

植物病原真菌毒素的研究进展^{*}

石凤梅

(黑龙江八一农垦大学植物科技学院, 大庆 163319)

摘要: 植物病原真菌毒素能使寄主产生特定病症反应, 在植物病害的发生、发展过程中具有明显的致病作用, 因此越来越受到植物病理学家的重视。文章综述了近年来有关植物病原真菌毒素的研究进展, 对其分离、纯化、化学结构、致病机理和应用方面的研究做了简要概括。

关键词: 植物病原真菌毒素; 寄主选择活性; 致病机理

中图分类号: S 432.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-2767(2006)02-0070-04

Research Advances on the Toxin of the Plant Pathogenic Fungus

SHI Feng mei

(Heilongjiang August First Land Reclamation University, Daqing 163319)

Abstract: The toxin of the plant pathogenic fungus, which makes the host to produce the specific sign reaction, has obviously the pathogenic action in the course of the outbreak and the development of the plant disease, so plant pathologists have paid more and more attention to it. The recent research progress on the toxin of the plant pathogenic fungus was reviewed. The toxin isolation, purification, chemical structure, pathogenic mechanism and application research were generalized concisely.

Key words: toxin of the plant pathogenic fungus; host-selective activity; pathogenic mechanism

真菌毒素是由植物病原真菌产生的一类对寄主植物有毒的代谢产物, 即真菌与寄主植物互作中的重要致病因子。长期以来, 植病学家和化学家对那些重要的致病毒素进行了分离、纯化和化学结构鉴定, 并对其致病机理进行了研究。

1 植物病原真菌毒素的分离与纯化

研究中发现, 培养真菌得到的真菌粗毒素常常是一个复杂的混合物, 为明确混合物中单个组分的作用及其化学结构, 必须将真菌毒素进行有效的分离、纯化。常用的方法有分馏法、重结晶法和色谱分析法等。

1.1 分馏法

它是借分馏柱来实现多次重复蒸馏从而达到毒素组分分离的过程, 从柱顶部出来的几乎是纯净的易挥发组分, 而最后在蒸馏瓶里残留的液体几乎是

纯净的高沸点组分。分馏法可用于分离沸点比较接近的毒素化合物, 但对于组分太复杂的毒素, 一般较难达到目的。

1.2 重结晶法

重结晶法是利用溶剂对毒素样品组分的溶解度不同, 使毒素某一组分从过饱和溶液中以结晶析出, 而其它组分则留在母液里, 从而达到分离纯化的目的。如李树正等曾用多次苯重结晶法从茄链格孢培养滤液中获得了其毒素的主要成分交链孢酸的纯品^[1]。

1.3 色谱分析法

色谱分析法是分离纯化真菌毒素最常用的方法, 有时也利用此方法鉴定毒素中未知组分的结构。常用的色谱分析有以下 3 种。

* 收稿日期: 2005-04-03

作者简介: 石凤梅(1978-), 女, 辽宁省凤城县人, 硕士, 从事植物病理学研究。

1.3.1 薄层色谱法(TLC) TLC是一种微量分离方法,按其分离原理可分为吸附薄层色谱、分配薄层色谱、离子交换色谱等。在真菌毒素研究中主要应用的是吸附薄层色谱法,即用硅胶、氧化铝等吸附剂铺成薄层,利用吸附剂表面对不同组分吸附能力的差别而实现分离的方法。该方法具有分离效果好、样品用量少、灵敏度高、分析速度快的优点。如 Kono(1988)利用薄层色谱分析了维多利亚毒素,分离出两个毒素组分 Toxin H 和 Toxin M,比移值(Rf)为 0.28 与 0.07。另外,在毒素分析中也常把 TLC 法作为其他色谱分析法中的样品前处理步骤^[2]。

1.3.2 气相色谱法(GC) GC是以气体为流动相,试样由载气带入装有固定相的柱子后被吸附剂所吸附,但随着载气不断地流动,吸附着的组分又洗脱下来,并随载气前移时,又被前面的吸附剂吸附。这样,随着不断的吸附、脱附,较难被吸附的组分移动快,因此可以把各组分分开。GC法具有分析成本低、速度快、分离度和灵敏度高的优点,但要求分离的样品是可挥发且是热稳定的,应用有一定的局限性^[3]。董金皋(1997)用气相色谱分析了玉米大斑病菌毒素(HT-toxin)样品,证明了所获得的 HT 毒素组分 I 为纯品。

1.3.3 高效液相色谱法(HPLC) HPLC是分离真菌毒素常用的方法。它是以层析理论为基础,采用大幅度降低支持物的颗粒度,同时增加压力,以维持必要流速的方法设计出来的。该法具有柱效高、分析时间短、色谱柱可连续使用的优点。按照流动相及固定相的状态或作用机制的不同可将其分为液固色谱、液液色谱(又分为正相色谱和反相色谱)、离子交换色谱、离子对色谱、体积排挤色谱、亲和色谱和电色谱等。在真菌毒素研究中应用较多的是反相液相色谱,其固定相是非极性的,而流动相则是极性的。崔洋(1999)用反相液相色谱纯化制备了玉米小斑病菌 C 小种毒素,分离物经 NMR 的结构分析证实,纯度达到结构分析要求^[4]。

2 真菌毒素生物活性测定方法

目前,真菌毒素活性测定的方法很多,包括生物、生理生化、物理等方法。其中生物测定方法在真菌毒素研究中占有极重要的地位,通过生物测定可以评价毒素的性质、作用机理及验证分离纯化毒素方法的正确性。根据所用材料与研究目的,可分为完整植株、植株部分器官、植物细胞或细胞器等测定方法。

2.1 完整植株

此法一般用于产生萎蔫症状的病害,毒素处理能诱发部分或全部病害症状。可采用喷雾、涂抹、注射或浸根等措施对待测植株施用毒素处理。陈绍江等^[5](1998)对大豆灰斑病菌毒素生物活性分析时,采取针刺法接种大豆植株,产生类似病原菌侵染的病斑;吕金殿等^[6](1991)报道了棉花黄萎病菌毒素对棉幼苗具有强烈的致萎作用。

2.2 植株部分器官

在植物病原菌毒素的生物测定中,为了使实验具有可比性、可重复性、可操作性和节约供试材料,尤其是在应用少数珍贵的原始材料时,常采用植株的枝条、叶片、根、种子等器官作为待测对象。对种子萌发的抑制已用于茄腐镰刀菌毒素、稻曲病菌毒素、水稻纹枯病菌毒素等的测定;欧阳丰等^[7](1993)用辣椒炭疽病菌毒素处理辣椒、绿豆、豌豆、豇豆种子,发现其对胚根的生长有明显的抑制作用;郑晓莲等^[8](1998)用白菜、番茄离体叶片测定了灰葡萄孢毒素的毒性强弱;朱宝成等用草莓愈伤组织测定了草莓灰霉病菌毒素的毒力大小。

2.3 植物细胞或细胞器

近年来,研究人员利用根冠细胞或花粉萌发测定法来反映毒素的致病或致毒能力。其优点是试验准确性高、节省供试材料、方法简便、实用性强。董金皋等^[9](1997)用离体根冠细胞致死生测法对 HT 毒素不同组分进行毒性和致病活性比较,得出其中的呋喃甲酸组分毒性最大。也有人用毒素对花粉的萌发或花粉管长度的影响来反映毒素的毒力。

用植物细胞器进行生物测定的方法对于毒素作用位点等机理研究具有重要意义,主要包括线粒体测定法、叶绿体测定法、原生质体测定法等。许多病原真菌毒素的作用位点是线粒体,因此植物细胞线粒体结构及呼吸作用的变化在某种程度上可以反映毒素致病活性的强弱。有人用玉米小斑病菌 T 小种毒素处理 26 个不同细胞质玉米的离体线粒体,发现 T、HA 和 Q 细胞质玉米的线粒体对 T 小种毒素是敏感的。叶绿体也是致病毒素的作用位点之一,可用毒素处理后其结构及光合作用的变化来确定毒素的致病力。还可利用原生质体对毒素进行测定,章元寿等^[10](1991)研究发现棉花黄萎病菌毒素对棉苗叶片的游离原生质体具有 30%~50%的损伤率,为该菌的致病机理的探讨提供了理论依据。

3 植物病原真菌毒素的化学结构及寄主选择活性

从已有报道来看,真菌毒素大多数为低分子量的次生代谢产物,主要包括环状肽类、类萜烯化合物、低聚糖、聚乙醇酰、生物碱类、脂类及酯类毒素,多糖及糖苷类毒素,以及芳环、杂环化合物及其衍生物类毒素等^[11]。根据对其寄主植物的选择活性可将这些真菌毒素分为寄主选择性毒素(HST)和非寄主选择性毒素(NHST)。

3.1 寄主选择性毒素(HST)

HST 是病原菌产生的一类对其寄主植物种类或栽培品种具有特异性生理活性和高度专化性作用位点的代谢产物。迄今为止已报道有 9 个属的 21 种病原真菌可以产生 HST,其中以蠕孢菌和链格孢菌产生的毒素种类居多^[12]。蠕孢菌产生的几种主要毒素:燕麦维多利亚毒素(HV-toxin)引起感病的燕麦品种“维多利亚”叶斑病,其化学结构是由一个肽基和一个含氮杂环组成,肽部由天冬氨酸、谷氨酸、甘氨酸、缬氨酸、亮氨酸组成,是毒素的专化性部分,而含氮杂环是一种萜类化合物,无专化性;甘蔗眼斑病菌毒素(HS-toxin)的化学结构为倍半萜葡萄糖苷,该毒素含 A、B、C 三种异构体,其中 C 异构体毒性最强,可引起感病甘蔗品种的组织坏死;玉米圆斑病菌毒素(HC-toxin)的化学结构为含丙氨酸和脯氨酸(比例为 1:1)的环状肽类物质,其中丙氨酸、脯氨酸和环氧癸酸的排列顺序对活性影响很大,该毒素可引起感病玉米品种圆斑病;研究证实,玉米小斑病菌 T 小种毒素(HMT-toxin)由 C₃₅~C₄₅ 骨架组成的线形聚乙酮醇,主要成分分子式为 C₄₁H₆₈O₁₃,对 T 细胞质玉米有特异致病性^[13~14]。链格孢菌产生的几种主要毒素:苹果链格孢菌毒素(AM-toxin)3 种组分的分子式分别为 C₂₃H₃₁N₃O₆、C₂₂H₂₉N₃O₅、C₂₂H₂₉N₃O₆,C₂₃H₃₁N₃O₆ 是含有内脂链和对甲氧苯基的多肽,而 C₂₂H₂₉N₃O₅ 和 C₂₂H₂₉N₃O₆ 则分别以苯基和对羟苯基取代了 C₂₃H₃₁N₃O₆ 的去甲氧基和去甲氧基类似物,该毒素可专化性地作用于苹果感病品种,使组织质膜透性改变而引起病害;菊池链格孢毒素(AK-toxin)是一种脂类物质,结构为环氧十三烯酸脂,能引起感病日本沙梨的组织细胞死亡和叶脉坏死;草莓黑斑病菌毒素(AF-toxin)也是一种脂类物质,结构与 AK 毒素很相似,分离到的 3 种组分结构上相似,但其生物活性不同,I 组分可引起草莓和日本梨叶脉坏死,II 组分只能使梨叶脉坏死,III 组分对草莓有很高毒性,但对梨只有轻微毒性^[17~19]。

3.2 非寄主选择性毒素(NHST)

NHST 是由病原菌产生的一类对其寄主植物或非寄主植物种类或栽培品种具有一定生理活性和非专化性作用位点的代谢产物。目前世界上已知有 50 多种病原真菌能产生非寄主选择性毒素,但对其化学结构研究较多的主要是由镰刀菌属、链格孢属、曲霉属、长蠕孢、轮枝孢菌等产生的毒素^[20]。镰刀菌可产生镰刀菌酸、番茄萎蔫素、马特素等毒素,它们均可引起多种作物萎蔫病,其中前两者是氨基酸衍生物,后者是萜醌衍生物;链格孢菌产生的细链格孢毒素是一种环四肽,它对多种作物有毒,影响叶绿素的正常积累,可引起棉花、苹果褪绿,幼苗死亡;黄曲霉萎蔫素为氨基酸衍生物,能引起多种作物幼苗枯萎病;长蠕孢菌毒素包括旋孢腔菌素、长蠕孢羟醛及长蠕孢二醛等,前者是二倍萜类毒素,能使寄主和非寄主植物叶片退绿,根生长受抑,后两者是倍萜类毒素,在高浓度时抑制根的生长,低浓度时可刺激根的生长,还可打破植物芽的休眠;轮枝孢毒素为蛋白质-脂类-多糖复合体,可导致植株体内脱落酸含量增加,改变细胞原生质膜透性以及破坏细胞原生质体,从而引起萎蔫症状。

4 病原真菌毒素的致病机理

4.1 毒素的作用位点

关于毒素的作用位点的研究早在 20 世纪 70 年代就开始了,已报道的主要作用位点有:质膜、线粒体、叶绿体。近年来研究发现,燕麦维多利亚毒素(HV-toxin)、甘蔗眼斑病菌毒素(HS-toxin)、菊池链格孢毒素(AK-toxin)、柑橘链格孢毒素(ACR-toxin)、草莓链格孢菌毒素(AF-toxin)和苹果链格孢菌毒素(AM-toxin)的作用位点是膜蛋白。柑橘链格孢粗皮柠檬毒素(ACR-toxin)、烟草赤星病菌毒素(AT-toxin)、番茄茎枯病菌毒素(AL-toxin)和玉米黄叶枯病菌毒素(PM-toxin)的作用位点都是线粒体。另外滕毒素可与叶绿体的 CF-1 结合,ACT 毒素和 AM 毒素除主要作用于寄主细胞膜外,还能作用于叶绿体。

4.2 毒素的作用方式

毒素能够破坏寄主叶片的细胞膜、线粒体、叶绿体等超微结构及影响寄主植物的一些生理代谢。

4.2.1 对寄主组织超微结构的影响 毒素对超微结构的影响主要表现为以下几方面:(1)对细胞壁和质膜的影响,主要包括附着物或胞外沉积物的形成或细胞壁崩解、质壁分离和细胞膜内陷、局部断裂等。(2)对线粒体的影响,如:玉米腐霉茎腐病菌毒

素处理感病植株的细胞后,线粒体形状不规则,双层膜崩解,基质外流,嵴消失或全部颗粒化及局部空泡化^[21]。(3)对叶绿体的影响,雪腐格氏霉粗毒素处理小麦叶片后,其细胞的叶绿体膜上出现电子密度高的沉积物、基粒片层肿胀、排列紊乱、出现空泡、最后解体。(4)对液泡、内质网、核糖体和细胞核的影响,高必达等(1993)用麦根腐长蠕孢毒素处理小麦叶片发现,除细胞壁、线粒体和叶绿体受到破坏之外,液泡膜、内质网和核膜也受到不同程度的影响。

4.2.2 对寄主生理代谢的影响 毒素对寄主生理代谢的影响主要体现在以下几个方面:(1)植物病原菌毒素能够引起寄主植物水分代谢发生变化,导致萎蔫。(2)细胞膜透性改变,通常表现为质膜电势能的超极化和去极化。(3)一些毒素能明显抑制寄主酶的活性。(4)非选择性毒素长蠕孢二醛以及 HV 毒素等对植物氧化磷酸化和呼吸作用有明显的影 响。(5)影响核酸代谢作用,某些毒素能够抑制 DNA 指导下的 RNA 合成,干扰基因的表达。(6)抑制蛋白质合成。(7)抑制光合作用。(8)对酚代谢的影响,许多毒素引起植物发生坏死或褐变,实际上并不是毒素的直接作用,而是一种次级效应,是一种酚代谢增加的结果。(9)毒素对植物生长调节过程有明显的干扰、破坏细胞和组织完成其功能所需的精细平衡。

5 植物病原菌毒素的应用

近年来,人们在理论上深入研究毒素致病机理的同时,也在积极探索其利用途径。如:(1)在抗病选育中的应用:利用毒素代替病原菌对待测材料进行试验,可以简单快速筛选出具有初步抗病作用的材料。(2)在品种抗性鉴定中的应用:由于有些植物病原菌毒素在植物上可以引起与病原菌相似的症状和病理变化,可用其替代病原菌进行品种的抗性鉴定。(3)在植物病害化学防治上的应用:植物病原菌毒素的研究为开发新型杀菌剂提供了理论上的依据。杀菌剂的作用方式可以是抑制病菌产生毒素或是钝化毒素,也可以是使寄主细胞的受体失活。(4)在真菌分类上的应用:利用毒素对寄主作用的专化性不同,辅助进行真菌分类。(5)毒素物质的利用及开发:某些病原菌可产生胞外多糖、杂环类化合物、有机酸、蛋白脂多糖等人工难以合成的具天然活性的复杂化合物类毒素,在商业上具有一定的开发应用前景。非寄主专化性毒素不仅对寄主有毒害作用,对其它一些植物甚至害虫也有一定的毒性,可进一步研究开发为生物杀虫、除草剂。

参考文献:

- [1] 李树正,岳东霞,刘准,等.交链孢酸的提纯与结构鉴定[A].董金皋,李树正.植物病原真菌毒素研究进展(第一卷)[C].北京:中国科学技术出版社,1997.218-221.
- [2] 张利辉,董金皋.植物病原真菌毒素的分离、纯化技术[J].现代科学仪器,2002,2:56-59.
- [3] 刘虎威.气相色谱方法及应用[M].北京:化学工业出版社,2000.
- [4] 崔洋,陈永丽,魏建昆.反相高效液相色谱法制备 HMC 毒素纯品[J].微生物学通报,1999,26(1):47-49.
- [5] 陈绍江,王金陵.大豆灰斑病菌毒素生物活性分析[J].植物病理学报,1998,28(3):233-236.
- [6] 吕金殿,甘莉.棉花黄萎病菌毒素的纯化与特性研究[J].植物病理学报,1991,21(2):129-133.
- [7] 欧阳丰,谢丙炎.辣椒炭疽病菌毒素[J].真菌学报,1993,12(4):289-296.
- [8] 郑晓莲,董金皋.灰葡萄孢毒素组分分析和生物测定[J].植物病理学报,1998,28(3):269-271.
- [9] 董金皋,李正平.玉米大斑病菌毒素结构的确定及几种类似物的毒性比较[J].植物病理学报,1997,27(3):257-261.
- [10] 章元寿,王建新.棉花黄萎病菌毒素对棉花作用机制的初步探讨[J].植物病理学报,1991,21(1):49-52.
- [11] 董金皋.寄主选择性真菌毒素与植物病害特异性[A].董金皋,李树正.植物病原真菌毒素研究(第一卷)[C].北京:中国科学技术出版社,1997.8-15.
- [12] 董金皋,李正平.寄主选择性植物病原真菌的毒素化学[J].微生物学通讯,1997,24(4):247-250.
- [13] 章元寿.植物病原真菌毒素的研究现状[J].真菌学报,1991,(3):169-181.
- [14] Vidhyasekaran P, Borromeo E S, Mew T W. Host-Specific Toxin Production by *Helminthosporium oryzae* [J]. Phytopathology, 1989, 76(3): 261-266.
- [15] Tegtmeier K J, Daly J M, Yoder O C. T-Toxin Production By Near-Isogenic Isolates of *Cochliobolus heterostrophus* Race T1 [J]. Phytopathology, 1982, 72(11): 1492-1495.
- [16] 段双科.应用玉米小斑病 T 小种毒素粗提液快速测定 T 形细胞质玉米技术方法的研究[J].植物病理学报,1981,11(4):58-59.
- [17] Deacon J W. Introduction to Modern Mycology[M]. Second edition. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1984.
- [18] Yoder O C. Toxins In Pathogenesis [J]. Ann. Rev. Phytopathol, 1980, (18): 103-129.
- [19] Pyoun Park, Kazutoshi UNNO. Temporary Acceleration of Exocytosis of Polysaccharides in Susceptible Strawberry Leaves by AF-toxin I from *Alternaria alternata* Strawberry Pathotype [J]. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn., 1999, (65): 515-520.
- [20] 王江柱,董金皋,王玉真.非寄主专化性植物病原真菌毒素致病机制研究现状[J].河北农业大学学报,1995,18(4):99-104.
- [21] 陈捷,高洪敏.玉米茎腐病菌毒素对寄主幼苗胚根超微结构的影响[J].植物病理学报,1997,27(2):242-245.