

网络出版时间:2017-11-06 13:53

DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2017.12.013

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20171106.1353.026.html>

小麦与两种病原菌互作的冷冻切片观察效果

姚娟妮^a, 成玉林^{a,b}, 韩青梅^a, 张国云^a

(西北农林科技大学 a 旱区作物逆境生物学国家重点实验室, b 生命科学学院, 陕西 杨凌 712100)

【摘要】【目的】制作小麦与条形柄锈菌小麦专化型(*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*)和禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*)互作的冷冻切片, 评判基于冷冻切片观察 2 种病原菌对小麦侵染过程的效果, 为将冷冻切片技术应用于植物病原菌侵染检测提供依据。【方法】以水源 11 和小偃 22 为试验材料, 分别接种条形柄锈菌小麦专化型和禾谷镰刀菌, 取样制备冷冻切片, 用 Olympus BX51 多功能显微镜观察 2 种病原真菌在侵染小麦叶片和穗部过程中的发育结构。【结果】利用冷冻切片观察到条形柄锈菌小麦专化型和禾谷镰刀菌 2 种病原真菌结构清晰, 小麦组织和细胞形态完整, 对比度良好。【结论】冷冻切片技术可用于植物病原菌侵染的预检。

【关键词】冷冻切片技术; 条形柄锈菌小麦专化型; 禾谷镰刀菌; 组织学

【中图分类号】Q-336

【文献标志码】A

【文章编号】1671-9387(2017)12-0090-05

Observation of cryosectioning technique in interaction of wheat and two pathogens

YAO Juanni^a, CHENG Yulin^{a,b}, HAN Qingmei^a, ZHANG Guoyun^a

(a State Key Laboratory of Crop Stress Biology for Arid Areas, b College of Life Science, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】By making frozen section samples of interactions between wheat and *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* and *Fusarium graminearum*, the infection process of the two pathogens on wheat was observed to provide basis for use of the cryosectioning technique in detecting infection of plant pathogens. 【Method】Wheat cultivars Suwon 11 and Xiaoyan 22 were inoculated using the two pathogens, and collected to prepare frozen section samples. The fungal structures of the two pathogens developed in wheat leaf and head tissues were observed using multi-functional microscopy (Olympus BX51). 【Result】The cryosectioning technique was suitable for observing structures of *P. striiformis* f. sp. *tritici* and *F. graminearum* infected wheat tissues easily, and configurations of wheat tissues and cells were kept in a good shape and had good contrast. 【Conclusion】The cryosectioning technique can be used to pre-check infection of plant pathogens.

Key words: cryosectioning technique; *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*; *Fusarium graminearum*; histology

植物病害是严重危害农作物生产的自然灾害之一, 由植物病原真菌引起的病害约占植物病害的

【收稿日期】2016-11-11

【基金项目】中国博士后科学基金项目(2015M580882)

【作者简介】姚娟妮(1986—), 女, 陕西扶风人, 实验师, 硕士, 主要从事植物与病原菌互作的组织细胞学研究。
E-mail: yaojuanni115@163.com

【通信作者】张国云(1974—), 男, 甘肃陇西人, 高级实验师, 硕士, 主要从电子显微镜的研究管理工作。
E-mail: zhangguoyun@nwsuaf.edu.cn

70%~80%。许多病原真菌寄生于植物组织内,只有通过制作显微切片,观察其形态特征,才能对其进行系统研究,从而搞清楚其生物学特性及发生规律,为防治措施的制定提供科学依据。组织切片技术是植物病理研究中观察病原真菌形态的常用方法,冷冻切片技术属于组织切片技术中的一种,它是利用低温使组织迅速冻结达到一定硬度后进行切片的一种方法。与常规的石蜡切片相比,冷冻切片因其不经过脱水和透明等步骤,具有快速简便、易操作、易保持生物体细胞原有形态等特点,该技术在医学上应用比较多。近年来在植物上的研究也逐渐多起来,且常常集中在植物器官结构,如高度木质化材料^[1]、植物花器官^[2]、植物微管骨架^[3]以及植物组织化学方面^[4]的研究上,而在植物病害方面的应用和研究较少。

由条形柄锈菌小麦专化型(*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*)引起的小麦条锈病和由禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*)引起的小麦赤霉病,是危害小麦的两大重要真菌病害^[5]。小麦感染这 2 种病菌后,不仅产量、品质下降,而且感染赤霉病菌后,由于受侵染小麦籽粒中含有真菌毒素,还可致人畜中毒^[6-7]。目前虽然对这 2 种病害的组织学研究较多,但是随着分子生物学突飞猛进的发展,激光共聚焦显微镜技术的推广辅以各种免疫荧光探针或荧光染料与被检测物质特异性结合,不仅需要观察组织细胞切片,还需要对活细胞的形态结构、分子和离子变化进行实时动态的观察及检测。而冷冻切片技术是多重免疫荧光标记及激光共聚焦显微镜技术前期制样的关键技术,因此本研究探索小麦与 2 种病原菌互作的冷冻切片制作方法及其观察效果,以便与激光扫描共聚焦显微镜技术相结合,为后续的危害发育、鉴定和防治提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材 料

小麦品种:水源 11 和小偃 22,均由西北农林科技大学旱区作物逆境生物学国家重点实验室提供。

供试菌种:条形柄锈菌小麦专化型条中 32 号生理小种(CYR32)和禾谷镰刀菌野生型菌株 PH-1,均由西北农林科技大学旱区作物逆境生物学国家重点实验室提供。

1.2 仪器与试剂

LEICA CM3050S 恒温冷冻机(莱卡公司,德国),Olympus BX51 多功能显微镜(奥林巴斯公司,

日本),LEICA OCT 包埋剂(莱卡公司,德国)。

1.3 方 法

1.3.1 接种方法 将水源 11 的种子播种于直径 10 cm 的培养钵中,待小麦生长 7~8 d,即第一叶完全展平、第二叶刚露时接种;用毛笔涂抹接种法^[8]将新鲜的条锈菌夏孢子接种于小麦叶片,接着将接种植株放置于 16 ℃ 黑暗保湿箱保湿 24 h,然后移至 16 ℃ 温室培养,接种后第 5 天从接种叶片采样,以后每隔 1 d 采样 1 次,直至叶片现孢。

供试菌种禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*)野生型菌株 PH-1 采用麦粒培养基扩大繁殖,具体方法参照文献^[9]。2014 年 10 月中旬将小偃 22 播于直径 30 cm 的花盆中,待翌年小麦扬花时用于接种试验。接种前,用无菌水冲洗麦粒培养基得到分生孢子,用无菌水调节孢子浓度至 2×10^5 mL⁻¹,然后将其接种于扬花期小麦穗头的内稃和外稃之间,每小花接种 10 μ L。接种后用保鲜袋封住接种穗,喷水保湿,25 ℃ 培养 48 h,摘掉保鲜袋,选取接种点外稃进行冷冻切片。

1.3.2 切片制备与观察 样品制备步骤为:取样—固定样品至冷台—冷冻切片—展片—观察拍照。

(1)取样。将接种条形柄锈菌的小麦叶片剪成 0.5 cm 长叶段,将接种禾谷镰刀菌的小麦穗头外稃用镊子轻轻取下,按时间点将采集到的样品排列好,在冷冻室内将样本装入样品盘快速冷冻并定位。

(2)固定样品。将冷刀与切片刀固定在切片机的刀槽上,平放冷台,并启动快速 LEICA CM3050S 恒温冷冻机的冷刀与冷台,将冷刀温度降低到 -24 ℃,冷台温度降至 -22 ℃。将样品切为 0.5 cm 高,随后在样品盘底部滴少量 LEICA OCT 包埋剂,迅速将待切的样品垂直插入包埋剂中,用镊子使其保持竖直状态,待下部完全固定,在其周围滴加 LEICA OCT 包埋剂逐层包埋,直至样品全部被包埋并能牢固粘附在样品台上。

(3)冷冻切片。把粘附有组织材料的冷台固定于冷台固定槽上,拧紧固定螺钉,将切片厚度设置为 20 μ m,匀速摇动旋转手轮进行切片。在切片过程中,如冷刀上的霜层较厚,应及时启动除霜程序去除切片上的霜层,以防卷片。

(4)展片。切片被切下后,可用毛笔将切片转移到已冷却至 0 ℃ 的载玻片上,滴加数滴甘油,盖上盖玻片(放盖玻片时动作要轻缓,不可随意挪动,以免样品的组织受到破坏)。

(5)观察。将切好的样品置于 Olympus BX51

多功能显微镜下观察并拍照。

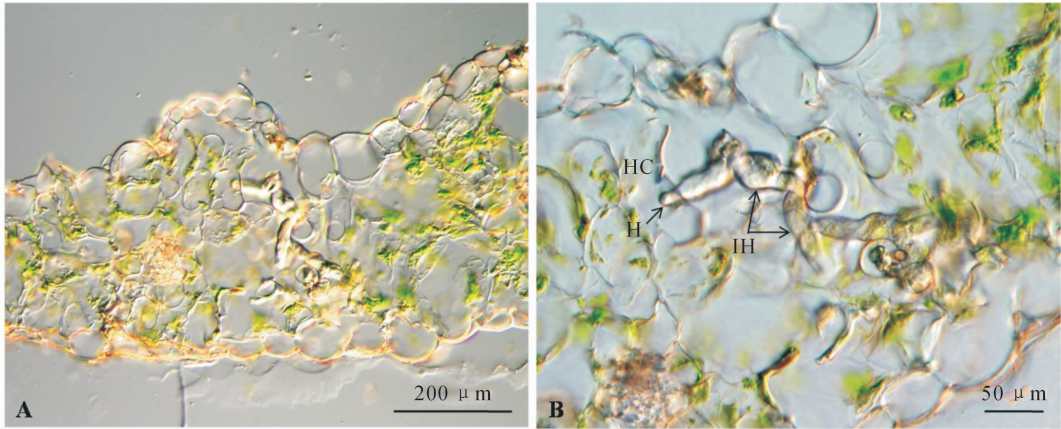
2 结果与分析

2.1 条形柄锈菌在小麦叶片上的侵染

利用冷冻切片方法,通过 Olympus BX51 多功能显微镜可以清晰地观察到条形柄锈菌在小麦叶片上的侵染结构和侵染过程。条形柄锈菌夏孢子萌发产生芽管,通过气孔侵入小麦,在小麦叶片细胞间隙扩展,依次分化出初生菌丝、次生菌丝和吸器。当胞间菌丝在小麦细胞间隙扩展一段时间后,便在小麦表皮细胞下聚集成垫状的产胞结构,随即产生夏孢

子,最终突破小麦叶片表皮形成夏孢子堆,结果见图 1 和图 2。同时寄主植物(小麦)也呈现活体细胞的结构状态,细胞形态完整,可见许多呈绿色的叶绿体(图 1、2)。

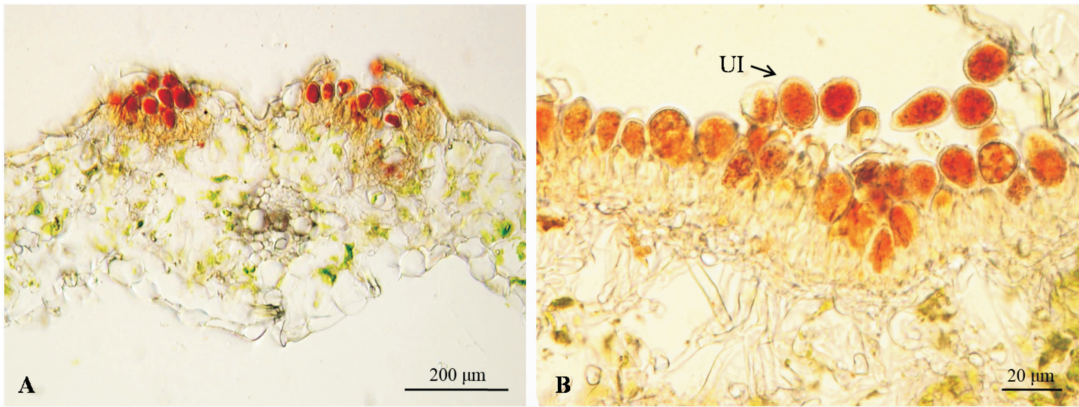
在接种后 7 d,小麦叶片中清晰可见具有立体感的侵染菌丝和吸器(图 1)。值得一提的是,吸器是条形柄锈菌最重要的侵染结构,然而通过一般的组织学方法很难清晰地观察到它。在接种后 14 d,可见突破小麦表皮细胞产生了许多鲜黄色的夏孢子(图 2)。



B 图是 A 图的局部放大。H. 吸器;HC. 植物细胞;IH. 侵染菌丝
B is partial magnification of picture A. H. Haustoria;HC. Host cell;IH. Infection hypha

图 1 接种条形柄锈菌后 7 d 小麦叶片中产生的胞间菌丝和吸器

Fig. 1 Production of infection hypha and haustoria in wheat leaves inoculated with *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* 7 days post-inoculation



UI. 夏孢子 Urediospores

图 2 接种条形柄锈菌后 14 d 小麦叶片中产生的夏孢子堆和夏孢子

Fig. 2 Production of urediospores and uredinium in wheat leaves inoculated with *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* 14 days post-inoculation

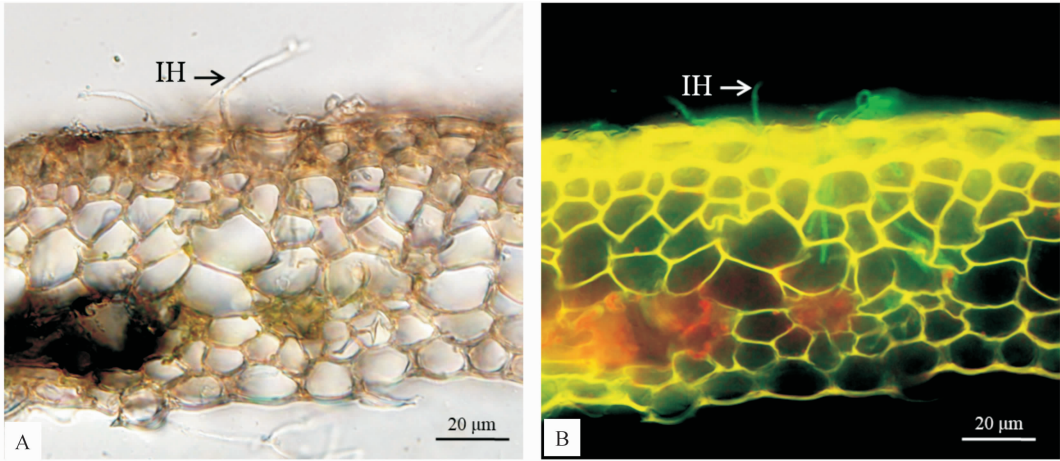
2.2 禾谷镰刀菌在小麦籽粒上的侵染

利用冷冻切片方法,通过 Olympus BX51 多功

能显微镜可以清晰地观察到禾谷镰刀菌在小麦籽粒上的侵染情况。禾谷镰刀菌分生孢子萌发产生一至

多个芽管,新形成的芽管并不立即侵入小麦组织,而是在寄主组织表面生长扩展,接种 48 h 后,寄主体表菌丝直接侵入寄主组织体内形成侵染菌丝(图 3)。由图 3-A 中可见寄主植物(小麦)呈现活体细胞

的结构状态,细胞形态完整并可见绿色叶绿体,同时可见侵染菌丝的分布;而在多功能显微镜下可见侵染菌丝在小麦细胞内扩展(图 3-B)。



A. 明场照片;B. 荧光照片;IH. 侵染菌丝
A. Bright field image;B. Fluorescent image;IH. Infection hypha

图 3 接种禾谷镰刀菌后 48 h 小麦稃片中产生的菌丝
Fig. 3 Production of infection hypha in wheat paleas inoculated with
Fusarium graminearum 48 hours post-inoculation

上述结果表明,将冷冻切片技术应用于小麦病原真菌发育观察获得了良好的效果,病原菌结构清晰,植物组织和细胞形态完整,对比度良好。并且通过冷冻切片可以观察到新鲜植物组织和病原菌结构的天然色彩,直接观察到活体细胞的结构状态,这是由于冷冻切片技术能迅速将植物组织和细胞的生命活动固定,保持细胞和组织在生活时原有的机构和状态,因此获得的切片具有特征典型、完整度及清晰度好等特点。

3 结论与讨论

3.1 获得最佳切片的条件

(1)准确取材是利用冷冻切片技术获得小麦病原真菌发育结构至关重要的一步。在试验过程中冷冻切片的取材要点为:a. 取材过程要迅速,保证小麦组织处于“生活状态”,否则细胞容易失水变形;b. 组织块大小要合适,组织块过大,易致切片皱折,无法展开,错过有价值的部位,有可能根本切不到想要的组织,一般情况下,样品大小为 0.5~1 cm 最合适;c. 选择样品的部位要准确,建议接种取样时做好标记,避免盲目取材。

(2)冷冻切片不宜过薄或过厚。切片太薄(小于 10 μm)易碎、易卷曲,并且 LEICA OCT 包埋剂在室

温下融化后容易将植物组织的细胞结构拉断;切片太厚(大于 50 μm),植物组织太厚,看不清楚真菌菌丝在植物中的发育状态。另外,切片厚度的调节与植物组织的硬度有关系,柔软的植物叶片切片应厚一些,而硬的植物组织可以薄一些。本次试验中,小麦叶片和颖壳的最佳切片厚度为 20 μm。为了获得平整的切片,应做到:a. 选择锋利无缺口的刀锋;b. 调节好防卷板与刀锋的位置;c. 选择合适的持刀器的倾斜角度,试验过程中发现 4°或 6°最佳。

(3)冷冻温度和时间也是冷冻切片制作过程中的重要环节,直接影响冷冻切片的质量。一般恒温冷冻切片机的工作室温度控制在-24~-20℃。不同组织的冷冻温度和时间要求不同,还需在实际操作中不断积累经验。

因此,获得最佳冷冻切片的条件为准确取材,切片厚度 20 μm,切片机的工作室温度-24~-20℃,刀口锋利无缺口,调节好防卷板与刀锋的位置,持刀器的倾斜角度以 4°或 6°最佳。

3.2 冷冻切片技术的特点

冷冻切片与常规的切片方法相比,具有快速、简便、易操作、节约试验材料等优点,并且在冷冻切片过程中减少了有害化学药品的使用,保护了环境和人身健康,同时缩短了工作周期。但此方法也具有

其局限性,如在连续观察小麦病原真菌的形态发育过程中,由于所切材料不易形成连续的冰带,因此不能进行系统的观察研究,对新鲜的试验材料切片效果好,但对于干燥的材料必须经过软化处理^[10]。另外,冷冻切片观察属于组织学研究方法的一种,对于小麦与病原菌互作的细胞学研究常采用超薄切片技术^[11-14],但是这种方法制作周期较长,如果取样目标性不强,将难以取得理想的结果。研究中若将冷冻切片方法与常规包埋切片技术相结合,先用冷冻切片方法快速检测到病原菌是否已经侵染小麦,然后再确定是否要进行超薄切片,这样可以大大提高细胞学研究的准确性。

利用冷冻切片方法进行小麦病原真菌形态的观察和研究,虽然具有一定的局限性,但在实践过程中只要有针对性地加以修正,即可克服上述缺点,加之该方法具有快速、简便、易操作、节省材料和容易掌握等特点,建议在实验教学和科学研究中推广应用,以便更好地为教学和科研服务。

[参考文献]

[1] 林月惠,李寒冰,贺新强. 高度木质化材料的冰冻切片技术 [J]. 植物学通报,2001,18(1):118-120.
Lin Y H,Li H B,He X Q. Application of cryo-sectioning technique in highly lignified tissues [J]. Chinese Bulletin Botany, 2001,18(1):118-120.

[2] 陈 丹,赵 洁. 适合于植物花器官的冰冻切片技术 [J]. 武汉植物学研究,2005,23(3):285-290.
Chen D,Zhao J. Suitable cryo-sectioning technique in floral organs of plants [J]. Journal of Wuhan Botanical Research,2005, 23(3):285-290.

[3] 张新成,李志刚,李素丽,等. 冰冻切片法在植物微管骨架研究中的应用 [J]. 广西植物,2008,28(2):164-166.
Zhang X C,Li Z G,Li S L,et al. Cryosectioning method for the observation of microtubule cytoskeleton in plant cells [J]. Guihaia,2008,28(2):164-166.

[4] 谢佩松,徐中根,韦存虚. 冰冻切片技术在植物显微结构和组织化学中的应用 [J]. 生物学杂志,2009,26(3):72-74.
Xie P S,Xu Z G,Wei C X. Cryo-sectioning technique for the observation of microstructure and histochemistry in plant [J]. Journal of Biology,2009,26(3):72-74.

[5] 李振歧. 麦类病害 [M]. 北京: 中国农业出版社,1997:57-781.
Li Z Q. The wheat disease [M]. Beijing:China Agricultural Press,1997:57-781.

[6] 程顺和,张 勇,别同德,等. 中国小麦赤霉病的危害及抗性遗传改良 [J]. 江苏农业学报,2012,28(5):938-942.
Cheng S H,Zhang Y,Bie T D,et al. Damage of wheat *Fusarium* head blight (FHB) epidemic and genetic improvement of wheat for scab resistance in China [J]. Jiangsu J of Agr Sci, 2012,28(5):938-942.

[7] 杨 源,杨 柳,代会静. 小麦赤霉病的危害及防治措施 [J]. 种业导刊,2012(5):22-23.
Yang Y,Yang L,Dai H J. Damage of wheat *Fusarium* head blight and control measures [J]. Journal of Seed Industry Guide,2012(5):22-23.

[8] 康振生,李振歧,洛夫林 10 常温治病新菌系的发现 [J]. 西北农业大学学报,1984,12(4):18-28.
Kang Z S,Li Z Q. Discovery of a normal type new pathogenic strain to Lovrin 10 [J]. Acta Univ Agric Boreali-Occidentalis, 1984,12(4):18-28.

[9] 李克昌. 小麦赤霉病及其防治 [M]. 上海:上海科学技术出版社,1982:15-287.
Li K C. Disease and management of the wheat scab [M]. Shanghai:Shanghai Scientific Technology Press,1982:15-287.

[10] 张力平,肖淑芹,朱桂清,等. 植物病原真菌冷冻切片制作方法的改进 [J]. 贵州农业科学,2013,41(4):106-108.
Zhang L P,Xiao S Q,Zhu G Q,et al. Improvement on frozen section of plant pathogenic fungi [J]. Guizhou Agricultural Sciences,2013,41(4):106-108.

[11] 康振生,黄丽丽,Buchenauer H,等. 禾谷镰刀菌在小麦穗部侵染过程的细胞学研究 [J]. 植物病理学报,2004,34(4):329-335.
Kang Z S,Huang L L,Buchenauer H,et al. Cytology of infection process of *Fusarium graminearum* on wheat spikes [J]. Acta Phytopathologica Sinica,2004,34(4):329-335.

[12] 康振生,李振歧,商鸿生,等. 小麦条锈菌胞间菌丝的超微结构和细胞化学研究 [J]. 真菌学报,1993,12(3):208-213.
Kang Z S,Li Z Q,Shang H S,et al. Ultrastructure and cytochemistry of intercellular hyphae of wheat stripe rust [J]. Acta Mycologica Sinica,1993,12(3):208-213.

[13] 康振生,李振歧,商鸿生,等. 小麦条锈菌夏孢子形成的电镜观察 [J]. 西北农业大学学报,1993,21(S2):10-13.
Kang Z S,Li Z Q,Shang H S,et al. Electron microscopy of urediospore formation in wheat stripe rust [J]. Acta Univ Agric Boreali-Occidentalis,1993,21(S2):10-13.

[14] 姚娟妮,张宏昌,赵 杰,等. 小麦条锈菌冬孢子发生的组织学和超微结构研究 [J]. 菌物学报,2012,31(4):560-566.
Yao J N,Zhang H C,Zhao J,et al. Histological and ultrastructural observation of teliospore formation in *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* [J]. Mycosystema,2012,31(4):560-566.