

湖泊或水库富营养化后产生的藻毒素 影响果树生长的实验室证据*

陈建中^{1,3} 孙庆俊² 刘志礼³ 郭佳兰¹ 张海洋¹

(1 湖州师范学院生命科学学院 湖州 313000; 2 南京新世纪园艺研究所; 3 南京大学生命科学院)

随着人口的增长和工农业生产的发展,水环境质量日趋恶化,淡水湖泊或水库中蓝藻水华频繁发生。微囊藻毒素(Microcystins, MCs)是蓝藻水华引起的危害最大的一类藻毒素,它进入生物体内对蛋白磷酸酶 1 和 2A 起抑制作用,被认为是一种促肝癌剂。本研究利用滇池蓝藻水华提取液探讨了微囊藻毒素在苹果组培苗中的积累情况及其对苹果苗生长和愈伤组织形成的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

微囊藻水华材料来源于云南滇池,经冻干处理后保存于 -20°C 下备用。微囊藻毒素-LR、-RR 和 -YR 标准品购自 Calbiochem 公司(Bad Soden, 德国)。抗微囊藻毒素-LR 的单克隆抗体由日本东京科技大学的 Yoshio Ueno 教授提供。

1.2 有毒蓝藻提取液的准备

将冻干蓝藻悬浮在蒸馏水中,冻融 8 次以后,20 000 g 下离心 30 分钟,取出上清液置 -20°C 备用。

1.3 提取液中微囊藻毒素的定量与特征分析

采用小白鼠腹腔注射法^[1]评估提取液中微囊藻毒素的毒性。以 4 周龄、体重 16~19 g 的雄性 ICR 小白鼠用于剂量反应试验,检测 LD_{50} (半致死剂量)。微囊藻毒素的分离、定量与特征分析均根据前人所用的试验方法^[2,3],即提取液经过 Sep-pak C18 小柱(Waters 公司)纯化^[2]后,酶联免疫吸附方法(ELISA)检测微囊藻毒素总量,高效液相色谱法(HPLC)检验毒素组分^[3]。

1.4 苹果组培试验

先获得长富 2 号苹果(*Malus pumila*)无茵苗,扩繁至一定数量后进行微囊藻毒素处理。培养基配方:MS+BA 1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 6.5 g/L, pH 值 5.8。无菌条件下,将毒素提取液过滤灭菌后加入已灭菌培养基中,对照加蒸馏水,接种后置培养室中培养。培养室温度 $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$,光照 3 000 lx,每天光照 12 小时。

苹果愈伤组织诱导培养基:MS+BA 4.0 mg/L

+NAA 1.0 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 6.5 g/L, pH 值 5.8。接种后暗培养 3 周,然后置光照培养室中培养。

1.5 ELISA 测定苹果组织中的微囊藻毒素含量

取苹果组培苗组织 0.5 g 加入蒸馏水 2 ml 研磨成匀浆,在 20 000 g 下离心 2 分钟,取上清液通过 Sep-pak C18 小柱进行纯化,ELISA 测定总微囊藻毒素含量,结果用微囊藻毒素-LR(MC-LR equiv)表示。

2 结果与分析

2.1 滇池蓝藻水华的藻毒素组分

我国湖泊中最常见的水华蓝藻种类为微囊藻。滇池位于中国西南部,在最近 15 年中经常出现有毒蓝藻水华的报道。我们已从富营养化的滇池中分离到产生水华的蓝藻——铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*),并已证实能产生肝毒素。为了研究微囊藻毒素对苹果生长的影响,我们以冷冻干燥的滇池水华为原材料,获得了有毒蓝藻的粗提液,并用小白鼠生物测试了粗提液的肝毒性,粗提液腹腔注射小白鼠后可引起小白鼠的死亡,其半致死剂量 LD_{50} 为 83 mg/kg 体重。反相高效液相色谱法分析表明粗提液中至少含有 3 种微囊藻毒素:MC-RR、MC-LR、MC-YR,分别占 62%、35%、3%。根据 ELISA 测定,有毒蓝藻水华粗提液中的微囊藻毒素总量为每毫克水华干重含相当于 0.4 μg MC-LR 的微囊藻毒素。

2.2 苹果无茵苗中微囊藻毒素的积累

如果人们用有微囊藻毒素的水灌溉植物,微囊藻毒素就有可能进入植物体内并积累。为了评估微囊藻毒素通过食物链对人类健康产生危害的可能性,本研究利用 ELISA 方法检测了微囊藻毒素在苹果组培幼苗中的积累情况。试验结果看出,随着 MCs 处理浓度增加和培养时间延长,苹果组培苗体内积累的微囊藻毒素含量逐渐增高,微囊藻毒素在

* 浙江省高校青年骨干教师资助项目和湖州师范学院优秀中青年骨干教师资助项目资助。

苹果组培苗中富集;但 $0.03 \mu\text{g/ml}$ 处理例外,14 天后苹果苗中毒素含量反而略低于 7 天后。苹果对照样品中检测不到微囊藻毒素的存在(见表 1)。

表 1 培养基添加微囊藻毒素(MCs)在苹果组培苗中的积累情况 ($n=3$)

MCs 浓度 $/\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$	组培苗 MC-LR equiv 浓度/ $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$		
	0 天	7 天	14 天
0(对照)	0	0	0
0.03	0	16.20 ± 0.73	14.76 ± 4.22
0.30	0	27.50 ± 3.54	43.94 ± 9.83
3.00	0	225.00 ± 25.62	510.23 ± 141.10

2.3 MCs 对苹果生长的影响

为了探讨微囊藻毒素对苹果生长和发育的影响,我们研究了滇池水华的粗提液对苹果组培苗生长的影响。试验结果表明,微囊藻毒素可显著影响苹果组培苗的分化和生长,当毒素浓度达到 $0.30 \mu\text{g/ml}$ 时,植株生长受到明显抑制,苹果无菌苗

的增殖系数也由对照的 18 倍骤减至 5 倍,植株叶片狭长,节间变短,植株呈浅黄色,表现出异常幼苗症状;当毒素浓度达到 $3.00 \mu\text{g/ml}$ 时,苹果植株几乎停止生长和分化,植株呈黄褐色(见图 1)。

微囊藻毒素是极强的促肿瘤剂,已被众多学者所共识,但是否能促进植物细胞的增殖尚未见有报道。鉴于此,我们研究了微囊藻毒素对苹果叶片、叶柄和茎段脱分化产生愈伤组织的影响。结果表明低浓度的 MCs 可以诱导苹果叶片、叶柄和茎段脱分化产生愈伤组织, $0.03 \mu\text{g/ml}$ 的 MCs 有利于苹果叶片脱分化,而 $0.12 \mu\text{g/ml}$ MCs 则可以诱导苹果叶柄和茎段的脱分化产生愈伤组织;随着 MCs 浓度的增加,诱导作用逐渐减弱并出现抑制现象,当 MCs 浓度达到 $1.92 \mu\text{g/ml}$ 时,微囊藻毒素对苹果叶片、叶柄和茎段外植体产生毒害作用,苹果叶片、叶柄和茎段逐渐变褐、死亡。

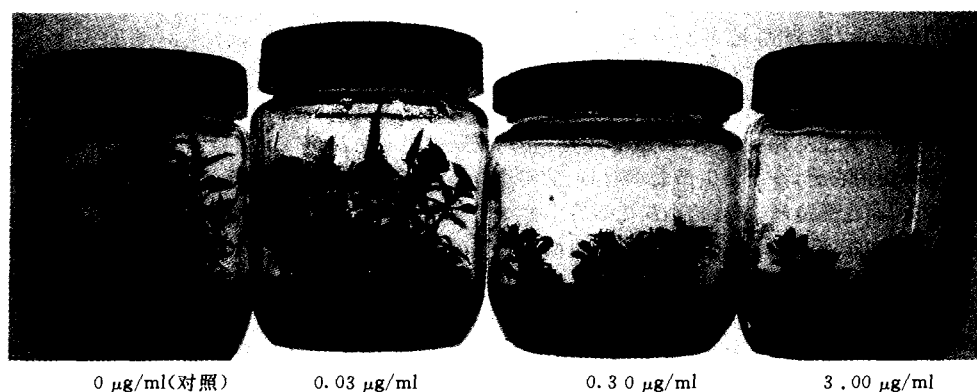


图 1 不同浓度微囊藻毒素处理 2 个月后苹果组培苗的生长状况

3 讨论

大部分关于微囊藻毒素对植物影响的研究都集中在单个微囊藻毒素异构体上。最近研究发现微囊藻毒素-LR、RR 和-LF 对芥菜生长的抑制效应存在显著差异^[4]。为了研究混合毒素对植物的作用效应,我们采用含有微囊藻毒素-RR、-LR 和-YR 的水华粗提液进行试验,这种毒素混合物的情况很大程度上代表了植物在自然界中所面临的环境。

虽然本研究的毒素处理浓度并不能很好地代表发生蓝藻水华时湖水^[5]或水库^[6]中的毒素含量,但微囊藻毒素是一种被认为很难降解的物质^[7],土壤中的微囊藻毒素可能被积累;Jones 和 Orr^[8]研究发现,在杀藻剂处理的湖水中曾检测到微囊藻毒素含量高达 $1\,300 \sim 1\,800 \mu\text{g/L}$ 。本试验结果表明,使用被蓝藻毒素污染的水灌溉将影响果树生长。

参 考 文 献

- [1] Rao P V L, Bhattacharaya R, Das Gupta S. Isolation, culture and toxicity of cyanobacterium (blue-green alga) *Microcystis aeruginosa* from freshwater source in India[J]. *Bull Environ Contam Toxicol*, 1994,52:878-885
- [2] Vasconcelos V M. Toxicity of cyanobacteria in lakes of North and Central Portugal. Ecological implications [J]. *Verh Inter Verein Limnol*, 1993, 25: 694-697
- [3] Oudra B, Loudiki M, Sbiyyaa B, et al. Isolation, characterization and quantification of microcystins (heptapeptides) hepatotoxins in *Microcystis aeruginosa* dominated bloom of Lalla Takerkoust lake-reservoir (Morocco)[J]. *Toxicon*, 2001, 39: 1375-1381
- [4] McElhiney J, Lawton L A, Leifert C. Investigations into the inhibitory effects of microcystins on plant growth, and the toxicity of plant tissues following exposure[J]. *Toxicon*, 2001, 39(9): 1411-1420
- [5] Lawton L A, Edwards C, Beattie K A, et al. Isola-

- tion and characterisation of microcystins from laboratory cultures and environmental samples of *Microcystis aeruginosa* and from an associated animal toxicosis [J]. *Nat Toxins*, 1995, 3: 50-57
- [6] Cousins I T, Bcaling D J, James H A, et al. Biodegradation of microcystin-LR by indigenous mixed bacterial populations[J]. *Wat Res*, 1996, 30: 481-484
- [7] Harada K I. Chemistry and detection of microcystins [M]. In: Watanabe, M. F., Harada, K. -I, Carmichael, W. W. and Fujiki, H. (Eds.), *Toxic Microcystis*, CRC Press, Boca Raton, FL, 1996, pp. 103-148
- [8] Jones G J, Orr P T. Release and degradation of microcystin following algicide treatment of a *Microcystis aeruginosa* bloom in a recreational lake, as determined by HPLC and protein phosphatase inhibition assay[J]. *Wat Res*, 1994, 28: 871-876

收稿日期: 2007-04-28

作者简介: 陈建中(1967-), 男, 博士, 副教授, 江苏泰兴人, 现从事果树生物技术和环境生物学研究。电话: (0572) 2321166, E-mail: jzchen@hut. zj. cn

少用农药防治好南方葡萄病害的综合措施

杨治元

王金良

(浙江省海盐县农业科学研究所 314300) (浙江省海盐县农经局植保站)

海盐县地处浙江北部, 属南方东部暖湿地区, 年平均温度 16.7℃, 年降雨量多数年份 1 300~1 400 mm, 年日照 1 700 小时左右。1987 年引种巨峰葡萄, 尔后每年均引入新品种。根据当时总结的经验, 葡萄防病 7 天左右用一次药, 雨后必用药, 多药混用。频繁使用农药, 不但使生产成本增高, 果实农药污染较重, 而且黑痘病、灰霉病和炭疽病等主要病害仍控制不住, 每年均受到一定的损失。我们在认真总结 1987—1993 年病害发生规律和病害防治经验教训的基础上, 从 1994 年开始, 在海盐县农业科学研究所葡萄实验园上进行少用农药防治病害的实践, 逐步探索到一套综合措施。

1 少用农药防治好病害实践概况

1994—2005 年的 12 年中, 试验园 3 种栽培方式的农药使用情况如下。

露地栽培: 1994—2000 年, 欧美杂交种品种, 全年使用农药次数平均为 14.9 次(8~19 次), 其中两药混用 2.4 次, 每 667 m² 农药成本 140.10 元(79.00~199.00 元)。

花前覆膜避雨栽培: 2001—2005 年, 欧美杂交种品种, 全年使用农药次数平均为 9.6 次, 其中两药混用 1 次, 每 667 m² 农药成本 95.00 元。

大棚促成栽培: 1999—2005 年, 欧亚种品种, 全年使用农药次数平均为 6.9 次, 其中两药混用 1 次, 每 667 m² 农药成本 69.30 元。

在这 12 年中黑痘病未发生过, 霜霉病、灰霉病和穗轴褐枯病均控制住。唯独欧亚种品种还在一定程度上受到穗轴白腐病为害, 其中美人指发病率 3% 左右, 其余品种 1% 左右。

2 少用农药防治好病害综合措施

2.1 保健栽培, 增强树体抗病力, 减轻发病 实施保健栽培, 改善葡萄园生态环境, 提高通风透光度, 促使根系发达, 树体健壮, 提高植株自身抗病能力, 是减轻和防治病害的基础。具体措施如下:

(1) 采用双十字 V 形架, 使冠幕分成通风带、结果带和光合带, 可减轻发病, 减少用药量。(2) 创造良好的土壤环境, 搞好水、土管理, 保持土壤疏松, 水气协调, 使根系具有活力。(3) 平衡施肥。晚秋每 667 m² 施鸡、鸭粪 1 t, 磷肥 50 kg。因品种特性施好催芽肥、膨果肥、着色肥和采果肥, 有些欧亚种补施秋肥, 要求“控氮, 稳磷, 增钾”, 掌握蔓、叶不徒长, 着果后果、蔓协调生长。(4) 合理整蔓。根据品种特性确定留梢量, 每 667 m² 留 2 500~3 000 条, 果穗以上副梢留 1 叶绝后摘心, 叶面积指数在 2~2.5, 叶片整齐分布在叶幕上, 蔓叶不郁闭, 叶叶见光, 通风透光良好。若蔓叶郁闭, 则很难控制灰霉病和穗轴褐枯病。(5) 控穗, 控产。按品种特性合理定穗, 不超量挂果, 每 667 m² 产量控制在 1 500 kg 左右。超量挂果, 很难控制白腐病。

2.2 上中下隔离栽培, 避免发病 上隔离: 设施栽培, 薄膜覆盖, 避免雨淋, 覆膜期基本免受黑痘病、炭疽病和霜霉病为害, 不必防治, 因而可减少用药 5~8 次。中隔离: 果穗套袋, 减轻病菌传到果穗, 减轻农药污染果穗。下隔离: 畦面铺双色反光膜, 减少土壤中病菌传播, 并有保湿和灭草效果。

2.3 绒球末期用好杀菌剂 试验园 3 种栽培方式均在葡萄绒球末期对树体和畦面喷波美 5 度石硫合剂, 杀灭越冬病原菌。此次用药原则为“宁焦勿早,