

文章编号: 1005-0906(2007)03-0084-03

玉米弯孢菌毒素对寄主细胞膜脂过氧化作用的研究

唐树戈¹, 王 芬¹, 高增贵¹, 庄敬华¹, 陈 捷²

(1. 沈阳农业大学, 沈阳 110161; 2. 上海交通大学, 上海 201101)

摘 要: 实验以黄早四玉米幼苗为试材, 研究玉米弯孢菌毒素对细胞质膜的伤害。结果表明, 玉米叶片经过毒素一定时间的处理, 在亲和组织中 MDA 的含量上升, 细胞膜的透性增大。同时, 这种破坏作用与毒素的浓度呈正相关, 并且随着处理时间的延长, 伤害指数和 MDA 都增大。

关键词: 玉米弯孢菌; 毒素; 细胞膜脂过氧化; MDA

中图分类号: S513

文献标识码: A

Influence of Toxin By Curvularia lunata on Superoxidation of Membrane Lipid in Corn Cell

TANG Shu-ge¹, WANG Feng¹, GAO Zeng-gui¹, ZHUANG Jing-hua¹, CHEN Jie²

(1. Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161; 2. Shanghai Jiaotong University, Shanghai 201101, China)

Abstract: Superoxidation of membrane lipid in corn leaf cells had been studied by researching the content of MDA under toxin stress. The results of experiment showed that the content MDA ascended in compatible combination, the permeability of corn cell membrane had increased. There were positive correlation between toxin effect and time exposure to toxin. This indicated that the toxin destroyed the permeability of corn cell membrane.

Key words: Curvularia lunata; Toxin; Superoxidation of membrane lipid; MDA

玉米弯孢菌叶斑病是玉米的一种重要叶斑类病害, 在世界各地均有发生, 常常造成大面积减产。自从发现维多利亚长蠕孢毒素以来, 人们已经认识到毒素在致病过程中的重要作用。细胞膜是毒素重要的作用位点, 通过与特异蛋白的结合影响膜的透性, 使电解质外渗, 最后导致植株的枯萎、死亡。本研究讨论在玉米弯孢菌毒素的作用下, 寄主细胞膜的变化, 为深入研究该毒素的致病机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试菌株及玉米

供试毒素为玉米弯孢菌的粗毒素(由东单 60 菌株产生), 由沈阳农业大学植物免疫室提供。

玉米为自交系黄早四、沈 135、E28、Mo17, 由沈阳农业大学植物免疫室提供。

1.2 方法

(1) 玉米幼苗的培养与处理。玉米种子首先用 1% 的甲醛溶液处理, 25℃ 下催芽, 播种于温室花盆中。20 d 后(约 4 叶期)剪下幼苗的叶片, 取第 3 叶片用于测定。

(2) 电解质渗漏的测定。将剪下的玉米叶片, 用直径为 $\Phi=1$ cm 的打孔器打出叶圆片, 将其放入盛有不同浓度毒素提取液的抽滤瓶中, 减压 20 min 后, 分别作用 6、12、24、48、72、96 和 120 h, 然后用无离子水冲洗干净, 在每个试管中加入 10 mL 的无离子水, 使叶圆片完全浸入在水中, 并将试管放入真空干燥器中, 减压 20 min, 然后缓慢放入空气恢复常压, 有利于细胞内电解质的外渗, 取出试管在室温下保持 30 min 并多次振荡, 分别测定其电导率 L_1 , 以无离子水为对照测其电导率为 L_2 , 对细胞膜的伤害度按以下公式计算: L_1-L_2 。

(3) 丙二醛(MDA)的测定。取经毒素处理 6、12、

收稿日期: 2006-11-23

基金项目: 辽宁省教育厅资助项目(05L406)

作者简介: 唐树戈(1971), 女, 辽宁省盖州人, 博士, 副教授, 从事植物病理学研究。E-mail: tangshuge@sina.com

陈捷为本文通讯作者。

24、48、72、96 和 120 h 的玉米叶圆片 0.5 g, 用自来水、蒸馏水及无离子水冲洗干净, 并用纱布吸干水分, 加入 2 mL 10%的 TCA(三氯乙酸)和少量石英砂研磨成浆, 然后加入 8 mL 10%的 TCA, 4 000 r/min 离心 20 min, 取上清液保存备用。

反应体系: 2 mL 0.6%TBA (硫代巴比妥酸)+2 mL 上清液混匀后在沸水中反应 15 min, 迅速冷却, 于 4 000 r/min 离心 20 min, 取上清液在 532 nm、600 nm、450 nm 下测定其吸光度。按以下公式计算 MDA 的含量:

MDA 的含量(μmol/L)=6.45 × (D₅₃₂-D₆₀₀)-0.56 × D₄₅₀

2 结果与分析

2.1 玉米弯孢菌毒素对不同自交系细胞膜透性的影响

表 1 不同处理时间毒素对不同玉米自交系细胞膜透性的影响

Table1 The effect of toxin on cell menbrance permeability of various inbred under various treatment time				
时间(h)	伤害指数(μ S/cm) Damage value			
Time	黄早四	E28	Mo17	沈 135
6	3.4	2.1	1.6	0.4
12	12.6	7.8	4.6	1.8
24	28.7	17.8	9.6	4.5
48	27.6	17.4	9.4	5.6
72	27.5	17.6	9.4	5.5
96	28.0	17.2	9.5	5.4
120	27.8	17.6	9.7	5.5

从表 1 可知, 毒素对不同玉米自交系细胞膜透性的影响存在显著差异, 在相同的处理时间时(如处理 24 h), 沈 135 细胞内的电解质外渗较少, 说明对细胞膜的伤害程度最小。Mo17、E28 次之, 黄早四外渗电解质的电导率最大, 对细胞膜的伤害最大。这种区别表现为不同玉米自交系在抗病性上的差异, 沈 135 的抗病性较强, 而黄早四抗病性较弱。以上数据表明, 随着毒素处理时间的延长, 细胞膜的透性增大, 这说明毒素对细胞膜有伤害作用。

2.2 玉米弯孢菌毒素处理时间不同对细胞膜透性的影响

随着处理时间的延长, 不同玉米叶片的细胞膜透性都增加。感病品种如黄早四, 24 h 内细胞膜透性增加, 处理 24 h 时达到最大值, 再延长处理时间, 对细胞膜的伤害程度并不增加; 中等抗病品种如 Mo17 在 24 h 伤害度达到最大值; 抗病品种沈 135 对细胞

膜的伤害指数趋势相同, 只是伤害指数达到最大值的时间推迟到 48 h, 随着时间的延长, 电解质的电导率没有明显变化。

2.3 不同稀释倍数毒素对细胞膜透性的影响

表 2 不同浓度毒素对不同玉米自交系细胞膜透性的影响

Table 2 The effect of toxin of various concentration on cell menbrance permeability of various inbred				
24 h				
浓 度	伤害指数(μ S/cm) Damage value			
Concentration	黄早四	E28	Mo17	沈 135
稀释 1 倍	17.6	10.2	6.5	2.6
稀释 2 倍	9.5	5.8	3.0	1.1
稀释 4 倍	5.4	3.2	1.2	0.6
稀释 8 倍	2.1	1.4	0.4	0.0
稀释 16 倍	0.7	0.5	0.0	0.0
稀释 32 倍	0.1	0.1	0.0	0.0
稀释 64 倍	0.0	0.0	0.0	0.0

用不同浓度的毒素处理不同自交系的玉米叶片, 从其电导率值表明, 毒素的浓度越低, 伤害指数下降, 对细胞膜的破坏程度减小。但下降速度与不同自交系的抗性有关, 感病品种在稀释 32 倍时, 电导率接近 0, 此时处理叶片的电导率与对照相近。中等抗性的玉米品种, 在稀释 16 倍时电导率为 0, 而抗性品种在稀释 8 倍时, 毒素不能破坏寄主细胞的膜结构。综上所述, 玉米弯孢菌毒素对细胞膜存在破坏作用, 其破坏能力与自交系的抗病性有密切关系, 抗病品种抵御毒素作用的能力较强, 感病品种的这种能力较弱。

2.4 丙二醛(MDA)的测定

表 3 不同自交系用毒素处理后 MDA 的变化

Table 3 The chang of MDA in toxin treatment				
自交系	时间(h)	对 照	处理	相对于对照的
Inbred lines	Time	(μmol/L)	(μmol/L)	变化率(%)
		CK	Treatment	Percent of relative to CK
黄早四	12	0.47	0.50	6.40
	24	0.54	0.79	46.30
	48	0.63	0.69	9.50
	72	0.46	0.51	10.80
	96	0.50	0.52	4.00
E28	12	0.56	0.60	7.10
	24	0.52	0.64	23.10
	48	0.48	0.52	8.30
	72	0.50	0.53	6.00
	96	0.53	0.55	3.70

续表 3 Continued 3				
自交系	时间(h)	对 照	处 理	相对于对照的
Inbred lines	Time	($\mu\text{mol/L}$)	($\mu\text{mol/L}$)	变化率(%)
		CK	Treatment	Pecent of relative to CK
Mo17	12	0.47	0.50	6.40
	24	0.50	0.59	18.00
	48	0.48	0.53	10.40
	72	0.49	0.53	8.20
	96	0.51	0.52	5.80
沈 135	12	0.38	0.40	5.20
	24	0.36	0.42	13.20
	48	0.39	0.41	5.12
	72	0.35	0.36	2.80
	96	0.34	0.36	5.80

用毒素处理不同自交系，在细胞中 MDA 的含量抗感品种是不同的，抗病品种中 MDA 含量的变化没有感病品种的大,而且低于感病品种,抗病的玉米叶片细胞对毒素的忍耐力较强。用毒素处理 24 h 后,MDA 的含量达到最高值，此时毒素对细胞膜的伤害度最大,48h 后细胞膜脂过氧化较低,与对照偏离不大。随着时间的延长，可能由于寄主细胞的老化,处理与对照间的差异变小。

3 讨 论

质膜透性是反映膜结构完整性的一个指标，一定程度上反映了膜结构的受损伤程度，病原菌侵染

引起细胞内电解质等内容物外渗，通常认为是质膜透性改变的标志。MDA 的含量反映了细胞膜脂过氧化程度，也能在一定程度上反映细胞膜的受伤害程度。本实验表明,毒素处理后在亲和组织上能够造成较严重的伤害,细胞膜脂过氧化程度高;在非亲和组织上的伤害程度较小,膜脂过氧化程度低,其原因可能是由于在亲和组织上存在毒素特异的结合蛋白，破坏细胞膜的结构,影响一系列的代谢活动;而在非亲和组织上不存在这种结合蛋白，或是结合蛋白不能与毒素作用,从而表现出抗性,也可能由于非亲和组织有很好的自我修复能力。毒素的致死作用可能是与细胞质反应,直接影响玉米的代谢过程,这些有待于进一步的研究。

参考文献:

[1] 董金皋,等. 玉米大斑病 HT- 毒素对玉米细胞膜透性和 Vc 氧化酶、PPO 活性的影响[J]. 玉米科学,1997,5(2):77-80 .
[2] 王罗霞,等. 一氧化氮对水分胁迫下小麦叶片活性氧代谢及膜脂过氧化的影响[J]. 草业学报,2006,15(4):104-108 .
[3] 韩建民,等. 玉米大斑病菌 HT- 毒素对玉米叶片木质素含量的影响[J]. 沈阳农业大学学报, 2000,31(5):456-459 .
[4] 董金皋,等.玉米大斑病 HT- 毒素与玉米细胞的 PAL 和 PPO 酶活性[J]. 山东农业大学学报,1999,30(增刊):114-117 .
[5] 董金皋, 等. 玉米大斑菌毒素组分分析 [J]. 植物病理学报, 1996,23(3):139-144 .

(责任编辑:李万良)