

小麦白粉菌早期发育与初侵染行为的细胞学研究*

胡东维 李振岐 康振生

(西北农业大学植保系, 陕西杨陵 712100)

摘 要 病菌孢子的萌发不受寄主专化抗性的影响,在叶面及玻片上均可正常进行;但有些抗源材料可抑制附着胞分化的正常分化,附着胞分化的形成需要一定的接触刺激,否则将导致产生纤细附着胞;病菌附着胞的多分枝现象是其多次入侵的表现;高抗性小麦品种多在病菌吸器产生前发生过敏性坏死反应;乳突频率的高低与乳突抗性强弱无必然联系。

关键词 小麦,白粉病,抗病性,细胞学

中图分类号 S432.1, S435.121.46

小麦白粉病是由高度专性寄生菌,禾白粉菌小麦专型(*Erysiphe graminis* f. sp. *tritici*)侵染造成的,近年来在我国发生流行趋势不断增强,现已对我国各主要麦区的小麦生产构成严重威胁。全面认识白粉菌与寄主相互作用的细胞学机理是进一步进行生化与分子生物学研究的基础,对于植物抗性的利用也有重要的指导意义。国外已采用胚芽鞘活体观察单个病菌孢子与寄主细胞的方法对大麦与白粉菌相互作用的细胞学机理作了较为广泛而系统的研究^[1],同时也对叶面接种条件下病菌的发育与初侵染行为有了一些认识^[2-5]。尽管小麦与大麦在许多抗病反应特征上存在着明显差别^[1,6,7],但小麦白粉病这方面研究却开展较少。有关早期发育与侵染行为的认识不但对进行超微结构和细胞化学研究,而且对规范有关细胞学实验方法均有重要的指导意义。为此,本文对已筛选出的多种不同抗病性小麦品种上白粉菌的早期发育与侵染行为进行了较为系统的光镜和扫描电镜分析,并对寄主的筛选和抗性的利用问题等进行了讨论。

1 材料与方法

1.1 病原菌及其繁殖

病原菌小种采用禾白粉菌小麦专化型 012 和 015 号小种,在小麦品种小偃 6 号和阿夫上转接繁殖和保存。在正式试验前,供试小种经两代以上单孢子分离纯化后使用。

1.2 寄 主

本研究所选用的寄主包括高感品种阿夫、小偃 6 号、高加索、洛夫林 10;中抗品种有 Era、宁 7840、提莫非维、尤白兰、白兔 3 号、丰伏早 2 号、CH2632;免疫或近免疫品种 Khapli、Khapli×Cc⁸、小白冬麦、贵州黑麦、栽培一粒小麦及波斯小麦。

寄主材料采用砂土培养,播种后第 8 d 在第一叶完全展开后接种。在接种前 12 h 抖

动除去菌落上的陈旧孢子,用新产生的孢子进行抖落法接种。接种后首先在 20℃,相对湿度 100%,弱光或无光条件下保持 2 h,然后在相同温度,相对湿度 60%~70%,弱光或无光下培养 12 h。随后按 12 h 光照周期处理,光照强度 5 000~7 000 lx。

1.3 光镜样品的制备

在接种一定时间后,将材料切成 1~1.5 cm 长叶段,放入卡诺溶液中 4℃下固定 24 h;系列丙酮溶液脱水并最终在无水丙酮中放置 24 h;透明后的叶片移入 20%甘油水溶液中放置 2~4 h;水中漂洗 5 min;0.05%考马斯亮兰 R-250 染液中染色 2~3 min 或在 0.2%甲苯胺兰染液中染色 5 min;水中漂洗 1~2 min,用 20%甘油封片;光镜观察。或采用扫描电镜样品的制备方法将样品干燥后再浸入 20%甘油,然后染色。

1.4 扫描电镜样品的制备

将样品材料切成约 1 cm 长的叶段,4%戊二醛磷酸缓冲液(100 mM,pH7.2)固定,系列乙醇溶液脱水,乙酸异戊酯置换,CO₂ 临界点干燥仪干燥,离子溅射仪镀膜,扫描电镜(Hitachi S-450)观察。观察病菌侵染介面时,用软毛笔轻拂去叶面孢子,二次镀膜后观察。

2 结果与分析

2.1 病菌在高感寄主上的发育

在最适环境条件下接种后 1 h 孢子萌发率为 50%,2 h 达 91.4%(图版 I.1);接种后 4 h 已有少量孢子长出附着胞芽管,6 h 已达萌发孢子总数的 87.4%。随后芽管不断伸长并从基部产生一隔膜,标志着附着胞已经形成。接种后 8 h,76.3%的萌发孢子形成了成熟附着胞(图版 I.2)。此后,附着胞还要进一步分化产生出入侵器官,从其端部向一侧长出短小分枝,即附着胞分瓣(图版 I.3)。接种后 12 h,有 92%的萌发孢子已完成附着胞分瓣的分化。

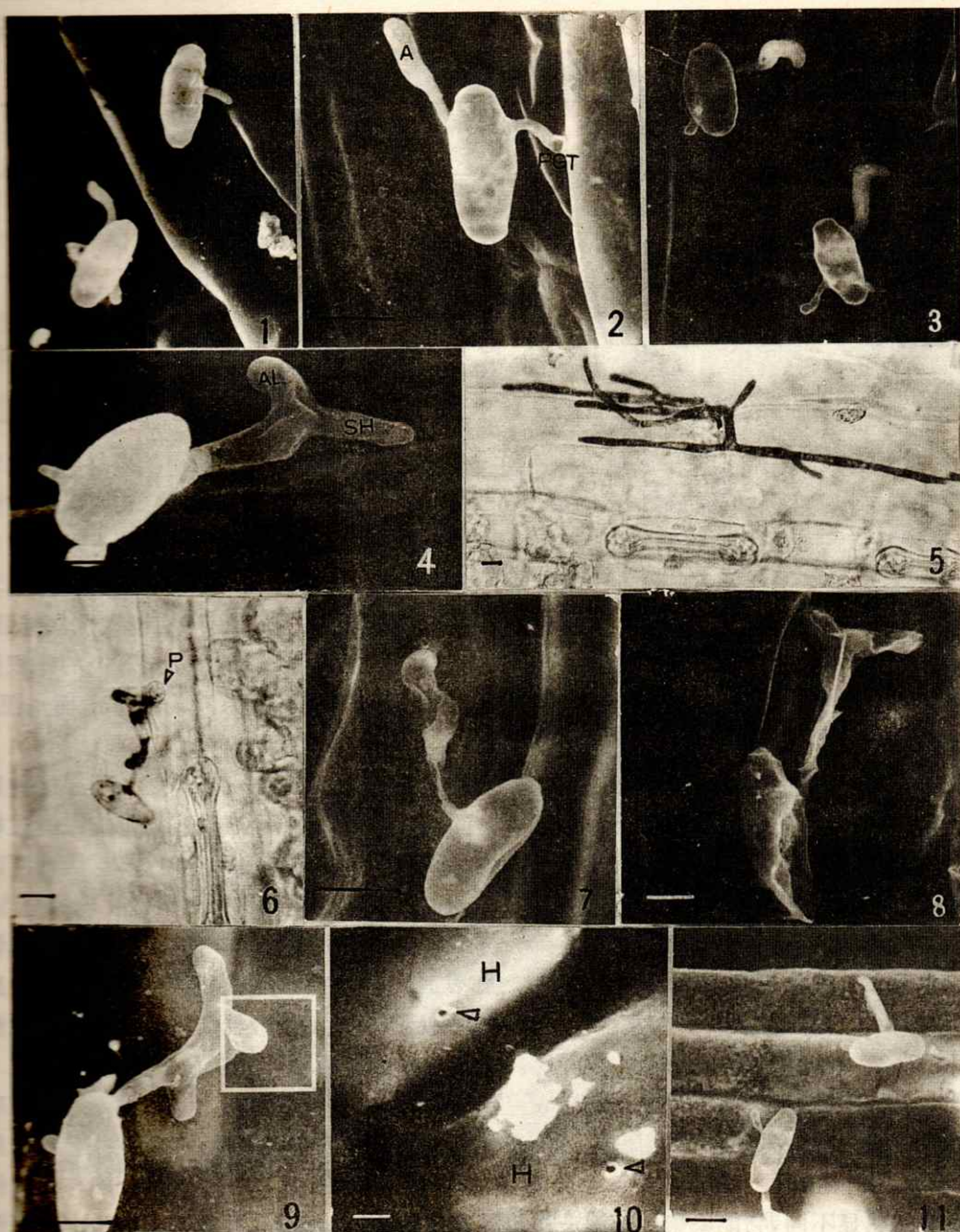
附着胞成熟后开始入侵寄主细胞。接种后 12 h 已陆续有吸器中心体产生,至接种后 24 h,高感材料上多数侵染位点已产生吸器并长出次生菌丝(图版 I.4),标志着侵染成功。接种后 48 h 吸器中心体已向两端长出吸器分枝,次生菌丝也已长出分枝(图版 I.5)。接种后 96 h 肉眼已能观察到白色的小菌落,显微镜下可见到分生孢子产生;接种后 192 h,菌落进入产孢盛期。

2.2 初侵染过程中寄主的防卫反应

2.2.1 孢子的萌发与附着胞的形成 将新鲜孢子分别接种在不同抗性小麦的新鲜或烘干的叶片上,或直接撒在干净的或硅化处理的玻片上,在最适条件下萌发 5 h,孢子的萌发率均在 95%以上,不同处理之间没有明显差别。说明孢子的萌发无需特异性接触介面的诱导,且寄主专化抗性对病菌的萌发过程没有明显的抑制作用。此外,接种密度的大小(40~200/mm²)对萌发速度与萌发率没有明显影响。

只在波斯小麦与一粒小麦上,寄主细胞在病菌附着胞分化完成前已发生坏死,细胞下陷,病菌附着胞也表现为基部膨大,多数不能分化出附着胞分瓣(图版 I.5),说明除少数近缘植物外,大部分抗病寄主对病菌附着胞的发育也无明显影响。

2.2.2 乳突反应 寄主细胞在受到病菌附着胞或初生芽管入侵时往往在入侵位点上沉积出具有自发荧光和强折光性的乳突(图版 I.6)。附表是接种后 48 h 乳突反应的一些主



图版 1. 1~5 高感寄主上病菌的发育。1. 接种后 4 h, 孢子萌发长出初生芽管与附着胞芽管; 2. 接种后 8 h, 附着胞芽管基部产生隔膜, 形成附着胞; 3. 接种后 12 h, 附着胞分化完成, 长出侵染结构附着胞分枝; 4. 接种后 24 h, 附着胞侵染成功, 从端部长出次生菌丝; 5. 接种后 72 h, 次生菌丝长出分枝; 6. 接种后 24 h, 小白冬麦上病菌因寄主乳突反应而入侵失败, 长出第二个入侵分枝; 7. 在小白冬麦上, 病菌附着胞芽管侵染失败, 在寄主细胞上留下了入侵孔; 8. 在游白兰小麦上, 附着胞芽管对寄主细胞两次入侵均未成功; 9. 小偃 6 号上一个三次侵染未成功的病菌孢子; 10. CI12632 上去除了两次侵染均未成功的孢子后, 可见到这两次入侵所留下的入侵孔; 11. 接种后 24 h, Khapli 叶片维管束上方表皮细胞表现出明显的坏死特征, 从坏死扩散情况判断, 这是由初生芽管引起的 (图中标尺除 10 为 2 μm 外, 其余均为 10 μm)。

要参数。鉴于初生芽管的作用(见下文),这里不包括它所作用过的寄主细胞的乳突情况。

附表 小麦对白粉菌侵染的乳突反应

寄主	乳突频率 (%)	乳突直径 (μm)	吸器率 (%)	有效乳突 百分率 (%)	无乳突位点 吸器率 (%)	反应型
小偃 6 号	61.4	4.7	71.0	14.7	48.3	4
阿 夫	66.6	4.3	67.9	18.6	41.0	4
高加索	89.9	4.3	90.0	2.6	24.1	4
游白兰	52.0	6.4	49.7	80.3	82.2	1
宁 7840	61.9	4.6	63.3	21.7	38.9	2
小白冬麦	84.1	6.7	9.2	100.0	57.9	0 ₁
Khapli $\times$ Cc ⁸	91.4	5.4	1.0	99.4	5.3	0
贵州黑麦	30.0	3.6	0	—	—	0

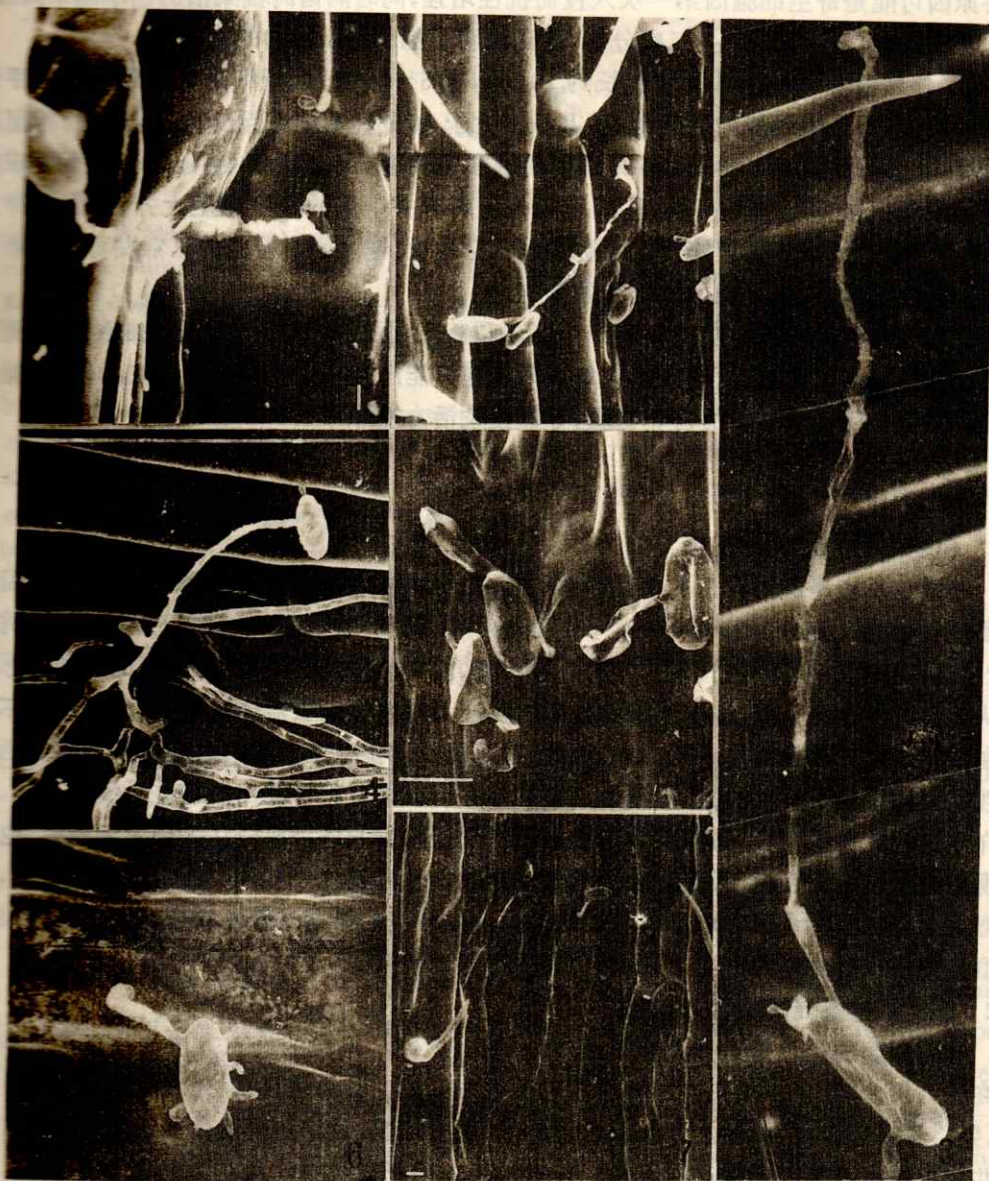
由附表可以看出,乳突反应是各种不同抗性寄主的一种普遍反应,但不同材料之间乳突频率差别很大。其中高抗材料 Khapli $\times$ Cc⁸ 与小白冬麦不仅乳突频率高,而且乳突抗性好;高感材料高加索乳突频率虽高,但乳突抗性很弱,能真正阻止吸器形成的有效乳突只有 2.6%,反而不如乳突频率较低的尤白兰乳突抗性强。这说明乳突频率与乳突抗性是乳突反应的两个不同的特性。但是,乳突大小与乳突抗性之间关系密切,乳突越大抗性越强。

寄主细胞壁上的晕环在扫描电镜下呈反差较高的白斑。晕环的大小与乳突的体积呈正相关,乳突越大,晕环也越大。游白兰与小白冬麦晕环直径一般为 15~25 μm ,而小偃 6 号上多为 10~15 μm 。

2.2.3 早期过敏性反应 在波斯小麦、贵州黑麦及栽培一粒小麦上,在接种后 12 h、病菌尚未产生吸器的情况下,几乎所有被侵的寄主细胞已经表现出染色加深的过敏性反应特征,在扫描电镜下表现为寄主细胞变形下陷(图版 I. 11,图版 I. 6,7)。因此可以说这种过敏性反应不是吸器诱发的。在小白冬麦上也常常能发现这种过敏性反应的位点,它们大部分由附着胞侵染所诱发,也有部分位点象是由初生芽管诱导的,但它在扫描电镜下表现与上述 3 个材料明显不同,主要是细胞表面变得粗糙,导电性变劣,整个细胞轮廓变白(图版 I. 11,图版 I. 6)。为了与大麦 *Mla* 基因所控制的由吸器所诱发的细胞过敏性坏死相区别,在此我们暂把波斯小麦等材料上的过敏性反应称作早期过敏性反应。

2.2.4 病菌侵染失败与再侵染 从附表可以看出,不论在什么寄主上病菌都不可能在所有侵染位点上产生吸器。如果附着胞第一个分瓣下不能成功侵染,那么病菌往往会在与第 1 个分瓣相对称的另一侧产生第 2 个分瓣,进行再次入侵(图版 I. 8)。这种分瓣与幼嫩的次生菌丝明显不同,它能象第 1 分瓣一样诱导寄主细胞产生晕环,并在寄主细胞上留下深深的入侵孔(图版 I. 10)。同样,如果第 2 次入侵再次失败,还可能继续产生出第 3 个附着胞分瓣(图版 I. 9)。

在低密度接种情况下(<50 个/ mm^2),随寄主侵染反应型的升高病菌多次分瓣的比率减少。这主要是因为高感材料上大部分侵染位点可以成功侵染并产生吸器,长出次生菌丝;而高抗材料如 Khapli $\times$ Cc⁸ 及小白冬麦上几乎没有成功侵染位点。但在高密度接种时,高感材料如小偃 6 号也会同样产生很高比率的次生分瓣。说明病菌附着胞的再次分瓣与侵染体现了它对寄主抗性所产生的适应性。



图版 I. 1~2. 尤白兰上病菌初生芽管由于悬空生长而形成纤细附着胞, 未能成功侵染形成菌落; 3. 一个极度伸长的纤细附着胞, 其基部有两个隔膜; 4. 接种后 72 h 阿夫上一病菌纤细附着胞侵染成功, 这是整个试验中唯一一例由纤细附着胞形成的菌落; 5. 接种后 24 h, 波斯小麦表皮细胞多坏死下陷, 病菌附着胞分化异常, 无正常附着胞分瓣; 6、7. 接种后 24 h, Khapli 上由附着胞引发的寄主细胞过敏性反应 (图中标尺均为 $10\ \mu\text{m}$)。

在使用新鲜孢子接种时, 约有 20% 的孢子在侵染失败后不再产生二次分瓣 (图 I. 1), 约 70% 的孢子可产生第 2 次分瓣, 产生第 3 次分瓣的不足 10%。这说明再分瓣的能力可能与病菌孢子的活力有关。遗憾的是附着胞第二、三分瓣成功侵染的情况极其罕见。其

主要原因可能是寄主细胞因第一次入侵而抗性增强,同时病菌的侵染活力也不断下降。病菌孢子中约有 20% 不能产生二次分瓣,这正说明了孢子侵染活力的有限性。

2.2.5 纤细附着胞 正常附着胞长约 20 μm ,宽 5~6 μm ;而纤细附着胞则表现为芽管极度伸长,基部产生隔膜的时间延迟,其长多大于 40 μm ,有的甚至 100 μm 以上,但宽往往只有 2~3 μm (图版 I.2~4)。纤细附着胞往往伴随以下情况产生:①附着胞芽管或附着胞由叶面高处向低洼处生长;②附着胞位于坏死并下陷的寄主细胞上方;③因接种方法、密度不当造成孢子叠压等使附着胞芽管悬空生长。这说明附着胞的正常发育可能需要一定的接触刺激,否则可能形成纤细附着胞。

纤细附着胞极少能成功侵染而产生吸器和菌落,图版 I.4 是整个试验中唯一一例建立了菌落的纤细附着胞。而绝大多数纤细附着胞只能产生一个分瓣进行一次入侵,可能是在徒长过程中消耗了过多的营养物质,导致侵染活力下降。

3 讨 论

3.1 小麦细胞的过敏性反应

过敏性反应是最为典型的植物抗病性机制,禾谷类作物中绝大多数抗白粉病基因都是通过过敏性反应来发挥作用的^[1]。以前的有关研究多认为过敏性反应是由吸器诱发的^[4]。但在高抗小麦材料如小白冬麦、一粒小麦、波斯小麦及贵州黑麦上,不论从细胞形态或从侵染进程方面分析,表皮细胞的过敏性反应都不可能是吸器诱发的,因为细胞的坏死远在吸器产生之前已明显表现出来。因此,很可能是这些寄主细胞中存在有某种能激活过敏性反应的接受子,可特异性识别由病菌初生芽管或附着胞释放出的某些激发子物质,从而介导过敏性反应。利用微注射方法把过敏性反应细胞的各种成分注入健康细胞时,也未发现能诱发过敏性反应,因而排除了毒素主导过敏性坏死的可能性^[1]。由此可以看出,植物寄主上可有两种诱因完全不同的过敏性反应。小麦的早期过敏性反应多发生在侵染反应型为免疫或近免疫的寄主上,因而值得更深入的研究。

3.2 病组织样的光镜染色方法

叶面病菌的染色是进行光镜样品制备的关键环节,不同的染色方法往往直接影响到最终的结果分析^[3]。一般先要进行组织透明处理以减少叶片色素,但处理后的组织透性增强,染料容易进入,从而增加背景着色,加大了观察难度。因此多采用微分干涉显微镜或激光共焦扫描显微镜来排除这种干扰。作者发现如果把透明的叶片在 20% 甘油中浸泡 2 h 以上,再用考马斯亮兰 R-250(蛋白质特异性染料)进行短时间染色,那么几乎只有病菌菌丝及寄主气孔细胞的原生质体着色。在此情况下不但可以观察到叶面上几乎所有病菌个体,而且在显微镜下利用乳突的高折光性能可容易地将其检出。如采用 Koga 等^[3]染色方法,高加索小麦的乳突频率为 50%(姚技强,西北农业大学硕士论文,1993);而用本方法时统计结果为 89.9%。此外,如果在扫描电镜样品制备方法的基础上延长纯丙酮脱水及乙酸异戊酯置换时间,样品经临界点干燥后再浸入甘油溶液,则透明和染色效果更为理想。

致谢:承蒙西北农业大学植保系张志德教授、姚技强同学及中国农科院植保所盛宝钦研究员和段霞

博士提供有关菌种,特此致谢。

参考文献

- 1 Aist J R, Bushnell W R. Invasion of plants by powdery mildew fungi and cellular mechanisms of resistance. in: Cole G T and Toch H C ed, *The Fungal Spore and Disease Initiation in Plants and Animals*. New York: Plenum Press. 1991. 321~345
- 2 Carver T L W, Ingerson-Morris S M. Effects of inoculum density on germling development by *Erysiphe graminis* f. sp. *avenae* in relation to induced resistance of oat cells to appressorial penetration. *Mycol Res*. 1989. 92: 18~24
- 3 Koga H, Bushnell W R, Zeyen R J. Specificity of cell type and timing of events associated with papilla formation and the hypersensitive reaction in leaves of *Hordeum vulgare* attacked by *Erysiphe graminis* f. sp. *Hordei*. *Can J Bot*. 1990. 68: 2344~2352
- 4 Koga H, Toyoda H, Mayama S et al. Characteristic cellular responses as expression of genes for resistance to *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* in barley leaves. *Phytopathol*. 1983. 73: 907~910
- 5 Kunoh H, Aist J R, Israel H W. Primary germ tubes and host cells penetrations from appressoria of *Erysiphe graminis hordei*. *Ann Phytopathol Soc Japan*. 1979. 45: 326~332
- 6 Barber M S, Ride J P. Levels of elicitor-active- β -(1-4) linked N-acetyl-D-glucosamine oligosaccharides in the lignifying tissue of wheat. *Physiol Mol Plant Pathol*. 1994. 45: 37~45
- 7 Smart M G, Aist J R, Israel H W. Structure and function of wall appositions. 1. General histochemistry of papillae in barley coleoptiles attacked by *Erysiphe graminis* f. sp. *Hordei*. *Can J Bot*. 1986. 64: 793~801

Cytological Studies on Development and Primary Infection of *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici* in Wheat

Hu Dongwei Li Zhenqi Kang Zhensheng

(Department of Plant Protection, Northwestern Agricultural University, Yangling Shaanxi 712100)

Abstract The studies on development and primary infection of *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici* were conducted with light and scanning electron microscopy in this paper. The results showed that the conidia could be germinated both on leaves of all wheat cultivars and glass slides, without any significant effects of cultivar-specific resistance on germination, but some cultivars inhibited the differentiation of appressorial lobe, the fungal infection organ. A contact stimulation was necessary for appressorial formation, otherwise thin appressorial would be produced. The multiple differentiation presences of the appressoria were resulted from their repeated inflexions. In high resistant hosts, the hypersensitive responses might happen prior to the present of fungal primary haustorium in the cell. There was no positive relation between papilla frequency and papilla-associated resistance.

Key words wheat, powdery mildew, *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici*, cytology