

# 钙调素拮抗剂及钙螯合剂 对玉米大斑病病原孢子萌发的影响

高志强 程增书

(河北省农林科学院粮油作物研究所,石家庄 050031)

**摘 要** 以田间玉米植株上自然生长的、在人工模拟条件下保存近一年的玉米大斑病病原孢子为试材,用改良 Czapek 液为基本培养基,对钙调素与大斑病病原孢子萌发的关系进行了研究,结果表明,在没有钙、钙调素拮抗剂和钙螯合剂时,有近 30% 的孢子能很好萌发。经拮抗剂和螯合剂处理后,孢子的萌发因药物的种类或浓度的不同而受到不同程度的影响,在实验浓度范围内,因药物浓度的提高而降低。外加  $3\text{mmolCa}^{2+}$  后,除个别外,基本上都能恢复到与对照相似的程度。说明药物对孢子萌发的影响不是由于孢子受损所致。试验结果初步提示,玉米大斑病菌孢子萌发时需钙,也说明此过程还可能与钙调素有关。

**关键词** 钙调素 拮抗剂 玉米大斑病 孢子 萌发

中国是玉米种植大国,危害我国玉米生产的病害约 40 余种,严重的近 20 种,由 *Helminthosporium turcicum* pass (简写为 Ht.) 引起的玉米大斑病就是此类严重病害的一种。

对于玉米大斑病的防治,曾运用过选育抗病品种,改进栽培措施以及药物喷杀手段,但都未取得理想效果,究其原因,可能主要是对 Ht 生长发育规律及其在分子水平上的调控机制缺乏深入认识之故。因此要想彻底根治此种病害,就必须在细胞、亚细胞乃至分子水平上彻底弄清 Ht 生长发育的调控机制。可喜的是,近年来在真核生物和部分已受检的原核生物细胞中,普遍发现了一种具有调节细胞的分裂、运动、分泌和代谢等多种重要生理功能的调节蛋白,它受钙的激活而又可调节细胞内的钙水平,被称之为钙调素(calmodulin)(简写为 CaM)<sup>[1~4]</sup>。真菌细胞中也存在 CaM 已有报道<sup>[4~5]</sup>,但在 Ht 中是否也存在 CaM 及其存在的意义目前尚一无所知。为了弄清 Ht 的生长发育及其与 CaM 的关系并探索防治玉米大斑病的新方法,我们研究了 CaM 拮抗剂及钙螯合剂对 Ht 孢子萌发的影响。现将结果报道如下。

## 1 材料和方法

为使试验结果能真实地反映病原菌在自然条件下生长发育及再侵染的情况,供试材料直接采自本所玉米室的田间发病植株,从田间摘取典型病叶,装入纸袋室温下自然干燥,然后模拟自然条件黑暗保存到次年 7 月。临试前,选具孢子多的病叶,用  $2.5\text{mmol EGTA}$  [乙二醇双( $\alpha$ -氨基乙基)醚四乙酸]脱孢子细胞壁钙,然后用毛刷刷洗病斑部位,用三层纱布过滤除去孢子梗,将滤过液静置约 1 分钟,吸出上部悬液保存,弃去下部沉淀物。此步骤反复进行 3~4 次,再用绸布过滤,微孔滤膜收集孢子,无离子水洗三次后重悬浮于无离子水中待用,如若不纯再经离心进一步纯化。

试验设对照(改良 Czapek 培养液,其配方为: $\text{KNO}_3$ ,  $2 \times 10^{-2} \text{mol}$ ;  $\text{KCl}$ ,  $6 \times 10^{-3} \text{mol}$ ;  $\text{CaCl}_2$ ,  $5 \times 10^{-5} \text{mol}$ ;  $\text{FeSO}_4$ ,  $6.5 \times 10^{-5} \text{mol}$ ;  $\text{MgSO}_4$ ,  $2 \times 10^{-3} \text{mol}$ ; pH 3.0), Ca 螯合剂 EGTA (2.5 mmol, 5.0 mmol, 10.0 mmol, 20.0 mmol), Ca 拮抗剂  $\text{La}^{3+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$  (2.5 mmol, 5.0 mmol, 10.0 mmol) 和 CaM 拮抗剂 Clopromazine (简称为 CPZ) ( $1 \times 10^{-2} \text{mmol}$ ,  $5 \times 10^{-2} \text{mmol}$ ,  $10 \times 10^{-2} \text{mmol}$ , 1.0 mmol),  $\text{Al}^{3+}$  (1.0 mmol, 5.0 mmol, 10.0 mmol, 20.0 mmol) 四组共计 19 个处理,重复三次。恢复培养液是在改良 Czapek 液的基础上再加入 3.0 mmol  $\text{Ca}^{2+}$ , 使  $\text{Ca}^{2+}$  的最终浓度为 3.05 mmol。培养采用微孔滤膜法(滤膜孔径为  $0.45 \mu\text{m}$ ), 用滤膜的粗糙面沾取孢子悬液, 置于装有不同检测试剂的小培养皿中(为防止滤膜下沉, 在滤膜下垫有干净且吸足药液的泡沫塑料圆片)。接种后, 于  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ , 光照 800 Lx 下保湿培养, 24h 后将每一滤膜分别移至载玻片上, 置 OLYMPUS-BH 显微镜下观察计数。为避免红光对实验的影响, 从病叶的保存到接种应避免光, 操作在  $500 \mu\text{m}$  绿色安全灯下进行。

## 2 结果与分析

供试材料 Ht 的孢子在人工模拟条件下保存到次年 7 月, 试验其萌发时, 发现在改良 Czapek 培养液中仍有约 30% 的孢子能正常萌发, 因此, 这部分孢子很可能是翌年重侵染的主要菌源。但这部分孢子分别经  $\text{Ca}^{2+}$  螯合剂和不同种类或不同浓度的  $\text{Ca}^{2+}$ —CaM 拮抗剂  $\text{La}^{3+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$ 、CPZ、 $\text{Al}^{3+}$  处理后, 都能明显地显示出对孢子萌发的抑制效应, 抑制作用的大小因药剂的

表 Ca—CaM 拮抗剂和 Ca 螯合剂对玉米大斑病菌孢子萌发的影响

处 理	浓 度 (mmol)	绝对萌发率 (%)	相对萌发率 (%)	相对抑制率 (%)	相对恢复率 (%)
对 照	0.0	29.3	100.0	0.0	100.0
EGTA	2.5	16.8	57.3	42.7	110.0
	5.0	14.0	47.8	52.2	96.7
	10.0	11.2	38.2	61.8	103.3
	20.0	9.0	30.7	69.3	66.7
	20.0	9.0	30.7	69.3	66.7
$\text{La}^{3+}$	2.5	24.8	84.6	15.4	153.3
	5.0	19.0	64.8	35.2	243.3
	10.0	16.0	54.6	45.4	176.7
$\text{Co}^{2+}$	2.5	18.0	61.4	38.6	90.0
	5.0	16.8	57.3	42.7	106.7
	10.0	10.7	36.5	63.5	90.0
CPZ	$1 \times 10^{-2}$	23.5	80.2	19.8	100.0
	$5 \times 10^{-2}$	21.3	72.7	27.3	90.0
	$10 \times 10^{-2}$	22.5	76.8	23.2	106.7
	1.0	13.7	46.8	53.2	146.7
$\text{Al}^{3+}$	1.0	28.5	97.3	2.7	93.3
	5.0	19.8	67.6	32.4	130.0
	10.0	18.7	63.8	36.2	103.3
	20.0	14.8	50.5	49.5	50.0

种类及浓度不同表现出一定差异。在可逆抑制浓度范围内,以  $\text{Ca}^{2+}$  螯合剂 EGTA 的作用最强,5mmol 时约 52.2%,10 mmol 时可高达 61.8%, $\text{Co}^{2+}$  次之,其余作用一般。在参试各处理中,除在 EGTA 20mmol 和  $\text{Al}^{3+}$  20mmol 处理出现不可逆抑制外,其它各处理在去除药物后,在恢复培养液中都可恢复萌发,而且大都能恢复到与对照相近的程度,试验中未看到完全抑制。在试验中还观察到,滤膜上残留的极微量的  $\text{La}^{3+}$  对孢子萌发有极明显的促进作用。结果如表所示。

### 3 讨论

从表中所列数字可明显看出,Ht 的孢子萌发,无论是对  $\text{Ca}^{2+}$  螯合剂还是对  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM 拮抗剂都比较敏感,受抑制范围在 2.7%~69.3%之间。说明 EGTA、CPZ、 $\text{Al}^{3+}$ 、 $\text{La}^{3+}$  和  $\text{Co}^{2+}$  对 Ht 的孢子萌发都是有一定影响的。

#### 3.1 $\text{Ca}^{2+}$ 螯合剂 EGTA 的影响

EGTA 是公认的专一性  $\text{Ca}^{2+}$  螯合剂,它不但可以与非细胞体系中的  $\text{Ca}^{2+}$  形成难溶性的络合物,而且也能螯合细胞壁中的  $\text{Ca}^{2+}$ ,造成  $\text{Ca}^{2+}$  的暂时性亏缺,从而阻断  $\text{Ca}^{2+}$  在细胞体系中的生理效应。已知  $\text{Ca}^{2+}$  存在于细胞壁中, $\text{Ca}^{2+}$  和细胞壁的相互作用发挥重要的生理功能,如细胞壁结构的稳定性、离子交换特性和细胞壁酶活性的调节等<sup>[6]</sup>。本试验中所观察到的 EGTA 对孢子萌发的影响可能是离子交换和酶活性调节受阻所致。从 EGTA 对孢子萌发的影响来看,可以初步认为 Ht 的孢子萌发过程是需  $\text{Ca}^{2+}$  的。试验中令人费解的是,不论是 Ca 螯合剂还是  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM 拮抗剂,除极端浓度外,都难以观察到完全抑制出现,这似乎有三种可能:(1)孢子萌发虽都需要  $\text{Ca}^{2+}$ ,但因孢子的生理状态或已积累的胞内  $\text{Ca}^{2+}$  含量的差别,积累较多的就不受胞外  $\text{Ca}^{2+}$  的影响而萌发,因为 EGTA 不能进入细胞和螯合胞内  $\text{Ca}^{2+}$ ,而胞内  $\text{Ca}^{2+}$  含量低于生理水平的就被抑制;(2)孢子在发育过程中只在某一阶段需要  $\text{Ca}^{2+}$ ,可能在参试时有些孢子已越过这一发育阶段而萌发;(3) $\text{Ca}^{2+}$  参与孢子萌发不是唯一的途径,可能还有其它代谢途径,当  $\text{Ca}^{2+}$  供应短缺时,通过旁途代谢引起孢子萌发。究竟是什么机制,本试验还难以断定。另外,需要指出的是,EGTA 虽不能进入细胞,但在高浓度如 20mmol 时仍能损伤细胞,至使不可逆抑制现象出现。

#### 3.2 $\text{Ca}^{2+}$ 拮抗剂的作用

$\text{La}^{3+}$  和  $\text{Co}^{2+}$  是常用的  $\text{Ca}^{2+}$  拮抗剂。 $\text{La}^{3+}$  的作用是它不进入细胞,可能是抑制质膜外表的  $\text{Ca}^{2+}$  或相当专一地限制  $\text{Ca}^{2+}$  向细胞内流动<sup>[10]</sup>, $\text{Co}^{2+}$  与红光的作用极为相似<sup>[10]</sup>,它们的生物效应都是抑制红光激发的孢子萌发过程<sup>[10]</sup>。在本试验中, $\text{La}^{3+}$  或者  $\text{Co}^{2+}$  虽都可在某种程度上抑制孢子萌发,但二者的抑制作用却不同, $\text{Co}^{2+}$  的作用大于  $\text{La}^{3+}$ ,而且在试验浓度范围内都为可逆抑制,同样说明  $\text{La}^{3+}$  和  $\text{Co}^{2+}$  也不伤害孢子,可能主要都是以限制  $\text{Ca}^{2+}$  的内流为特点的,这再一次证明 Ht 的孢子萌发过程确是需要  $\text{Ca}^{2+}$  的。

试验中引人注目的是  $\text{La}^{3+}$  各处理。当去除  $\text{La}^{3+}$  外加 3mmol  $\text{Ca}^{2+}$  时,恢复萌发率出现了显著的超对照现象,最高可达 243%,此一现象似乎说明滤膜中残留的极微量的  $\text{La}^{3+}$  对孢子萌发有促进作用。有人认为  $\text{La}^{3+}$  在维持膜完整性和细胞壁的结构整体上,在一定时间范围内有代替  $\text{Ca}^{2+}$  的作用<sup>[7]</sup>,这里很可能是  $\text{La}^{3+}$  和  $\text{Ca}^{2+}$  的迭加作用所致。

#### 3.3 CaM 拮抗剂的影响

根据在动植物细胞中所获得的大量资料已证实,CPZ 等吩噻类药物可作为 CaM 的专一性拮抗剂已广泛应用<sup>[10]</sup>,无机  $\text{Al}^{3+}$  也已被证明是一个较强的 CaM 无机拮抗剂<sup>[8]</sup>,CaM 拮抗剂已成为目前研究 CaM 在细胞中生理功能的重要药理学工具和生理探针<sup>[1,9]</sup>。利用 CaM 拮抗

剂结合其它技术也已证实 *Onoclea sensibilis* L. 和 *Anabena azollae* 的孢子萌发都是受 CaM 调控的<sup>[4,10]</sup>。在 Ht 的孢子萌发过程中,我们也观察到 CaM 拮抗剂 CPZ 和  $Al^{3+}$  具有明显的抑制作用,两种拮抗剂都可使抑制率达到 50% 左右,结果间接表明,Ht 孢子萌发过程可能是受 CaM 调控的。

诚然,CPZ 和  $Al^{3+}$  等作为 CaM 的拮抗剂,在高浓度时有其非专一性效应的不足,如  $Al^{3+}$  20mmol 时就是这样。但 CPZ 的浓度限定在 ( $IC_{50}=1\sim 100\mu mol$ )<sup>[10]</sup>,Al 限定在 10mmol 时就不会出现不可逆损伤。因此本研究所获结果是有意义的。

我们的试验初步证实,Ht 的孢子萌发过程是需  $Ca^{2+}$  的, $Ca^{2+}$  在其中可能发挥重要的生理作用。还间接证明此萌发过程亦和 CaM 的活动有关,很可能是  $Ca^{2+}$ -CaM 的共同作用。另外考虑到孢子的萌发仅抑制到约 50%,推测  $Ca^{2+}$ -CaM 对孢子萌发的调节不是唯一的途径,可能还有其它非  $Ca^{2+}$ -CaM 调节系统存在(?),是否如此,尚待深入研究。

鸣谢 钙调素拮抗剂由河北师大生物系孙大业教授提供,特表谢意

### 参 考 文 献

- 1 孙大业. 钙调蛋白及其在植物体内的功能. 植物生理学通讯, 1984, (6): 13~19
- 2 张崇高. 钙调蛋白与细胞功能的调节. 细胞生物学杂志, 1982, (1): 14~19
- 3 高志强. 钙调素抑制剂对转板藻细胞骨架的影响. 植物生物学通讯, 1989, (3): 25~28
- 4 白光智. 原核生物钙调素. 植物学通报, 1988, (2): 92
- 5 祖父江充治. 钙调蛋白の分布. 蛋白质. 核酸. 酵素, 1982, (27): 2201~2210
- 6 叶正华等. 小麦细胞壁钙调素的研究初报. 科学通报, 1988, (8): 624~626
- 7 邢金铭等. 镧、铈和钙对马铃薯苗株超微结构的影响. 华北农学报, 1990, (1): 17~21
- 8 徐友涵, 张遂波. 钙调蛋白研究的进展. 生物化学与生物物理进展, 1987, (4): 10~14
- 9 孙大业等. 烟草培养细胞中钙离子、钙调素与细胞质流的关系. 植物生理学报, 1989, (1): 24~29
- 10 Wayne R and Hepler PK. The role of calcium ions in phytochrome mediated germination of spores of *Onoclea sensibilis* L. Planta, 1984, (160): 12~20

## Effect of Calcium - calmodulin Antagonists and Calcium Chelating Agents on Germination of Fungus Spores of Corn Leaf Blight

Gao Zhiqiang

Cheng Zengshu

*(Cereal and Oil Crops Institute, Hebei Academy of Agricultural  
and Forestry Sciences, Shijiazhuang)*

**Abstract** The relationship between the calcium - calmodulin (CaM) antagonists and the germination of fungus spores of corn leaf blight was studied by use of the fungus spores of corn leaf blight growing on the corn plants and reserved in a condition simulated artificially for about a year. In the experiment the improved Czapek's solution was used as a minimal medium. The research result showed that about 30% of spores could germinate very well without  $\text{Ca}^{++}$ , CaM antagonists and calcium chelating agents. When the spores was treated with the antagonists or the chelating agents, the germination was affected in varying degree owing to difference in sort of the agents and their concentration, and the higher the concentration, the lower the germination rate. If 3 mmol of  $\text{Ca}^{++}$  was added to the treating agents, the germination rate could be almost returned to same as that of the control. This showed that the effect of agents on the spores germination was not due to damage to the spores. The experiment result showed that the  $\text{Ca}^{++}$  was necessary for the fungus spores of Corn leaf blight to germinate, and the germination process might be related to the CaM.

**Key words:** Calcium; Calmodulin; Antagonist; Corn leaf blight; Spore; Germination