N H_2SO_4 终止反应(CK 组先加 3.6N H_2SO_4 再加 5 mL 0.1N H_2O_2),再依次加入 1 mL 20% KI,3 滴钼酸铵和 5 滴 1% 淀粉指示剂,用 0.02N 硫代硫酸钠滴定至兰色消失。

被分解 H_2O_2 量(mg) = (CK 组消耗硫代硫酸钠 mL 数 - 处理组消耗硫代硫酸钠 mL 数) × 硫代硫酸钠浓度 × H_2O_2 毫克当量。式中:硫代硫酸钠浓度为 0.02N, H_2O_2 毫克当量为 17。

CAT 酶活性($\text{H}_2\text{O}_2\text{mg/g}\cdot\text{FW}\cdot\text{min}$) = 被分解 H_2O_2 量(mg) × 酶液总体积(mL) ÷ 测定时所用酶液(mL) ÷ 样品重量(g) ÷ 反应时间(min)。CAT 酶相对活性为毒素处理的酶活性与该时间时 CK 酶活性的比值。

2 试验结果

2.1 HT-毒素对玉米叶片细胞 CAT 酶活性的影响

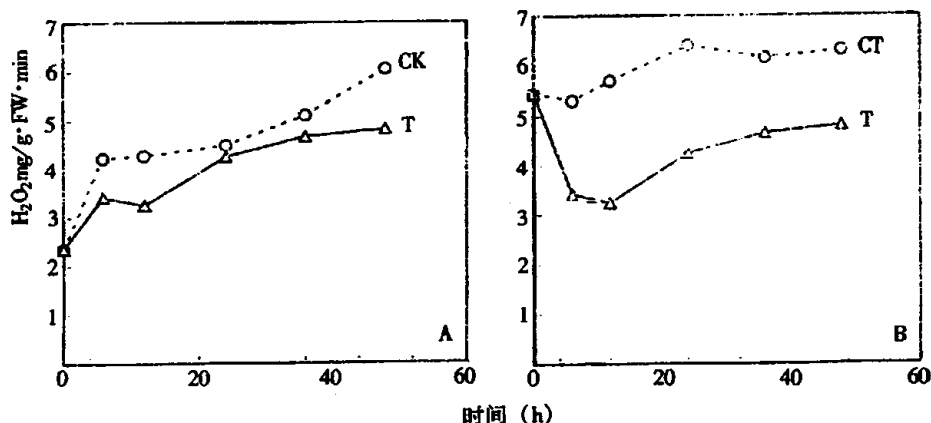


A: 自交系 Oh43; B: 自交系 Oh43Ht1; T: 粗毒素; CK: 对照

图 1 HT-粗毒素对玉米叶片细胞 CAT 酶活性的影响

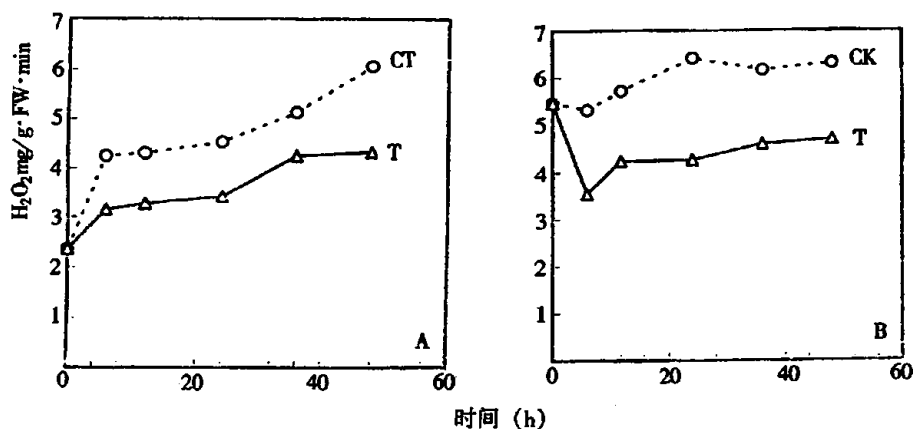
图 1 为粗毒素对玉米叶片细胞 CAT 酶活性的影响。总的看来,毒素处理后,供试 2 个玉米自交系叶片细胞的 CAT 酶活性都受到了抑制;但自交系 Oh43Ht1 在毒素处理 6 h 时受抑制作用极其明显(此时 CAT 酶活性下降到 $1.9992 \text{ mgH}_2\text{O}_2/\text{g}\cdot\text{FW}\cdot\text{min}$)。

图 2,图 3 分别为毒素组分 I 和 5-羟甲基-2-呋喃甲醛对玉米叶片细胞 CAT 酶活性的影响。与粗毒素处理一样,处理后,玉米叶片细胞 CAT 酶活性也都受到了抑制;且 Oh43Ht1 玉米叶片受抑制明显,但与粗毒素相比要轻的多,毒素处理 6 h 时 CAT 酶活性分别是:组分 I 为 $3.7400 \text{ mgH}_2\text{O}_2/\text{g}\cdot\text{FW}\cdot\text{min}$,为 $3.5488 \text{ mgH}_2\text{O}_2/\text{g}\cdot\text{FW}\cdot\text{min}$ 。



A: 自交系 Oh43; B: 自交系 Oh43Ht1; T: 毒素组分 I; CK: 对照

图 2 HT-毒素组分 I 对玉米叶片细胞 CAT 酶活性的影响



A: 自交系 Oh43; B: 自交系 Oh43Ht1; T: 标准毒素 I; CK: 对照

图 3 5-羟甲基-2-呋喃甲醛对玉米叶片细胞 CAT 酶活性的影响

表 1 HT-毒素对玉米叶片细胞 CAT 酶活性的影响

处 理	基因型	CAT 酶相对活性(%)				
		6h	12h	24h	36h	48h
粗毒素	Oh43	0.707 4	0.874 5	1.025 5	0.926 6	0.859 2
	Oh43Ht1	0.375 9	0.508 9	0.932 0	0.877 1	0.968 7
毒素组分 I	Oh43	0.573 2	0.758 6	0.948 2	0.914 7	0.796 3
	Oh43Ht1	0.703 3	0.846 5	0.791 9	1.079 3	1.087 6
标准毒素	Oh43	0.570 4	0.761 9	0.758 1	0.828 2	0.711 9
	Oh43Ht1	0.667 3	0.745 0	0.666 6	0.749 6	1.062 5

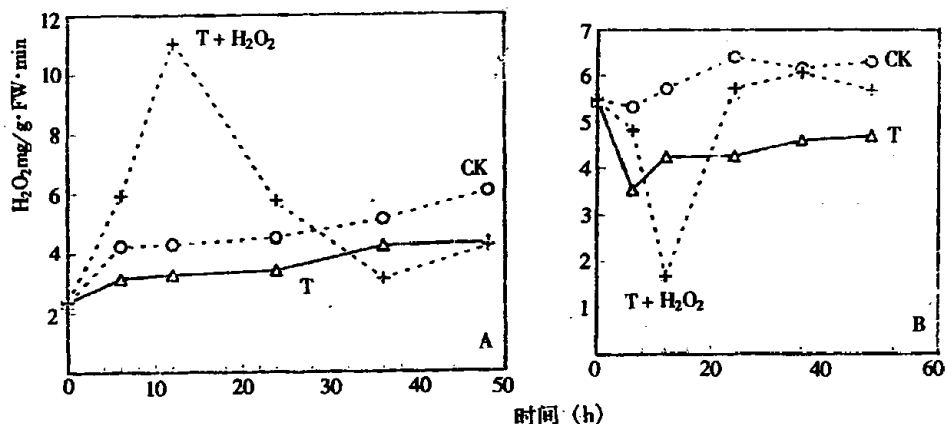
注:毒素浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

表 1 是用 HT-粗毒素(381 菌株产生)、组分 I、5-羟甲基-2-呋喃甲醛处理玉米叶片细胞 CAT 酶的相对活性。可以看出:①粗毒素处理 6h, 自交系 Oh43 玉米叶片细胞 CAT 酶相对活性为 0.707 4%, 而 Oh43Ht1 为 0.375 9%, 后者明显低于前者;6 h 之后, 毒素对 CAT 酶活性的抑制作用逐渐减弱。②毒素组分 I 和 5-羟甲基-2-呋喃甲醛处理 6 h, Oh43 叶片细胞 CAT 酶相对活性分别为 0.573 2% 和 0.570 4%, 而 Oh43Ht1 则分别为 0.703 3% 和 0.667 3%, 后者明显高于前者;同样毒素处理 6 h 以后, 对 CAT 酶活性的抑制逐渐减弱。

从总的结果来看, HT-毒素抑制玉米叶片细胞 CAT 酶的活性, 但在毒素的不同制剂与不同的基因型玉米之间其抑制的程度不同, 表现了一定的选择活性。

2.2 HT-毒素补加 H_2O_2 后对玉米叶片细胞 CAT 酶活性的影响

往 $10 \mu\text{g/mL}$ 的标准 HT-毒素组分 I(5-羟甲基-2-呋喃甲醛)中外源补加浓度为 $1 \mu\text{L/mL}$ 的 H_2O_2 后再处理玉米幼苗,测定 CAT 酶的活性变化,结果(图 4)。



A: 自交系 Oh43; B: 自交系 Oh43Ht1; T: 毒素 I; CK: 对照

图 4 HT-毒素补加 H_2O_2 后对玉米叶片细胞 CAT 酶活性的影响

试验结果发现 HT-毒素补加 H_2O_2 后,自交系 Oh43 的 CAT 活性在处理上升异常迅速(0h:2.358 6 $\text{mgH}_2\text{O}_2/\text{g}\cdot\text{FW}\cdot\text{min}$;6h:5.916 0 $\text{mgH}_2\text{O}_2/\text{g}\cdot\text{FW}\cdot\text{min}$;12h:11.056 8 $\text{mgH}_2\text{O}_2/\text{g}\cdot\text{FW}\cdot\text{min}$),之后活性又开始下降(24h:5.752 8 $\text{mgH}_2\text{O}_2/\text{g}\cdot\text{FW}\cdot\text{min}$;36h:3.107 6 $\text{mgH}_2\text{O}_2/\text{g}\cdot\text{FW}\cdot\text{min}$);而自交系 Oh43Ht1 的 CAT 活性在处理迅速下降(0h:5.474 0 $\text{mgH}_2\text{O}_2/\text{g}\cdot\text{FW}\cdot\text{min}$;6h:4.807 6 $\text{mgH}_2\text{O}_2/\text{g}\cdot\text{FW}\cdot\text{min}$),到 12h 酶活性下降到最小值(CAT 活性为 1.700 0 $\text{mgH}_2\text{O}_2/\text{g}\cdot\text{FW}\cdot\text{min}$),12h 之后 CAT 活性又逐渐上升。

2.3 HT-毒素对玉米幼茎细胞 CAT 酶活性的影响

表 2 HT-毒素对玉米幼茎细胞 CAT 酶活性的影响

处 理	基因型	CAT 酶活性($\text{H}_2\text{O}_2\text{mg/g}\cdot\text{FW}\cdot\text{min}$)			
		0h	24h	48h	72h
CK	Oh43	1.108 0	0.965 6	1.560 6	1.672 8
	Oh43Ht1	1.802 0	0.979 2	1.373 6	2.108 0
HT-粗毒素	Oh43	1.108 0	0.775 2	2.125 0	2.325 6
	Oh43Ht1	1.802 0	0.693 6	1.305 6	1.373 6
毒素组分 I	Oh43	1.108 0	0.659 6	1.346 4	2.186 2
	Oh43Ht1	1.802 0	0.754 8	0.312 8	1.149 2
标准毒素	Oh43	1.108 0	0.918 4	1.146 6	2.167 4
	Oh43Ht1	1.802 0	0.863 6	0.333 2	1.659 2
标准毒素 + H_2O_2	Oh43	1.108 0	0.312 8	0.928 2	1.887 0
	Oh43Ht1	1.802 0	0.489 6	0.727 6	1.703 4
标准毒素 + 代森锰锌	Oh43	1.108 0	0.299 2	0.816 0	1.683 0
	Oh43Ht1	1.802 0	0.700 4	0.856 8	1.598 0

注:毒素浓度为 $10 \mu\text{g/mL}$,代森锰锌浓度为 $10 \mu\text{g/mL}$, H_2O_2 的浓度为 $1 \mu\text{g/mL}$ 。

由表 2 可以看出,供试的 2 个玉米自交系(Oh43 和 Oh43Ht1)无论是用哪种毒素样品处理其幼茎细胞的 CAT 酶活性变化基本上趋于一致。即在处理的 24h 内 CAT 酶活性下降,之后酶活性上升,但不同的处理上升和下降的幅度有所不同:(1)对于 Oh43 玉米自交系来讲,CK 处理的 CAT 酶活性上升和下降的幅度都比较缓慢;粗毒素处理的 CAT 酶活性上升和下降的幅度都比较快;组分 I 和标准毒素处理的 CAT 酶活性在 24h 下降较慢,但 24h 后上升很快。(2)对于

Oh43Ht1 玉米自交系来讲,CK 处理的 CAT 酶活性在 24h 内缓慢下降(下降的幅度比其他处理慢),24h 以后活性快速上升(比其他处理要快);粗毒素处理的 CAT 酶活性在 24h 之内下降较快,但 24h 以后活性缓慢上升;组分 I 和标准毒素处理的 CAT 活性在 48h 之内活性一直下降,以后才上升。(3)毒素中外源加入 H_2O_2 后 Oh43 和 Oh43Ht1 2 个玉米自交系 CAT 酶变化基本表现一致,即 24h 内活性下降比其他处理都快,24h 之后活性稳定上升。

3 讨 论

植物的正常生长发育总是伴随的 AO 代谢。一般来讲,植物体内 AO 的产生与清除处于动态平衡。若植物受到逆境的胁迫而 AO 大量积累时,植物会出现伤害,甚至死亡。近来研究表明,AO 代谢与植物的抗病性有关,如 Baker Orlandi(1995)在“Active Oxygen in plant pathogenesis”一文中谈到 AO 与植物——病原物互作体系中的许多关键过程,包括抗病信号传导(signal transduction),抗菌效应(antimicrobial effect),膜脂氧化(membrane lipoxidation),细胞壁改性(cell wall modification),植保素激活(phytoalexin elicitation)和过敏性细胞死亡(hypersensitive cell death)等有密切关系^[7]。生物体内的 AO 种类有: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,它们在生物体内相互转化。现已明确,植物体内至少存在以下抗氧化机制有 SOD 酶(超氧化物歧化酶),抗坏血酸/谷胱甘肽系统和 CAT 酶(过氧化氢酶)。这些机制在清除 AO、维持植物体内 AO 代谢平衡方面起重要作用。CAT 酶存在于多种需氧生物中,由于具有较高的 K_m 值,在清除细胞内高浓度的 H_2O_2 作用明显,但尚若清除低浓度的 H_2O_2 效果很差。在胁迫条件下 CAT 酶的作用则较为重要。

早在 1983 年,Doke 就曾报道马铃薯块茎经过敏性反应产生 AO,而且 AO 的产生只发生在用马铃薯晚疫病菌的非亲和小种或菌丝细胞壁组分处理的马铃薯组织中。后来不断有非亲和植物——病原物组合产生 AO 的报道。Baker 实验室用植物的悬浮细胞更确切地将植物——病原物非亲和组合 AO 的产生分为 I、II 2 个明显阶段(2 个高峰)。阶段 I(AO)活性相对较短,无专化性反应,用亲和或非亲和性的病原菌处理均可立即产生。阶段 II(AO)活性相对较长,只发生在用非亲和病菌接种后的 1.5~3.0 h 期间,用亲和病菌接种无阶段 II AO 产生,看来该阶段 AO 具有专化性。Baker 认为,阶段 II AO 反应与在种水平上非寄主与病原物互作和在亚种水平(subspecies level)上非亲和小种与品种间互作紧密相关^[7,10]。

在产毒素植物病原真菌与寄主的互作体系中,人们已经对许许多多的与 AO 有关的酶类活性进行了广泛探讨^[1,8],Kohomoto(1987)在建立 AK-毒素对日本梨作用的新体系中也谈到毒素与受体蛋白结合后会影响到依赖于 O_2 的过程,继而使质膜透性增加、结构发生变化,最后导致梨叶片叶脉坏死。本研究发现 HT-毒素胁迫后,感病组合玉米细胞内 CAT 酶活性受抑制的程度强于抗病组合(图 1~3),结果 AO 大量积累,造成细胞膜的损伤,毒素中外源加入 H_2O_2 后感病组合 CAT 酶活性在早期受到强烈刺激,而抗病组合却受抑制作用更强(图 4),原因何在?还有待进一步试验明确,而 H_2O_2 的作用是先氧化了 HT-毒素提高了毒素的致毒作用还是其他作用?等等一系列问题都尚需试验明确。看来深入探讨产毒素植物病原真菌与寄主植物间互作后的 AO 代谢可能非常重要。

参 考 文 献

- [1] 王敬文,薛应龙. 玉米小斑病 T 小种和大斑病菌毒素对 PAL 刺激作用. 植物生理学报,1982,8(2):237-244.
- [2] 李正平,董金皋,等. 玉米大斑病菌毒素的硅胶 G 柱分析. 河北农业大学学报,1995,18(4):1-5.
- [3] 荆加海,丁钟荣译. 植物生物化学分析方法(苏 XH 波钦诺著). 北京:科学出版社,1981.201-209.

- [4] 董金皋. 全国科技论文精选(雷铁栓主编). 郑州:河南科技出版社, 1994. 67 - 71.
- [5] 董金皋, 李正平, 等. 玉米大斑菌 Ht 毒素组分分析. 植物病理学报, 1996, 26(2): 139 - 144.
- [6] 董金皋, 李正平, 等. 玉米大斑病菌毒素结构确定及几种类似物的毒素比较. 植物病理学报, 1997, 27(3): 257 - 261.
- [7] Baker C J, Orlandi E W, Annu. Rev. phytopathol., 1995, 33: 299 - 321.
- [8] Han J M, Dong J C, et al, J Hebei Agric. Univ. 1995, 18(4): 6 - 11.
- [9] Kohmoto K, Korean J. Plant pathol., 1987, 3(4): 43 - 53.
- [10] Orlandi E W, et al. Physiol Mol. plant pathol., 1992, 40: 173 - 180.
- [11] Petitprez M, et al. Revue de Cytologie et de biologie vegetales le Botaniste, 1984, 7(3): 261 - 270.
- [12] Walton J D, Panaccione D G, Annu. Rev. phytopathol., 1993, 31: 275 - 303.
- [13] Yokap, et al. Bulletin de la societe d'Histoire Nature// e de Toulouse 1975, III(3/4): 255 - 272.

Effect of Ht - toxin Produced *Setospharia Turcica* on Cat Enzyme Activity of Corn Leaves

DONG Jin-gao, YAN Shu-juan, YANG Juan

(Dept. of plant pathol Hebei Agric. Univ. , Baoding 071001, China)

Abstract: Activity of CAT enzyme was inhibited after HT-toxin treatment. The activity of CAT enzyme in Oh43 corn leaves was highly inhibited by several HT-toxin preparations used such as crude HT-toxin, component I of HT-toxin, standard HT-toxin, and its activity would rise while HT-toxin added H_2O_2 which showed they might have detoxification effect. The activity of CAT enzyme in Oh43Htl corn leaves was also inhibited by HT-toxin, but the degree of inhibition depended on HT-toxin preparations used: crude HT-toxin had stronger inhibition and component I standard HT-toxin only had slightly inhibition, and the inhibition would increase while H_2O_2 were added.

Key words: Corn *Setospharia turcica*; *Exserohilum turcicum*; HT-toxin; CAT enzyme