雪腐格氏霉粗毒素对小麦膜透性和结构的影响

左豫虎 康振生 吴学宏 李振岐
(西北农业大学植保系,陕西杨凌 712100)

摘 要 用电导法测定了小麦叶片经 Gn粗毒素处理后的组织细胞膜损伤情况,发现毒素能导致小麦叶片细胞内电解质外渗,不同抗性品种对毒素反应有明显差异,抗病品种的细胞损伤率明显低于感病品种。电镜观察发现,毒素还引起组织超微结构发生显著变化,包括叶绿体膜上出现电子致密度高的沉积物,基粒片层肿胀,排列紊乱;直至叶绿体、细胞核和整个细胞解体。损害发生最早最严重的是叶绿体基粒片层。抗病品种比感病品种的超微结构受害轻、反应迟。

关键词 小麦雪霉叶枯病,雪腐格氏霉,毒素,细胞膜,超微结构
中图分类号 S432.1, Q949.329.304

雪腐格氏霉 [*Gerlachia nivalis*,异名:雪腐镰刀菌 (*Fusarium nivalis*)] 是引致小麦雪霉叶枯病的病原菌。前人报道该菌能够产生毒素 (Gn-毒素)[1~3]及该菌在小麦寄主上的侵染过程[4,5],康振生[6]报道寄主叶绿体对毒素极为敏感。但关于该病菌毒素与致病性的关系、作用方式和对寄主超微结构的影响,以及利用毒素鉴定品种抗病性和筛选抗病体细胞突变体等方面还未见报道。本试验就该菌毒素对不同抗性小麦品种叶组织细胞膜渗透性和组织超微结构的影响进行了初步探索,为进一步研究该病菌的致病机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试小麦品种为西植 763(高感)、偃师 9号 (高感)、小偃 6号 (中抗)和 8525(高抗)。小麦种子经精选后播于花盆中,于常规条件下培育备用。粗毒素的制备按照左豫虎等[7]介绍的方法进行。

1.2 电导法测定粗毒素对叶片组织细胞膜的损伤率

参照刘惕若等[8]介绍的方法处理小麦叶片,测定粗毒素对小麦叶片组织细胞膜的损伤率。

1.3 电镜样品的毒素处理

自同一叶位叶片中部沿叶脉垂直方向切取 2 cm叶段,分别浸入 200 mL·L^{-1}的毒素滤液和水中 (CK),减压渗透 5 min后,在 20℃下保湿,于 2, 6, 12, 24 h分别取样 4次。

收稿日期 1997-09-19
课题来源 国家"九五"攻关项目
作者简介 左豫虎,男,1965年生,副研究员,硕士;现在黑龙江八一农垦大学植物科技学院工作 (黑龙江省密山市 158308)

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://w

1.4 电镜样品的制备和观察

样品固定、脱水、包埋均按常规方法[9]进行。样品超薄切片经醋酸双氧铀-柠檬酸铅双重染色后,于 JEM 2000EX型透射电镜下观察。

2 结果与分析

2.1 Gn-粗毒素对小麦叶片组织细胞膜的损伤作用

毒素对细胞膜具有损伤作用,可以破坏质膜透性,导致细胞内电解质外漏。表 1表明,不同抗性类型的小麦品种叶片对毒素反应存在明显的差异,用 250 mL·L^{-1}粗毒素处理叶片后,不同品种的电解质外渗量差异不明显,只有小偃 6号略高,其细胞膜损伤率为 43.22%。500 mL·L^{-1}的粗毒素处理叶片后,感病品种西植 763和偃师 9号的细胞膜损伤率明显增高,分别为 74.52%和 60.19%,而抗病品种小偃 6号和 8525的细胞膜损伤率增高不明显。继续提高毒素浓度至粗毒素原液,不同品种间细胞膜损伤率的差异亦不明显。这说明感病品种对毒素反应特别敏感,中抗品种小偃 6号对粗毒素比较敏感,但其细胞膜损伤率随毒素浓度增高变化不大,对毒素有一定的耐受力,应属耐病类型;而抗病品种 8525对粗毒素不敏感,抗性较强。这一结果与田间鉴定结果[10]一致,说明用电导法测定毒素对寄主细胞膜的损伤率可以用于进行品种抗性鉴定。试验证明,500 mL·L^{-1}粗毒素为试验最适浓度,浓度过低或过高品种间差异均不显著,这可能是因为浓度过低,毒素致毒性较弱,品种间反应不明显,而浓度过高达到了致死浓度,抗性品种失去了对毒素的耐受力,品种间的差异也不明显。

表 1 粗毒素对不同抗性品种叶片组织细胞膜的损伤率 %

毒素浓度 (mL·L^{-1})	西植 763	偃师 9号	小偃 6号	8525
250	16.08	24.08	43.22	13.19
500	74.52	60.19	66.23	33.76
1000	85.27	68.94	58.32	62.14

2.2 粗毒素对小麦叶组织超微结构的影响

2.2.1 对照叶组织 用蒸馏水处理的叶组织细胞超微结构正常,细胞器沿细胞膜均匀分布。线粒体丰富,其形状依切片角度呈球形或长椭圆形,嵴明晰可见;叶绿体内基粒片层排列整齐有序,基质均匀;细胞核内核质均匀丰富,核膜、液泡膜等原生质膜均匀连续 (图版 –1)。

2.2.2 粗毒素处理的感病叶组织 粗毒素处理感病品种西植 763叶组织 2 h,除可见叶绿体 (CH)基粒片层稍微肿胀外,叶组织的超微结构基本正常 (图版 –2)。处理后 6 h,组织中可见的明显变化是叶绿体 (CH)膜上出现了电子致密度高的沉积物 (图版 –4),基粒片层有的正常,有的肿胀不规则,并且出现空腔 (图版 –3)。处理后 12 h,叶绿体中片层普遍肿胀,排列紊乱,空腔增大;有的叶绿体膜和核膜变得模糊不连续,细胞核染色加深 (图版 –6);线粒体 (M)内只能见到极少的嵴,可能大部分嵴已被消解 (图版 –5)。处理后 24 h,叶绿体、细胞核解体,线粒体空泡化,细胞壁不规则内陷,整个细胞开始解体。

2.2.3 粗毒素处理的抗病叶组织 粗毒素处理抗病品种 8525的叶组织 2 h,电镜下观

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://w

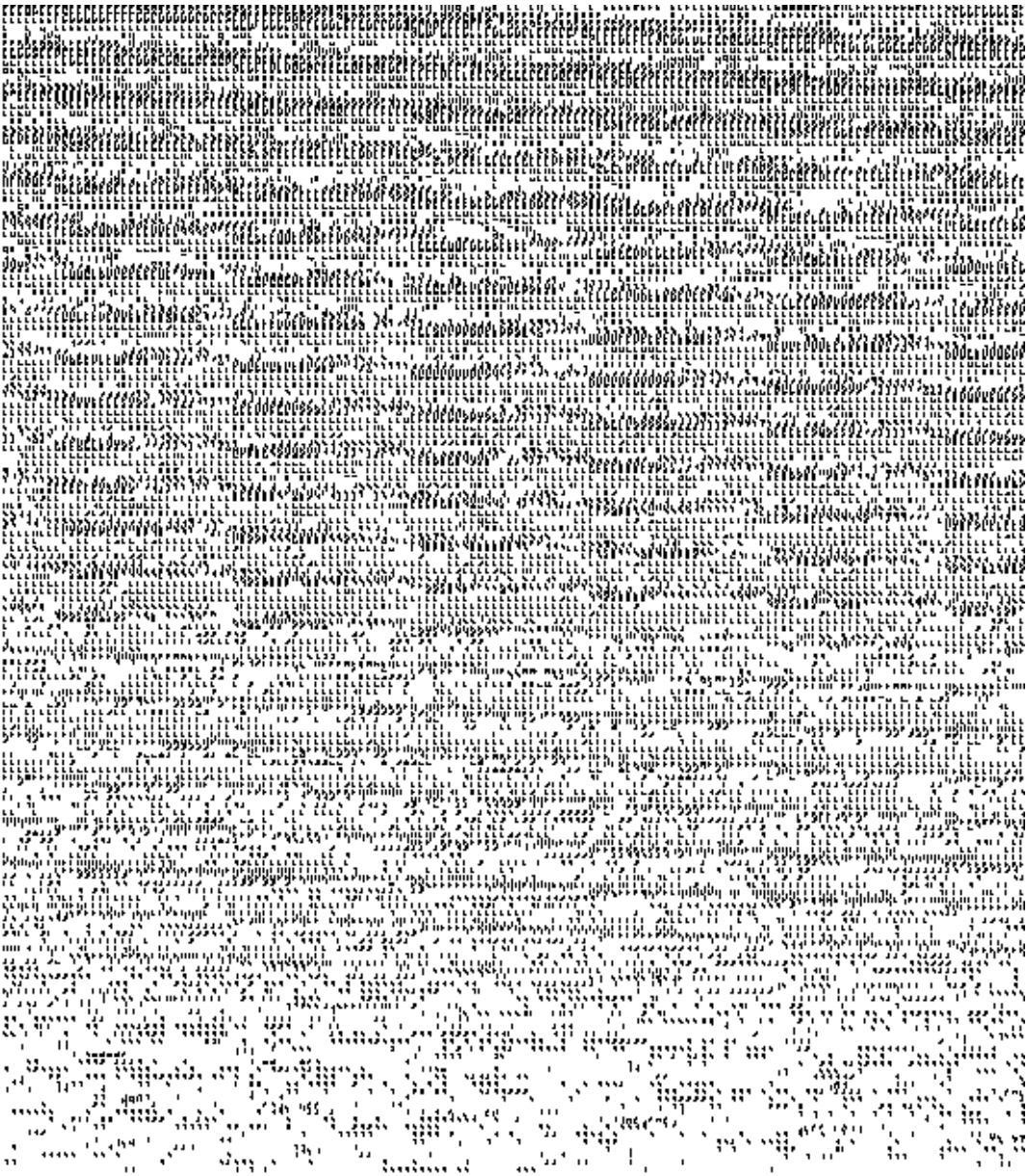

图 版 说 明

1. 西植 763(感病),对照处理 2 h,细胞超微结构正常(6480×);

2. 西植 763,粗毒素处理 2 h,可见基粒片层稍微肿胀,细胞超微结构基本正常(10 799.7×);

3. 西植 763,粗毒素处理 6 h,叶绿体基粒片层有的正常,有的肿胀不规则,出现空腔(12 960×);

4. 西植 763,粗毒素处理 6 h,叶绿体膜上出现电子致密度高的沉积物(54 002.7×)

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://w

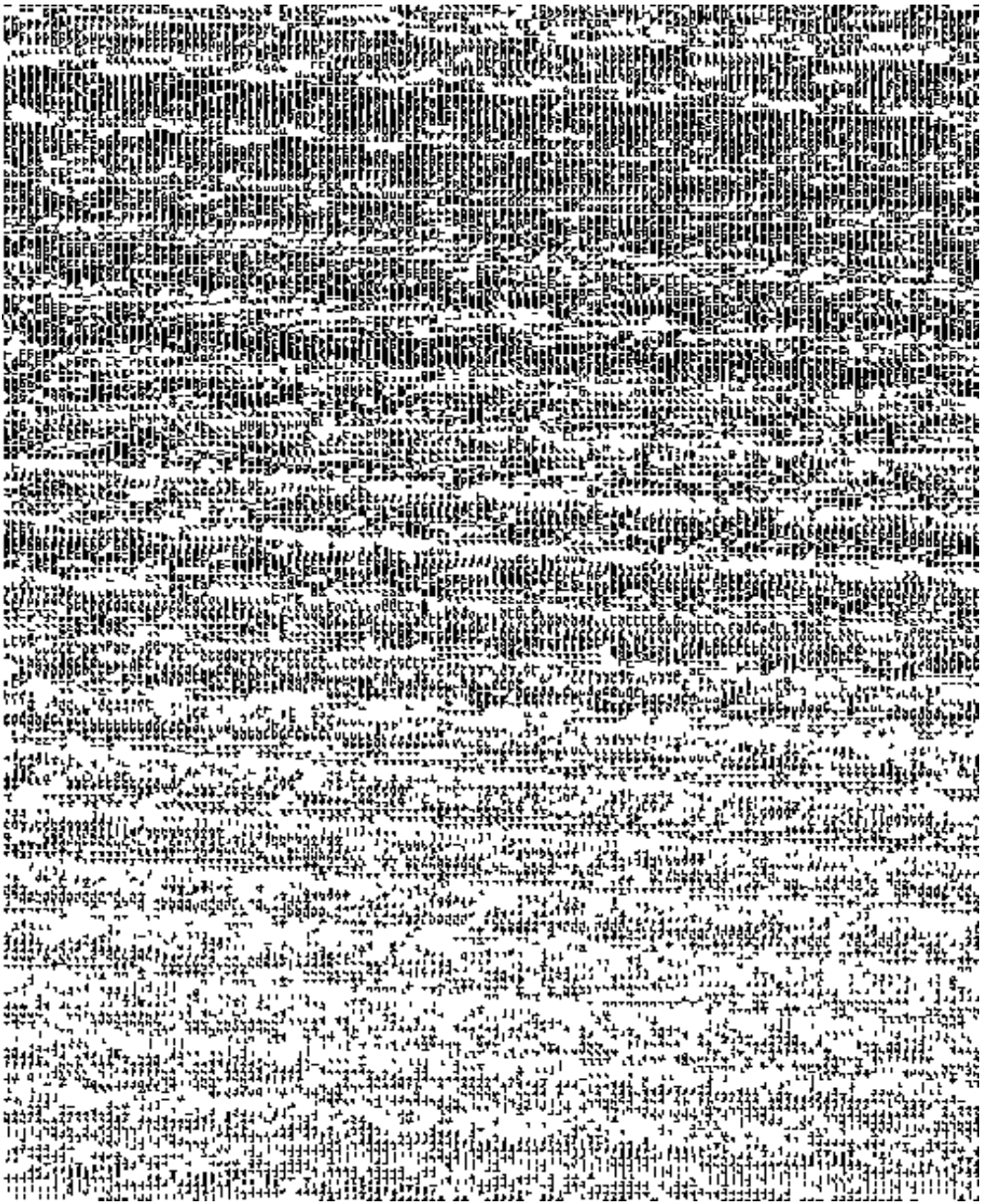

图 版 说 明

5.西植 763,粗毒素处理 12 h,线粒体内大部分嵴被消解 (12 960×);

6.西植 763,粗毒素处理 12 h,叶绿体膜和核膜模糊不连续 ,细胞核染色加深 (10 799.7×);

7. 8525(抗病) ,粗毒素处理 6 h,细胞内少数叶绿体基粒片层肿胀 (12 960×);

8. 8525,粗毒素处理 24 h,叶绿体膜内陷 ,基粒片层肿胀严重 ,排列紊乱 ,出现空腔 ,线粒体嵴模糊不清 (10 799.7×)

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://w

察,组织超微结构均正常,叶绿体基粒片层排列整齐有序,未出现任何肿胀。处理后 6 h,只有少数叶绿体基粒片层肿胀 (图版 -7),有些叶绿体膜上出现了电子致密度高的沉积物,线粒体、细胞核、液泡等组织超微结构基本正常。处理后 12 h,组织超微结构变化不大,叶绿体基粒片层较处理 6 h肿胀略微增加,排列仍较整齐; 线粒体未见损害,膜均匀连续,嵴清晰可见。处理后 24 h,叶绿体基粒片层肿胀严重,排列紊乱不规则,出现空腔,叶绿体出现内陷,不规则,线粒体 (M)嵴模糊不清 (图版 -8)。

3 讨　论

用电导法测定粗毒素导致叶片组织细胞膜的损伤情况,能够反应出品种的不同抗性。对不同抗性小麦品种叶片组织细胞膜损伤率测定结果表明,不同抗性小麦品种对毒素反应有明显差异,抗病品种的细胞膜损伤率明显低于感病品种。但叶组织电阻大小除与毒素致病性有关外,还与小麦本身的生长发育状况、叶龄、部位、组织含水量等有关,因此在使用此方法时,要力求在各种条件一致情况下进行,避免误差产生。此外,值得一提的是,田间鉴定小偃 6号为中抗品种[10],但电导率测定结果,小偃 6号对 Gn粗毒素反应敏感,在粗毒素浓度为 250 mL· L^{-1}时,其细胞膜损伤率高达 43.22%,甚至远高于感病品种 (表 1),但似乎对毒素浓度的升高反应迟钝,随着浓度的升高,感病品种细胞膜损伤率急剧增高,而小偃 6号变化不大。这是否是由于小偃 6号属耐病类型,对毒素的耐受性较强,其抗病机制还不清楚。

离体叶片经真空导入毒素后,可观察到寄主细胞超微结构发生剧烈的变化,叶绿体膜上出现电子致密度高的沉积物,基粒片层肿胀,排列紊乱,出现空泡,最后解体; 线粒体空泡化; 细胞核解体; 最终整个细胞解体。抗病品种较感病品种对毒素反应约推迟 12 h.该结果与病原菌侵入寄主细胞后导致其超微结构的变化一致[4],只是超微结构的反应较病菌侵入发生得早。作者认为寄主受病原菌侵染后所发生的病理生理变化主要是由于病菌产生的毒素所引起,病原菌侵入寄主到产生达到致病量的毒素需要一段时间,因此超微结构发生变化较直接导入毒素发生的迟。

迄今为止,已报道 *Pseudomonas syringae* pv. *tagetis* 产生的毒素 tagetitoxin, *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* 产生的毒素 tabtoxin, *Cercospora beticoal* 产生的毒素 cercosporin, HS-毒素,维多利亚毒素和 AM-毒素等对叶绿体有破坏作用。其表现在叶绿体内基粒片层膨胀,基粒数目减少,出现大量泡囊,质体小球数增多,质体形状不规则等[11,12]。本研究发现叶绿体是细胞中最易受毒素伤害的细胞器,基粒片层变化发生得最早,感病品种西植 763在处理 2 h时即可见基粒片层肿胀,由此看来,叶绿体可能是 Gn-毒素作用的初始位点。随着处理时间的延长,还可观察到叶绿体膜和核膜模糊不连续,线粒体嵴减少空泡化,直至整个细胞解体。说明 Gn-毒素的作用位点并不仅仅在叶绿体上,而可能是作用于膜系统。

叶组织用 Gn-毒素处理后,抗病品种 8525较感病品种受害轻,超微结构变化发生得迟,但在抗病品种叶组织内尚未发现有其他特异的变化,进一步弄清其抗病机制将给抗病育种工作提供理论依据,在理论和实践上都具有重要意义。

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://w

参 考 文 献

1 宁毓华,冯益民,杨 桦等.小麦雪霉病菌粗毒素的提取及其致病性鉴定方法的研究.西北农业学报, 1992, 1(4): 15~ 18

2 Ueno Y, *et al*. Chem Pharm Bull, 1970, 18: 304

3 Ueno Y, *et al*. Japan J Exp Med, 1971, 41: 521

4 康振生,左豫虎,王 瑶等.小麦雪霉叶枯病菌侵染过程的细胞学研究.真菌学报, 1996, 15(4): 284~ 287

5 商鸿生,王树权,齐艳红等.小麦雪霉叶枯病菌侵染过程.植物病理学报, 1989, 19(3): 155~ 159

6 康振生.植物病原真菌的超微结构.北京: 中国科学技术出版社, 1995. 50~ 51

7 左豫虎,康振生,李振岐等.雪腐格氏霉产毒培养基的筛选及培养条件.西北农业大学学报, 1996, 24(4): 6~ 9

8 刘惕若,薛国兴,张匀华.小麦品种对赤霉病的抗性.黑龙江八一农垦大学学报, 1989(1): 9~ 18

9 康振生,李振岐,商鸿生等.小麦条锈菌胞间菌丝的超微结构和细胞化学研究.真菌学报, 1993, 12(3): 208~ 213

10 王保通,段双科.小麦雪霉叶枯病产量损失及品种初步研究.见: 陕西省植物保护研究所编.植物保护研究.西安: 陕西科学技术出版社, 1992. 150~ 152

11 Jutte S M, Durbin R D. Ultrasturctural effects in Zinnia leaves of a chlorosis-inducing toxin from *Pseudomonas tagetis*. Phytopathology, 1979, 69: 839~ 842

12 Durbin R D. Chlorosis-inducing pseudomonacl toxins: their mechanism of action and structure. In: Ouchis Akais, eds. Morphological and Biochemical Eventsin Plant Parasite Interaction. Tokyo: Phytopathology Society Japan, 1971. 369~ 382

The Effect of Crude Toxin from *Gerlachia nivalis* on the Membrane Permeability and Ultrastructure of Wheat Leaf

Zuo Yuhu Kang Zhensheng Wu Xuehong Li Zhenqi

(*Department of Plant Protection, Northwestern Agricultural University, Yangling, Shaanxi*, 712100)

Abstract The damage of wheat cell membrane treated with crude toxin is examined by electrical conductivity method and it is found that the toxin can damage wheat leaf tissue cell membrane and cause it's leakage of electrolytes in the cell, but there is an obvious difference to toxin for different resistant cultivars. The cell damage rate of the resistant cultivars is lower than that of susceptible cultivars. It has been also observed that toxin results in the obvious change in ultrastructure of wheat leaf, including dilated, disorganized and vacuolated grana lamellae, vacuolated mitochondrion and high density electron deposition located on the chloroplast membrane. The chloroplast, nuclear and cell collapse successively. The damage of chloroplast occurs earliest and seriously. The effect of toxin on ultrastructure is heavier and faster on susceptible cultivars than on resistant cultivars.

Key words gerlachia leaf blight of wheat, *Gerlachia nivalis*, toxin, membrane, ultrastructure

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://w