

莲子草假隔链格孢毒素对空心莲子草叶片和根尖组织超微结构的影响

张云霞¹ 范兰兰² 施祖荣¹ 姜子德² 黄江华¹ 向梅梅¹

1. 仲恺农业工程学院农学院, 广州 510225; 2. 华南农业大学资源与环境学院, 广州 510642

摘要 用不同质量浓度的莲子草假隔链格孢毒素处理空心莲子草叶片和根尖, 研究毒素对组织超微结构的影响。结果表明: 毒素处理后, 叶片细胞质壁分离、质膜消解, 叶绿体片层紊乱、膜消解, 线粒体膜破裂、嵴消解; 根尖细胞质壁分离、质膜消解, 线粒体膜破裂、嵴消解, 分生区和表皮细胞空泡化并萎缩。随毒素质量浓度的增加和处理时间的延长, 对叶片和根尖细胞破坏作用逐渐增强。

关键词 空心莲子草; 莲子草假隔链格孢; 超微结构

中图分类号 S 432.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2011)01-0084-05

空心莲子草 (*Alternanthera philoxeroides* Griseb), 属苋科莲子草属, 又称水花生、革命草, 是多年生宿根草本植物, 原产于巴西, 于 1930 年末被侵华日军用作养马饲料引至我国上海郊区栽培, 后来我国南方一些省市将其作为猪羊饲料草种植, 现已逸为杂草并广泛传播, 给农业生产和生态安全造成很大威胁^[1]。近年来, 随着对化学除草剂长期使用带来的环境污染和杂草抗药性问题的关注, 许多学者都在探讨用植物病原真菌或真菌毒素控制该草为害的可能性^[2-5]。

Kimura 等^[6]从 *Penicilium* sp. 代谢产物中分离获得了莲子草假隔链格孢毒素 (vulculic acid), 并发现其对黑松 (*Pinus thunbergii*) 花粉的萌发有很强的抑制作用。周遗品等^[7]、向梅梅等^[8]从空心莲子草叶斑病菌 (*Nimbya alternantherae*) 代谢产物中也分离获得了该毒素, 并发现其可为害空心莲子草叶片及植株, 引致叶片水渍状变褐及植株萎蔫, 是一种潜在的天然除草化合物。向梅梅等^[8]的初步研究表明, 该毒素可引致空心莲子草叶片细胞中叶绿体片层紊乱、膜消解, 线粒体膜破裂、嵴消解。本研究探讨莲子草假隔链格孢毒素对空心莲子草叶片和根尖组织超微结构的影响, 旨在为探明毒

素的致病机理和开发应用提供理论依据。

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 营养液配方进行培养, 长出 5~6 对新叶时备用。

1.2 毒素制备

参照周遗品等^[7]的方法, 将经 PDA 培养的莲子草假隔链格孢 *Nimbya alternantherae* (Holcomb & Antonopoulos) Simmons & Alcom 斜面菌种 2 支接入 200 mL 改良 Fries 3 号培养液中, 以 28 ℃、200 r/min 连续振荡培养, 7 d 后按 1:10 接入新培养液扩大培养, 5 d 后再按 1:10 接入 30 L 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, 将滤液于 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

收稿日期: 2010-03-31

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

张云霞, 博士, 讲师, 研究方向: 植物病原真菌学。E-mail: yx_zhang08@163.com

通讯作者: 向梅梅, 博士, 教授, 研究方向: 植物病原真菌及其代谢产物。E-mail: mm_xiang@163.com

酮溶液,水浴加热(60℃),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50和100 μg/mL的毒素溶液备用。

1.3 材料处理

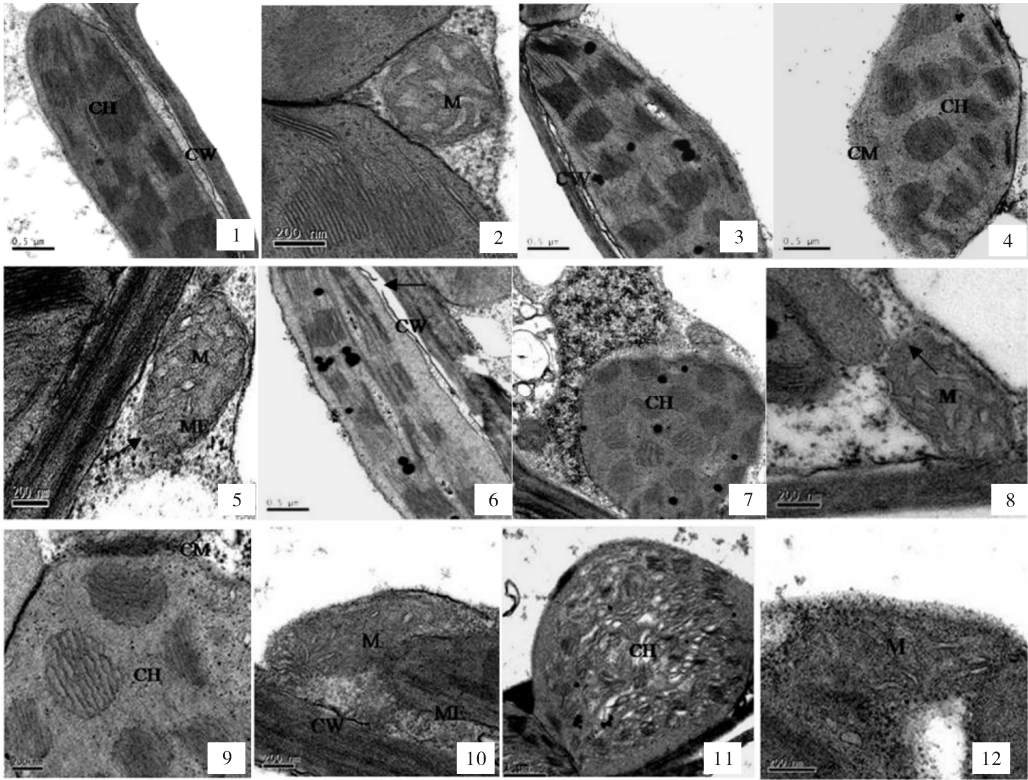
1)叶片的处理。参照付东亚等^[9]的方法,稍作修改。选取生长均匀一致、健康的空心莲子草,将自顶部往下第2~3对叶片用双蒸水冲洗3次,以无菌滤纸吸干水分,用脱脂棉将不同质量浓度的莲子草假隔链格孢毒素分别涂抹在叶片正反面上,每天涂

1次,连续涂抹5和10 d。以双蒸水涂抹作对照。

2)根尖的处理。参照台莲梅等^[10]的方法,稍作修改。取健康的空心莲子草,分别浸入质量浓度为50和100 μg/mL的毒素溶液中,置25℃光照培养箱中分别保湿12、24 h后,切取2 mm长根尖备用。用双蒸水作为对照。

1.4 电镜样品的制备和观察

样品采用戊二醛-锇酸双重固定法固定。经毒素处理的材料用2.5%戊二醛前固定,经磷酸缓冲液冲洗后,再用2%锇酸进行后固定。经系列乙醇逐级脱水后,用环氧树脂812包埋,超薄切片后,经醋酸双氧铀-柠檬酸铅双重染色,于TECNAI G2 12分析透射电子显微镜下观察、拍照。



1.对照叶组织的正常叶绿体 Normal chloroplast in control leaf tissue; 2.对照叶组织正常线粒体 Normal mitochondria in control leaf tissue; 3~5.50 μg/mL 毒素处理 5 d 叶绿体片层肿胀,叶绿体被膜和线粒体膜破裂 Chloroplast lamellae swelled, chloroplast envelope and mitochondria membrane disrupted in the treated tissue with vulculic acid of 50 μg/mL for 5 d; 6~8.50 μg/mL 毒素处理 10 d 叶绿体变形,片层肿胀离散,叶绿体被膜和线粒体膜消解 Chloroplast deformed, chloroplast lamellae swelled and scattered, chloroplast envelope and mitochondria membrane digested in the treated tissue with vulculic acid of 50 μg/mL for 10 d; 9~10.100 μg/mL 毒素处理 5 d,叶绿体片层明显离散,线粒体开始消解 Chloroplast lamellae scattered evidently, mitochondria began to digest in the treated tissue with vulculic acid of 100 μg/mL for 5 d; 11~12.100 μg/mL 毒素处理 10 d 叶绿体片层严重紊乱,空泡化,线粒体严重消解 Chloroplast lamellae severely scattered and disordered and vacuolated, mitochondria severely disintegrated with vulculic acid of 100 μg/mL for 10 d.

图 1 对照和毒素处理的叶片超微结构

Fig. 1 Ultrastructure of control and treated leaf tissues

2 结果与分析

2.1 莲子草假隔链格孢毒素对空心莲子草叶片细胞超微结构的影响

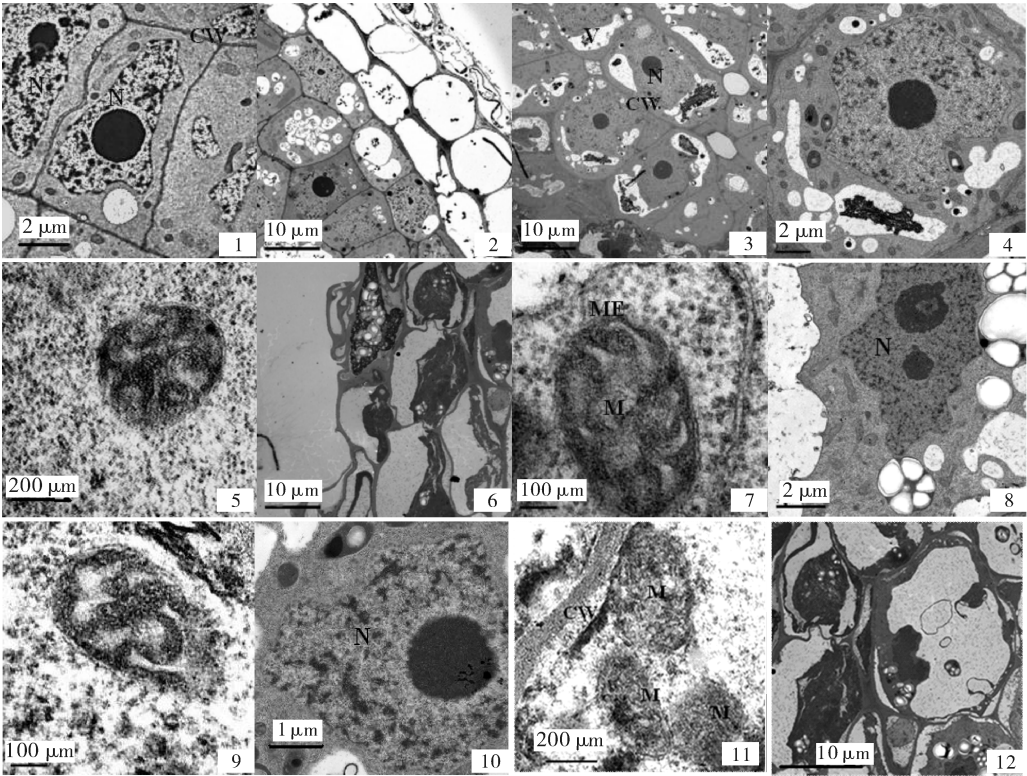
经双蒸水处理 5 和 10 d 后,空心莲子草叶片组织细胞超微结构均正常,细胞器丰富且分布均匀。细胞壁和质膜连接紧密;叶肉细胞中叶绿体多呈长梭形,双层被膜完整均一,基质片层和基粒片层结构完整,排列整齐有序(图 1-1)。线粒体膜完整,嵴丰富、清晰(图 1-2)。

经 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 毒素处理 5 d 后,质膜内陷,开始质壁分离(图 1-3)。少数叶绿体变形膨大,基粒片层肿胀,并开始有轻微离散,叶绿体被膜局部消解(图 1-4)。线粒体膜局部断裂、消解,基质外流

(图 1-5)。

毒素处理 10 d 后,质壁分离加重(图 1-6)。同样有少数叶绿体变形膨大,基粒片层肿胀,但离散程度较处理 5 d 明显,叶绿体被膜部分消解(图 1-7)。线粒体膜局部消解、断裂(图 1-8)。

经 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 毒素处理 5 d 后,质膜内陷严重,局部断裂消解。部分叶绿体变形膨大;叶绿体片层严重肿胀,离散明显,被膜多处消解断裂,基质外流(图 1-9)。线粒体膜多处断裂、消解,多数线粒体嵴开始消解,数量减少,嵴紊乱(图 1-10)。毒素处理 10 d 后,大多数叶绿体肿胀成球形,片层离散、紊乱,出现空泡化(图 1-11);线粒体消解严重,多数已经观察不到完整的线粒体,嵴消解、紊乱(图 1-12)。



1. 对照根尖组织正常的细胞结构和细胞核 Normal cell architectures and nuclei in control root tip tissue; 2. 对照根尖组织分生区和表皮正常细胞 Normal cells in meristematic zone and epidermis of root tip tissue; 3~6. 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 毒素处理 12 h 核膜、线粒体膜消解,分生区细胞空泡化,表皮细胞萎缩 Nucleus and mitochondria membrane digested, meristematic cells vacuolated, epidermal cells shrunk in the treated tissue with vulculic acid of 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 12 h; 7~8. 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 毒素处理 24 h 线粒体膜消解,部分嵴消失,核仁开始消解 Mitochondria membrane digested and some ridges disappeared, and nucleolus began to digest in the treated tissue with vulculic acid of 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 24 h; 9~10. 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 毒素处理 12 h 线粒体、核膜、核仁开始消解 Mitochondria, nucleus membrane and nucleolus began to digest in the treated tissue with vulculic acid of 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 12 h; 11~12. 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 毒素处理 24 h 线粒体消解,整个细胞萎缩 Mitochondria digested and the whole cells shrunk in the treated tissue with vulculic acid of 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 24 h.

图 2 对照和毒素处理的根尖超微结构

Fig. 2 Ultrastructure of control and treated root tip tissues

2.2 莲子草假隔链格孢毒素对空心莲子草根尖组织超微结构的影响

经双蒸水处理后,根尖组织细胞超微结构正常,细胞器丰富且排列均匀,细胞壁和质膜连接紧密,细胞质膜均匀连续,细胞壁电子密度均一,细胞核核质均匀丰富,双层核膜边界清晰,核仁电子密度高,边缘清晰、整齐(图 2-1);分生区细胞内细胞质丰富,大液泡少,根表皮细胞结构正常(图 2-2)。

经 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 毒素处理 12 h 后,细胞质的电子密度下降,大液泡增多,细胞壁的颜色变浅但电子密度仍均匀一致(图 2-3);细胞核核膜开始模糊,核质电子密度下降;核仁边缘开始模糊,电子密度下降(图 2-4);线粒体的部分双层被膜变成单层膜且局部消解,基质外流,电子密度开始下降,嵴局部消失,部分空泡化(图 2-5);分生区细胞大液泡明显增多,严重空泡化,根表皮细胞萎缩(图 2-6)。24 h 后,线粒体双层被膜大部分消解,基质外流,基质电子密度下降,部分嵴消失(图 2-7);细胞核变形,核仁电子密度下降,边缘变得不整齐(图 2-8)。

经 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 毒素处理 12 h 后,线粒体双层被膜消解,基质外流,基质电子密度明显下降,整体开始消解(图 2-9);细胞核核膜边界不清晰,核质电子密度明显下降,核仁模糊,边缘开始消解(图 2-10);分生区细胞几乎完全被大液泡占据,严重空泡化,根表皮细胞严重萎缩。24 h 后,线粒体整体模糊,严重消解(图 2-11);整个细胞严重空泡化、萎缩(图 2-12)。

3 讨论

马春红等^[11-12]的研究表明,毒素对寄主植物细胞可造成明显的损伤,而且膜系统最易受伤害。常缨等^[13]的研究表明,链格孢菌(*Alternaria alternata*)产生的毒素处理紫茎泽兰叶片组织 24 h 后,叶肉细胞的细胞壁变形甚至断裂,质膜断裂,叶绿体变形严重,类囊体片层解体,叶绿体膜膨胀、断裂。台莲梅等^[10]研究了尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)产生的毒素对大豆胚根组织超微结构的影响,结果表明:毒素处理后,胚根细胞质壁分离;质膜、线粒体膜、核膜、液泡膜局部断裂;线粒体肿胀、变形、内部电子透明化、空泡化。于莉等^[14]在研究黑斑毒素对感病和抗病向日葵叶组织超微结构的影响时也

发现,质膜和叶绿体片层在细胞结构中最容易受伤害。在本研究中,在 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 毒素处理 5 d 和 12 h 后,叶和根组织细胞中的细胞质膜、叶绿体膜、线粒体膜和核膜等均受到了明显损伤,也说明膜系统最易受伤害。

本研究中,经莲子草假隔链格孢毒素处理后,空心莲子草叶片和根尖组织的细胞均受到破坏,且随毒素质量浓度的提高和处理时间的延长,破坏作用更明显。低质量浓度(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)处理叶组织时,少数叶绿体变形膨大,基粒片层肿胀,开始离散,线粒体主要表现为膜局部断裂消解;高质量浓度(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)处理叶组织时,多数叶绿体畸形膨胀,片层严重离散直至紊乱,空泡化;线粒体嵴逐渐消解,膜破裂消解,直至观察不到完整的线粒体。毒素处理根尖组织时,变化与叶组织类似。由此可见,叶绿体和线粒体可能是莲子草假隔链格孢毒素作用的初始位点。笔者所在实验室在研究莲子草假隔链格孢毒素对空心莲子草叶片光合作用和呼吸作用的影响时也发现,用不同质量浓度的毒素处理叶片 5 d,叶肉细胞的光合活性显著下降,表现为净光合速率、气孔导度值、蒸腾速率明显下降,胞间 CO_2 浓度升高。用毒素处理线粒体后,呼吸作用的 P/O 和呼吸控制率 RCR 显著下降,氧化磷酸化解偶联,线粒体的正常呼吸功能遭到破坏,且毒素质量浓度越高,破坏作用越明显,进一步验证了本研究结论。

参 考 文 献

- [1] 谭万忠. 空心莲子草在中国的分布[J]. 杂草学报, 1994, 8(2): 30-33.
- [2] BARRETO R, CHARUDATTAN A, POMELLA A, et al. Biological control of neotropical aquatic weeds with fungi[J]. Crop Protection, 2000, 19, 697-703.
- [3] TAN W Z, LI Q J, QING L. Biological control of alligator weed (*Alternanthera philoxeroides*) with a *Fusarium* sp. [J] Bio-Control, 2002, 47, 463-479.
- [4] 向梅梅, 曾永三, 刘任, 等. 空心莲子草叶斑病菌代谢产物的除草活性[J]. 中国生物防治, 2002, 18(2): 87-89.
- [5] 向梅梅, 曾永三, 刘任, 等. 莲子草假隔链格孢的寄主范围及对空心莲子草的控制作用[J]. 植物病理学报, 2002, 32(3): 286-287.
- [6] KIMURA Y, NISHIBE M, NAKAJIMA H, et al. Vulculic acid, a pollen germination inhibitor produced by the fungus *Penicillium* sp. [J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1991, 55(4): 1137-1138.

[7] 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.

[8] XIANG M M,FAN L L,ZENG Y S,et al. Study on the herbicidal activity of vulculic acid from *Nimbya alternantherae* [C]// JULIEN M H,SFORZA R,BON M C,et al. XII. International Symposium on Biological Control of Weeds. Wallingford:CABI Publishing,2008:357-360.

[9] 付亚东. 植物病毒抑制寄主光合作用的机理和弱病毒保护研究[D]. 杭州:浙江大学图书馆,2002.

[10] 台莲梅,许艳丽,闫风云. 尖孢镰刀菌毒素对大豆胚根组织影响的超微结构研究[J]. 植物病理学报,2006,36(6):512-516.

[11] 马春红,李秀丽,董文琦,等. 玉米小斑病菌 C 小种毒素诱导玉米离体根冠细胞凋亡的检测[J]. 华中农业大学学报,2010,29(2):138-142.

[12] 马春红,翟彩霞,郑秋玲,等. 玉米小斑病菌 T 小种毒素对玉米叶片苯丙氨酸解氨酶活性的影响[J]. 华中农业大学学报,2010,29(1):21-25.

[13] 常纓,王学东,强胜. 链格孢菌毒素对紫茎泽兰叶组织超微结构的影响[J]. 电子显微学报,2004,23(5):566-570.

[14] 于莉,陈捷,李亦,等. 黑斑毒素对感病和抗病向日葵叶组织超微结构的影响[J]. 植物病理学报,2002,32(3):252-256.

Effects of vulculic acid on the ultrastructure of
leaf and root tip tissues of *Alternanthera philoxeroides*

ZHANG Yun-xia¹ FAN Lan-lan² SHI Zu-rong¹
JIANG Zi-de² HUANG Jiang-hua¹ XIANG Mei-mei¹

1. College of Agrinomy, Zhongkai University of Agriculture and
Engineering, Guangzhou 510225, China;
2. Resource and Environment College, South China Agricultural
University, Guangzhou 510642, China;

Abstract The leaf and root tip tissues of *Alternanthera philoxeroides* were treated with vulculic acid of different concentrations to study the effects of vulculic acid on the ultrastructure. The results showed that the damages appeared as the disruption of plasma membrane, digestion of the membrane of chloroplast and mitochondria, disorder of chloroplast lamellae, digestion of mitochondria ridge in leaf tissue, disruption of plasma membrane, digestion of mitochondria membrane and ridge, vacuolation and shrinking of meristematic and epidermal cells in root tip tissue. The severity of damages was increased with the increasing concentration of toxin and time of treatment.

Key words *Alternanthera philoxeroides*; vulculic acid; ultrastructure

(责任编辑:张志钰)