

## 链格孢菌毒素对紫茎泽兰的致病机理

万佐玺, 朱晶晶, 强 胜

(南京农业大学杂草研究室, 江苏 南京 210095)

**摘要:** 以叶圆片法分析链格孢菌 [*Alternaria alternata* (Fr.) Keissler] 毒素对紫茎泽兰 (*Eupatorium adenophorum* Spreng.) 叶组织细胞膜透性、过氧化物酶(POD)、抗坏血酸过氧化物酶(APX)和过氧化氢酶(CAT)活性以及丙二醛(MDA)含量的影响, 结果表明, 链格孢菌毒素使紫茎泽兰叶组织细胞膜透性上升,  $\text{Na}^+$  和  $\text{K}^+$  渗漏量增加, 膜脂过氧化加强, MDA 含量上升; 链格孢菌毒素处理的紫茎泽兰叶片中 POD、APX 和 CAT 的活性均较对照降低。

**关键词:** 链格孢菌; 毒素; 紫茎泽兰; 致病机理

**中图分类号:** Q949.32; S451.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0978(2001)03-0047-04

**The pathogenic mechanism of toxin of *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler to *Eupatorium adenophorum* Spreng.** WAN Zuo-xi, ZHU Jing-jing, QIANG Sheng (Weed Research Laboratory, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2001, 10(3): 47-50

**Abstract:** Effects of toxin in *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler on cell membrane permeability, MDA content and activities of POD, APX and CAT enzymes of *Eupatorium adenophorum* Spreng. were conducted by the method of excised leaf test. The results showed that toxin increased permeability of cell membrane, leakage of  $\text{K}^+$  and  $\text{Na}^+$ , over-oxidation of cell membrane and content of MDA in *E. adenophorum* leaf tissue, but activities of POD, APX and CAT in treated leaves were lower than those in control leaves.

**Key words:** *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler; toxin; *Eupatorium adenophorum* Spreng.; mechanism of pathogenicity

紫茎泽兰 (*Eupatorium adenophorum* Spreng.) 是一种世界性的恶性杂草, 链格孢菌 [*Alternaria alternata* (Fr.) Keissler] 是紫茎泽兰的自然致病真菌, 有潜力开发成防除紫茎泽兰的真菌除草剂<sup>[1,2]</sup>, 链格孢菌使紫茎泽兰致病的主要原因是其产生的毒素<sup>[3-5]</sup>。作者试图从生理生化方面探讨链格孢菌毒素对紫茎泽兰的致病机理, 为开发链格孢菌及其毒素防除紫茎泽兰提供理论依据。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 材 料

紫茎泽兰为南京农业大学温室培养的实生苗, 培养时间为 2 个月。链格孢菌毒素为南京农业大学杂草研究室自链格孢 [*Alternaria alternata* (Fr.) Keissler] 501 菌株培养液中提取所得。

DTS-I 型数字电导仪, 上海分析仪器厂 6400A 火焰光度计。

#### 1.2 方 法

1.2.1 试验材料的处理 取生长均匀一致、无病虫

害的紫茎泽兰实生苗的倒数第 2、3 对叶片, 流水轻轻冲洗 30 min, 用蒸馏水清洗 3 次, 以滤纸吸干水分。用刀片切取 0.5cm × 0.5cm 的方块, 混合均匀, 称取 0.5 g, 分别浸入盛有蒸馏水和不同浓度毒素溶液的试管中, 真空减压处理 30 min, 置于 25℃ 光照下 2 h, 供生理指标测定。各项指标测定均设 4 个重复。

1.2.2 细胞膜透性的测定 材料取出后用蒸馏水冲洗 3 次, 快速吸干叶片表面的水分, 置于盛有 10 mL 蒸馏水的 20 mL 试管中, 用滤网使叶片完全浸入水中, 于 0.5、1、2、3 和 4 h 后, 在室温下用电导仪测定叶组织浸出液的电导率, 最后将各处理材料煮沸 15 min, 冷却至室温后再测定叶片组织细胞膜彻底破坏后的最大电导率值, 计算毒素对叶片组织细胞膜的伤害率。

收稿日期: 2001-03-28

基金项目: 高等学校博士点专项科研基金(960205); 农业部九五高新技术及基础研究项目(02-03-031)资助

作者简介: 万佐玺(1968-), 男, 湖北恩施人, 硕士, 讲师, 主要从事杂草生物防治研究。

相对电导率 = (处理电导率/最大电导率) × 100%。

1.2.3 细胞内  $\text{Na}^+$  和  $\text{K}^+$  渗漏量的测定 取供试材料用蒸馏水冲洗3次,快速吸干叶表面水分,置含10 mL蒸馏水的20 mL试管中,用滤网使叶片完全浸入水中0.5、1、2、3和4 h后,用火焰光度计测定浸出液的  $\text{Na}^+$  和  $\text{K}^+$  含量,计算单位质量叶组织的  $\text{Na}^+$  和  $\text{K}^+$  的渗漏量。

1.2.4 丙二醛(MDA)含量的测定 4 h后取出材料并洗净,加入5 mL磷酸缓冲液(pH 7.8,内含1% PVP),冰浴研磨匀浆,于2 500 g离心10 min,取上清液2 mL与2 mL TBA(20%三氯乙酸,0.5%硫代巴比妥酸)混合,100℃水浴30 min,冷却后再离心(2 500 g)10 min,取上清液分别在450、532和600 nm处测消光度值  $\text{OD}_{450}$ 、 $\text{OD}_{532}$  和  $\text{OD}_{600}$ ,按公式<sup>[6]</sup>:  $Y_{532} = -0.00198 + 0.088 \text{OD}_{450}$ , MDA的消光度值  $D = \text{OD}_{532} - \text{OD}_{600} - Y_{532}$ ,求出样品的MDA含量。

1.2.5 酶活性的测定 取供试植物用浓度为5  $\mu\text{g/g}$ 的毒素处理1、3、6、9和12 h后取出,用蒸馏水洗净、吸干、剪碎,加预冷的提取缓冲液进行酶的提取。

1.2.5.1 过氧化氢酶(CAT)活性的测定 加预冷的提取缓冲液(50 mmol/L PBS pH 7.0, 1% PVP, 5 mmol/L  $\beta$ -巯基乙醇)共5 mL,加少许石英砂,匀浆后转入7 mL离心管中,离心20 min(10 000 g, 4℃),将上清液转入刻度试管,记下体积。在3 mL反应液(2.1 mL 50 mmol/L PBS pH 7.0, 0.9 mL 15 mmol/L  $\text{H}_2\text{O}_2$ )中加入适量酶液,连续记录240 nm的光吸收值的变化,然后计算酶反应的初速度(酶活力,以鲜重计) =  $\Delta A_{240}/(\text{min} \cdot \text{g})$ <sup>[7]</sup>。

1.2.5.2 抗坏血酸过氧化物酶(APX)活性测定 加预冷的提取缓冲液(50 mmol/L PBS pH 7.8, 1% PVP, 5 mmol/L EDTA, 2 mmol/L AsA)共5 mL,加少许石英砂,匀浆后转入7 mL离心管中,离心20 min(10 000 g, 4℃),将上清液转入刻度试管,记下体积。在3 mL反应液(50 mmol/L PBS pH 7.0, 0.1 mmol/L EDTA, 0.1 mmol/L  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 0.5 mmol/L AsA)中加入适量酶液,连续记录290 nm的光吸收值的变化,然后计算酶反应的初速度(酶活力,以鲜重计) =  $\Delta A_{290}/(\text{min} \cdot \text{g})$ <sup>[7]</sup>。

1.2.5.3 过氧化物酶(POD)活性的测定 加预冷的提取缓冲液(50 mmol/L 硼砂、200 mmol/L 硼酸, pH 8.7, 内含5 mmol/L 亚硫酸氢钠)5 mL,置冰浴上充

分研磨。匀浆液全部转入7 mL离心管,平衡后于10 000 g, 4℃下离心30 min。将上清液转入刻度试管,记下体积。在3 mL反应液(2 mL 100 mmol/L 醋酸-醋酸钠缓冲液 pH 5.4, 1 mL 0.25% 愈创木酚)中加入0.1 mL酶液,最后加入0.1 mL  $\text{H}_2\text{O}_2$ 溶液,连续记录460 nm的光吸收值的变化,然后计算酶反应的初速度(酶活力,以鲜重计) =  $\Delta A_{460}/(\text{min} \cdot \text{g})$ <sup>[7]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 链格孢菌毒素对紫茎泽兰叶片细胞膜透性的影响

链格孢菌毒素对紫茎泽兰离体叶片细胞膜透性的影响见图1。可以看出,总的趋势是随着毒素浓度的增加,浸出液的相对电导率上升。当毒素浓度从1  $\mu\text{g/g}$ 增加到2.5  $\mu\text{g/g}$ 时,浸出液的相对电导率变化很小,而当毒素浓度从2.5  $\mu\text{g/g}$ 增加5  $\mu\text{g/g}$ 时,浸出液的相对电导率明显增大,增幅超过100%,但当毒素浓度再增加时,浸出液的相对电导率仅略有上升。这个结果表明,毒素的吸收可能与膜上受体有关,当受体被饱和后,相对透性不再受毒素浓度的影响,详细情况有待进一步研究。

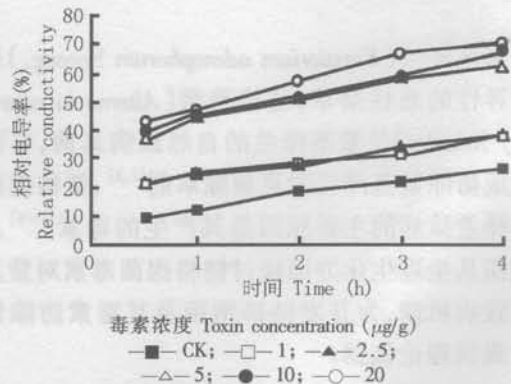


图1 链格孢菌毒素对紫茎泽兰叶组织电解质渗漏的影响  
Fig. 1 Influence of toxin of *Alternaria alternata* on the electrolyte leakage of *Eupatorium adenophorum* leaf tissue

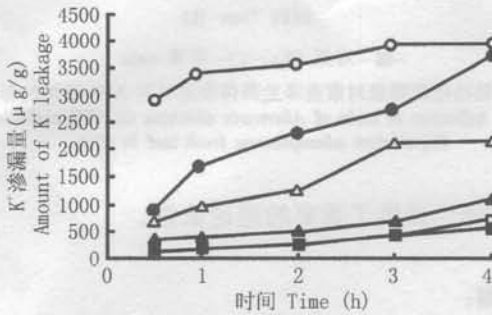
### 2.2 链格孢菌毒素对紫茎泽兰叶片 $\text{K}^+$ 和 $\text{Na}^+$ 渗漏的影响

链格孢菌毒素能引起紫茎泽兰叶组织  $\text{K}^+$  和  $\text{Na}^+$  的渗漏,随着毒素浓度的增加,浸出液中  $\text{K}^+$  和  $\text{Na}^+$  的含量上升(如图2和3)。

在毒素浓度低于2.5  $\mu\text{g/g}$ 时,引起的  $\text{K}^+$  的渗漏量较小,但当增加到5  $\mu\text{g/g}$ 时,渗漏量明显增加(图2)。当处理浓度增加到10  $\mu\text{g/g}$ 时,随处理时间延

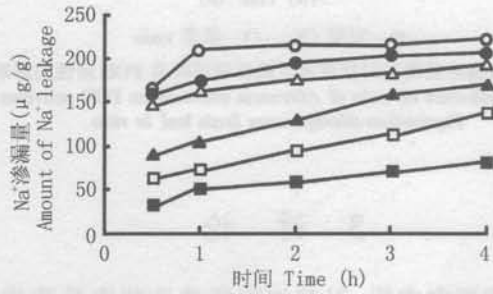
长,渗漏量增加较快,曲线很陡。处理量再增加1倍,处理后的渗漏量在很短时间即达到高值,之后增加很少,几乎与10 μg/g处理4 h处于同等水平(图2)。这启示10 μg/g毒素的浓度就可以引起K<sup>+</sup>的渗漏量达到最大值。毒素对Na<sup>+</sup>渗漏量的影响,基本

上也表现出K<sup>+</sup>渗漏的规律性。不过,在2.5 μg/g浓度处理后,Na<sup>+</sup>渗漏量就开始显著增加,之后趋缓(图3)。这一研究结果基本上与毒素引起膜的通透性改变相吻合。



毒素浓度 Toxin concentration (μg/g)  
 -■- CK; -□- 1; -▲- 2.5;  
 -△- 5; -●- 10; -○- 20

图2 链格孢菌毒素对紫茎泽兰叶组织K<sup>+</sup>渗漏的影响  
 Fig. 2 Influence of toxin of *Alternaria alternata* on K<sup>+</sup> leakage of *Eupatorium adenophorum* leaf tissue



毒素浓度 Toxin concentration (μg/g)  
 -■- CK; -□- 1; -▲- 2.5;  
 -△- 5; -●- 10; -○- 20

图3 链格孢菌毒素对紫茎泽兰叶组织Na<sup>+</sup>渗漏的影响  
 Fig. 3 Influence of toxin of *Alternaria alternata* on Na<sup>+</sup> leakage of *Eupatorium adenophorum* leaf tissue

2.3 链格孢菌毒素对紫茎泽兰叶片MDA的影响

毒素处理能增加紫茎泽兰离体叶片组织MDA含量(图4)。当毒素浓度在5 μg/g以下时,MDA的含量随着毒素的增加而上升,而毒素浓度在5 μg/g以上时,MDA含量却随着毒素浓度的提高而下降,但仍高于对照的MDA的含量。出现该结果的原因可能是毒素浓度高于一定水平后,细胞的整体功能在短时间内遭到严重破坏,膜脂过氧化的酶也遭破坏,

产生的MDA反而比低浓度毒素处理时下降。

2.4 链格孢菌毒素对紫茎泽兰离体叶片保护酶的影响

链格孢菌毒素对紫茎泽兰离体叶片CAT、POD和APX等保护酶活性的影响见图5、图6和图7。可以看出,用浓度5 μg/g的毒素处理后,随着时间的延长,CAT、POD和APX的活性下降,唯CAT在处理早期(处理1~3 h)活性有一个上升过程。

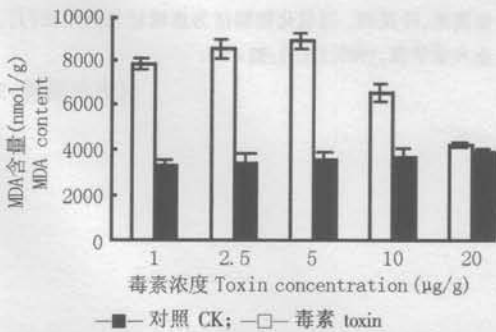


图4 链格孢菌毒素对紫茎泽兰离体新鲜叶片MDA含量的影响  
 Fig. 4 Influence of toxin of *Alternaria alternata* on MDA amount of *Eupatorium adenophorum* fresh leaf in vitro

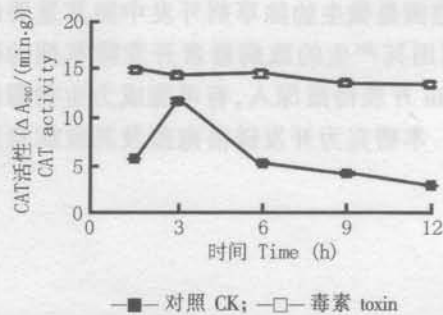


图5 链格孢菌毒素对紫茎泽兰离体新鲜叶片CAT活性的影响  
 Fig. 5 Influence of toxin of *Alternaria alternata* on CAT activities of *Eupatorium adenophorum* fresh leaf in vitro



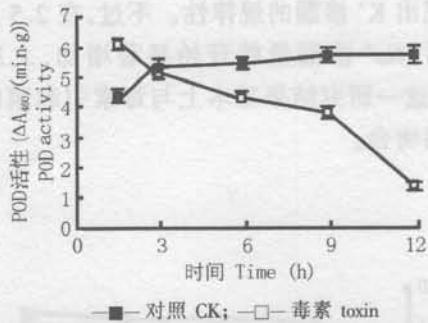


图 6 链格孢菌毒素对紫茎泽兰离体新鲜叶片 POD 活性的影响  
Fig. 6 Influence of toxin of *Alternaria alternata* on POD activities of *Eupatorium adenophorum* fresh leaf in vitro

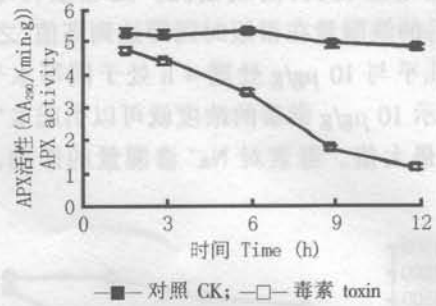


图 7 链格孢菌毒素对紫茎泽兰离体新鲜叶片 APX 活性的影响  
Fig. 7 Influence of toxin of *Alternaria alternata* on APX activities of *Eupatorium adenophorum* fresh leaf in vitro

### 3 讨论

众多研究表明,引起细胞膜透性改变是致病毒素作用于寄主后发生的普遍性反应,细胞膜是毒素的最初作用位点。链格孢菌产生的致病毒素能引起紫茎泽兰离体叶片细胞膜透性上升, $K^+$ 、 $Na^+$  渗漏量增加,叶组织的膜脂过氧化加剧,MDA 含量上升,说明致病毒素引起细胞膜的伤害,造成膜功能的紊乱。但是致病毒素在细胞膜上的受体以及信号的传递等有待进一步研究。

在进行活性氧与植物抗病性关系的研究中发现,活性氧的产生与植物抵御病原体的侵染有关。一般情况下植物体内活性氧的产生和清除处于动态平衡。致病毒素处理后,紫茎泽兰离体叶片的 POD、APX、CAT 的活性下降,可能使活性氧清除系统中酶系统遭到破坏,活性氧过量积累,细胞因此受到伤害,最终使紫茎泽兰叶片表现出受害症状。

链格孢菌是微生物除草剂开发中极其重要的一类真菌,利用其产生的致病毒素开发除草剂的研究以 AAL-toxin 开展得最深入,有可能成为生物源的化学除草剂。本研究为开发链格孢菌及其致病毒素防

除紫茎泽兰提供了重要的理论依据。

#### 参考文献:

- [1] 强 胜. 链格孢菌作为真菌除草剂防除紫茎泽兰潜力的研究 [D]. 南京:南京农业大学,1998.
- [2] 强 胜,万佐玺,董云发,等. 链格孢菌毒素对紫茎泽兰致病性的初步研究[A]. 孙庸昌. 面向 21 世纪中国杂草可持续治理. 第六次全国杂草科学学术研讨会论文集[C],南宁:广西民族出版社,1999. 158-165.
- [3] Kohmoto K, Itoh Y, Shimomura N, et al. Isolation and biological activities of two host-specific toxins from the tangerine pathotype of *Alternaria alternata* [J]. *Phytopathol*, 1993, 83(5): 495-502.
- [4] Montemurro N, Visconti A. *Alternaria* metabolites-chemical and biological data [A]. Chelkowski J, Visconti A. *Alternaria: Biology, Part II, Plant Disease and Metabolites* [M], Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1992. 449-558.
- [5] 万佐玺,强 胜,徐尚成,等. 链格孢菌产毒培养条件及其毒素的致病范围[J]. *中国生物防治*, 2000, 17(1): 10-15.
- [6] 赵世杰. 植物中丙二醛测定方法的改进[J]. *植物生理学通讯*, 1994, 30(3): 207-210.
- [7] 徐朗莱,叶茂炳. 过氧化物酶活力连续记录测定法[J]. *南京农业大学学报*, 1989, 12(3): 82-83.

(责任编辑:宗世贤)