

小麦高温抗条锈性的组织病理学 和超微结构变化

王保通 商鸿生

(西北农林科技大学教育部植保资源与病虫害综合治理重点开放实验室, 杨凌 712100)

摘要: 为了进一步弄清高温抗条锈病的抗性机制, 利用荧光显微技术和电镜技术研究了高温抗条锈性品种小偃 6 号的组织病理学特征和超微结构变化。结果表明: 在高温抗条锈性表达时, 病斑周围寄主细胞发生坏死和木质化, 在高温处理 24h, 坏死细胞和木质化细胞数分别为初期的 17.1 和 23.8 倍。从超微结构观察, 在高温抗条锈性表达时, 侵染点附近寄主细胞壁表面凹凸不平、粗糙, 细胞壁的厚度也较健康细胞厚。之后, 细胞内的细胞器消解, 仅有沿细胞壁分布的原生质和残存的一些颗粒状物质。

关键词: 小麦, 高温抗条锈性, 组织病理学, 超微结构

植物高温抗病性是在较高的环境温度下所诱导的一种低反应型抗病性^[1]。高温抗条锈性是一种持久抗病性, 小种专化性弱, 防病保产效能高, 因而受到越来越多的重视。在我国的农家品种和目前大面积推广品种中存在大量的高温抗条锈性品种, 由于对其抗病性的机制缺乏了解, 致使一大批高温抗条锈性品种的抗锈性没有得到充分利用, 造成大量的资源浪费。为了更好地利用这类宝贵的抗条锈性资源, 作者系统研究了高温抗条锈性表达的生理生化机制^[2-5], 为进一步揭示高温抗条锈性的抗性机制, 作者又对小麦高温抗条锈性表达时的组织病理学和超微结构的变化进行了研究。

1 材料与方法

1.1 供试小麦品种与小麦条锈菌菌种

供试小麦 (*Triticum aestivum*) 品种为小偃 6 号 (高温抗条锈性品种)、辉县红 (高感品种); 小麦条锈菌 (*Puccinia striiformis* West) 菌种为条中 29 号 CY29 及其弱毒突变菌系 Mut29。菌种为单孢分离菌系, 在鉴别寄主上鉴定确认无误后, 在辉县红上隔离繁殖, 收集新鲜夏孢子, 保存冰箱备用。

基金项目: 国家自然科学基金项目 (39170511) 资助

作者简介: 王保通 (1964 -), 男, 副研究员, 从事小麦病害抗性机制和综合治理方法的研究 (E-mail: wangbtng@public.xa.sn.cn); 收稿日期: 2001 - 01 - 25

1.2 试验处理

小麦育苗采用常规土培法,待初生叶完全展平后(苗龄 9~10 天),涂抹接种供试条锈菌的新鲜夏孢子,保湿 24h 后,置于植物生长箱中(14~16℃)培养,生长箱光强 8000~10000lx,光照时间每天 16h。将供试的条锈菌新鲜夏孢子分别接种供试小麦品种,以常规处理(14℃)和花斑初期转高温(21℃)处理 24h,造成下列 4 种类型的寄主-病原菌相互关系类型:小偃 6 号-CY29 在常温下的亲和性组合,小偃 6 号-CY29 在高温下的非亲和性组合(高温抗条锈性),小偃 6 号-Mut29 在常温下的非亲和性组合(小种专化抗性)和小偃 6 号-Mut29 在高温下的非亲和性组合(高温抗条锈性+小种专化抗条锈性)。以不接种健苗作对照。分别在花斑后 0、12、24、48 和 72h 采样,于冰壶中带回实验室测定。

1.3 组织病理学研究

1.3.1 Rohringer 的整叶透明荧光染色法: Calcofluor M2R White New 荧光染料由加拿大温尼泊农业试验站提供。具体染色步骤:①将叶片切成 2cm 长的小段,放入甲醇-氯仿(甲醇:氯仿=1:2v/v)透明液中处理 6h;②将叶组织转入固定透明液乳酸乙醇液(乳酚油:95%乙醇=1:2v/v)中煮沸 1.5min,然后放置过夜;③用 50%乙醇冲洗 2 次,每次 15min,然后用蒸馏水冲洗 2~3 次;④冲洗后转入 0.05mol/L NaOH 中漂白透明 2 次,每次 15min,然后用蒸馏水快速冲洗 2~3 次;⑤叶段转入 Tris-HCl 缓冲液(pH=8.5)中 30min;⑥用 0.1% Calcofluor 的 Tris-HCl 缓冲液染色 5~6min,迅速转入蒸馏水中;⑦蒸馏水冲洗 4 次,每次 10min,然后转入 25%甘油液中 30min,即可用含有少量乳酚油的甘油液作载浮剂制片。将制成的玻片用荧光显微镜观察。用 Y475 的屏障滤光片,激光滤光片为 U 激发,隔热滤光片为 BG38。健康寄主细胞自体荧光呈淡绿色,侵染引起的寄主细胞坏死有黄色自体荧光,菌丝经 Calcofluor 荧光染料处理产生兰色次级荧光。每处理测定 30 个夏孢子侵入形成的侵入点。测定寄主细胞坏死情况,计坏死细胞数和单个侵染点中坏死的寄主细胞数、高温处理前后侵染点周围细胞坏死情况。

1.3.2 HCl-间苯三酚(Phloroglucinol)法:该方法是一种细胞木质化染色方法。通过染色,木质化的细胞壁可染成樱桃红色或红紫色,即染即看。试剂配制:间苯三酚溶液(0.1g 间苯三酚溶于 100ml 95%乙醇中),20%盐酸溶液。将叶片放于载玻片上,先滴上一滴盐酸溶液(媒染),然后加一滴间苯三酚溶液,盖上盖玻片在显微镜下观察。测定每视野内的木质化细胞数。每样品记载 30 个侵染点。

1.4 电镜切片的制备和观察

采用康振生^[7]的方法,在花斑后 24 和 48h,分别采常温和高温处理的接种小麦叶片,切成 2mm 的方块,经 4%戊二醛和 2%锇酸双重固定后,经系列丙酮脱水,于 Epon810 树胶中浸透包埋。切成超薄切片,经醋酸双氧铀和柠檬酸铅染色后,于 EM-200EX 型透射电镜上观察并照相。

2 结果

2.1 高温抗条锈性的组织病理学特征

接种条中 29 号的小偃 6 号品种在常温下培养至花斑期,寄主叶内只产生极少量的木

质化细胞和坏死细胞,之后坏死细胞只有少量增加,从花斑初期至花斑后 72h,每侵染点平均坏死细胞数由 0.13 个增至 0.31 个,每视野木质化细胞数由 0.16 个增加到 0.44 个(表 1)。花斑期转入高温下的处理,在转入 12h 就能明显观察到坏死细胞和木质化细胞数量的增多,至 24h,坏死细胞和木质化细胞数明显增加,分别为花斑期的 17.1 和 23.8 倍(表 2),之后部分坏死细胞连片。同时,在试验中发现,高温抗条锈性处理的细胞坏死和木质化有一个特点,即在前期常温下寄主与菌丝表现亲和反应,当转入高温后,寄主细胞的坏死发生在菌丝周围的细胞,而原来表现亲和反应的细胞不发生坏死。在荧光显微镜下病斑中心为健康寄主和产生蓝色次体荧光的菌落,周围为产生黄色自体荧光的坏死细胞,这层坏死细胞阻抑了菌丝的进一步蔓延和扩展。而在小种专化抗性造成的非亲和处理,在花斑期观察寄主叶内的坏死细胞就比对照明显增加,说明坏死发生在花斑期之前。从组织病理学也可以看出,小种专化抗性的坏死细胞发生在紧靠侵染点周围的寄主细胞,之后逐渐向外扩展,到后期部分坏死细胞连片。

表 1 常温(14℃)下寄主细胞坏死和木质化变化
Table 1 Necrosis and lignification of wheat leaf cells at normal temperature(14℃)

品种 Varities	菌种 Races	观察项目 Items	花斑后时间 Time after chlorosis(h)				
			0	12	24	48	72
小偃 6 号 Xiaoyan 6	CY29	坏死细胞(个/侵染点)	0.13	0.18	0.22	0.29	0.31
		No. necrotic cells/infection site					
		木质化细胞(个/视野)	0.16	0.23	0.25	0.38	0.44
		No. lignify cells/visual field					
		含坏死细胞侵染点百分率(%)	6.00	10.00	11.00	13.00	15.00
		Rate of infection site with necrotic cells(%)					
	Mut29	坏死细胞(个/侵染点)	1.63	1.68	1.74	1.82	2.87
		No. necrotic cells/infection site					
		木质化细胞(个/视野)	3.45	4.10	4.78	5.01	5.13
		No. lignify cells/visual field					
		含坏死细胞侵染点百分率(%)	68.00	70.00	73.00	73.00	78.00
		Rate of infection site with necrotic cells(%)					
辉县红 Huixianhong	CY29	坏死细胞(个/侵染点)	0.07	0.07	0.09	0.09	0.11
		No. necrotic cells/infection site					
		木质化细胞(个/视野)	0.13	0.13	0.15	0.15	0.16
		No. lignify cells/visual field					
		含坏死细胞侵染点百分率(%)	2.00	2.00	3.00	4.00	5.00
		Rate of infection site with necrotic cells(%)					

2.2 小麦高温抗条锈性表达时寄主叶片内的超微结构变化

条中 29 号小种侵染高温抗条锈品种小偃 6 号,在显症时转高温处理,寄主表达高温抗病性。从超微结构观察,高温 24h 时,在侵染点附近可观察到部分寄主细胞壁开始发生坏死,表现为细胞壁表面凹凸不平、粗糙,且颜色深浅不一。细胞壁的厚度也较健康细胞厚,而细胞内的细胞器并未发生变化(图 1-A)。至高温 48h,寄主叶内坏死细胞数目明显增多,坏死程度进一步加剧(图1-B),除细胞壁的坏死更加严重外,细胞壁内的细胞器也

表 2 高温(21℃)下寄主细胞坏死和木质化变化

Table 2 Necrosis and lignification of wheat leaf cells at high temperature(21℃)

品种 Varieties	菌种 Races	观察项目 Items	花斑后时间 Time after chlorosis(h)				
			0	12	24	48	72
小偃 6 号 Xiaoyan 6	CY29	坏死细胞(个/侵染点) No. necrotic cells/infection site	0.13	0.33	2.22	3.15	5.40
		木质化细胞(个/视野) No. lignify cells/visual field	0.16	0.46	3.81	6.10	8.35
		含坏死细胞侵染点百分率(%) Rate of infection site with necrotic cells(%)	6.00	21.00	33.00	96.00	100.00
		坏死细胞(个/侵染点) No. necrotic cells/infection site	1.63	2.20	2.68	5.78	8.31
	Mut29	木质化细胞(个)/视野 No. lignify cells/visual field	3.45	3.21	5.47	9.21	9.62
		含坏死细胞侵染点百分率(%) Rate of infection site with necrotic cells(%)	68.00	81.00	92.00	98.00	100.00
		坏死细胞(个/侵染点) No. necrotic cells/infection site	0.07	0.08	0.08	0.09	0.12
		木质化细胞(个)/视野 No. lignify cells/visual field	0.13	0.14	0.15	0.15	0.18
辉县红 Huixianhong	CY29	含坏死细胞侵染点百分率(%) Rate of infection site with necrotic cells(%)	2.00	3.00	3.00	5.00	5.00
		坏死细胞(个/侵染点) No. necrotic cells/infection site	0.07	0.08	0.08	0.09	0.12
		木质化细胞(个)/视野 No. lignify cells/visual field	0.13	0.14	0.15	0.15	0.18
		含坏死细胞侵染点百分率(%) Rate of infection site with necrotic cells(%)	2.00	3.00	3.00	5.00	5.00

发生变化,细胞内的内质网、线粒体和叶绿体等数目明显减少,有的细胞内已无细胞器存在(图 1-C),仅有沿细胞壁分布的原生质和残存的一些颗粒状物质。表明高温抗条锈性表达的超微结构有其自身的特异性。它的坏死首先发生在侵染点附近细胞的细胞壁,之后逐渐发生到细胞质内的细胞器。图 1-D 为未接种处理的健康细胞。

3 讨论

本研究发现,在前期常温下寄主与菌丝表现亲和反应,寄主细胞并不发生坏死,当转入高温后,寄主细胞开始出现坏死,坏死发生在菌丝周围的细胞。在荧光显微镜下观察表现为侵染点中心为健康寄主和产生蓝色次体荧光的菌落,周围为产生黄色自体荧光的坏死细胞,正是这层坏死细胞阻抑了菌丝的进一步蔓延和扩展。由此可以推断细胞的坏死是由高温抗性诱导而产生。而小种专化抗性处理中,细胞的坏死发生在侵染点,然后向周围蔓延。这一结果证明了高温抗条锈性的表达主要是通过高温诱导才产生的,而在常温下这种抗条锈性并不表达。

从超微结构观察,寄主植物的细胞坏死是从寄主细胞的细胞壁开始,接种寄主的细胞壁首先加厚,表面变得粗糙、模糊,之后细胞内的细胞器慢慢解体,最后死亡。利用生化手段研究表明,高温抗条锈性品种在高温条锈性表达时,寄主叶内的木质素含量、酚酸含量及与木质素形成相关的酶活性明显增高。对其它病害的研究结果也表明,木质素是植物体内存在最多的高聚合物之一,可抵抗大多数微生物的降解,并可抵御微生物入侵与机械创

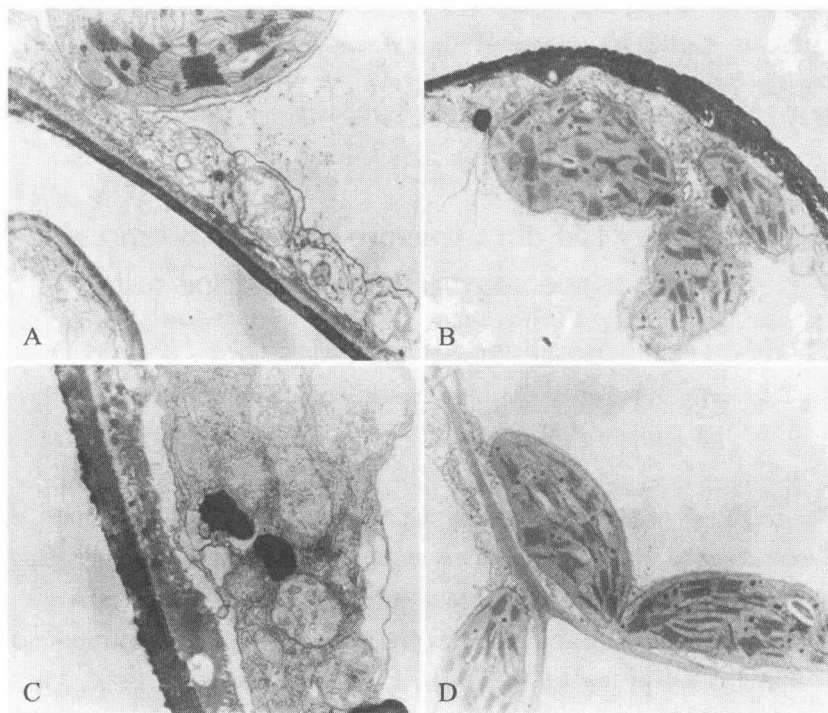


图1 小偃6号高温抗性表达时叶内细胞的超微结构

Fig.1 The ultrastructure of Xiaoyan 6 in expression of high-temperature resistance

注: A. 高温 24h 时, 在侵染点附近可观察到寄主细胞壁开始发生坏死 ($\times 15000$); B. 高温 48h 时, 寄主叶内坏死细胞数目增多, 坏死程度进一步加剧 ($\times 7500$); C. 内质网、线粒体和叶绿体等数目明显减少, 有的细胞内已无细胞器存在 ($\times 20000$); D. 未接种的健康细胞, 细胞壁边缘整齐, 细胞内的细胞器完整 ($\times 7500$)。Note: A. The cells began necrosise and lignify after 24 hours high temperature treatment ($\times 15000$); B. The number of necrotic cells increased after 48 hours high temperature treatment ($\times 7500$); C. The number of endoplasmic reticulum, mitchondrion and chloroplast has disjointed and decreased in evidence ($\times 20000$); D. Health cells without inoculation, the edge of cell wall is neat and the organelles are intact ($\times 7500$).

伤等,从而提高寄主植物的抗病性。受侵植物细胞发生坏死也是细胞的一种主动抗性,从而阻止病菌的进一步扩展和蔓延。

本研究从组织病理学和超微结构角度进一步证实了在小麦高温抗条锈性表达时寄主细胞坏死和木质化进程与细胞木质素增加进程一致,为高温抗条锈性的抗性机制研究提供了佐证。

参 考 文 献

- 1 Qayoum A, Line R F. High-temperature adult-plant resistance to stripe rust of wheat. *Phytopath.*, 1985, 75: 1121 - 1125
- 2 王保通, 商鸿生. 小麦高温抗条锈性表达与木质素合成的关系, *植物保护学报*, 1996, 23(3): 229 - 234
- 3 王保通. 小麦高温抗条锈性表达与寄主叶内细胞壁过氧化物酶活性的关系, *中国青年农业科学学术年报 A 卷*, 北京: 中国农业出版社, 1997
- 4 王保通, 商鸿生. 小麦高温抗条锈性表达与苯丙氨酸解氨酶和多酚氧化酶活性的关系. *麦类作物学报*, 2001, 21(3): 42 - 45

- 5 商鸿生. 小麦高温抗条锈性研究. 中国农业科学, 1998, (2): 143 - 148
- 6 Rohringer R, Kim W K, Samborski D J. A histological study of interactions between avirulent races of stem rust and wheat containing resistance genes Sr5, Sr6, Sr8, Sr22. Can. J. Bot., 1979, (57): 324 - 331
- 7 康振生, 李振岐, 商鸿生. 小麦条锈菌与寄主交界面的超微结构和细胞化学. 西北农业大学学报, 1993, 21(增 2): 1 - 5

Histopathology and ultrastructure of wheat in expression of high-temperature resistance to stripe rust

Wang Baotong Shang Hongsheng

(Key Laboratory of Plant Protection and Pest Management, Ministry of Education, Northwest
Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling 712100, China)

Abstract: The characters of histopathology and the changes of ultrastructure of wheat leaves of Xi-aoyan No. 6 were observed with fluorescence microscopy and electron microscopy to understand the mechanism of wheat high-temperature resistance to stripe rust. The result showed that the host cells necrosised and lignified in expression of wheat high-temperature resistance to stripe rust, and then the extension of hyphal in host cells was restrained. The necrosised and lignified cells increased 17.1 and 23.8 times respectively individually more than the original ones after 24 hours high temperature treatment. It was observed that the host cell wall became thicker than normal one, and the surface of the cell wall changed into roughness under electron microscopy. Afterwards the organelles in the cell vanished while protoplasm near the cell wall and some small substances as granule still existed.

Key words: wheat, high-temperature resistance, histopathology, ultrastructure