

莲子草假隔链格孢毒素对空心莲子草根尖组织防御酶活性的影响

范兰兰¹, 姜子德¹, 向梅梅²

(1 华南农业大学 资源与环境学院, 广东 广州 510642; 2 仲恺农业工程学院 农业与园林学院, 广东 广州 510225)

摘要:研究了莲子草假隔链格孢 *Nimbya alternantherae* 毒素 2-乙酰基-3,4-二羟基-5-甲氧苯基-乙酸(Vulculic acid)对空心莲子草 *Alternanthera philoxeroides* 根尖组织防御酶活性的影响. 结果表明:Vulculic acid 能够引起空心莲子草根尖组织防御酶活性发生变化,在处理初期,细胞内过氧化氢酶(CAT)、抗坏血酸过氧化物酶(APX)、过氧化物酶(POD)、多酚氧化酶(PPO)的活性均低于对照,而苯丙氨酸解氨酶(PAL)、超氧化物歧化酶(SOD)的活性高于对照.

关键词:空心莲子草; 莲子草假隔链格孢; 致病毒素; 防御酶

中图分类号:S435.651

文献标识码:A

文章编号:1001-411X(2010)03-0028-04

Effects of Vulculic Acid on the Activities of Defense Enzymes of *Alternanthera philoxeroides*

FAN Lan-lan¹, JIANG Zi-de¹, XIANG Mei-mei²

(1 College of Resource and Environment, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

2 Agriculture and Landscape College, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225, China)

Abstract: The activities of catalase (CAT), ascorbic acid peroxidase (APX), peroxidase (POD), polyphenol oxidase (PPO), phenylalanine ammonia-lyase (PAL), superoxide dismutase (SOD) in the root tip tissues of alligatorweed, *Alternanthera philoxeroides*, treated with vulculic acid from *Nimbya alternantherae* were analyzed. The results showed that the toxin could result in the activity change of defense enzymes in the root tip tissue of alligatorweed. The activities of CAT, APX, POD, PPO in tissues treated were lower than that of controls respectively in initial stages after treatment, while the activities of PAL and SOD were higher than those of controls.

Key words: *Alternanthera philoxeroides*; *Nimbya alternantherae*; phytotoxin; defense enzyme

空心莲子草 *Alternanthera philoxeroides* 又称水花生, 属苋科莲子草属, 20 世纪 30 年代引入我国, 现已成为广东乃至全国大部分省区的恶性杂草之一. 近年来, 国内外在利用真菌代谢产物防除空心莲子草方面取得了一些进展. 万佐玺等^[1]发现链格孢菌 *Alternaria alternata* 的毒素对空心莲子草叶片有很强的致病作用; Tan 等^[2]和涂永勤等^[3]发现镰刀菌 *Fusarium* sp. 及其代谢产物可引致该草产生叶斑及枯萎症

状; 周遗品等^[4]从空心莲子草叶斑病菌 *Nimbya alternantherae* 代谢产物中分离获得了毒素 2-乙酰基-3,4-二羟基-5-甲氧苯基-乙酸(Vulculic acid), 并发现其可引致空心莲子草根组织变褐和植株萎蔫, 是一种潜在的天然除草化合物. 曾永三等^[5]的研究表明, Vulculic acid 能够引致空心莲子草叶片细胞膜透性升高, 导致电解质渗漏, 同时降低叶片细胞内某些保护酶的活性, 使细胞防御酶系统发生紊乱. 为

收稿日期: 2009-04-08

作者简介: 范兰兰(1981—), 女, 硕士; 通信作者: 向梅梅(1959—), 女, 教授, 博士 E-mail: mm_xiang@163.com

基金项目: 国家自然科学基金(30671382); 广东省自然科学基金(6022863)

探明 Vulculic acid 对空心莲子草的致萎机理,为其开发应用提供理论依据,本文研究了该毒素对空心莲子草根尖组织防御酶活性的影响。

1 材料与方法

1.1 供试植物

将采自田间的空心莲子草用 Hoagland 和 Arnon 营养液配方 [$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.945 g、 KNO_3 0.607 g、 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 0.115 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.439 g、 H_2O 1 000 mL] 进行培养,长出 5~6 对新叶时备用。

1.2 方法

1.2.1 毒素制备 参照周遗品等^[4]的方法,将经 PDA 培养的莲子草假隔链格孢 *Nimbya alternantherae* 斜面菌种 2 支接入 200 mL 改良 Fries3 号培养液中,以 28 ℃、200 r/min 连续振荡培养,7 d 后按体积比 1:10 接入新培养液扩大培养,5 d 后再按体积比 1:10 接入 30 L 的 Biostat 发酵罐(德国产)中,于 28 ℃、400~500 r/min、12 L/min 通气量下发酵培养,3~4 d 后过滤,获得培养滤液。于培养滤液中加入 1/3 体积的甲醇,混匀,过滤除去沉淀,滤液于 60 ℃ 下减压浓缩至原体积 1/3,然后过 DM-130 大孔树脂色谱柱(700 mm×70 mm),用甲醇洗脱。将洗脱液减压浓缩至近干,再用乙酸乙酯加热浸提,过滤,滤液于 60 ℃ 下减压浓缩至干得到毒素粗提物。在粗提物中加入体积比为 1:1 的苯-丙酮溶液,60 ℃ 水浴加热,趁热过滤,冰水浴冷却结晶,所得晶体反复重结晶后,得到含少量褐色杂质的白色针状晶体。将所得晶体装入硅胶柱,用体积比为 1:1 的苯-丙酮溶液洗脱,将洗脱液于冰水浴中冷却结晶,即获得白色针状的纯毒素。获得的纯毒素用双蒸水配成 6 μg/mL 的毒素溶液备用。

1.2.2 材料处理 参照房保海等^[6]的方法,取生长均匀一致、健康的空心莲子草,流水轻轻冲洗 5 min,用双蒸水冲洗 3 次,以无菌滤纸吸干水分,分别浸入盛有双蒸水和 Vulculic acid 质量浓度为 6 μg/mL 的溶液中,置于 25 ℃ 下光照处理,分别于 12、24、36、48、60 和 72 h 后取出,用双蒸水洗净,吸干,每株剪取 0.5 cm 长根尖 0.05 g,进行酶液提取及活性测定,各项指标均设置 3 个生物重复。

1.2.3 酶活性测定 过氧化氢酶(CAT):参照万佐玺等^[7]的方法,经 1.2.2 处理后的材料加入缓冲液(50 mmol/L pH7.0 PBS,内含 5 mmol/L β-巯基乙醇),匀浆,4 ℃ 条件下 12 000 r/min 离心 15 min,上清液即为粗酶液。反应液中含有 0.2 mmol/L pH7.8

PBS 1.5 mL、 H_2O_2 1.5 mL 和粗酶液 0.2 mL,连续记录 $D_{240\text{ nm}}$ 变化,每 1 min 测 1 次,共测 4 min,以 $D_{240\text{ nm}}$ 变化 0.01 为 1 个酶活性单位(U)。按 Bradford^[8]的方法测定酶蛋白含量,然后计算酶活性。

抗坏血酸过氧化物酶(APX):参照万佐玺等^[7]的方法,经 1.2.2 处理后的材料加入缓冲液(50 mmol/L pH7.8 PBS,内含 5 mmol/L EDTA 和 2 mmol/L AsA),匀浆,4 ℃ 条件下 12 000 r/min 离心 15 min,上清液即为粗酶液。反应液中含有混合液(50 mmol/L pH7.0 PBS,内含 0.1 mmol/L EDTA、0.06 mmol/L H_2O_2 、0.3 mmol/L AsA) 3 mL 和粗酶液 0.1 mL,连续记录 $D_{290\text{ nm}}$ 变化,每 30 s 测 1 次,共测 2 min,以 $D_{240\text{ nm}}$ 变化 0.001 为 1 个酶活性单位(U)。

过氧化物酶(POD):参照李合生等^[9]的方法,经 1.2.2 处理后的材料加入缓冲液(pH7.8 硼酸缓冲液,内含 5 mmol/L 亚硫酸氢钠) 2 mL,匀浆,4 ℃ 条件下 12 000 r/min 离心 15 min,上清液即为粗酶液。反应液含有 100 mmol/L pH5.4 醋酸-醋酸钠缓冲液 1.8 mL、 H_2O_2 0.2 mL、 w 为 0.25% 愈创木酚 1 mL 和粗酶液 0.1 mL,连续记录 $D_{460\text{ nm}}$ 变化,每 15 s 测 1 次,共测 2 min,以 $D_{460\text{ nm}}$ 变化 0.01 为 1 个酶活性单位(U)。

多酚氧化酶(PPO):参照张笑宇等^[10]的方法,经 1.2.2 处理后的材料加入缓冲液 50 mmol/L pH 6.8 PBS,匀浆,4 ℃ 条件下 12 000 r/min 离心 15 min,上清液即为粗酶液。反应液含有 50 mmol/L pH6.8 PBS 1.5 mL、50 mmol/L 邻苯二酚 1.5 mL 和粗酶液 0.2 mL,连续记录 $D_{470\text{ nm}}$ 变化,每 15 s 测 1 次,共测 2 min,以 $D_{470\text{ nm}}$ 变化 0.01 为 1 个酶活性单位(U)。

超氧化物歧化酶(SOD):参照邹琦等^[11]的方法,经 1.2.2 处理后的材料加入缓冲液 50 mmol/L pH7.8 PBS 2 mL,匀浆,4 ℃ 条件下 12 000 r/min 离心 15 min,上清液即为粗酶液。反应液含有 50 mmol/L pH7.8 PBS 1.8 mL、130 mmol/L 甲硫氨酸 0.3 mL、750 μmol/L NBT 0.3 mL、100 mmol/L EDTA 0.3 mL、20 μmol/L 核黄素 0.3 mL 和粗酶液 0.1 mL,以抑制 NBT 光还原的 50% 为 1 个酶活力单位(U)。

苯丙氨酸解氨酶(PAL):参照张笑宇等^[10]的方法,经 1.2.2 处理后的材料加入缓冲液(pH8.8 硼酸缓冲液,内含 0.5 mmol/L β-巯基乙醇),匀浆,4 ℃ 条件下 12 000 r/min 离心 15 min,上清液即为粗酶液。反应液含有 20 mmol/L L-苯丙氨酸 1 mL、pH 8.8 硼酸缓冲液 2 mL 和粗酶液 0.3 mL,连续记录 $D_{290\text{ nm}}$ 变化,每 15 min 测 1 次,共测 1 h,以 $D_{290\text{ nm}}$ 变化 0.01 为 1 个酶活性单位(U)。

2 结果与分析

2.1 Vulculic acid 对 CAT 活性的影响

经 Vulculic acid 处理后,空心莲子草根尖组织内 CAT 活性随处理时间延长呈先上升后下降趋势,对

照(CK)则变化不明显. 在处理后 12 ~ 30 h 间,处理组的 CAT 活性低于 CK, 于处理后 24 h 低于对照 29%; 之后处理组 CAT 活性明显上升, 于处理后 30 ~ 60 h 高于 CK, 且于 48 h 达活性峰值, 对照则于 60 h 达最高峰值(图 1a).

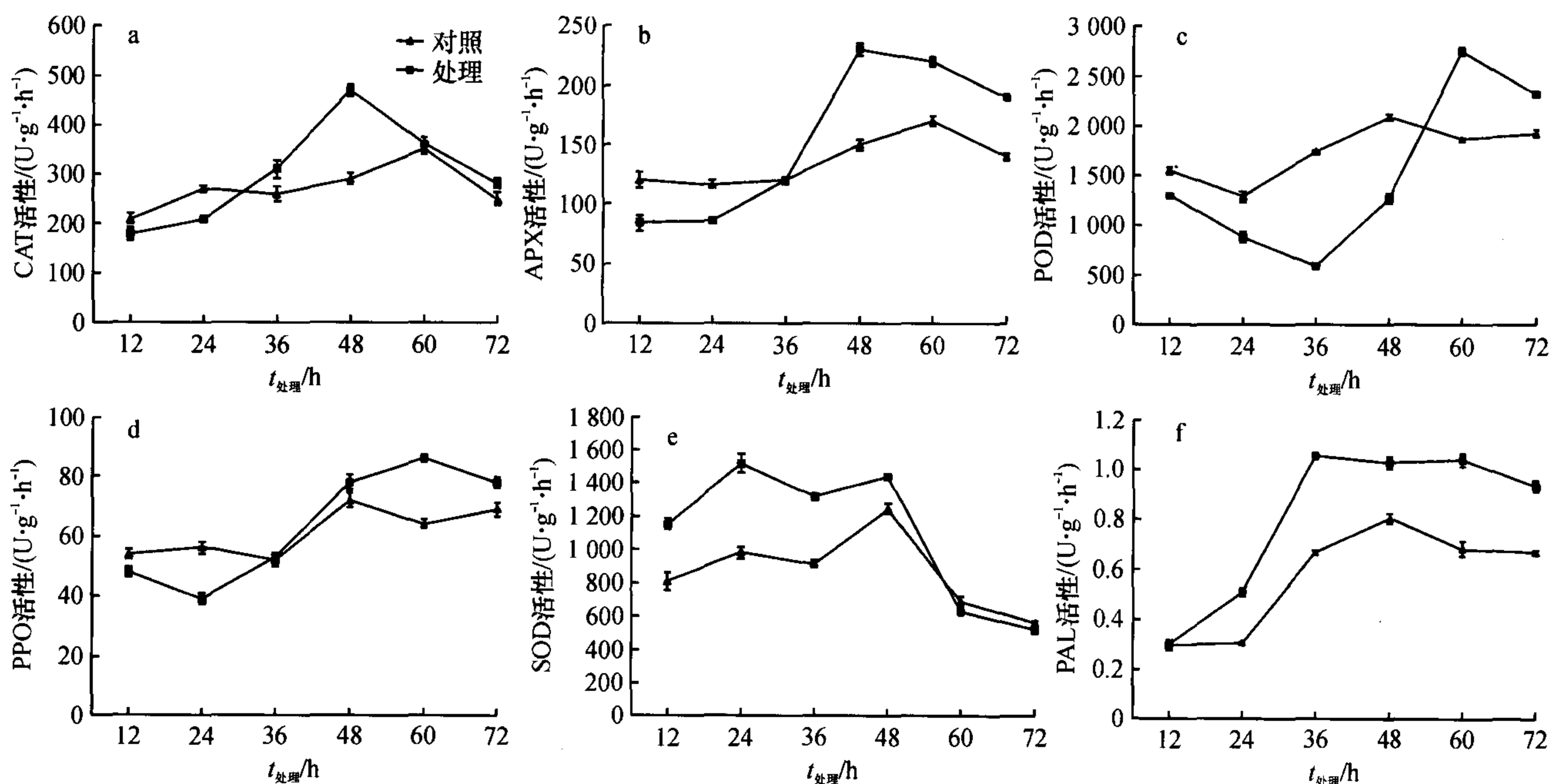


图1 Vulculic acid 对空心莲子草根尖酶活性的影响

Fig. 1 Effect of Vulculic acid on enzyme activity in the root tip of alligatorweed

2.2 Vulculic acid 对 APX 活性的影响

空心莲子草根尖组织内 APX 活性于毒素处理后 12 ~ 60 h 呈上升趋势, 对照(CK)于 12 ~ 48 h 呈上升趋势, 但变化幅度明显小于处理组. 在处理后 12 ~ 36 h 间, 处理组的 APX 活性低于 CK, 于处理后 24 h 低于对照 41%; 之后处理组 APX 活性迅速上升, 于处理 36 h 后明显高于 CK, 且于 48 h 达最高峰值(图 1b).

2.3 Vulculic acid 对 POD 活性的影响

空心莲子草根尖组织内 POD 活性于毒素处理后 12 ~ 36 h 呈下降趋势, 明显低于 CK, 且于处理后 36 h 达活性最低峰值, 低于对照 64%; 之后处理组 POD 活性迅速上升, 于 50 h 后高于 CK, 且于处理后 60 h 达最高峰值(图 1c).

2.4 Vulculic acid 对 PPO 活性的影响

经 Vulculic acid 处理后,空心莲子草根尖组织内 PPO 活性随处理时间的延长呈先下降后上升趋势, 对照(CK)也呈先下降后上升趋势, 但变化幅度小于处理组. 在处理后 12 ~ 36 h 间, 处理组的 PPO 活性低于 CK, 且于处理后 24 h 活性最低, 低于对照 32%; 处理后 24 ~ 48 h 处理组 PPO 活性明显上升, 于 36 h 后高于 CK, 且于 60 h 达活性最高峰值(图 1d).

2.5 Vulculic acid 对 SOD 活性的影响

Vulculic acid 处理后,空心莲子草根尖组织内 SOD 活性随处理时间的延长呈先上升后下降趋势, 且在上升阶段出现 2 个峰值, 对照(CK)也表现出类似的变化趋势. 处理后 12 ~ 48 h 处理组的 SOD 活性明显高于 CK, 且于 24 和 48 h 的 2 个峰值处分别高于对照 56% 和 12%; 之后处理组和 CK 的 SOD 活性相近(图 1e).

2.6 Vulculic acid 对 PAL 活性的影响

Vulculic acid 处理后,空心莲子草根尖组织内 PAL 活性随处理时间的延长呈上升趋势, 对照(CK)也呈上升趋势, 但上升幅度小于处理组. 处理后 12 ~ 36 h 处理组和 CK 的 PAL 活性均明显增加, 增幅分别为 280% 和 116%; 之后活性均趋于稳定. 整个过程处理组活性始终高于对照, 最高峰值分别出现在处理后 36 和 48 h, 处理组早于对照组, 且处理组高出对照组 35% (图 1f).

3 讨论

3.1 Vulculic acid 处理后空心莲子草根组织内防御酶系统明显变化

APX、CAT、PPO 和 POD 为具有清除活性氧作用

的防御酶,寄主体内防御酶系统变化是致病毒素作用于寄主后的明显反应之一.毒素能使这些防御酶活性降低,导致活性氧过量积累,从而对寄主细胞造成破坏.曾永三等^[5]报道,Vulculic acid 可抑制空心莲子草叶片细胞中 CAT 和 POD 的活性,导致活性氧积累,寄主叶片表现受害症状.万佐玺等^[7]的研究表明链格孢菌毒素可抑制紫茎泽兰叶片细胞内 CAT、APX、POD 的活性,导致寄主叶片产生棕褐色病斑.本研究也表明,Vulculic acid 能够抑制空心莲子草根尖细胞内 APX、CAT、PPO、POD 的作用,降低其对活性氧的清除能力,从而导致活性氧过量积累,使空心莲子草根细胞受到破坏.

SOD 能够直接清除超氧阴离子自由基,往往在其他防御酶活性降低时发挥直接补偿作用,减轻活性氧对寄主的伤害.阚光锋等^[12]将烟草接种烟草野火病菌毒素后,在处理初期寄主细胞内 CAT、POD、PPO 活性受到抑制时,SOD 的活性增强.本研究中,Vulculic acid 处理后空心莲子草根组织内 SOD 的活性也上升.这进一步表明,空心莲子草根尖组织中的其他防御酶活性受到了抑制,导致活性氧积累,SOD 被激活.

PAL 是能合成各种酚类及木质素前体物质的苯丙烷类代谢途径的关键酶和限速酶,调控着酚类物质和木质素在植物体中的合成和积累,因而在植物抗病反应中起着重要作用.病原菌毒素能诱导 PAL 活性升高,刘琼光^[13]用水稻基腐病菌毒素处理水稻,台莲梅等^[14]用尖孢镰刀菌毒素处理大豆幼根,都证明了毒素对寄主体内 PAL 活性的诱导作用.本研究中,经 Vulculic acid 处理的空心莲子草根细胞内 PAL 活性始终高于对照,再次证明了病原菌毒素对 PAL 活性的诱导作用,同时也表明寄主细胞对毒素的作用产生了主动防卫反应.

3.2 防御酶活性变化可能是 Vulculic acid 对空心莲子草根组织的重要致病机理

植物的防御酶体系是一个多因素相互作用的复杂体系,病原菌及其毒素战胜寄主防御酶系统的保护作用是导致寄主发病的重要机理.本研究涉及到寄主根细胞内 APX、CAT、POD、PPO、SOD 和 PAL 等 6 种防御酶的活性变化,虽然这些酶在与毒素对抗过程中表现出的反应不同,但其活性变化可能都与空心莲子草根细胞受损,植株萎蔫有关.Vulculic acid 处理后空心莲子草根组织内 APX、CAT、PPO、POD 活性降低,导致活性氧过量积累,根部细胞受

到破坏;而 PAL 活性升高,造成酚类物质大量积累,也会导致根细胞受到伤害.在前期的致萎试验中,毒素处理后空心莲子草根细胞变褐(毒素处理液也变褐),植株萎蔫,可能就是活性氧和酚类物质过量积累,根部细胞受到破坏的结果.

参考文献:

- [1] 万佐玺,强胜,徐尚成,等.链格孢菌的产毒培养条件及其毒素的致病范围[J].中国生物防治,2001,17(1):10-15.
- [2] TAN W Z, LI Q J, QING L. Biological control of alligator-weed (*Alternanthera philoxeroides*) with a *Fusarium* sp. [J]. BioControl (Dordrecht), 2002, 47(4): 463-479.
- [3] 涂永勤,胥秀英,付善权,等.空心莲子草叶斑病菌及代谢产物活性研究[J].生物学杂志,2004,21(3):27-28.
- [4] 周遗品,向梅梅,姜子德,等.莲子草假隔链格孢毒素的分离纯化与结构鉴定[J].高等学校化学学报,2006,27(8):1485-1487.
- [5] 曾永三,向梅梅,谢燕平.莲子草假隔链格孢毒素的致病机理研究[J].仲恺农业技术学院学报,2005,18(4):1-5.
- [6] 房保海,张广民,迟长凤,等.烟草低头黑病菌毒素对烟草细胞膜透性的影响[J].烟草科技,2005(1):44-46.
- [7] 万佐玺,朱晶晶,强胜.链格孢菌毒素对紫茎泽兰的致病机理[J].植物资源与环境学报,2002,10(3):47-50.
- [8] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72: 248-254.
- [9] 李合生,孙群,赵世杰,等.植物生理生化实验原理和技术[M].北京:高等教育出版社,1999,165.
- [10] 张笑宇,刘正坪,胡俊,等.向日葵菌核病菌毒素对向日葵体内几种酶活性的影响[J].北京农学院学报,2005,20(1):49-52.
- [11] 邹琦.植物生理生化实验指导[M].北京:中国农业出版社,1995:97-99.
- [12] 阚光锋,张广民,房保海,等.烟草野火病菌 (*Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*) 对烟草细胞内 5 种防御酶系统的影响[J].山东农业大学学报,2002,33(1):28-31.
- [13] 刘琼光.水稻基腐病菌侵染激发水稻活性氧代谢及其致病毒素研究[D].广州:华南农业大学资源环境学院,2007.
- [14] 台莲梅,许艳丽,闫凤云.尖孢镰刀菌毒素对大豆防御酶系活性的影响[J].中国油料作物学报,2008,30(2):249-251.

【责任编辑 周志红】