

向日葵品种对锈病抗性的组织学和超微结构研究

景 岚¹, 王丽芳¹, 康 俊¹, 韩青梅², 康振生²

(1. 内蒙古农业大学农学院, 内蒙古 呼和浩特, 010019; 2. 旱区作物逆境生物学国家重点实验室, 陕西 杨凌, 712100)

摘要: 为了进一步了解向日葵与向日葵锈病菌的互作关系及品种的抗性机制, 采用电子显微镜技术对向日葵品种对锈病抗性的组织学和超微结构进行研究。在电镜下观察发现, 向日葵锈病菌感染向日葵后, 在感病品种和抗病品种上发育的组织学和超微结构特征有明显差异。病菌在感病品种细胞间隙分布有大量的胞间菌丝, 寄主细胞发生质壁分离; 叶绿体变形, 叶绿体的片层结构排列零乱, 直至叶绿体解体。在抗病品种上表现为菌丝生长受抑, 没有观察到吸器的产生, 寄主细胞的早期坏死与锈菌的发育受阻密切相关。品种的抗病性可能与饥饿阻止真菌生长有关。

关键词: 向日葵; 向日葵锈菌; 抗病性; 组织学; 超微结构
中图分类号: S435.655 **文献标识码:** A **文章编号:** 1007 – 9084(2013)03 – 0313 – 04

Histology and ultrastructure of different combination between *Puccinia helianthi* Schw. and sunflower cultivars

JING Lan¹, WANG Li – fang¹, KANG Jun¹, HAN Qing – mei², KANG Zhen – sheng²

(1. College of Agronomy, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010019, China;
2. State Key Laboratory of Crop Stress Biology in Arid Areas, Northwest A&F University, Yangling 712100, China)

Abstract: In order to know the interaction between sunflower and *Puccinia helianthi* Schw. and resistance mechanism, the combinations between *P. helianthi* Schw. and sunflower cultivars were examined by electron microscopy. The observation revealed striking differences in the fungal development and the host responses after infection by the pathogen. Pathogen hyphae grew in the intercellular space between cells or along the cell wall in the susceptible sunflower cultivars. At the early and middle stage of infection process, the host cell became plasmolyzed. The chloroplast was malformed. The thylakoid inside chloroplast became disordered. At the later stage, some chloroplasts collapsed. The main histological manifestation of the pathogen development in the resistant sunflower cultivars includes inhibition of hyphal growth, no haustorium produced. Host cells' necrosis was closely related with the inhibition of hyphal development. It is possible that starvation was the primary cause of the cessation of fungal growth.

Key words: Sunflower; *Puccinia helianthi* Schw.; Resistance; Histology; Ultrastructure

锈病是向日葵的重要病害之一, 在世界各地普遍发生, 严重影响向日葵的产量和含油量。在我国主要发生在黑龙江、吉林、辽宁、内蒙古、新疆等向日葵产区, 其他种植地区也有零星发生。近十年来, 随着我国向日葵种植面积不断扩大, 向日葵锈病的发生也逐年加重, 给生产带来的危害也日趋严重^[1]。寄主病原互作是当今植物病理学研究的热点领域。

在植物和病原菌共同进化、相互作用和相互识别过程中, 形成了一种高度错综复杂的关系。在向日葵和向日葵锈菌的相互作用系统中, 关于向日葵锈菌致病性分化、流行规律、向日葵抗锈性的遗传与鉴定、抗病品种选育以及化学防治等方面, 国内外许多学者进行了大量的研究工作^[2~7]。从细胞和组织水平开展向日葵品种抗锈性机制的研究未见报道, 因

而本研究利用电子显微镜技术揭示向日葵不同抗性品种与锈菌互作的组织病理学差异,进一步阐述向日葵和向日葵锈菌的互作过程中的基础特性,以及抗锈菌侵染过程中的一些生化事件,以便为向日葵抗锈病育种提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 植物

感病品种:益民花葵二号,反应型是“4”;抗病品种:S₄₀(HyoIc40)油葵,反应型是“0”。品种抗性由本实验室鉴定并标注。

1.2 病原菌

锈菌样本采自内蒙古乌拉特前旗和呼和浩特市郊区向日葵锈病流行区,经若干次繁殖、纯化后得到足够菌量置于指形管中,-20℃条件下保存备用。

1.3 培养方法

供试向日葵种植在直径10cm的花盆里,播深2cm,当幼苗长到第1、2片真叶充分展开时接种锈菌。

1.4 接种方法

本实验采用夏孢子悬浮液接种,用浸湿毛笔蘸取10⁵个/mL夏孢子悬浮液(加入0.01% Tween-80并搅拌均匀)涂到充分展开的子叶和第1、2片真叶背面上。接种后的植株置于相对湿度90%~

100%、温度18~20℃的保湿桶内黑暗保湿24h,促使夏孢子萌发侵入。保湿后在日温22℃,夜温18℃,相对湿度50%~60%条件下培养^[6]。

1.5 扫描电镜样品的制备

分别于接种后2、4、6、12、24h随机切取接种叶片,参照文献[8,9]的方法制样。

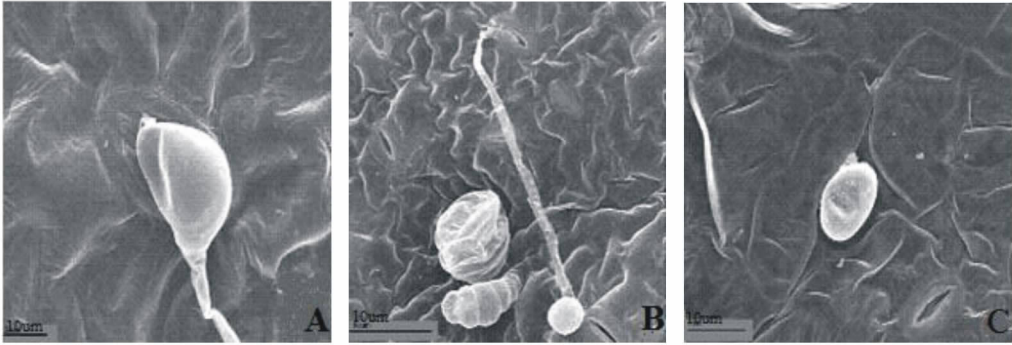
1.6 透射电镜样品的制备

分别于接种后2、3、4、6d随机切取接种叶片,参照文献[8,9]的方法制样。

2 结果与分析

2.1 病原菌的萌发及侵入

通过扫描电镜观察,感病品种接种6h后,夏孢子已萌发产生芽管,随后形成附着胞从气孔侵入寄主(图1A);抗病品种在接种后12h,观察到夏孢子萌发产生芽管,接种后24h,芽管继续生长,在气孔上方有时形成和感病品种相似的典型的附着胞,有时不形成附着胞,直接从气孔侵入(图1B)。在抗病品种中,向日葵锈菌夏孢子萌发产生芽管较感病品种晚,在接种后24h,还可以观察到没有萌发的夏孢子,且向内凹陷变形(图1C)。除以上特征外,感病品种和抗病品种均可在接种24h内侵入寄主,侵入过程无明显差异。

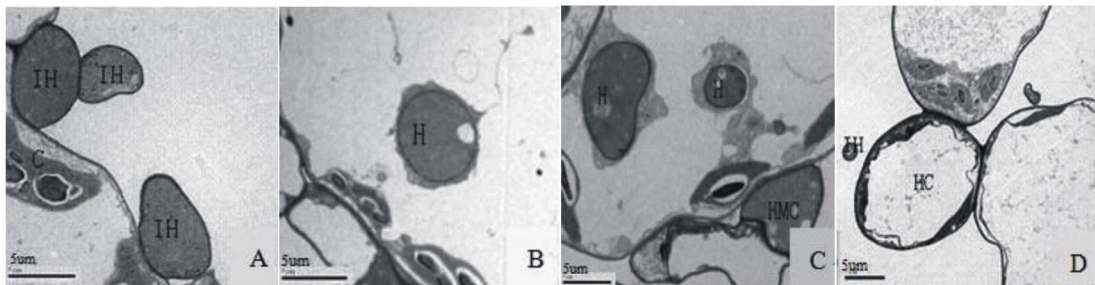


注:A:感病品种叶片上芽管形成附着胞从气孔侵入;B:抗病品种叶片上芽管不形成附着胞从气孔侵入;C. 抗病品种叶片上的夏孢子
Notes:A:A germ tube formed an appressorium over the stomata of host leaf in susceptible variety(S); B:A germ tube not formed an appressorium over the stomata of host leaf in resistant variety(R); C. Urediospore of *Puccinia helianthi* Schw. on sunflower leaf in resistant variety(R)

图1 向日葵锈菌侵染过程的扫描电镜观察
Fig.1 Infection process of *Puccinia helianthi* Schw. under electron microscope scanning

通过透射电镜观察表明,在感病品种中,锈菌发展较快,在侵染早期(接种后2d)即观察到叶肉细胞间有大量菌丝蔓延(图2A),并在细胞内形成吸器(图2B、C)。但病菌的存在并不引起被侵染细胞的坏死;而在抗病品种中,在侵染早期(接种后2d)即

观察到被侵染的寄主细胞及其相邻细胞快速坏死,锈菌菌丝的扩展受到限制,因此,在电镜下很难观察到在细胞间蔓延的菌丝(图2D),其生长速度显著地慢于感病品种。



注:A:感病品种中,锈病发展较快,在侵染早期(接种后2d),观察到叶肉细胞间有大量菌丝蔓延;

B,C:感病品种寄主细胞内的吸器;D:在侵染的早期(接种后2d),抗病品种中,被侵染细胞及其邻近细胞的坏死,

限制了病原菌在寄主细胞间的扩展。C=叶绿体;IH=胞间菌丝;H=吸器;HMC=吸器母细胞;HC=寄主细胞,下同

Notes: A: A lot of hyphae spread intercellularly (S); B,C: Haustorium in host cells (S); D: The host cells contacted by hypha became necrotic and collapsed, 2d after inoculation (R). C = chloroplast; IH = intercellular hypha; H = haustorium; HMC = haustorium mother cell; HC = host cell; Same as below

图2 向日葵锈菌侵染过程的透射电镜观察

Fig.2 Infection process of *Puccinia helianthi* Schw. in sunflower leaf cells under transmission electron microscope

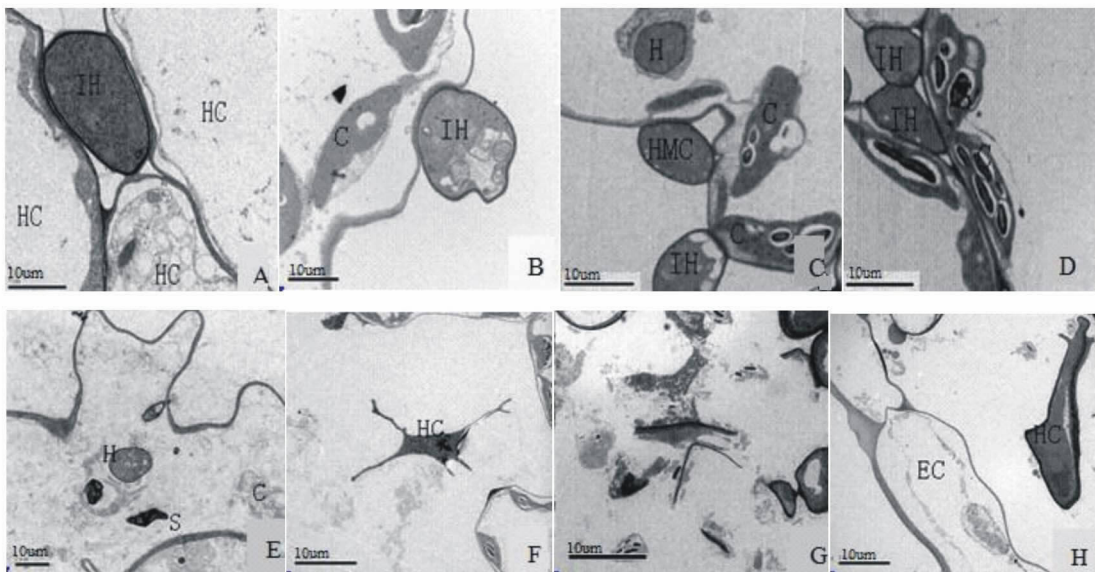
2.2 寄主细胞的结构变化

一般在健康叶片的组织细胞结构中,细胞内含物丰富,细胞质、细胞器排列分布均匀;细胞内含有大量叶绿体,且有规律地排列于细胞质膜上。

在感病品种中,向日葵锈菌侵染早期(接种后2d),寄主细胞的超微结构变化并不明显,只看到被侵染细胞质膜轻微下陷(图3A);锈菌在寄主细胞间隙或沿寄主细胞壁延伸时,寄主细胞保持正常状态;发现叶绿体稍显膨胀,被侵染细胞发生质壁分离(图3B),侵染后期(接种后4d),部分叶绿体膨胀变

形,片层结构散乱,淀粉粒数目增多(图3C,D)。锈菌的侵染还造成了向日葵细胞叶绿体的解体,内部的片层结构也遭到了破坏,而细胞内吸器正常(图3E)。

在抗病品种中,病原菌侵染的早期(接种后2d)即可观察到寄主细胞坏死的现象(图3F)。到侵染后期(接种后4d)寄主细胞的叶绿体外膜破裂,叶绿体解体,寄主细胞解体,不同细胞的细胞器堆积在一起,寄主细胞严重坏死(图3G)。在抗病品种中还观察到了表皮下细胞坏死(图3H),限制了菌丝向内部的进一步扩展。



注:A:感病品种中,锈菌侵染早期(接种后2d)的胞间菌丝;B:感病品种中,寄主细胞质壁分离;

C,D:感病品种在侵染后期(接种后4d),部分叶绿体膨胀变形,片层结构散乱,淀粉粒数目增多;

E:感病品种中细胞叶绿体的解体,内部的片层结构也遭到了破坏,而细胞内吸器正常;

F:抗病品种寄主细胞坏死;G:抗病品种寄主细胞解体、叶绿体解体,不同细胞的细胞器堆积在一起;

H:抗病品种表皮下细胞坏死。S=淀粉粒;EC=表皮细胞

Notes: A: Intercellular hyphal cells at the early stage of the infection process (S); B: The cell of host became plasmolyzed (S); C,D: Chloroplast was malformed at the late stage of the infection process, with a lot of starch grains in the chloroplast (S); E: The outer membrane of chloroplast was disorganized, the chloroplast disintegrated in some host cells at the late stage of the infection process, the haustorium is well (S); F: Disorganized necrotic host cell (R); G: The host cell wall was disorganized, organelles became malformed and the organelles coming from different host cells congregated together (R); H: Disorganized necrotic host cell below the epidermal cell (R). S = starch grain; EC = epidermal cell.

图3 锈菌侵染对寄主细胞结构的影响

Fig.3 Effects of *Puccinia helianthi* Schw. on ultrastructure of sunflower leaf cells

3 讨论

扫描电镜观察发现,锈菌在侵染向日葵时,在抗病品种上,芽管在侵入时不形成或形成典型的附着胞,感病品种上均形成典型的附着胞,除此之外,并无明显差异。透射电镜观察,向日葵锈菌侵染向日葵感病品种与抗病品种所表现出的主要不同反应在于被侵染细胞的快速坏死,这种坏死对锈菌的生长具有决定性影响,直至锈菌停止生长。这一结论与豇豆-豇豆锈菌^[10, 11]、小麦-小麦锈菌互作系统中所得到的结果一致^[12, 13]。在抗病品种中,胞间菌丝很少,没有发现吸器,寄主细胞发生表皮下坏死,限制菌丝在寄主细胞间蔓延。

本研究发现,菌丝在寄主细胞间或沿寄主细胞壁延伸时寄主细胞保持正常状态,而且侵染点及其附近细胞都无明显坏死现象,这一现象反映出亲和性互作时,病原菌的侵入并不损伤寄主细胞;在亲和互作中,寄主细胞也表现出了一定的抗性反应,如细胞壁周围胼胝质的出现、细胞器的解体等。在小麦秆锈菌亲和性互作组合中也有类似情况的发生^[14];张凤国^[15]在研究小麦叶锈菌时,发现亲和性互作中有细胞坏死现象。说明在寄主病原亲和互作组合中,作为对逆境的一种反应,寄主细胞也有一定的抗性反应。

冯东昕^[16]在对菜豆-菜豆锈病菌相互作用系统进行研究时发现,在高抗品种中很快即观察到了寄主细胞的解体,而在感病品种中则表现为被侵染细胞的慢慢解体,这种解体包括细胞质分解成碎片以及细胞膜的断裂。本研究中向日葵锈病侵染对向日葵细胞超微结构的影响方面,所得结果与其相似。

参考文献:

[1] 刘双平,袁亮,胡俊. 内蒙古向日葵病害种类及研究概况[A]. 中国植物病理学会学术年会论文集[C]. 北京:中国农业科学技术出版社. 2006.

[2] Amaresh Y S, Nargund V B. Assessment of yield losses due to *Alternaria* leaf blight and rust of sunflower[J]. *Journal of Mycology and Plant Pathology*, 2004, 34(1): 75-79.

[3] Amaresh Y S, Nargund V B. Development of disease pre-

diction models in sunflower rust epidemics[J]. *Indian Journal of Plant Protection*, 2002, 30(2): 105-108.

[4] Amaresh Y S, Nargund V B. Effect of sowing dates and weather factors on the incidence of sunflower rust[J]. *Indian Journal of Plant Protection*, 2002, 30: 157-160.

[5] Amaresh Y S, Nargund V B. Management of sunflower rust through fungicides[J]. *Annals of Plant Protection Sciences*, 2003, 11(2): 296-299.

[6] 张建平,李子钦. 向日葵锈病菌生理小种国际统一的鉴定方法[J]. *植物保护*, 1994, 20(6): 33-34.

[7] 刘杰,莫结胜,刘公社,等. 向日葵分子生物学研究进展[J]. *植物学通报*, 2001, 18(1): 31-39.

[8] 康振生. 植物病原真菌超微结构[M]. 北京:中国科学技术出版社, 1996.

[9] 康振生,王瑶,黄丽丽,等. 小麦品种对条锈病低反应型抗性的组织学和超微结构研究[J]. *中国农业科学*, 2003, 36(9): 1 026-1 031.

[10] Heath M C. Ultrastructure of host and nonhost reaction to cowpea rust[J]. *Phytopathology*, 1971, 62(1): 27-38.

[11] Heath M C. Fungal growth, haustorial disorganization, and host necrosis in two cultivars of cowpea inoculated with an incompatible race of the cowpea rust fungus[J]. *Physiological Plant Pathology*, 1982, 21(3): 347-359.

[12] Tiburzy R, Reisener H. Resistance of wheat to *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*: association of the hypersensitive reaction with the cellular accumulation of lignin-like material and callose[J]. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 1990, 36(2): 109-120.

[13] 马青,商鸿生. 小麦与条锈病菌不亲和互作的超微结构[J]. *植物病理学报*, 2002, 32(4): 306-311.

[14] 徐建强,曹远银,侯颖,等. 小麦/小麦秆锈菌亲和性互作的组织病理学及超微结构研究[J]. *沈阳农业大学学报*, 2005, 36(5): 536-540.

[15] 张凤国,王智忻,汪宜萱,等. 不同亲和性的小麦品种和叶锈菌小种相互作用的组织病理学研究[J]. *植物病理学报*, 1991, 21(4): 271-276.

[16] 冯东昕,朱国仁,李宝栋. 菜豆锈病菌侵染对寄主超微结构的作用及菜豆抗锈病的细胞学表现[J]. *植物病理学报*, 2001, 31(3): 246-250.

(责任编辑:王丽芳)