

# 小麦慢锈品种‘平原 50’上条锈菌侵染的 超微结构观察初报<sup>①</sup>

张元恩<sup>②</sup> 杨爱东 翟彤  
(植物病理系)

**摘 要** 用光镜和电镜观察以条中 28 号小种接种的慢锈品种‘平原 50’和感病品种‘铭贤 169’的病理组织和超微结构。光镜观察发现两品种在侵入阶段无明显差异。在接种 5 天后,两品种中的菌落大小,吸器个数上出现较明显差异。与感病品种‘铭贤 169’进行电镜比较观察,在慢锈品种‘平原 50’中发现如下现象:在吸器外基质(EM)出现染色较深的物质;吸器周围有大量增生的膜复合体(MC)和内质网(ER);有一吸器的分支出现;有叶绿体向吸器移动的现象。

**关键词** 小麦条锈菌; 慢锈品种; 超微结构

**中图分类号** S435.121.42

## Preliminary Ultrastructural Study on Infection Structure of *Puccinia striiformis* in Solw-Rusting Cultivar ‘Pingyuan 50’

Zhang Yuanen Yang Aidong Zhai Tong  
(Dept. of Plant Pathology)

**Abstract** Pathological and ultrastructural differences between wheat cultivar ‘Mingxian 169’ (susceptible check) and ‘Pingyuan 50’ (slow-ruster) infected by Chinese stripe rust 28 were observed by means of light and electron microscope. Results of observation by light microscope showed that no differences in penetration stage between ‘Mingxian 169’ and ‘Pingyuan 50’. Obvious differences in terms of area of colony and number of haustoria per colony between cultivars occurred after 5-days inoculation. Results of electron microscope observation as compared with ‘Mingxian 169’ showed that some phenomena in ultrastructure of ‘Pingyuan 50’ as following: the more densely staining of extrahaustorial matrix (EM); proliferation of membrane complex (MC) and endoplasmic reticulum (ER) around extrahaustorial membrane (EHM); the occurrence of a branch of haustorium; chloroplastid moving to haustorium.

**Key words** wheat stripe rust; slow-ruster; ultrastructure

小麦条锈病一直是影响我国小麦产量的重要因素。实践证明,利用品种的抗病性防治麦类的锈病是最为经济有效的措施。在利用抗病品种中,最为突出的问题是抗性的丧失。因此,

收稿日期 1995-12-26

①国家自然科学基金资助项目 39230260

②张元恩,北京圆明园西路 2 号中国农业大学(西校区),100094

在探索抗性的研究中,对水平抗性或慢锈性品种在生产上的利用越来越受到关注。从1915年 Stakeman 首次报道了关于抗锈品种过敏性坏死现象到目前,抗锈性研究涉及到遗传学、组织学、细胞学、生物化学和分子生物学等很多领域,而品种抗锈性在细胞、亚细胞水平上的结构研究是上述各方面研究的基础,因而也受到各国研究者的重视。

70年代以来,科研人员通过光学及电子显微镜对寄主抗性进行了大量的研究,并取得了相当多的成果。在明确了感病寄主上病原的发育过程及特征后,又以抗病品种为对象进行研究,基本明确了以下几方面的事实:锈菌从入侵到发育最终受阻过程中一系列事件的发生顺序<sup>[1]</sup>;明确了抗锈性表达的时间<sup>[1,2]</sup>;揭示出抗锈性表达过程中,受侵寄主细胞坏死与初生吸器坏死之间的复杂关系<sup>[1,3]</sup>。明确受侵染细胞内原生质、细胞器以及细胞壁的变化特征<sup>[4]</sup>;明确了吸器,特别是初生吸器发育受阻、寄主细胞畸形坏死与病菌进一步发育扩展的关系<sup>[1,4]</sup>。以上这些组织学和超微结构的研究揭示了品种抗锈性的多样性、复杂性及某些规律性,明确了抗性表达中关键事件的顺序、发生位点及寄主在组织、细胞和亚细胞水平抵抗锈菌侵染的结构特征。这些结果的获得为抗锈品种的选育、鉴定和抗病品种的合理利用提供了科学依据,同样也促进了品种抗锈生理和抗锈分子病理学的发展。值得注意的是,在这些研究中人们将注意力逐渐集中在病原物与寄主最直接的互作交界面上,即锈菌的吸器与寄主细胞超微结构的关系上。

近年来,以 Heath<sup>[1]</sup>等学者为代表,对锈菌吸器的形态及其与寄主相互识别的媒介的现象有了新的认识,即吸器在菌丝与寄主细胞间架起物质转运的桥梁,对锈菌与寄主之间确立寄生关系起着重要作用,并将寄主整个受侵细胞扩展成为双方真正的“功能性”的界面。对这一界面的超微结构的观察,必将揭示出寄主与病原相互识别和抗锈性表达的组织学基础,从而可以进一步揭示抗锈性的机制。另外,过敏性坏死反应这一现象自从1915年 Stakman 提出来后,人们一直无法断定这种现象是抗性表达的原因还是结果,利用电子显微镜的观察可以为最终确定它在抗锈性中所起的作用提供新的依据。

国外在这方面的研究多以小麦秆锈病、叶锈病、燕麦冠锈病及豆类锈病为对象,对条锈病的研究只有个别报道,而小麦条锈病在我国是一种对生产影响很大的病害,人们利用抗病育种来控制病害的发生和流行,取得了很多科研成果,但在抗锈性机制的基础研究方面仍不够深入。西北农业大学康振生与李振岐等在小麦条锈感病品种的超微结构及细胞化学的研究中取得了一定进展。但在不同抗病类型品种,如垂抗、水抗或慢锈品种病理组织超微结构的比较研究方面仍呈空白。‘平原50’多年来对条锈表现为慢锈性,曾被初步鉴定为具有水平抗性的品种<sup>[6]</sup>。本次实验从光镜的观察入手,对慢锈品种‘平原50’和感病品种‘铭贤169’的病理组织进行了电镜观察并进行了初步比较分析,为深入研究锈菌寄主的界面结构及其生化基础提供一些线索。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

‘铭贤169’(感病品种),‘平原50’(慢锈品种,可能具有水平抗性);小麦条锈菌条中28小种。以上小麦品种及条锈菌小种均由中国农业科学院植保所锈病室提供。

### 1.2 方法

育苗 菜园土加少许园艺土,用直径13 cm的花盆育苗,每盆育苗10株,放置在人工温

室中,保持温度15℃左右,人工补充光照16 h光强20 000 lx,相对湿度保持在80%以上。

**接种** 小麦第一片真叶完全展开后(株高10 cm左右)进行接种,繁殖菌种可采用扫抹法,为制作电镜样品,可采用涂抹法,即用毛笔蘸新鲜菌粉抹于经脱蜡的小麦叶片上,保湿24 h,前16 h保持黑暗,此后可以补充光照。24 h后将接种小麦移回到育苗条件下继续生长。

**光镜观察** 以24 h为间隔,从接种后24 h开始取样。样品处理如下:固定透明,乳酚油:乙醇:三氯甲烷为3:2:1(体积比)常温下2 d;染色,饱和水合氯醛内溶1%曲利本蓝,常温下1.5~2 d;退色,饱和水合氯醛,常温下2~4 d;上镜观察,观察接种后侵染事件的序列、吸器出现的时间及其发育特征及其他特异的病理结构。

**电镜观察** 从接种后5天开始取样。按常规透射电镜样品制备观察的样品:剪取发病小麦叶片切成1.0 mm<sup>2</sup>的小块,迅速放入2%的戊二醛磷酸缓冲液中进行前固定4 h。倒去戊二醛固定液,0.1 mol·L<sup>-1</sup>磷酸缓冲液(pH7.0)充分漂洗3次,每次15 min,4℃下进行。然后用1%锇酸4℃下后固定2~4 h。如前所述,再漂洗3次,而后是系列浓度梯度的丙酮脱水,然后环丙烷和包埋剂(Epon 812)浸透3~6 h。最后用Epon 812进行包埋10 h。

## 2 结果与分析

### 2.1 光镜观察

通过多批次的观察,可以看出,在接种后24 h,供试品种均未观察到侵染发生,仅可见少量孢子萌发。48 h后,各品种上孢子萌发率上升,可见到个别成功的侵染点,即能够形成完整的气孔下泡囊及主侵染菌丝。接种后3 d,‘平原50’上可见到成功的吸器及其吸器母细胞,但数量较少且较为分散。‘铭贤169’上也可观察到零星吸器,接种天的菌落发展与接种3 d时相近。到接种5 d时,各品种间出现较大差异。‘铭贤169’上可见到正常扩展的菌落并有较多的吸器形成。‘平原50’上伴随着菌落的扩展出现了寄主细胞过敏性坏死(坏死细胞表现为细胞质染成深色,有的细胞壁瓦解)同时还可以观察到一些异形的吸器均为多分枝状,这可能与逆境有关(扩大其吸收面积),但也有可能是吸器的多核现象<sup>[5]</sup>。

‘平原50’接种5 d后,大多数侵染点仅限于形成气孔下泡囊,而其主侵染菌丝刚一扩展即引起细胞的坏死。这样的侵染点占全部观察侵染点的90%以上。但即使是在坏死细胞包围之中也能形成极个别的成功侵染点,其菌丝扩展也没有受到坏死的阻碍,甚至在已坏死的细胞中形成了完整的吸器。这可能是由叶片细胞质的异质性所致,同时这也说明抗锈性具有复杂性。但有一点值得注意,在坏死细胞中的吸器比正常细胞中之吸器体积小,染色也较深。这还需要利用电镜做进一步观察。

### 2.2 电镜观察

通过对慢锈品种‘平原50’和感病品种‘铭贤169’的病理组织进行超微结构的观察和初步分析,我们获得了如下结果。

从图1-1中可观察到‘平原50’受侵细胞内的瓣状吸器结构,在吸器体内沿壁排列着线粒体,有些已拉长,由一层膜包被的多泡体结构及中间的大液泡;另外其周围还附集了大量膜状复合体(MC)及内质网(ER),在外围可见排列散乱的管状结构,这些大、小管结构与膜复合体相联,而膜状复合体与吸器、寄主细胞核(HCN),甚至叶绿体(CL)及多泡体(MVB)均有连系,将互作界面推向整个寄主细胞原生质体。另外,整个吸器壁已看不出分层,明显加

厚,其中液泡占据了几乎全部吸器内部空间。

从图 1-4 可见受侵的‘平原 50’细胞中吸器周围聚集了大量叶绿体,这在图 1-1 中也可观察到。并且,叶绿体中的片层结构排列杂乱,片层与片层之间出现分离。吸器周围存在大量膜状复合体、多泡体及内质网(ER)等结构。其中膜状复合体的大小管排列散乱,同时可见到吸器内部的线粒体的壁出现溶解状不连续现象,而且吸器外膜也有断开的现象。此时可见到吸器内部有微管状结构出现。从图 1-3 中可以看出吸器外膜状复合体中的管状结构与吸器外膜(EM)有线性连接。

从图 1-2 中可见‘平原 50’中吸器体向寄主细胞中叶绿体处形成分枝,这在光镜观察中也有类似的现象。在吸器体内部还沉积有高电子密度的颗粒状物质。

对感病品种‘铭贤 169’受侵细胞超微结构(图 2-1,2,3,4)的观察中,可见吸器内完整的线粒体(M),致密而均匀分布的原生质,清晰的吸器壁和皱折的吸器外膜(EM),大量增生的膜复合体(MC)与寄主细胞核(HCN)等细胞器相连;这与在慢锈品种‘平原 50’中所观察到的吸器中线粒体拉长、中间大的液泡及加厚的吸器壁有着明显的区别。

### 3 结论与讨论

吸器这一复杂的锈菌胞内侵染结构日益成为人们研究的重点,这不仅仅在锈菌与寄主物质交换中起重要作用,而且它还是寄主与病原菌最直接的互作界面。吸器的形成由吸器母细胞(HMC)形成侵入钉开始,继而形成吸器起始体(HI),吸器起始体不断向寄主细胞内生长,最后其顶端膨大,吸器母细胞内含物全部转移到吸器内、形成空泡状时吸器成熟。不同组合的锈菌吸器结构基本一致,由吸器颈(HN)和吸器体组成,其外包被着由寄主质膜扩展形成的吸器外膜(EHM),此膜在吸器体部分与吸器体壁分开,其间形成吸器外基质(EM),在吸器的颈部还存在领状结构。

在吸器形成过程中不同抗性表现的寄主随时对侵染做出不同的反应,其中最为明显的是吸器颈部的领状结构。它是由寄主细胞质中增生的泡囊中内含物构成,可以阻止吸器起始体的进一步生长,在成熟的吸器颈部周围也可观察到这种结构,一般认为这是一种不亲合的抗性表现,但在丰抗 8 号这一对 28 号小种敏感的品种中也观察到了该结构。国内康振生等也发现过类似现象<sup>[8,9]</sup>。也许抗病品种和感病品种受侵染时都可以形成这种胼胝质,只是在形成的速度上不同而已,也有可能是因为寄主细胞存在异质性,这使得抗锈性的结构研究更为复杂。

另外一种寄主的反应是在吸器周围的寄主细胞质中形成大量膜状复合体,多泡体及寄主的内质网等结构,并且膜状复合体一般与吸器外膜相通。Chong 等在 1981 年发现膜复合体通常是在寄主细胞核和吸器之间形成<sup>[5]</sup>。在图 1 中可见到这种现象值得注意,在未受侵染的小麦细胞中没有观察到过该膜状复合体,这说明该现象是由锈菌侵染引发的。Chong<sup>[5]</sup>曾发现 *P. graminis* f. sp. *auenae* 侵染的燕麦中膜复合体的类型与受 *P. graminis* f. sp. *tritici* 侵染的小麦中的膜复合体类型相近,而与受 *P. coronata* 侵染的燕麦上的膜复合体类型不同,这说明锈菌能够向受其侵染的寄主细胞传递信息,从而特异性地改变那个细胞的代谢。

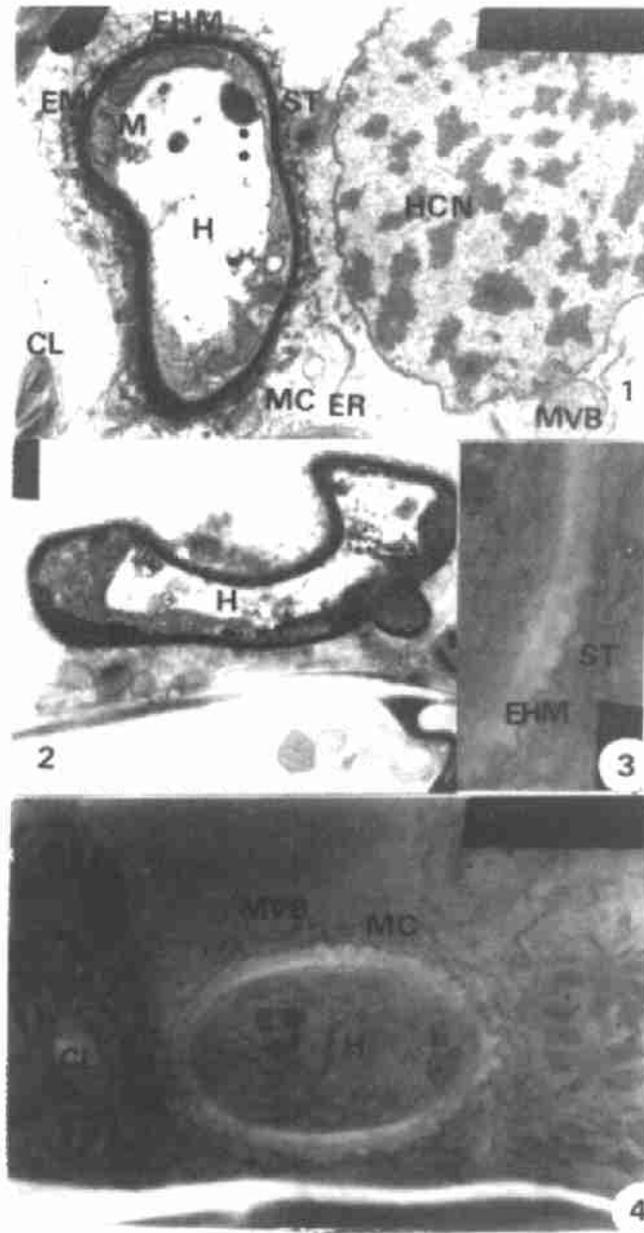


图 1 慢锈品种‘平原 50’受小麦条锈菌侵染的超微结构观察

1. ‘平原 50’细胞内瓣状吸器(H),含有电子密度很深的吸器外基质(EHM),吸器外膜(EM)及其大量增生的膜复合体(MC),附属周围的小管结构(ST)及内质网(ER),它们与寄主的细胞核(HCN)、叶绿体(CL)及多泡体(MVB)相互连接。(×7 000)
2. ‘平原 50’吸器上产生的分枝。(×4 620)
3. ‘平原 50’的吸器外膜(EHM)及其周围膜复合体的散乱排列的管状结构(ST)。(×18 200)
4. ‘平原 50’吸器周围增生的膜复合体(MC),多泡体(MVB)可见周围叶绿体向吸器体接近的趋势。(×14 000)

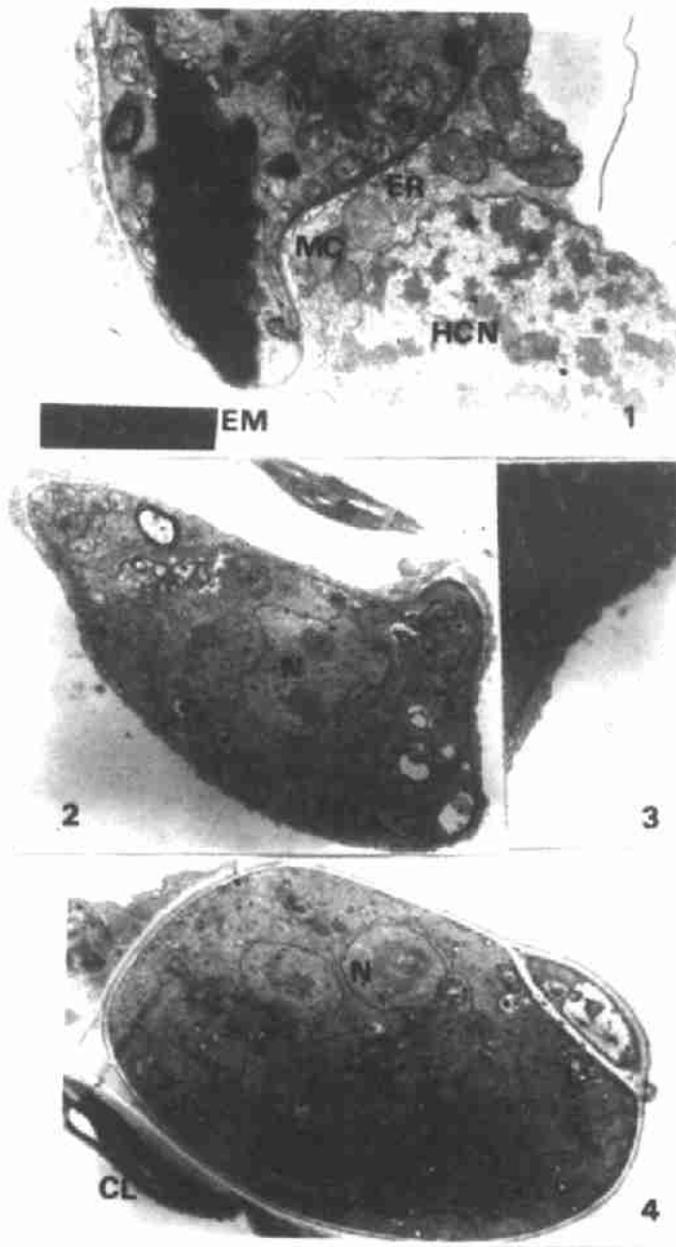


图2 感病品种‘铭贤169’受小麦条锈菌侵染的超微结构现查

1. ‘铭贤169’细胞内条锈菌吸器,可见结构完整的线粒体(M)、皱折的外膜(EM)及大量增生的膜复合体(MC),附集周围的内质网(ER)与寄主的细胞核(HCN)相互连接。(×5 810)
2. ‘铭贤169’细胞内吸器,可见吸器的双核(N)、完整的线粒体(M)及均匀分布的细胞质。(×3 500)
3. ‘铭贤169’受侵细胞内吸器的局部放大。(×7 000)
4. ‘铭贤169’胞间丝内部结构,可见完整的线粒体(M)、核(N)、脂肪体(L)及寄主细胞的叶绿体(CL)。(×3 500)

膜复合体是由管状结构组成的,在受 *P. graminis* f. sp. *tritici* 侵染的感病小麦细胞中膜复合体管状结构排列是整齐的、规则的。而且,似乎该膜复合体起源于寄主的内质网;这些特点都类似于一些具有分泌作用的器官,在此结构处可能发生着强烈的分泌和吸收作用,且与锈菌的生理需求相关。另外,以往的大量研究都证明膜复合体向吸器外基质开放。在由内质网连接的整个网络系统中常常也伴随有寄主的细胞核。因而我们有理由认为增生大量的具分泌作用的膜结构是一种寄主与病原亲合的表现。本次实验中观察到的‘平原 50’中吸器周围都增生有大量的膜状复合体,这是亲合的反应。但其中管状结构排列很不规则,又可看作是种不亲合的表现,这可能是‘平原 50’对 28 号小种体现中度抗性的结构表现,即同时可见到亲合与不亲合的表现。

图 1-2 是所观察到的吸器具有分枝现象,光镜观察中也可以看到类似现象。这可能是一种抗逆表现,它可以增大吸收面积,也可能与多核现象有关<sup>[3]</sup>。另外,在以往的亲合组合电镜观察中发现吸器内没有液泡或很小,但在‘平原 50’上吸器内部都有一个很大的液泡。

对感病品种‘铭贤 169’和慢锈品种‘平原 50’受侵细胞超微结构的比较观察并结合前人对小麦锈病亲合组合的电镜观察结果,可以看出慢锈品种‘平原 50’上的侵染与典型的亲合组合有以下几点不同之处:

- ①吸器体壁明显加厚,内部液泡增大;
- ②吸器外膜状复合体管状结构排列散乱;
- ③吸器外基质染色比亲合组合中的更深并有大量颗粒状物质沉积;
- ④吸器内部线粒体拉长甚至出现溶解性断裂;
- ⑤在吸器中可观察到聚集状的微管结构(可能与物质转运有关);
- ⑥寄主细胞中叶绿体内部片层结构排列散乱。

上述观察结果仅是初步的,欲求明确的结论尚需对多个慢锈或水平抗性的品种做进一步的电镜观察和深入的研究。

## 参 考 文 献

- 1 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. *Physiol Plant Pathol*, 1982 21:347~359
- 2 Prusky K, et al. The sequence of death of haustoria and host cells during the hypersensitive reaction of oat to crown rust. *Physiol Plant Pathol*, 1980, 17:33~40
- 3 Tiburzy R, Noll U, Reisener H J. Resistance of wheat to *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*; Histological investigation of resistance caused by the Sr5 gene. *Physiol and Molecular Plant Pathol*, 1990, 36:95~108
- 4 Taylor J, et al. Fungal development and host cell responses to the rust fungus *Puccinia substriata* var. *indica* in seedling and mature leaves of susceptible and resistant pearl millet. *Can J Bot*, 1991, 69:1207~1219
- 5 Chong J, et al. Ontogeny of mono-and dikaryotic rust haustoria; Cytochemical and ultrastructural studies. *Phytopath*, 1981, 71:975~983
- 6 曾士迈,肖悦岩. 小麦水平抗性多点联合鉴定方法的研究初报. *中国农业科学*, 1981, (4):58~67
- 7 杨华安,吴立人,Stubbs R W. 绵阳系统小麦品种抗条锈性分析. *中国农业科学*, 1990, 23(6):1~5
- 8 康振生,李振岐,商鸿生,Chong J. 小麦条锈菌吸器发育的超微结构研究. *西北农业大学学报*, 1993, 2(3):25~28
- 9 康振生,李振岐,庄约兰 J, 罗林格 R. 小麦条锈菌吸器超微结构和细胞化学的研究. *真菌学报*, 1994, 13(1):52~57