

# 小麦秆锈病细胞间隙液的提取及注射技术研究

徐建强<sup>1</sup>, 侯颖<sup>2</sup>, 曹远银<sup>3</sup>, 林晓民<sup>1</sup>, 周雷<sup>3</sup>

(1. 河南科技大学林学院, 洛阳 471003; 2. 河南科技大学食品与生物工程学院, 洛阳 471003;  
3. 沈阳农业大学植物免疫研究所, 沈阳 110161)

**摘要:** 通过真空渗入离心法提取小麦秆锈病组织的细胞间隙液, 并采用注入法将细胞间隙液注入到健康的小麦细胞, 研究了小麦秆锈病细胞间隙液对小麦叶片细胞 HR 的诱导作用, 明确了细胞间隙液的提取和注射技术在小麦秆锈病细胞间隙液研究中的可行性。

**关键词:** 小麦秆锈病; 细胞间隙液; 寄主病原互作

中图分类号: S435.121.4<sup>+</sup>1 文献标识码: A 文章编号: 1004-1389(2006)02-0066-03

## Studies on the Extracting and Injecting Technique of IWF for *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*

XU Jian qiang<sup>1</sup>, HOU Ying<sup>2</sup>, CAO Yuan Yin<sup>3</sup>, LIN Xiao min<sup>2</sup> and ZHOU Lei<sup>3</sup>

(1. College of Forestry, He'nan University of Science and Technology, Luoyang 471003 China;  
2. College of Food and Engineering, He'nan University of Science and Technology, Luoyang 471003 China;  
3. Institute of Plant Immunity, Shenyang University of Agriculture, Shenyang 110161 China)

**Abstract:** Primary leaves of wheat infected by the *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* were detached, infiltrated with redistilled water, and centrifuged to yield intercellular washing fluids (IWF). IWF were then injected into the healthy wheat leaves. The result showed the induction of IWF to the hypersensitive reaction (HR) on wheat leaves. Two methods were available in the research of IWF.

**Key words:** Wheat stem rust; Intercellular washing fluids; The interaction between wheat and stem rust

作为一种专性寄生菌, 小麦秆锈菌侵入寄主后, 以吸器伸入寄主细胞内吸收营养, 但吸器并不破坏寄主原生质膜, 在寄主原生质膜与吸器之间有吸器外间质区域的存在<sup>[1]</sup>。由于吸器在寄主病原相互识别及营养交换方面具有重要作用, 所以吸器外间质区域的物质中可能含有寄主病原互作中的激发子类物质。这方面的研究对于揭示寄主病原互作中的信号传递及抗性反应的表达具有重要意义<sup>[2]</sup>。

细胞间隙液 (Intercellular washing fluids, IWF) 是指小麦叶片细胞之间的物质, 在秆锈菌侵入小麦后, 细胞间隙液里也包括了吸器同寄主原

生质膜之间即吸器外间质区域的物质以及秆锈菌菌丝同小麦细胞之间的物质, 里面可能有寄主病原互作中的激发子类物质<sup>[3]</sup>。本研究通过真空离心抽提的方法提取小麦秆锈病 IWF, 利用注射器将提取到的 IWF 注射到小麦健叶中, 初步明确了细胞间隙液在小麦同秆锈菌互作中的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试的小麦秆锈菌菌系和抗秆锈病单基因系

供试的小麦秆锈菌生理小种为 34MKG, 供试的小麦单基因系为 Sr5。在温室里进行幼苗种

\* 收稿日期: 2005 10 25 修回日期: 2005 12 10

基金项目: 国家十五科技攻关项目(2001BA509 B03); 河南科技大学人才科学研究基金资助(04087)。

作者简介: 徐建强(1979), 男, 河南商丘人, 硕士, 河南科技大学林学院讲师, 从事植物病害寄主病原互作研究。电话: 132 33993876, E-mail: xujqust@126.com.

植,正常培养。待小麦长至一叶一心时采用涂抹法接种,接种后置于温室中常规培养。

## 1.2 IWF的提取技术

参考王庆梅<sup>[1]</sup>、Rohringer<sup>[4]</sup>和 Deverall<sup>[5]</sup>的真空渗入离心法提取 IWF(略有改动)。

小麦叶片接种后初显潜育斑时提取 IWF,同时从未接种的小麦叶片中也提取 IWF,作为对照。

将初显潜育斑的小麦幼苗第一片叶剪下,去除叶尖,将叶片剪成 4 cm 的叶段,重蒸水冲洗切口,用细线束紧,两束为一批放入大试管中,用冰冷的重蒸水浸没,放入真空干燥器中抽真空,每次 3~5 min,连续抽 3 次,随后将试管里的叶段颠倒,重复上述步骤,直至每个叶段都有重蒸水渗入(叶片颜色深绿)。将叶片从大试管中取出,在滤纸上晾干至叶表无附水。用细线束紧小麦叶段,放入离心管中,线头留在离心管外,使叶段离离心管底部约 2 cm 左右的距离,随后盖紧离心管管帽,在高速冷冻离心机中 5 000 r/min 离心 15 min,收集离心管底部的液体,再以 12 000 r/min 离心 5 min 除去细胞碎片,离心操作均在 4℃条件下进行,将最后得到的液体收集起来在 20℃冰箱中保存。对得到的细胞间隙液进行编号处理,如 IWF<sub>34MKG Sr5</sub>表示 Sr5 接种 34MKG 后的 IWF。

## 1.3 IWF的注射技术

1.3.1 注射器的制作 参照邓恩新<sup>[6]</sup>的方法,略有改动。取 6 mL 青霉素瓶的胶质瓶盖 2 个,将瓶盖的表面磨平,在一个瓶盖的中央用红热的粗铁丝烫出圆形小凹穴(深 3 mm,穴直径可选用不同粗细的铁丝来控制,以不超过 5 mm 为宜,过大针尖易刺伤叶片),然后将 2 个瓶盖的背部小穴用棉花等塞紧、压实。用 1 mL 医用注射器和 4 号针头,从烫有凹穴的瓶盖沿侧面刺入,针尖露出在瓶盖凹穴底部中央,即制作成一个可向植物薄叶片内注射溶液的注射器。

1.3.2 IWF 的注射方法 取下注射器的针头(不要将针头从瓶盖中拔出),用针管吸取液体,安上带有具凹瓶盖的针头,再手拿另一个瓶盖,用食指和拇指将植物叶片夹持在两瓶盖中间,使叶背面向有凹穴的瓶盖,用力夹紧,右手注射。液体在压力作用下自气孔进入小麦叶片细胞间隙内,向叶片两端迅速扩散,浸润区清晰可见。

## 1.4 IWF 注射对小麦叶片的影响

分别向小麦健叶中注射重蒸水、IWF<sub>Sr5</sub>、

IWF<sub>34MKG Sr5</sub>,于注射后第 10 d 观察注射不同液体对小麦叶片的影响。

## 1.5 IWF 提取和注射中对小麦叶片细胞损伤的研究

对 IWF 提取及注射后的小麦叶片进行透射电镜观察,按照常规方法进行电镜样品制备和观察。

## 2 结果与分析

### 2.1 IWF 的一般性质及产生比例

采用真空渗入离心法,本研究获得了小麦对照及感病组合的细胞间隙液。接种后的细胞间隙液一般为黄色,未接种的为无色或浅黄色。细胞间隙液的 pH 值一般在 6.0 左右,呈酸性。对小麦叶片提取前后进行称重,然后计算细胞间隙液的产出量,结果表明:IWF 的产出量一般在 3 mL/10g 叶片左右,小麦叶片中物质的失去量在 0.05 g/g,即 1 g 小麦叶片在提取 IWF 后会有 0.05 g 物质失去。

### 2.2 IWF 的注射技术

用自制的注射器向 7 d 龄的小麦第一片叶内注射液体时,液体一般可浸润到注射点上、下各 2 cm 左右,注入量约为 0.5 mL。注射前将小麦先从温室移至光照较弱的实验室内,1 h 左右后最易注射。初次注射时液体易从瓶盖裂缝中间漏出,或折断叶片,多次练习后即可掌握协调用力的技巧。另外,应用此法注射,一次不要注射太多,时间过长手指酸疼,影响注射效果。

### 2.3 IWF 注射对小麦叶片 HR 的诱导

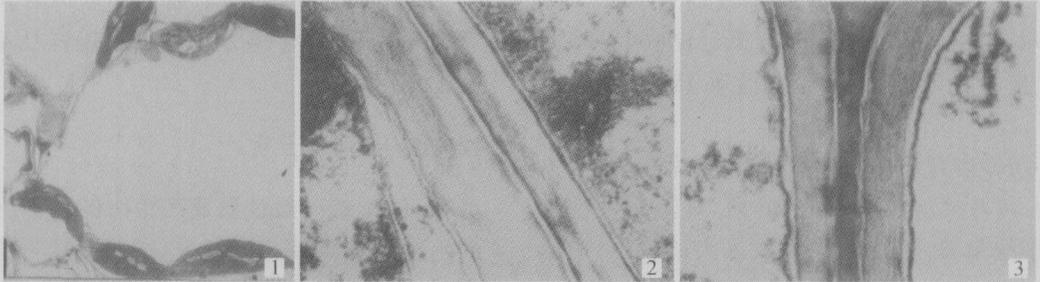
利用注射器向健叶中注射液体后发现:注射重蒸水或注射健叶来源的细胞间隙液对小麦叶片无明显影响,只不过在注射点周围出现局部坏死,这可能是注射中对小麦造成的局部性机械损伤。但是注射接种后小麦叶片的细胞间隙液不仅使注射点周围细胞坏死,而且在细胞间隙液的浸润区均见到小麦细胞坏死的现象,且叶尖处也表现出了不同程度的坏死,这种反应类似于 HR 反应。王东梅在研究小麦叶锈病 IWF 时也观察了相同的结果<sup>[7]</sup>。

由此可以看出:IWF 的注射会对小麦叶片造成轻度的局部的损伤;接种后的小麦叶片的细胞间隙液在物质组成上由于秆锈菌的侵染而不同于健叶来源的 IWF,里面可能含有寄主病原互作中的激发子类物质。

### 2.4 IWF 提取和注射中对小麦叶片细胞损伤的影响

通过对 IWF 提取和注射后小麦叶片细胞的超微结构观察表明: IWF 提取和注射后的小麦叶

片细胞, 细胞膜保持完整, 细胞器形态正常, 同正常的小麦细胞在形态上一样, 说明 IWF 提取和注射并未对小麦叶片细胞造成损伤。



1. 正常的小麦细胞(× 7499) Healthy wheat cells (× 7499); 2. IWF 提取后的小麦细胞(× 7502) Wheat cells after extraction of IWF(× 7502) 3. IWF 注射后的小麦细胞(× 7500) Wheat cells after injection of IWF(× 7500)

图 1 IWF 的提取和注射后小麦叶片细胞的超微结构

Fig. 1 Ultrastructure of wheat cells after extraction and injection of IWF

### 3 结论与讨论

通过真空渗入离心法获取了小麦的细胞间隙液, 并利用注射器将细胞间隙液注入到小麦细胞中, 表明了接种后的小麦叶片的细胞间隙中可能含有寄主病原互作中的激发子类物质。

通过真空渗入离心法获取植物的细胞间隙液及通过注射器法将细胞间隙液注入到植物叶片中具有一定的可行性。这在番茄叶霉病<sup>[8]</sup>及小麦叶锈病<sup>[2]</sup>中均有报道, 但在小麦秆锈病上研究甚少。今后应对细胞间隙液提取和注射条件进行优化, 寻找到最佳的提取和注射方法。另外, Rohringer<sup>[4]</sup>在提取大麦细胞间隙液时使用了各种缓冲剂来提高 IWF 的产出量, 这对进化 IWF 的提取具有一定的指导作用。

IWF 提取和注射过程中是否对植物叶片细胞造成损伤是一个值得关注的问题, 因此 IWF 中的物质应当来源于植物细胞间, 尽可能排除细胞内原生质体物质的影响。王东梅通过测定胞质标记酶活性即 6 磷酸葡萄糖脱氢酶的活性来检测 IWF 提取对小麦细胞是否损伤(私人交流), 本研究则通过透射电镜方法来进行检测, 两种检测方法都过于繁琐, 而且结果可信度不高, 应当寻找一种新的检测方法。

接种后的小麦叶片来源的 IWF 能诱导小麦叶片产生 HR 反应, 说明 IWF 中可能含有激发子成分, 但 IWF 中不全是激发子。通过采用理化方法对细胞间隙液中的物质组成进行分析, 分离纯

化激发子, 为今后研究植物抗病性反应的表达及寄主病原互作中的信号传递等一系列深层次问题奠定基础。

#### 参考文献:

[ 1 ] 李振歧, 曾士迈主编. 中国小麦锈病[ M ]. 北京: 中国农业出版社, 2002. 20 ~ 24.

[ 2 ] 王庆梅, 王智祈, 刘娟, 等. 感染叶锈菌的小麦细胞间隙液中激发子的定性及初步分离[ J ]. 植物生理学报, 2000, 26( 5 ): 427 ~ 432.

[ 3 ] De Wit PJGM. Molecular characterization of gene for gene systems in plant fungus interactions and the application of avirulence genes in control of plant pathogens [ J ]. Annual Review of phytopathology, 1992 30: 391 ~ 418.

[ 4 ] Rohringer Roland, Firous Ebrahim nesbat, Gerhard Wolf. Proteins in Intercellular washing fluids from leaves of barley ( *Hordeum vulgare* L. ) [ J ]. Journal of Experimental Botany, 1983, 34: 1589 ~ 1605.

[ 5 ] Deverall R J, Deakin A L. Assessment of Lr20 gene specific of symptom elicitation by intercellular fluids from leaf rust infected wheat leaves [ J ]. Physiological and Molecular Plant Pathology, 1985, 27: 99 ~ 107.

[ 6 ] 邓恩新, 王文忠, 王智祈. 一种简易的向植物薄片内注射溶液的装置[ J ]. 植物生理学通讯, 1992 28( 4 ): 296.

[ 7 ] 王东梅, 王智祈, 刘娟. 小麦 - 叶锈菌互作的细胞间隙液对细胞过敏性坏死的诱导效应[ J ]. 植物病理学报, 1997, 27( 4 ): 376.

[ 8 ] De Wit PJGM, Spikman G. Evidence for the occurrence of race and cultivar specific elicitors of necrosis in intercellular fluids of compatible interactions of *Cladosporium fulvum* and tomato [ J ]. Physiological Plant Pathology, 1982, 21: 1 ~ 11.