

黄瓜抗霜霉性的组织学和超微结构研究*

马青¹ 崔鸿文² 魏国荣¹ 董志有¹

(1 西北农业大学植保系, 2 园艺系, 陕西杨陵 712100)

摘 要 组织学研究表明, 黄瓜霜霉菌在不同抗病类型品种上, 其侵入前的过程基本相似, 并且都能形成胞间菌丝和吸器。然而, 随着品种抗病性的增强, 吸器形成速率变慢, 数目减少, 同时菌丝扩展缓慢, 寄主细胞坏死发生时间早, 机率高。电镜观察显示, 抗病品种中菌丝和吸器的细胞质中液泡数量增加, 菌丝和吸器的壁与细胞质膜分离, 原生质电子致密度加深。最后菌丝和吸器解体, 受侵寄主细胞分泌的胼胝质, 可将吸器体完全包围, 从而阻止了吸器的进一步发育; 在发生坏死的寄主细胞中, 吸器也解体坏死。

关键词 黄瓜, 黄瓜霜霉菌, 组织学, 超微结构

中图分类号 S436.421.11, S432.23

黄瓜霜霉病 [*Pseudoperonospora cubensis* (Berk. et Curt.) Rostow.] 是黄瓜上的毁灭性病害, 利用抗病品种是防治该病的最有效措施。采用组织学和电镜技术研究该病菌在不同抗病类型上的侵染过程, 是揭示寄主抗病机制的重要方面之一。

关于霜霉病的抗性机理, 国外在莴苣霜霉病^[1]、甘蓝霜霉病^[2]、大豆霜霉病^[3]等方面都有深入的研究, 但对黄瓜霜霉病研究甚少。国内李靖等^[4]仅就病菌侵入后寄主的一系列变化进行了研究, 但未从病菌以及与寄主相互作用方面进行探讨。为此, 作者选用不同抗性的黄瓜品种, 就黄瓜霜霉菌的侵染过程及侵入后寄主与病菌的相互关系的一系列变化, 探讨黄瓜品种的抗病性机制, 从而为抗病育种提供理论依据及鉴定手段。

1 材料和方法

1.1 供试品种与菌种

选用不同抗性的黄瓜品种4个: 津杂2号(抗病)、津研6号(中抗)、黑单1号(中感)、长春密刺(感病)。将种子催芽处理后, 播于直径为20 cm的花盆中, 待幼苗长出4片真叶时, 用于接种试验。供试菌种采自大田发病植株, 室内在感病品种长春密刺上繁殖备用。

1.2 接种

接种前, 先将发病长霉层的黄瓜叶片用清水冲洗后, 置100%相对湿度下保湿24 h, 用毛笔将新产生的霉层刷入无菌水中, 配成孢子囊悬浮液, 均匀地喷在黄瓜植株的第二叶上, 保湿16 h, 最后将接种幼苗置人工光源下培养, 光照为1万 lx, 光照时间每天16 h, 温度为18~22℃。

1.3 取样、染色及光学显微镜观察

于接种后4, 6, 12, 24, 48, 72, 96 h各取样一次, 每次每品种取1 cm×0.5 cm的叶块6~8个, 置于饱和的水合三氯乙醛溶液中透明, 然后在0.1%乳酚油棉蓝液中染色15 min,

收稿日期: 1995-04-05
* 国家“八五”攻关项目

以乳酚油作浮载剂,在光学显微镜下观察侵入方式、菌落、吸器发育以及黄瓜叶肉细胞坏死程度等。菌落大小用其长度即菌落两端伸展最远的菌丝尖端之间的距离表示,吸器和黄瓜叶肉组织坏死数量均按侵染点(菌落)为单位分别统计。叶表面孢子萌发情况,采用荧光染色法,接种叶片先用荧光染料 Calcofluor white 染色后,于荧光显微镜下观察。

1.4 电镜制样及观察

于接种后第 1,3 d 分别于感病品种长春密刺及抗病品种津杂 2 号接种叶片上采样。叶样于 4% 在戊二醛液中固定 16 h, 随后用 2% 钼酸固定 2 h, 然后经系列丙酮脱水,用 Epon 812 环氧树脂包埋。样品的超薄切片经醋酸双氧铀和柠檬酸铅双重染色后,在 JEM-2000EX 型透射电镜上观察、拍照。

2 结果与分析

2.1 光学显微镜观察

2.1.1 黄瓜霜霉菌的侵入 通过普通光学显微镜和荧光显微镜观察,黄瓜叶面上接种孢子囊后,这些孢子囊在水滴中萌发产生游动孢子,游动孢子游动一段时间后在气孔上休止成为休止孢,休止孢直接萌发从气孔侵入叶内。接种后 4 h 观察,所有品种的气孔正下方都形成了梨形或不规则形状的气孔下囊。而位于气孔外的休止孢虽然可以萌发产生芽管,但却很少侵入。接种后 6 h,在 4 个品种上,叶表面休止孢的萌发率为 35.5%~38.6%,这些萌发的芽管通常并不侵入寄主,这表明只有到达气孔的游动孢子才能萌发侵入叶内。上述过程在感病和抗病的黄瓜品种上基本相似。通常一个气孔上只形成一个侵染点,但有时也可以形成两个侵染点。在一个气孔上有两个休止孢,分别产生气孔下囊和侵染菌丝。

2.1.2 黄瓜霜霉菌的吸器形成 接种后 6 h,气孔下囊上长出侵染菌丝,然后从侵染菌丝上产生裂瓣状或球状吸器伸入寄主细胞,偶而从气孔下囊上直接产生吸器。吸器的形成标志着病原物与寄主寄生关系的建立,黄瓜霜霉菌成功侵入是以吸器的形成为标志的,虽然不同抗性的黄瓜品种在接种后 6 h 都开始产生吸器,但在抗病品种上只有少数侵染点有吸器形成,而感病品种上较多,并且在个别的侵染点上产生了两个吸器。接种后 6 h,抗病品种的侵入率为 21%,而感病品种则为 65.6%。在感病和中感品种上,单个侵染点的吸器平均数明显多于抗病品种。随着菌丝的扩展,吸器数目随之增多。接种后 24 h,感病品种单个侵染点吸器平均数为 2.15 个,而抗病品种仅为 0.91 个,到 48 h,吸器数目骤然增多,感病品种达 11.17 个,而抗病品种仅为 2.53 个,二者相差悬殊,中感和中抗品种吸器平均数居中(表 1)。在观察中还发现,在一个寄主细胞里可以形成 2 个以上的吸器。

表 1 不同抗病类型黄瓜品种上的霜霉菌吸器形成比较*

抗病类型	品种名称	接种后不同时间单个侵染点吸器平均数(个)					
		6 h	12 h	24 h	48 h	72 h	96 h
抗病	津杂 2 号	0.21	0.66	0.91	2.53	3.82	4.68
中抗	津研 6 号	0.55	1.02	1.26	4.15	6.33	7.71
中感	黑单 1 号	0.63	1.12	1.64	8.15	10.90	13.52
感病	长春密刺	0.70	1.38	2.15	11.17	13.25	15.57

* 每次每品种镜检 30 个侵染点。

2.1.3 黄瓜霜霉菌的菌落扩展 侵染菌丝不断分枝扩展形成菌落。接种后 24 h 内,霜霉

菌菌落扩展缓慢,此后明显加快,接种后 48 h,感病品种菌落线性长度 164.6 μm ,已明显大于抗病品种(64.7 μm),中感、中抗品种分别为 117.6 μm 和 75.0 μm (表 2)。菌落扩展趋势与吸器形成数目相一致,随着菌落的扩展,形成了更多的吸器。

表 2 不同抗病类型黄瓜品种霜霉菌的菌落扩展*

抗病类型	品种名称	接种后不同时间菌落长度(μm)			
		24 h	48 h	72 h	96 h
抗病	津杂 2 号	16.4	64.7	73.9	82.3
中抗	津研 6 号	19.5	75.0	98.1	107.4
中感	黑单 1 号	25.4	117.6	127.8	176.2
感病	长春密刺	27.9	164.4	176.2	190.7

* 每次每品种镜检 30 个菌落。

2.1.4 寄主细胞的坏死 在霜霉菌侵染过程中,寄主细胞迅速坏死是抗性表达的一个重要方面。本研究观察到,抗病、中抗品种从接种后 24 h 起寄主细胞就开始出现坏死。中感品种坏死反应出现较晚,在接种后 48 h 出现,而感病品种在 72 h 也出现坏死,但机率较低,坏死细胞数较少。抗病品种在接种后 72 h,出现坏死细胞的侵染点数目占 40.7%,而感病品种为 13.7%,表明不同抗病类型的品种,坏死反应出现的时间及机率显然不同。

2.2 电子显微镜观察

2.2.1 胞间菌丝 电镜观察发现,黄瓜霜霉菌侵入感病品种叶片组织中后,可在细胞间隙产生大量呈线状的胞间菌丝。菌丝扩展时产生分枝,但均无隔膜。菌丝细胞壁在电镜下可分辨出由两层构成,其内层电子致密度较低,但较厚;而外层电子致密度较高,并且较薄。菌丝细胞内分布有大量的线粒体、内质网、核糖体、脂肪粒以及高尔基体等细胞器。原生质中并分布有小型液泡,菌丝细胞质膜中度染色,紧贴菌丝细胞壁(图 1)。而在抗病品种的叶片内,菌丝的数量明显减少,并且菌丝细胞内发生了一系列变化。菌丝细胞原生质中液泡数目增加,并且体积增大。细胞质膜染色程度加深,并与细胞壁分离。细胞内原生质的电子致密度加深,细胞器呈不规则排列,并趋于解体(图 2)。

2.2.2 吸器 菌丝在感病品种叶片细胞间扩展过程中,当与寄主细胞壁接触后,可产生入侵结构伸入寄主细胞内而形成吸器。每一菌丝在扩展过程中可先后产生多个吸器。吸器形成时,在与寄主细胞接触的菌丝细胞壁上先形成一个楔状的入侵栓,它穿过寄主的细胞壁,使寄主细胞质膜内陷,同时入侵栓顶端开始延伸和扩展形成吸器(图 3)。多数吸器都为颈部和膨大的吸器主体两部分,少数吸器颈部不明显或没有。吸器体通常呈菌丝状,具分枝(图 4)或者呈球状。吸器体壁由两层构成,其外层染色较深,而内层染色较浅。吸器在寄主细胞内发育过程中,始终未刺破寄主细胞质膜,而是被寄主质膜包围起来。而抗病品种细胞内,尽管吸器可以形成,然而吸器体通常呈畸形,吸器内液泡数量增加,吸器质膜与吸器壁分离,吸器内原生质电子致密度加深,细胞器趋于解体,最后吸器坏死(图 6)。

2.2.3 寄主细胞的变化 在菌丝细胞产生入侵栓,入侵寄主细胞壁以及吸器发育过程中,寄主细胞发生了一系列的变化。其中最明显的特征是向入侵部位分泌和沉积胼胝质(图 3),这种现象在感病品种中也有出现,但是在抗病品种中较为普遍,并且胼胝质的分布面广,有时可将入侵结构完全包围起来,从而阻止了吸器的形成;而有些胼胝质则包围



说明

图版

在肝组织和神经组织中抗腺病毒血清的
 在肺组织和神经组织中抗腺病毒血清的
 在脑组织和神经组织中抗腺病毒血清的

了吸器,阻止了吸器的进一步发育(图5)。接种后第1 d,感病品种细胞保持正常,而抗病品种侵染点中个别寄主细胞,其原生质电子致密度加深,细胞器呈现无规则排列,并且有些已经解体,整个寄主细胞趋于坏死。到接种后第3 d,含坏死细胞的侵染点数目明显增加,并且寄主细胞完全坏死并已解体(图6)。在观察中也发现,在发生坏死的寄主细胞中,其吸器也都坏死解体。

3 讨 论

植物抗病性是寄主-病原物相互作用复杂过程的表现。本试验利用普通光学显微镜、荧光显微镜和电子显微镜,就黄瓜霜霉菌在不同抗病类型的黄瓜品种上的侵染过程进行了较为系统的观察,基本明确了不同抗性表达中所涉及到的重要事件、时间顺序以及病菌发育受抑的特征。

Cohen^[5]曾报道,在感病和抗病黄瓜品种上,黄瓜霜霉菌的游动孢子释放,休止以及萌发产生芽管侵入气孔,这些过程都基本相似,并且侵入寄主以后也都能产生胞间菌丝,形成吸器。本试验所获结果也证实了这一点,而与李靖等^[4]的结果有不同之处,他们在抗病品种上没观察到菌丝及侵染过程。我们的研究进一步表明,黄瓜霜霉菌在不同黄瓜品种上侵染的组织病理学特征表现不同。与感病品种相比,黄瓜霜霉菌在抗病品种上的侵染过程受到了明显的抑制,吸器形成速率变慢,吸器数目减少,同时菌丝扩展缓慢,菌落减小。黄瓜霜霉菌这种侵染受抑的程度与品种抗性密切相关,随抗病性增强,受抑程度加重。

黄瓜霜霉菌侵入寄主后,随吸器在寄主细胞内的形成,标志着病菌与寄主间寄生关系的建立。然而,在抗病和感病品种上,病菌吸器形成的速率存在着明显差异。吸器形成受阻无疑与品种抗病性的表达有密切关系。值得注意的是,在接种后6 h,在感病品种上65.6%的侵染点已有吸器形成,但在抗病品种上仅21%的侵染点产生了吸器,这表明在吸器形成初期,抗病品种已表达出对黄瓜霜霉菌的抗性。随着寄生抗病性的表达,病菌菌丝扩展缓慢,吸器数量减少,并且吸器和菌丝细胞内也发生了一系列的病变,由最初原生质的电子致密度加深,细胞器呈不规则排列,到最终细胞器解体而坏死。病菌在抗病品种上的这些组织学和细胞学特征仅仅是侵染受抑的结果,而就其受抑的直接原因可能涉及到寄主抗性的生理生化机理。

在多种霜霉菌与寄主相互关系的超微结构研究中,康振生等^[6]和 Wehtje 等^[7]曾观察到,在霜霉菌侵入寄主细胞形成吸器的过程中,部分寄主细胞在入侵栓部位分泌并沉积大量胼胝质,但胼胝质的功能目前仍不清楚。本试验也发现,在黄瓜霜霉菌吸器发育过程中,寄主细胞也不同程度地分泌和积累了胼胝质,但是胼胝质积累的量 and 分布范围在抗病品种与感病品种中不尽相同。在抗病品种中,受侵细胞出现胼胝质的机率高,同时胼胝质在细胞中的分布较广,有时可将整个吸器体包围起来。在此情况下,吸器的进一步发育与营养的吸收无疑会受到阻碍。由此表明寄主细胞分泌胼胝质可能与寄主抗性表达有关。

李靖等^[4]在研究黄瓜抗病品种受霜霉菌侵染中观察到了寄主细胞的过敏性坏死现象。在本试验中我们发现,不仅在抗病品种的侵染点中可观察到坏死的寄主细胞,而且在部分感病品种的侵染点中也有坏死寄主细胞存在,但是两者在出现时间和机率上存在明显差异。在抗病品种上,接种后24 h寄主细胞就开始出现坏死,而感病品种在接种后72 h

才有坏死寄主细胞出现,并且坏死细胞数目很少,并不影响菌丝的扩展。黄瓜霜霉菌为严格寄生菌,寄主细胞的迅速坏死可明显抑制它的进一步发育。本试验的电镜观察发现,在抗病品种上发生坏死的寄主细胞有两种类型,一类是被病菌侵染的,即寄主细胞内有吸器存在,并且吸器已经解体坏死;另一类是未被侵染的。这两种情况下,病菌坏死与寄主细胞坏死是同时发生,还是互为因果,其坏死发生的直接因子是什么,这些问题值得进一步研究,它们的澄清将为揭示其抗病的内在机理提供科学依据。

参 考 文 献

- 1 [英]费兰德 J, 恩雷尔福尔 D R. 莴苣盘梗霉对莴苣的侵染. 植物与寄生物关系的生化问题. 1976, 29~50
- 2 Chou C K. An electron microscope study of host penetration and early stage of haustorium formation of *Peronospora parasitica* (Fr.) Tul. on cabbage cotyledons. *Ann Bot*, 1970, 34: 189~204
- 3 Dunleavy J M. Downy mildew of soybean. In: The downy mildew. Spencer D M ed. London: Academic Pr. , 1981, 515~529
- 4 李靖等. 黄瓜对霜霉病抗性的显微和超微结构的研究. 武汉植物研究, 1991, 9(3): 209~214
- 5 Cohen Y. Downy mildew of cucurbits. In: The downy mildew, Spencer D M(ed.) London: Academic Pr. , 1981, 314~354
- 6 康振生, 胡东维, 商鸿生. 向日葵霜霉菌吸器和孢囊梗发育的电镜观察. 西北农业大学学报, 1993, 21(增 2): 41~45
- 7 Wehtje G, Littlefield L T, Zimmer D E. Ultrastructure of compatible and incompatible reactions of sunflower to *Plasmopara halstedii*. *Can J Bot*, 1979, 57: 315~323

The Histology and Ultrastructure of Cucumber Resistance to *Pseudoperonospora cubensis*

Ma Qing¹ Cui Hongwen² Wei Guorong¹ Dong Zhiyou¹

(1 Department of Plant Protection, 2 Department of Horticulture,
Northwestern Agricultural University, Yangling, Shaanxi, 712100)

Abstract Histological studies indicated that among cucumber cultivars of various resistant degrees, the pre-penetration processes of cucumber downy mildew, *Pseudoperonospora cubensis*, were similar and that the intercellular hyphae and haustoria were formed; but the formation of haustoria became slower in speed and fewer in number. The mycelial growth slowed down and the host cell necrosis occurred more often and earlier with resistance increase. TEM observation showed that the vacuoles in cytoplasm of hyphal cells and the haustoria in resistant cultivars increased in number, and that the walls of both hyphae and haustoria were separated from plasmalemma. The cytoplasm of hyphae and haustorium became denser and the hyphal cells and haustoria turned out to be degenerated. As a result, the collars formed in the infected host cells could thoroughly surround the haustoria, thus inhibiting further development of the haustoria, resulting in the degeneration of the haustoria in the necrosis host cells.

Key words Cucumber, *Pseudoperonospora cubensis*, histology, ultrastructure