

## 水稻基腐细菌毒素的分离纯化、性质和生物学作用

刘琼光, 罗建军, 何雪霞, 王振中\*

(华南农业大学资源环境学院, 广州 510642)

**摘要:**【目的】水稻基腐细菌毒素迄今未见报道。毒素是病原微生物重要的致病因子之一, 毒素的分离纯化是研究病菌毒素功能和作用的前提和基础。【方法】通过几种层析柱的多次层析分离及对水稻幼苗的生物活性跟踪测定, 分离纯化水稻基腐细菌毒素; 采用化学及生物化学方法, 研究毒素的性质及生物学作用。【结果】获得了水稻基腐细菌毒素的一个成分 T<sub>3</sub>, 该成分为黄色固体, 溶于甲醇、正丁醇、水和甲酸; 不溶于三氯甲烷、乙酸乙酯; 微溶于丙酮, 是非糖类和非蛋白质类物质, 对紫外线敏感。毒素具有抑制水稻生根、使水稻秧苗萎蔫和对烟草细胞坏死的作用。高浓度毒素抑制水稻、玉米、番茄和烟草种子萌发, 低浓度毒素则具有促进根、芽生长的作用。毒素对来自 5 个属的 10 种植物病原细菌具有抑菌活性, 同时具有诱导水稻 PAL 和 POD 活性, 且对抗病品种 128 的 POD 和 PAL 诱导活性均高于感病品种特籼 13。【结论】首次建立了水稻基腐细菌毒素的分离纯化方法。该毒素具有抑制水稻幼根生长、导致秧苗萎蔫、引起烟草细胞坏死、抑制植物病原细菌和诱导水稻防卫酶活性等生物学作用。

**关键词:** 水稻基腐细菌; 毒素; 分离纯化; 生物作用

中图分类号: Q93 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 11-1499-08

毒素(Toxin)是病原微生物产生的与病程密切相关的一类重要致病因子。一些植物病原细菌能产生一种或多种与致病相关的毒素, 包括: 丁香假单胞菌 (*Pseudomonas syringae*)、甘蔗白纹病菌 (*Xanthomonas albilineans*)、水稻白叶枯病菌 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*)、甘蓝黑腐病菌 (*Xanthomonas campestris*)、梨火疫病菌 (*Erwinia amylovora*)、根癌土壤杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*)、密执安棒杆菌 (*Clavibacter michiganense*)、青枯病菌 (*Ralstonia solanacearum*)、大豆根瘤菌 (*Rhizobium japonicum*) 等, 已经定名的植物病原细菌毒素有 10 多种, 均为非寄主专化性毒素, 引起寄主产生萎蔫、褪绿、水渍状、畸形等症状, 其化学类别包括胞外多糖、有机酸、聚酮类化合物、多肽、糖肽等<sup>[1]</sup>。

对植物病原微生物毒素的研究, 能够更深入了解寄主与病原菌互作中的生理学、生物化学、遗传学和分子生物等各方面<sup>[2]</sup>, 同时毒素也具有广泛的应用前景<sup>[3]</sup>。人们在弄清毒素结构的基础上, 可以合成与毒素相拮抗的化学物质进行病害防治<sup>[4]</sup>; 用毒素作为选择压力可筛选抗病品种或对植物进行抗性鉴定; 用毒素对某些种子的萌发具有促进或抑制作用可将其进一步开发为作物的促生剂或化学抑制剂<sup>[5]</sup>; 非寄主专化性毒素, 可望进一步研究开发为生物除草剂和抗生素<sup>[6]</sup>。细菌毒素也可用于病害抗性工程的靶标。

由菊欧氏杆菌玉米致病变种 (*Erwinia chrysanthemi* pv. *zeae*) 引起的水稻基腐病, 是近 20 年来水稻上重要的细菌病害之一, 在东南亚许多国家都有发生, 成为水稻高产稳产的严重障碍, 目前对该细菌的

基金项目: 广东省攻关项目(E99032)

\*通讯作者. Tel: +86-20-85281469; E-mail: zzwang@scau.edu.cn

作者简介: 刘琼光(1964-), 男, 江西吉安人, 副教授, 博士, 研究方向为植物细菌学. E-mail: qgliu@scau.edu.cn

收稿日期: 2008-05-19; 修回日期: 2008-07-29

致病机理研究较少,迄今未见该病原细菌毒素的研究报道。刘琼光等<sup>[7]</sup>在研究水稻基腐细菌侵染规律时,发现该菌具有潜伏侵染和抑制水稻根生长的现象,提出病菌可能产生毒素。随后,笔者首次发现水稻基腐细菌能产生毒素,该毒素对抑制水稻种子发芽至关重要,并具有对水稻幼苗萎蔫和烟草细胞坏死的作用,毒素是水稻基腐细菌重要的致病因子之一(资料未发表)。

由于水稻基腐细菌产生的毒素至今未见报道,毒素的性质及结构仍然不清楚,本文首次对水稻基腐细菌产生的毒素进行了分离纯化,并对毒素中一个成分的有关性质及生物学作用进行了研究。目的为进一步研究毒素的致病机理及其应用提供研究材料和方法。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 主要试剂和仪器:** AB-8 树脂粉,购自安徽三星树脂有限公司;聚酰胺粉(200~300目)聚酰胺薄膜板,购自浙江台州市路桥四甲生化塑料厂;葡聚糖凝胶 Sephadex L H-20 购自 Pharmacia 公司。高速冷冻离心机(3K18, Sigma 公司);恒温摇床(THZ-82B,江苏金坛市医疗仪器厂);旋转蒸发器(EYELAN 1000,日本);三用紫外分析仪(ZFC,上海康禾光电仪器有限公司)。

**1.1.2 供试菌株:** 水稻基腐细菌(*Erwinia chrysanthemi* pv. *zea*)强致病力产毒素菌株 Ech7,从广东佛山种植的特粳 13 水稻品种上分离,细菌保存于华南农业大学植物细菌研究室。

**1.1.3 供试植物病原细菌为:** 番茄叶斑病菌(*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*),根癌土壤杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*),茄劳尔氏菌(*Ralstonia solanacearum*),荧光假单胞细菌(*Pseudomonas fluorescens*),甘蓝黑腐病菌(*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*),海棠叶斑病菌(*Xanthomonas campestris* pv. *begoniae*),一品红叶斑病菌(*Xanthomonas campestris* pv. *poinsetticola*),菜豆疫病菌(*Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*),马铃薯环腐病菌(*Clavibacter michiganense* subsp. *sepedonicus*)。所有菌株均由华南农业大学细菌室提供。

**1.1.4 无蛋白培养基:** 1 mol/L 的 NaOH 9 mL, 10% CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 6 mL, NaNO<sub>3</sub> 2 g, 蔗糖 10 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5 g, 蒸馏水 1000 mL, pH7.0。

### 1.2 毒素的分离纯化

**1.2.1 粗毒素制备:** Ech7 接种于无蛋白培养液, 30 振荡培养 24 h, 细菌菌液 4 下 10000×g 离心 15 min, 取上清液(即粗毒素)用于分离纯化。

**1.2.2 树脂吸附柱层析分离:** 6 L 的 Ech7 上清粗毒素不断加入 AB-8 树脂层析柱中,吸附后,依次用水、甲醇、乙酸乙酯和三氯甲烷洗脱并收集流分,每种洗脱溶剂收集约 250mL。旋转蒸发器抽去有机溶剂,室温风干,进行生物活性测定。具有毒素活性的部分,用于下一步的分离。本文毒素生物活性测定用浸根处理 2~3 片叶的水稻苗,12~24 h 观察幼苗萎蔫情况。

**1.2.3 聚酰胺柱层析:** 每次称取 1.2 g 树脂柱收集的活性组分和 25 g 聚酰胺粉进行层析分离。本文以甲醇:水(含 0.1%甲酸, V/V)系列浓度的混合溶剂进行洗脱和收集,流分经聚酰胺薄层层析(TLC),展开系统为甲醇:水(含 0.1%甲酸, V/V)=2:3,和三用紫外分析仪检验后,选取 Rf 值相同或相近的流分合并,生物活性跟踪测定,具毒素活性部分,用于下一步的分离。

**1.2.4 制备薄层层析(TLC):** 将聚酰胺柱获得的毒素活性部分,用甲醇溶解,划直线点在聚酰胺板上,直线宽度约 3 mm,自然风干,用甲醇:水:甲酸为 2:3:0.03 的展剂进行展样,在三用紫外分析仪下切取不同 Rf 值部分,用甲醇溶解,室温风干,取少量样品生物活性跟踪测定,剩余样品于-80 保存备用。具有毒素活性的部分,用于下一步的纯化。

**1.2.5 葡聚糖凝胶 Sephadex L H-20 柱层析:** 每次取 0.1 g 制备 TLC 中获得的毒素活性组分,进行葡聚糖凝胶 Sephadex L H-20 层析,以甲醇作为流动相洗脱并收集,每管 2 mL,共收集 50 管。逐管进行 TLC 板纯度检查,在三用紫外分析仪 360 nm 下检测只有一个黄色斑点的收集管,合并流分,抽去有机溶剂,取少量样品进行生物活性测定,其余-80 保存备用。

### 1.3 毒素的生物活性测定

**1.3.1 烟草细胞坏死:** 将 0.5 mL 浓度为 0.1 mg/mL 的纯化毒素,注射烟草叶片,12~24 h 观察烟草细胞坏死现象,清水做对照。

**1.3.2 水稻幼苗致萎:** 取 1 mL 纯化的毒素,浓度 0.1 mg/mL,浸 2~3 片叶的水稻苗,12~24 h 后观察秧苗萎蔫现象,清水做对照。

### 1.4 毒素组分的溶解性

各称取 10 mg Sephadex L H-20 柱层析收集的活

性成分固体,分别用三氯甲烷、乙酸乙酯、丙酮、甲醇、正丁醇、乙腈、水和甲酸等各 1~5 mL 进行溶解性测试,室温下观察溶解情况。

### 1.5 毒素成分的稳定性

**1.5.1 供试毒素成分:**为 Sephadex L H-20 柱层析收集的活性成分,浓度为 1mg/mL。

**1.5.2 紫外线敏感试验:**取 1 mL 供试毒素成分于 10 mL 小烧杯中,设紫外灯下照射 30 min 和 8 h,以及室温下空气中放置 24 h 和 -80 °C 避光共 4 个处理。处理后先进行 TLC 检测,随后进行生物活性测定。

**1.5.3 三氟乙酸处理和热稳定性:**1 mL 供试毒素成分于 10 mL 小烧杯中,加 50  $\mu$ L 浓三氟乙酸,100 °C 处理 30 min,室温风干,用 10 mL 蒸馏水溶解。检测方法和活性测定方法同 1.5.2。

**1.5.4 甲酸和盐酸处理后的稳定性:**取 1 mL 供试毒素成分于 10 mL 小烧杯中,分别加 50  $\mu$ L 浓甲酸和浓盐酸,室温放置 10 h。检测方法和活性测定方法同 1.5.2。

### 1.6 毒素成分物质类别初步鉴别

**1.6.1 糖检测试验:**取 1 mg/mL 的纯化毒素成分 1 mL,用浓硫酸-萘酚方法测定<sup>[8]</sup>。

**1.6.2 蛋白质和氨基酸检测试验:**各取 1 mg/mL 的纯化毒素成分 0.1 mL,用考马斯亮兰检测蛋白质;在滤纸上用茚三酮检测氨基酸。按常规方法进行。

### 1.7 毒素的生物学作用

**1.7.1 毒素对植物种子的萌发作用:**毒素用蒸馏水配成系列浓度:0.5 mg/mL、0.1mg/mL、0.05 mg/mL、0.01 mg/mL、0.005 mg/mL、0.001 mg/mL,浸泡水稻、玉米、番茄和烟草种子 24 h,弃去毒素液,种子用蒸馏水洗 2 次后,置于有湿滤纸的培养皿中,30 °C 培养箱中发芽,5 d 后测量种子萌发后的根、芽生长情况。每处理共 150 粒种子,3 次重复。

**1.7.2 毒素对植物病原细菌的抑菌作用:**采用平板抑菌测定方法,取培养 24 h 的供试细菌液 50  $\mu$ L (浓度  $5 \times 10^7$  CFU/mL) 均匀涂布于普通细菌培养基平板上。另取一灭菌滤纸小片蘸过滤灭菌后的毒素液(浓度 0.1 mg/mL),将滤纸片置于培养基平板中间,于 30 °C 培养 2 d,观察并测量记录抑菌圈直径。

**1.7.3 毒素诱导水稻防卫酶的作用:**用 0.02 mol/L Tris-HCl (pH 7.0) 缓冲液配成 0.001 mg/mL 的纯化毒素处理液,以毒素缓冲液 + 营养液为对照。在水稻第 4 片叶完全展开时,以压伤斑法处理水稻抗基腐病品种 128 和感基腐病品种特粳 13,每处理 6 片叶,

每片叶 8 个压伤斑,压伤斑直径为 2 mm,每个压伤斑上滴加 2  $\mu$ L 毒素,保湿,于处理后 12 h、24 h、48 h、3 d、5 d 取样。参照 Schaffrath 等<sup>[9]</sup>方法,测定 POD,参照肖栓锁<sup>[10]</sup>方法测定 PAL。

## 2 结果和分析

### 2.1 毒素的分离纯化

**2.1.1 树脂吸附柱层析分离:**6 L 水稻基腐细菌培养上清液经 AB-8 树脂柱吸附层析,收集流出液 6 L,以及水、甲醇、乙酸乙酯和三氯甲烷洗脱液各 250 mL,对水稻幼苗的毒素生物活性测定结果表明,毒素活性组分在甲醇洗脱液中。

**2.1.2 聚酰胺柱层析分离:**树脂柱层析中获得的毒素活性组分,经聚酰胺柱层析,得到 50 个流分( $F_1 \sim F_{50}$ ),TLC 检测合并相同或相似的流分 8 个,水稻幼苗致萎活性测定结果发现,流分  $F_3 \sim F_9$  能使水稻在 12 h 内萎蔫, $F_{10} \sim F_{13}$  能使水稻在 24 h 萎蔫,其它流分对水稻幼苗没有致萎作用,表明,毒素活性最强的组分在流分  $F_3 \sim F_9$  中,该活性组分呈黄色。本研究下一步纯化选用流分  $F_3 \sim F_9$ 。

**2.1.3 制备薄层层析(TLC):**将流分  $F_3 \sim F_9$ ,制备薄层层析,展剂系统为甲醇:水:甲酸为 2:3:0.03,三用紫外分析仪检测,获得了 6 个不同组分,命名为: $T_1$ 、 $T_2$ 、 $T_3$ 、 $T_4$ 、 $T_5$  和  $T_6$ ,Rf 值分别为 8.2,6.7,5.5,3.8,2.8 和 1.7。切取  $T_1 \sim T_6$  各部分,溶于甲醇中,除去甲醇后,进行生物活性测定,结果表明, $T_3$  组分活性最强,紫外灯下呈黄色荧光,Rf 值约为 5.5(图 1), $T_2$  (Rf 值 6.7) 也有微弱活性,但不如  $T_3$  活性强。本研究以  $T_3$  进一步纯化。

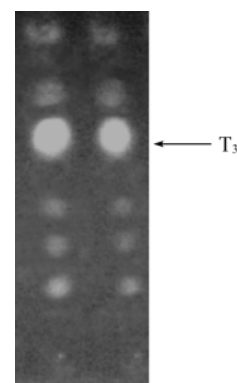


图 1 流分  $F_3 \sim F_9$  制备 TLC 在 360 nm 紫外检测

Fig. 1 Ultraviolet detection at 360 nm of  $F_3 \sim F_9$  elution fraction with making TLC.

**2.1.4 葡聚糖凝胶 Sephadex-LH-20 柱层析：** $T_3$  进行葡聚糖凝胶 Sephadex-LH-20 柱层析，收集到 50 个流分，经 TLC 和三用紫外分析仪检测，流分 1~20 和流分 33~50 均观察不到荧光，仅流分 21~32 有一个黄色斑点（图 2-A），表明，毒素  $T_3$  成分较纯。生物活性测定结果表明，仅流分 21~32 具有生物活性（图 2-B）。将具活性部分-80 避光保存备用。

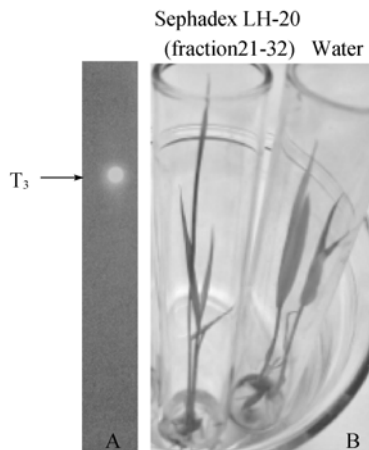


图 2  $T_3$  经 Sephadex L H-20 的流分(21~32)TLC 紫外检测 (A)和活性测定(B)

Fig. 2 Ultraviolet detection of  $T_3$  TLC fraction(fraction21~32) with Sephadex LH-20 (A) and toxic determination(B).

## 2.2 毒素生物活性测定

毒素成分  $T_3$  注射烟草叶片 12 h，在烟草注射了毒素的区域变褐，细胞坏死（图 3）。 $T_3$  浸水稻幼苗 12 h，水稻叶片卷曲，植株萎焉（图 4）。

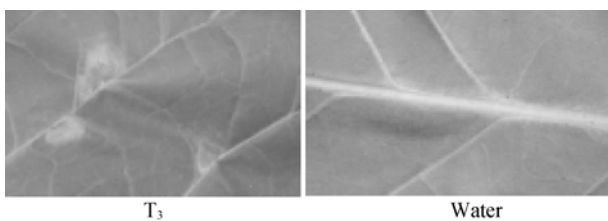


图 3  $T_3$  毒素成分对烟草生物活性测定

Fig. 3 Toxic determination of  $T_3$  toxin on tobacco leaf.

## 2.3 毒素的溶解性

本研究分离纯化的毒素单体物质  $T_3$  为黄色固体，通过对不同溶剂的溶解试验，结果表明， $T_3$  毒素成分可溶解于甲醇、正丁醇、乙腈、水和甲酸，不溶于三氯甲烷和乙酸乙酯，微溶于丙酮，说明该毒素成分是一类极性较大的物质。

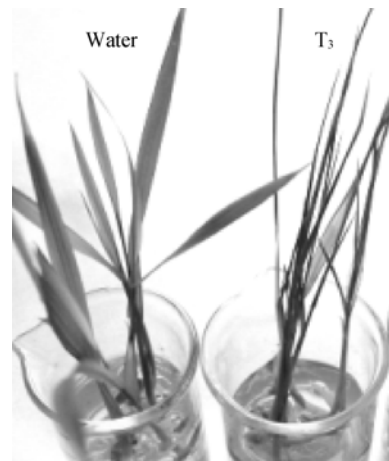


图 4  $T_3$  毒素成分对水稻幼苗生物活性测定

Fig. 4 Toxic determination of  $T_3$  toxin on rice seedlings.

## 2.4 毒素的稳定性

**2.4.1 紫外线影响：**毒素成分  $T_3$  于紫外灯下照射 30 min，TLC 仍可检测到黄色斑点，还出现其它组分（图 5-C），紫外照射 8 h 后，TLC 紫外检测不出黄色斑点，毒素颜色已经明显变淡（图 5-A），表明毒素经紫外线作用被分解了。活性测定结果表明， $T_3$  于紫外灯下照射 30 min 后，引起水稻致萎的能力下降（图 5-D），受紫外照射 8 h 后，不能引起水稻秧苗致萎（图 5-B）； $T_3$  室温下置于空气中 24 h，也出现分解现象（图 5-C），但活性测定结果与-80 避光保存的  $T_3$  没有差别（图 5-D），原因可能分解不完全或者分解的物质仍然有活性。

**2.4.2 三氟乙酸和热处理：** $T_3$  经三氟乙酸 100 处理 30 min，TLC 和紫外检测毒素黄色斑点变淡和变小，同时分解产生较大极性和较小极性的成分（图 5-A）。活性测定基本没有致萎活性（图 5-B）。不加三氟乙酸的毒素热处理，也有分解现象（图 5-C），由于分解不完全，仍表现有生物活性（图 5-D）。

**2.4.3 甲酸和盐酸处理：** $T_3$  经甲酸室温处理 10 h，明显分解产生一个比  $T_3$  组分极性小的物质，紫外灯观察还出现另外一黄色斑（图 5-C）。 $T_3$  经盐酸室温处理 10 h，则分解产生一个比  $T_3$  极性更大的物质，但  $T_3$  成分的黄色斑点仍然可见（图 5-A）。活性测定均表现出致萎活性（图 5-B，图 5-D）。

## 2.5 毒素的糖检测试验

$T_3$  成分用浓硫酸 - 蒽酮方法检测没有颜色反应，而阳性对照葡萄糖则显蓝色，表明该毒素成分为非糖类化合物。

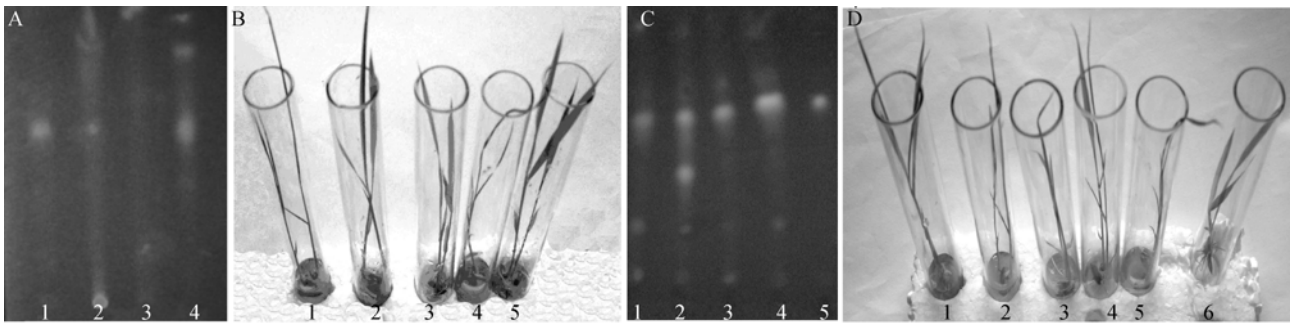


图 5 毒素成分 T<sub>3</sub> 经不同处理后 TLC 检测(A, C)及生物活性测定(B, D)

Fig. 5 TLC ultraviolet detection(A and C) and toxic determination(B and D) of T<sub>3</sub> with different treatment. A and B: 1. T<sub>3</sub> (stored at -80 °C); 2. T<sub>3</sub> with trifluoroacetic acid treatment 30 min at 100 °C; 3. T<sub>3</sub> with ultraviolet ray treatment eight hours; 4. T<sub>3</sub> with HCl treatment ten hours; 5. water. C and D: 1. T<sub>3</sub> with ultraviolet ray treatment 30 min; 2. T<sub>3</sub> with formic acid treatment ten hours; 3. T<sub>3</sub> with heated 30 min; 4. T<sub>3</sub> in air 24 h; 5. T<sub>3</sub> (stored at -80 °C); 6. water.

2.6 毒素的蛋白质及氨基酸检测

纯化毒素 T<sub>3</sub> 用考马斯亮兰和茚三酮检测均无颜色反应,表明该毒素成分为非蛋白质和非氨基酸类化合物。

2.7 毒素对植物种子萌发作用

用不同浓度的水稻基腐细菌毒素处理 4 类种子, 5 d 后测量种子萌发后的根、芽生长情况, 数据进行

统计分析,结果见表 1。当毒素浓度为 0.5 mg/mL 时, 除水稻芽以外, 其它几种作物根和芽都受到抑制。水稻芽的生长对基腐细菌毒素不敏感, 但根的生长对毒素敏感。随着毒素浓度的降低, 抑制种子根、芽生长的作用减弱, 当毒素含量为 0.01 mg/mL 时, 水稻、玉米和番茄的根长度明显大于各自的对照。

表 1 水稻基腐细菌毒素对 4 类作物种子根、芽生长的影响  
Table 1 Effects on 4 kinds of seeds of toxin from *Erwinia chrysanthemi* pv. *zeae*

c(Toxin)/ (mg/mL)	Length of rice roots and buds		Length of corn roots and buds		Length of tomato roots and buds		Length of tobacco roots and buds	
	Roots(cm)	Buds(cm)	Roots(cm)	Buds(cm)	Roots(cm)	Buds(cm)	Roots(cm)	Buds(cm)
0.5	0.00±0.00 f	2.56±0.06 d	0.00±0.00 d	0.00±0.00 d	0.00±0.00 f	0.00±0.00 e	0.00±0.00 f	0.00±0.00 d
0.1	1.31±0.04 e	3.89±0.11 c	0.00±0.00 d	0.00±0.00 d	0.46±0.03 e	1.20±0.06 d	0.00±0.00 f	0.00±0.00 d
0.05	2.50±0.21 d	4.10±0.03 b	2.00±0.21 c	3.10±0.06 c	0.85±0.03 d	1.15±0.04 d	0.10±0.02 e	1.16±0.03 b
0.01	4.78±0.08 a	4.18±0.02 ab	6.50±0.23 a	5.50±0.06 a	3.30±0.06 a	1.85±0.03 a	0.21±0.02 d	1.13±0.04 bc
0.005	4.25±0.03 b	4.16±0.03 ab	7.10±0.35 a	5.00±0.06 b	2.40±0.10 c	1.38±0.02 c	0.25±0.01 cd	1.35±0.04 a
0.001	3.65±0.04 c	4.26±0.04 ab	6.53±0.04 a	3.20±0.06 c	3.22±0.02 a	1.68±0.04 b	0.40±0.06 a	1.00±0.12 c
0.0005	4.47±0.03 b	4.28±0.02 a	5.20±0.30 b	5.50±0.06 a	2.90±0.10 b	1.24±0.02 d	0.31±0.02 bc	1.23±0.02 ab
Ck	4.35±0.02 b	4.25±0.03 ab	5.12±0.04 b	5.43±0.04 a	2.89±0.03 b	1.21±0.02 d	0.34±0.02 ab	1.33±0.03 a

The data in Table 1 were analysed by SAR software, Duncan method was used for multiple comparison.

由以上结果显示, 高浓度毒素抑制 4 种作物根、芽的生长, 低浓度毒素对作物根、芽生长有促进作用, 一定范围含量的毒素对水稻芽生长的影响较小, 但对根的生长影响较大。

2.8 毒素对病原细菌的抑菌作用

水稻基腐细菌毒素对供试的 10 种植物病原细菌都表现不同程度的抑菌作用, 其中对水稻白叶枯病菌和甘蓝黑腐病菌的抑菌作用较强, 抑菌圈直径分别为 15 mm 和 14 mm, 对番茄叶斑病菌和菜豆疫病病菌抑菌作用较小, 抑菌圈直径为 9 mm (见表 2)。

表 2 水稻基腐细菌毒素对植物病原细菌的抑菌作用  
Table 2 Inhibition to pathogenic bacteria of toxin from *Erwinia chrysanthemi* pv. *zeae*

Pathogenic bacteria	Inhibition diameter/mm
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	9
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	12
<i>Ralstonia solanacearum</i>	12
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	13
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	14
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>begoniae</i>	13
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>poinsettiicola</i>	11
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>phaseoli</i>	9
<i>Clavibacter michiganense</i> subsp. <i>sepedonicus</i>	11
<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	15

## 2.9 毒素诱导水稻 POD 活性变化

水稻基腐细菌毒素处理水稻叶片后,抗、感病品种的 POD 活性均高于各自的对照。抗病品种 128 和感病品种特籼 13 的 POD 活性在 12 h 后都迅速上升,24 h 都出现第一个高峰,其中抗病品种 128 的 POD 活性增幅为 233%,感病品种特籼 13 的活性增幅为 191%,在 24 h 到 48 h 之间,抗、感品种水稻的 POD 活性仍维持在较高水平。整个过程中,抗病品种 POD 活性增加幅度大,感病品种则增幅小,且变化平缓(图 6)。

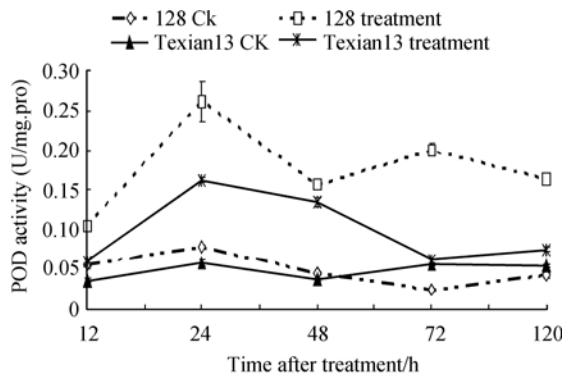


图 6 毒素诱导水稻叶片 POD 活性变化  
Fig. 6 The changes of POD activity in rice leaf induced by toxin.

由此表明,水稻基腐细菌毒素可诱导水稻抗、感病品种叶片 POD 活性在早期均迅速升高,且抗病品种的 POD 活性显著高于感病品种 ( $p < 0.05$ )。

## 2.10 毒素诱导水稻 PAL 活性变化

毒素处理水稻叶片后,抗、感品种 PAL 活性均高于各自的对照,但抗病品种的增幅较大(图 7)。表明:在水稻基腐细菌毒素处理水稻叶片后,都能诱导 PAL 活性,其中抗病品种的 PAL 活性增幅大于感病品种。

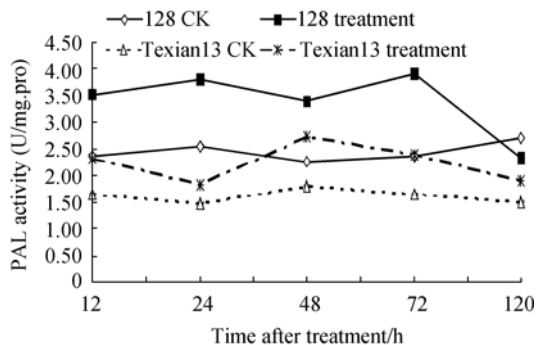


图 7 毒素诱导水稻叶片 PAL 活性变化  
Fig. 7 The changes of PAL activity in rice leaf induced by toxin.

## 3 讨论

### 3.1 水稻基腐细菌毒素的性质

不同植物病原细菌的属、种甚至变种之间产生的毒素其组分和结构不同。假单胞杆菌(*Pseudomonas* spp.)是产生毒素最多的一类<sup>[11]</sup>,其中冠毒素 COR( coronatine)含有两部分,一部分为多聚酮化合物(polyketide),另一部分为 $\alpha$ -氨基酸,两部分通过酰胺链相连接;脂缩酚酸肽 Lipodepsipeptides 和肽内脂 peptidolactones 毒素是由丁香致病变种 *P. syringae* pv. *syringae* 产生<sup>[12,13]</sup>。菜豆毒素的结构为磺基-二氨基-磷酸基肽;烟毒素由苏氨酸与 tabtoxinine- $\beta$ -lactan(简称 T $\beta$ L)通过肽链连接而成的二肽,属 $\beta$ -内酰胺。万寿菊毒素含有一个八元半缩酮环<sup>[14]</sup>。由 *Xanthomonas albilineans* 产生的白纹毒素详细的化学结构仍然不清楚,质子和 C<sup>13</sup> 核质共振表明毒素化合物有几个芳香环,溶于甲醇,四氢呋喃,氧化硫乙烷和 95%丙酮,不溶于低极性物质<sup>[15]</sup>。水稻黄单胞细菌产生的毒素为苯乙酸等 7 种有机酸<sup>[16]</sup>。此外,革兰氏阳性的棒状杆菌(*Clavibacter michiganensis*)各致病变种产生的致萎毒素的化学组分属于糖肽类物质<sup>[17]</sup>。

本研究首次发现水稻基腐细菌产生毒素,并建立了该毒素分离纯化方法。经纯化获得的该细菌毒素的一个单体成分 T<sub>3</sub> 为黄色固体物质,溶于甲醇、正丁醇、乙腈、水和甲酸;不溶于三氯甲烷、乙酸乙酯;微溶于丙酮。进一步的研究结果表明,毒素 T<sub>3</sub> 为非糖类和蛋白质类物质,对紫外线较敏感,在三氯乙酸、甲酸和空气中会缓慢分解,且分解的产物不同。关于 T<sub>3</sub> 的化学组成及结构有待于进一步研究。

### 3.2 毒素成分 T<sub>3</sub> 的生物学作用

一些植物病原细菌产生的毒素对植物种子萌发和幼苗生长具有抑制作用。如水稻白叶枯病菌产生的毒素能显著地抑制水稻幼苗、根的生长,能引起水稻萎蔫和烟草快速坏死,是重要的致病因子<sup>[16,18]</sup>。本研究结果表明,高浓度的水稻基腐细菌毒素能抑制水稻、玉米、番茄和烟草 4 类作物根、芽的生长,低浓度毒素则具有促进根、芽生长的作用,且水稻根比水稻芽对病菌毒素更敏感。

同时,一些植物病原细菌产生的毒素具有杀菌活性。Volksch 等<sup>[19]</sup>用 *Escherichia coli* 作为指示菌,通过琼脂扩散试验测定了丁香假单胞菌各致病变种抗代谢毒素的情况,所有对 *E. coli* 和 *Geotrichum candidum* 具有抑菌活性的菌株同时也表现出对一些叶围细菌具有抑菌作用<sup>[19]</sup>。白纹毒素能抑制原核生物

DNA 复制,对革兰氏阳性和阴性细菌都具有杀菌作用<sup>[20]</sup>。本研究结果表明,水稻基腐细菌产生的毒素至少对 *Agrobacterium*、*Clavibacter*、*Pseudomonas*、*Ralstonia* 和 *Xanthomonas* 等 5 个属的 10 种植物病原细菌具有抑菌活性,表明水稻基腐细菌毒素抑菌作用的广谱性,但对不同种的细菌,抑菌程度有差异,其中毒素对 *Xanthomonas oryzae* pv.*oryzae* 和 *Xanthomonas campestris* pv.*campestris* 的抑菌活性最强。

此外,植物病原微生物,特别是病原真菌产生的毒素具有诱导植物防卫酶的活性<sup>[21,22]</sup>。如玉米抗病品种的 POD 活性比感病品种更易被玉米弯孢叶斑病菌毒素激活<sup>[21]</sup>。烟草低头黑病菌毒素诱导烟草 SOD、POD 活性前期升高,后期下降,但抗病品种下降速度较感病品种慢<sup>[22]</sup>。假单胞细菌毒素具有提高黑松松针细胞的 POD、PAL 和 SOD 防御酶活性<sup>[23]</sup>。黄瓜抗病品种经黄瓜褐斑病菌毒素处理后,PAL 活性增加幅度较感病品种大<sup>[24]</sup>。本研究用水稻基腐细菌毒素 T<sub>3</sub> 处理水稻叶片,早期均可迅速诱导水稻抗病和感病品种 POD 和 PAL 活性,且诱导抗病品种的 POD 和 PAL 活性明显高于感病品种 (p<0.05),与前人报道的结果基本一致<sup>[20,24]</sup>,说明抗病品种中防卫酶对毒素的诱导反应快。

### 参 考 文 献

- [1] Yoder OC. Toxin in plant pathogenesis. *Ann Rev Phytopathology*, 1980, 18: 103-129.
- [2] Dunkel LD. Fungal phytotoxins: Perspectives and promises (Abstract). *Phytopathology*, 2005, 95(6): 134.
- [3] 耿锐梅, 张建萍, 余柳青. 植物病原菌毒素的种类、作用机理和应用前景. *浙江农业学报(Acta Agriculturae Zhejiangensis)*, 2007, 19(5): 393-398.
- [4] Birch RG. *Xanthomonas albilineans* and the antipathogenesis approach to disease control. *Molecular Plant Pathology*, 2001, 2(1): 1-11.
- [5] Howell CK, Stipanovic RD. Effect of sterol biosynthesis inhibitors on phytotoxin (viridiol) production by *Gliocladium virens* in culture. *Phytopathology*, 1994, 84(9): 969-972.
- [6] Saxena S, Pandey AK. Microbial metabolites as eco-friendly agrochemicals for the next millennium. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2001, 55(4): 395-403.
- [7] 刘琼光, 王振中, 陈玉托, 等. 水稻细菌性基腐病菌再侵染和潜伏侵染研究. *植物保护学报(Acta Phytophylacica Sinica)*, 2003, 30(3): 333-334.
- [8] 孔祥生, 张妙霞, 杜爱玲, 等. 植物组织中可溶性糖含量测定方法的比较和改进. *华中农业大学学报(Journal of Huazhong Agricultural University)*, 1998, 26: 49-53.
- [9] Schaffrath U, Scheinplflug H, Reisendr HJ. An elicitor from *Pyricularia oryzae* induces resistance responses in rice: isolation, characterization and physiological properties. *Physiol Mol Plant Pathol*, 1995, 46: 293-307.
- [10] 肖栓锁, 王钧. 水稻中超氧诱导与稻瘟菌抗性及苯丙氨酸解氨酶、几丁质酶、 $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶活性的诱导关系. *中国水稻科学(Chinese J Rice Sci)*, 1997, 11(2): 93-102.
- [11] Hu FP, Young JM, Fletcher MJ. Preliminary description of bio-cidal (syringomycin) activity in fluorescent plant pathogenic *Pseudomonas* species. *Fletcher Journal of Applied Microbiology*, 1998, 85: 365-371.
- [12] Iacobellis N, Lavermicocca P, Grgurina I, et al. Phytotoxic properties of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* toxin. *Physiol Mol Plant Pathol*, 1992, 40: 107-116.
- [13] Vassilev V, Lavermicocca P, Di GD, et al. Production of syringomycins and syringopeptins by *Pseudomonas syringae* pv. *atofaciens*. *Plant Pathology*, 1996, 45 (2): 316-322.
- [14] Julien RH Plet, Michael JP. Synthesis of the bicyclic core of tagetitoxin. *Chem Commun*, 2006, 11: 1197-1199.
- [15] Monique Royer, Laurent Costet, Eric Vivien, et al. Albicidin pathotoxin produced by *Xanthomonas albilineans* is encoded by three large PKS and NRPS genes present in a gene cluster also containing several putative modifying, regulatory, and resistance genes. *Mol Plant-Microbe Interact*, 2004, 17(4): 414-427.
- [16] Noda T, Sato Z, Kobayashi H, et al. Isolation and structural elucidation of phytotoxic substances produced by *Xanthomonas campestris* pv.*oryzae*. *Ann Phytopath Soc*, 1980, 40: 663-666.
- [17] Strobel GA. Bacterial phytotoxin. *Annu Rev Microbiol*, 1977, 31: 205-224.
- [18] 邵敏, 王金生. 水稻白叶枯病菌毒素的分离, 生物测定及化学成分初步分析. *植物病理学报 (Acta Phytopathologica Sinica)*, 1997, 27 (4): 315-320.
- [19] Volksch B, Weingart H. Toxin production by pathovars of *Pseudomonas syringae* and their antagonistic activities against epiphytic microorganisms. *Journal of Basic Microbiology*, 1999, 38 (2): 135-145.
- [20] Birch RG, Patil SS. Preliminary characterization of an antibiotic produced by *Xanthomonas albilineans* which inhibits DNA synthesis in *Escherichia coli*. *J Gen Microbiol*, 1985, 131(5): 1069-1075.
- [21] 陈捷, 蔺瑞明, 高增贵, 等. 玉米弯孢叶斑病菌毒素对寄主防御酶系活性的影响及诱导抗性效应. *植物病理学报 (Acta Phytopathologica Sinica)*, 2002, 32 (1): 43-48.
- [22] 房保海, 张广民, 迟长风, 等. 烟草低头黑病菌毒素对烟草丙二醛含量和某些防御酶的动态影响. *植物病理学报(Acta*

- Phytopathologica Sinica*, 2004, 34(1): 27–31.
- [23] 蒋继宏, 高甜惠, 陈凤美, 等. 假单胞菌毒素对黑松松针细胞防御酶系统影响. 福建林学院学报(*Journal of Fujian College of Forestry*), 2006, 26(4): 328–331.
- [24] 陆宁海, 吴利民. 黄瓜褐斑病菌毒素对抗、感黄瓜品种的作用. 微生物学杂志(*Journal of Microbiology*), 2007, 27 (4): 101–103.

## Separation, characters and biological functions of *Erwinia chrysanthemi* pv. *zeae* toxin

Qiongguang Liu, Jianjun Luo, Xuexia He, Zhenzhong Wang\*

(College of Natural Resource & Environment, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

**Abstract: [Objective]** The toxin produced by *Erwinia chrysanthemi* pv. *zeae* has not been reported so far. Toxin is one of the important pathogenic factors for plant pathogenic bacteria. The separation and purification of toxin are the key and basal work for toxin functional study. **[Methods]** We used several chromatography columns, chemical and biochemical methods for *Erwinia chrysanthemi* pv. *zeae* toxin separation and its characterization. **[Results]** We obtained a pure ingredient T<sub>3</sub> of *Erwinia chrysanthemi* pv. *zeae* toxin. It was a yellow solid and dissolved in methanol, N-butyl alcohol(NBA), water and formic acid. It dissolved weakly in acetone but did not dissolve in trichloromethane and ethyl acetate. The results showed that T<sub>3</sub> toxin ingredient was neither carbohydrate nor protein, and was sensitive to ultraviolet ray. Biological assays of the toxin showed that it could inhibit rice growth, cause rice seedlings to wilt and make tobacco cells necrosis. Toxin with high content could inhibit buds and roots of rice, corn, tomato and tobacco to grow, whereas toxin with low content could promote their growth. In addition, the toxin inhibited 10 plant pathogenic bacteria with 5 genera. Furthermore, toxin T<sub>3</sub> induced the activities of phenylalanine ammonia-lyase(PAL) and peroxidase(POD) in rice. **[Conclusions]** It is the first report about the separation and purification of *E. chrysanthemi* pv. *zeae* toxin. The T<sub>3</sub> toxin of *E. chrysanthemi* pv. *zeae* had the biological characters with inhibiting plant seeds germination, causing rice seedlings wilt, inhibiting some plant pathogenic bacteria and inducing defense enzyme activities in rice.

**Keywords:** *Erwinia chrysanthemi* pv. *zeae*; toxin; separation; biological function

Supported by the Guangdong key Scientific and Technological Project (E99032)

\*Corresponding author. Tel: +86-20-85281469; E-mail: zzwang@scau.edu.cn

Received: 19 May 2008/ Revised: 29 July 2008

### 科技写作中应正确使用英语缩写语

科技文章的发表是科学研究的重要组成部分。科研结果如果没有发表,就意味着科研工作没有完成。而科技文章发表的目的,就是要把科研中的新发现、或者在原有基础上的提高传播给同行、乃至跨领域以及广大普通的读者。因此,科技写作在道义上来讲,作者应该对读者负责,即:要准确、简洁、清晰地向读者传达科学研究的目的、方法、结果、结论和意义。

在科技论文的写作中,初学者经常会滥用英文缩写语。有些缩写语出现在正文、摘要、甚至题目中,让读者丈二和尚摸不着头脑。这种滥用缩写语的做法危害之深,让一个辛辛苦苦的实验结果失去了传播知识的价值和机会!因为除了作者自己,没有人能够看懂作者要传播什么信息。其实,许多年后,这些作者自己再来看自己文章中这些莫名其妙的缩写语时,他一定也会后悔莫及。借此机会,根据自己学习的体会和国际上科技文章缩写语使用的惯例,和大家探讨正确使用英语缩写语的方法。

原则上,不鼓励使用缩写语。(1) 题目:根据常规,题目中一律不用缩写语。因为题目是一个非常重要的检索工具,如果作者在题目中使用缩写语,会造成人们通过检索系统找不到这篇文章,因此也就失去了传播科学技术的作用和意义。找不到文章,

(下转 1513 页)