

玉米大斑病菌特异性毒素组分分离条件的优化研究*

王绍新 董金皋**

(河北农业大学真菌毒素实验室 保定 071001)

摘要: 把从玉米大斑病菌的1号小种菌株(99-2)中提取的粗毒素进行硅胶TL层析, 分离到I (R_f 0.06)、II (R_f 0.21)、III (R_f 0.45)、IV (R_f 0.60)、V (R_f 0.75) 5种组分, 分别对此5组分进行生物测定, 发现组分II对带Ht1基因的玉米具有较强的特异性。经对组分II进行HPLC的进一步纯化, 又可得到3种组分II-1、II-2、II-3, 其中只有II-3具有特异致病活性。对II-1、II-2、II-3进行紫外-可见全波长扫描, 发现只有II-3在300nm处有吸收峰, II-1和II-2的峰形相似, 可能为类似物。

关键词: 玉米大斑病, 真菌毒素, 玉米

中图分类号: S435.131 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 02-0006-04

Study on Optimum Conditions of Isolation and Purification of Specific Toxin Fractions Produced by *Exserohilum turcicum**

WANG Shao-Xin DONG Jin-Gao**

(Mycotoxin Laboratory, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001)

Abstract: Five fractions, I (R_f 0.06)、II (R_f 0.21)、III (R_f 0.45)、IV (R_f 0.60)、V (R_f 0.75) have been obtained after HT-toxin from race 1 of *Exserohilum turcicum* 99-2 isolated by TLC. In all of these fractions, only fractions II had specific toxicity to the corn leaves with Ht1 gene. Then fractions II-1、II-2、II-3 were isolated from fractions II by HPLC purification, and the bioassay result showed only fraction II-3 was toxic to corn leaves with Ht1 gene but non-toxic to corn leaves without Ht1 gene. Fractions II-1、II-2 and II-3 were scanned by UV-Vis spectrophotometer. It was shown that the fractions II-1 and II-2 had analogous spectrum, and especially the fraction II-3 had a special peak at 300nm.

Key words: Corn northern leaf blight, Mycotoxin, Corn

玉米在世界各地广泛种植, 其也是我国的主要粮食作物之一。近年来玉米大斑病菌(*Exserohilum turcicum*)中的1号小种广泛流行, 对Ht1抗病基因玉米品种的推广带来严峻挑战^[1,2]。

研究表明, 许多真菌主要是通过毒素来伤害寄主植物的, 这些毒素大多数属于低分子量的次生代谢产物, 主要包括: 环状肽类(HC-毒素, 引起玉米圆斑病; AB-毒素, 引起白菜黑斑病; AM-毒素, 引起苹果斑点落叶病)、脂类化合物(AK-毒素, 引起日本梨黑斑病; AF-毒素, 引起草莓黑斑病)、低聚糖(HS-毒素, 引起甘蔗眼斑病)和聚乙醇酐(HMT-毒素, 引起玉米小斑病; PM-毒素, 引起玉米黄叶枯病)等。基于不同毒素的结构特点, 人们采取的分离手段方法和试验条件也不尽相同。

* 国家教育部骨干教师计划资助项目

河北省自然科学基金项目(No. 302318)

河北农业大学9816科技重点项目

** 通讯作者 Tel: 0312-7528266, E-mail: dongjg@21cn.com

收稿日期: 2005-05-08, 修回日期: 2005-07-05

经研究,玉米大斑病菌也是通过产生致病毒素来破坏玉米组织的^[3-5],1号小种产生的毒素组分—HT-IV是诱导 *Ht1* 基因玉米发病的特异性致病因子,该毒素对细胞内的某些防御酶系以及与活性氧有关的酶类影响很大,但由于毒素为病原菌的次生代谢产物,含量很低,把 μg 甚至 pg 级毒素提取纯化相当困难,对 HT-毒素特异性组分的大量分离纯化难度更大,从而阻碍了化学结构和致病机理研究的顺利开展^[6,7]。本试验采用 TL 层析和 HPLC 相结合的方法,从粗毒素中纯化到了大量毒素特异性组分,打破了对其进行研究的瓶颈,为对其进行结构鉴定、从分子水平上探讨病原菌与寄主互作的机制以及研究毒素的钝化机制和作用机理奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试玉米:自交系 OH43, OH43 *Ht1*; 供试菌种:玉米大斑病菌 1 号小种菌株 (99-2)。

1.2 玉米苗的种植

玉米种子用 70% 酒精消毒后再用自来水冲洗干净,置 25℃ 的恒温培养箱中催芽 30h,选取发芽一致的种子均匀铺在带有自来水浸湿滤纸的培养皿上,再放入 25℃ 的恒温培养箱中催芽 4h,待苗长至 5~6 叶期时剪取叶片用于生物测定。

1.3 菌种复壮

将玉米大斑病菌菌种(试管)于无菌条件下接种在 PDA 平皿内,10d 后接于自交系 OH43 玉米叶片上,发病后将大斑病菌接回 PDA 平皿内,置 25℃ 恒温培养箱内培养,待菌落长满平皿时将其放置在 0℃~4℃ 冰箱内保存备用。

1.4 培养滤液的制备

在 250mL 三角瓶中装入 100mL 改良 Fries 培养基,每瓶接入 4~5 片菌盘($\phi=6\text{mm}$),置 25℃ 黑暗条件下静置培养 21d,无菌条件下用两层纱布过滤,然后用定性滤纸(中速)过滤,所得液体即为培养滤液。

1.5 HT-粗毒素的提取

在 250mL 锥形瓶中定量盛装 100mL 改良 Fries 培养基,接入 5 片玉米大斑病菌 1 号小种菌盘,置 25℃ 培养箱内培养 21d,然后在无菌条件下用 Whatman 1 号滤纸过滤,得培养滤液。将其加等体积丙酮 2 次沉淀,取上清液用等体积乙酸乙酯萃取 3 次,将上清液在 40℃ 下减压蒸发去除有机溶剂,即得棕褐色粗毒素。甲醇溶解后存于 4℃ 冰箱内保存备用。

1.6 粗毒素的 TLC 分析

3% 羟甲基纤维素钠用前稀释 3 倍,与 10g 硅胶进行研磨,均匀铺于 10×20 薄板上,自然晾干,点样前 110℃ 活化 20min。展开剂为石油醚 12mL、乙酸乙酯 38mL、甲醇 10mL。把展开的条带用刮刀刮下,用甲醇洗涤硅胶数次,抽滤,浓缩,进行生物测定。

1.7 HT-毒素的生物测定

参照张利辉等的方法^[8]——离体叶片针刺法。

1.8 组分 II 的 HPLC 分析

60% 甲醇等梯度洗脱,进样量 25 μL ,流速 1.0 mL/min,检测波长 220nm,色谱柱为 Nova-pak C₁₈ 柱 (7.8×300mm)。分别收集 3 个主要组分,用于生物测定。

1.9 组分 II-1、II-2、II-3 的紫外-可见光谱分析

把收集的 3 个组分分别进行紫外-可见光谱扫描,扫描范围为 200nm~600nm。

2 结果与分析

2.1 HT-粗毒素的硅胶 TL 层析及生物测定

HT-粗毒素经硅胶 TL 层析后可分为 5 条带, 分别对其进行生物测定 (结果见表 1), 发现组分 I 对两个品种的叶片伤害都比较大, 可能为一混合组分, 组分 III、IV、V 对两个品种的叶片伤害都比较小, 只有组分 II 在 OH43Ht1 叶片上产生的病斑明显大于在 OH43 叶片上的病斑, 即表现出了强特异致病性。

表 1 HT-粗毒 TL 层析所得各组分生物测定结果

| 玉米自交系 | 玉米叶片病斑面积 (mm ²) | | | | | |
|---------|-----------------------------|------|------|------|------|------|
| | CK | I | II | III | IV | V |
| OH43 | 0 | 5.02 | 1.52 | 1.33 | 0.86 | 2.03 |
| OH43Ht1 | 0 | 5.15 | 7.76 | 1.05 | 1.03 | 1.05 |

注: 本试验以甲醇为对照

2.2 组分 II 的 HPLC 分析及生物测定

对组分 II 进行 HPLC 分析, 得到 3 个主要组分, 即 II-1 (t_R 6.0min)、II-2 (t_R 13.3min)、II-3 (t_R 18.2min) (图 1), 分别对其进行收集后, 立即用液氮仪进行吹干, 然后用甲醇溶解, 进行生物测定。其中组分 II-1 和 II-2 对叶片伤害都不大, 而组分 II-3 在 OH43Ht1 叶片产生的病斑明显大于在 OH43 叶片上的病斑, 生物统计分析表明差异极显著 (表 2), 即 II-3 对 OH43Ht1 表现强特异性。组分 II-3 分别在 OH43 和 OH43Ht1 玉米叶片上的病斑如图 2。

组分 II-3 在 60% 甲醇等梯度洗脱条件下保留时间为 18.2min, 比张利辉等^[8]用 HPLC, 10% ~ 30% 梯度洗脱, 直接从粗毒素中分离活性组分 (7 号峰) 的保留时间缩短约 10min, 有利于大量活性组分的分离纯化。

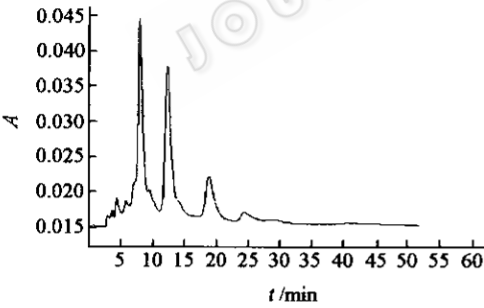


图 1 组分 II 的 HPLC 分析

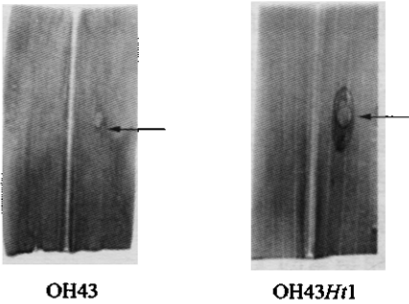


图 2 组分 II-3 分别在 OH43 和 OH43Ht1 玉米叶片上的病斑

表 2 组分 II 经 HPLC 所得各组分生物测定结果

| 玉米自交系 | 玉米叶片病斑面积 (mm ²) | | | |
|---------|-----------------------------|------|------|-------|
| | CK | II-1 | II-2 | II-3 |
| OH43 | 0 | 0.32 | 0.21 | 1.01c |
| OH43Ht1 | 0 | 0.43 | 0.25 | 5.54a |

注: a、c 表示组分 II-3 对两个基因型效果差异显著性 ($P=0.05$)

2.3 组分 II-1、II-2、II-3 的紫外-可见光谱分析

对 II-1、II-2、II-3 3 个组分进行紫外-可见光谱扫描, 组分 II-1、II-2、II-3 在 200nm ~ 250nm 处都有吸收峰, 但在 300nm 处只有组分 II-3 有吸收峰, 如图 3 所示。

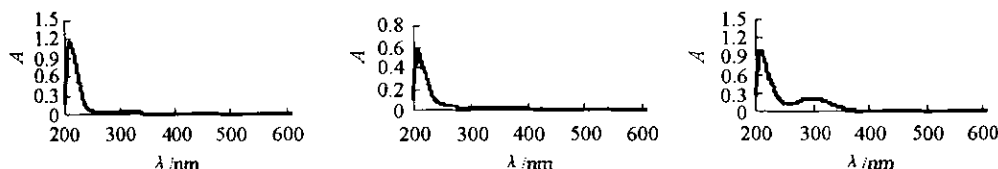


图 3 组分 II-1、II-2、II-3 的紫外-可见光谱图

3 讨论

上世纪初, 人们对许多真菌毒素进行了分离纯化、结构鉴定、致病机理等各方面的研究。如: 玉米小斑病菌 T 小种产生的 HMT-毒素以及玉米黄叶枯病菌 (*Phyllosticta maydis*) 产生的 PM-毒素为线状的多酮醇类化合物^[9,10]。HMT-毒素的原初作用位点是线粒体, 但质膜也直接受到影响。AM-毒素 (苹果斑点落叶病菌毒素) 的结构为环四肽类, 由丙氨酸、 α -羟基异戊酸、 α -氨基丙烯酸和 α -氨基- δ -(对甲氧基苯基) 戊氨酸组成, 它至少有 3 种组分, 在寄主上的作用位点可能位于质膜-细胞壁的连接处^[11], 等等, 其研究工作日益深入。

对于每一种新发现的植物病原真菌毒素, 人们的研究总是先从它的化学方面入手, 包括毒素的分离、纯化及结构鉴定, 继而对于它的作用机理、产生的遗传学等方面做进一步的深入探讨。董金皋等先后对 HT-毒素产生的条件、特性等进行了研究, 通过对大斑菌 5 个菌株毒素 (分属于 0 号、1 号小种) 的生物测定结果表明, 1 号小种毒素可选择性诱致 *Ht1* 基因玉米出现典型的病斑, 因而提出该毒素中含有寄主选择性组分。已经鉴定结构的组分 I 为 5-羟甲基-2-呋喃甲醛、组分 II 为 2, 5-二甲醛呋喃^[12,13]。可以说本室在真菌毒素的研究方面, 取得了丰硕的成果, 但随着研究的深入, 也越来越感受到毒素的分离纯化是基础、是关键, 究竟如何将培养获得的毒素进行纯化并进而结构鉴定, 也是许多化学家和植物病理学家研究的热点问题。

参考文献

- [1] 吴纪昌, 陈刚, 邹桂珍, 等. 植物病理学报, 1983, 13 (2): 15 ~ 20.
- [2] 姜晶春, 潘顺发, 尹志. 吉林农业科学, 1991, 1: 46 ~ 49.
- [3] 董金皋, 李正平, 李秉华, 等. 植物病理学报, 1996, 26 (2): 139 ~ 144.
- [4] Cuq F, Herrmann G S, Klaebe A, et al. Phytochemistry, 1993, 34 (5): 1265 ~ 1270.
- [5] Bashan B, Levy R S, Cojocaru M, et al. Physiological and Molecular Plant Pathology, 1995, 47: 225 ~ 235.
- [6] 董金皋, 史有艳, 康绍兰. 微生物学通报, 1993, 20 (2): 73 ~ 77.
- [7] 董金皋, 韩建民, 张利辉. 微生物学通报, 2001, 28 (5): 1 ~ 5.
- [8] 张利辉, 刘云惠, 董金皋, 等. 植物病理学报, 2003, 33 (1): 67 ~ 71.
- [9] Kwon C Y, Rasmussen J B, Franc L J, et al. Phytopathology, 1996, 86: 1360 ~ 1363.
- [10] 崔洋. 植物病理学报, 1992, 22 (4): 187 ~ 191.
- [11] Park P, Nishimura S, Kohmotp K, et al. Canadian Journal of Botany, 1981, 59 (3): 301 ~ 310.
- [12] 董金皋, 李正平, 薛峰, 等. 植物病理学报, 1997, 27 (3): 257 ~ 261.
- [13] 董金皋, 周宗山, 李正平. 植物病理学报, 2000, 30 (2): 186 ~ 187.