

水稻纹枯病菌侵染过程的细胞学特征

张国良^{1,2*} 闫大伟² 何祖华²⁽¹⁾ 淮阴工学院生命科学与化学工程学院, 淮安 223003;⁽²⁾ 中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所, 上海 200032)

摘要 利用荧光显微镜、扫描和透射电镜观察了纹枯病病菌侵染水稻过程的细胞学特征。结果表明, 接种纹枯病菌后 24h, 病菌可形成侵染垫和附着胞。菌丝通过直接穿透表皮、从胞间隙和气孔途径侵入寄主细胞, 其中以表皮直接侵入为主。菌丝也可以形成穿透爪侵染细胞, 穿透爪下面有类似粘液的物质存在。初生菌丝进入叶鞘细胞后形成次生菌丝, 在寄主细胞内生长, 也可以在胞间隙进行扩展。菌丝穿壁侵入邻近细胞有 2 种方式, 一种是菌丝在穿过胞壁时明显变细, 进入邻近细胞后又恢复原来的大小; 另一种是在穿壁时菌丝膨大覆盖胞壁一侧, 穿过胞壁后菌丝很细, 然后再变宽恢复穿壁前菌丝大小。

关键词 水稻; 纹枯病菌; 侵染; 细胞学特征

水稻纹枯病(病原菌无性态为立枯丝核菌, 其有性态为瓜亡革菌, 一般以无性态危害水稻)是水稻生产上的三大病害之一, 主要危害水稻叶鞘和茎秆, 在水稻抽穗后, 也危害叶片和穗子, 随着矮秆品种的推广、氮肥水平的提高以及密植程度的增加, 纹枯病的发生有加重的趋势^[1,2]。选育高抗纹枯病的水稻品种是最为有效的方法, 但目前世界上还未发现对纹枯病免疫和高抗的水稻品种, 仅鉴定出抗性相对较高的少数几个品种, 抗性遗传和育种工作未取得突破性进展^[3-7]。生产上往往用井冈霉素防治水稻纹枯病, 但近年来由于病菌产生明显的抗药性, 药效下降, 每季用药次数已从 20 年前的 2 次增加到现在的 3~5 次, 用药量也从以前的 1.5 kg/hm² 增加到目前的 4.5~6.0 kg/hm²。而且大量农药的使用会造成生态环境污染和稻米农药残留问题^[8]。因此, 积极寻找有效防治水稻纹枯病的方法就成为目前生产上迫切而急需解决的问题, 这就需要解析纹枯病菌侵染水稻的规律和特征。

对于纹枯病菌侵染水稻的过程, 以往研究^[9-12]发现纹枯病菌侵染水稻时一般形成侵染垫和裂瓣状附着胞这两种专门的侵染结构。侵染垫下面可观察到大量的侵入钉和侵入孔。侵染垫一般呈圆形, 紧贴于寄主表面, 结合紧密, 可由单根菌丝聚集而成, 也可由多根菌丝的分枝结合在一起。侵染垫的大小相差悬殊, 其数目和裂瓣状附着胞的形成与供试的水稻品种的抗性有关。纹枯病菌丝主要通过直接穿过表皮细胞的方式侵入, 少部分菌丝也从气孔侵入。以往报道主要集中在纹枯病菌是如何在水稻叶鞘(片)

扩展、繁殖和进入表皮细胞的, 而菌丝进入表皮细胞后, 如何在水稻细胞内生长和繁殖, 以及如何在寄主细胞间扩展, 目前还不甚清楚。本试验选用感病品种日本晴, 通过人工接种纹枯病菌, 研究纹枯病菌侵染水稻过程的细胞学特征, 为该病的科学防治提供决策依据。

1 材料与方法

1.1 供试水稻品种

供试水稻(*Oryza sativa* L.)品种为感病品种日本晴。将种子经 1% 双氧水浸泡 1 d 和蒸馏水浸种 2 d, 浸种温度 30℃, 然后播种于食品周转箱中, 在分蘖末期接种纹枯病菌。

1.2 纹枯病接种

接种用的纹枯病菌(*R. solani*)是一种强致病性菌株 RH-9(属于 AG1-IA 菌丝融合群)。将 1.0 cm 长的木质短牙签做无菌处理后, 于培养皿中在 PDB 液体培养基上接菌培养 3~5 d, 待菌丝密集布满培养皿时用于接种, 于水稻分蘖末期, 用镊子将牙签嵌入倒 3 叶

收稿日期: 2010-03-02 接受日期: 2010-05-21

国家自然科学基金(No. 30571090), 江苏省自然科学基金(No. BK2008193), 植物分子遗传国家重点实验室开放课题(2008), 国家农业综合开发土地治理省级科技推广项目(No. 2010KJ-04), 江苏省高校“青蓝工程”优秀青年骨干教师资助项目(2006), 淮安市产学研合作促进计划项目(No. HAC0823), 淮安市农业科技支撑计划项目(No. SN0939)资助

* 通讯作者。Tel: 0517-83559044, Fax: 0517-83591100, E-mail: hgzgl@sina.com

叶鞘内侧。

1.3 取样和测定项目

分别于接种后 12 h (0.5d) 和 1、2、3 d 取叶鞘和叶片进行观察。光镜样品制备: 将叶鞘置于 0.75 mol/L 的蔗糖溶液中, 然后放在光镜下观察。荧光显微镜观察: 将叶鞘在 FAA 中固定透明, 剥取近轴面, 分别用 0.1% 的苯胺蓝、苔酚蓝以及 Chlorazol black E 进行染色, 然后在 LEICA DC 300F 和 ZEISS LSM500 荧光显微镜下观察。扫描电镜观察: 先将样品在 3% 戊二醛溶液中固定 4~6 h, 随后经系列梯度丙酮脱水、醋酸异戊酯置换、二氧化碳临界点干燥、粘样、镀膜后在 XL30-ESEM 型扫描电镜下观察、拍照。透射电镜观察: 接种 24 h 后, 取叶鞘浸入 3% 的戊二醛中固定 2 h, 0.1 mol/L 磷酸缓冲液清洗 2 次, 每次 10 min, 锇酸固定 5 h, 0.1 mol/L 磷酸缓冲液清洗 2 次, 每次 10 min, 丙酮梯度脱水, 纯丙酮脱水 2 次, 812 树脂按 3:1、3:2、3:3 梯度渗透, 打开样品瓶盖, 放置干燥处 8 h, 包埋, 梯度聚合, 切片, 染色, 在 Phillips CM120 型透射电镜下观察。

2 结果

2.1 纹枯病菌在水稻叶鞘内表面的扩展

接种纹枯病菌 12 h 后观察到菌丝在水稻叶鞘表面生长, 不久随机纵横分枝(图 1a)。24 h 后接种部位出现水渍状斑块。用显微镜观察, 菌丝在叶鞘表面形成的初级分枝不断分化出很多短粗的侧枝, 有些菌丝的侧枝继续重复分枝, 这些侧枝相互聚集在一起形成感染垫(图 1b、图 1c、图 1d); 有些侧枝顶端膨大形成裂瓣状附着胞(图 1e)。

2.2 纹枯病菌入侵叶鞘内表面的方式

纹枯病菌在叶鞘内表面生长时, 通过菌丝(图 2a、图 2b、图 2c)和感染垫下面的穿透爪(图 2d)感染细胞。菌丝可以直接侵入细胞(图 2a 箭头所指部分), 也可以从胞间隙处侵染(图 2b 箭头所指部分), 还可以从气孔直接进入(图 2e)。将叶鞘内表面菌丝部分去除, 可见到清晰的侵入孔(图 2c 中 PO 处)。菌丝也可以形成穿透爪侵入表皮细胞(图 2d 中 PC 处), 在穿透爪下面是类似粘液的物质(图 2d 中 M 处)。接种 2 d 后, 在叶鞘外侧的气孔处观察到成丛的菌丝(图

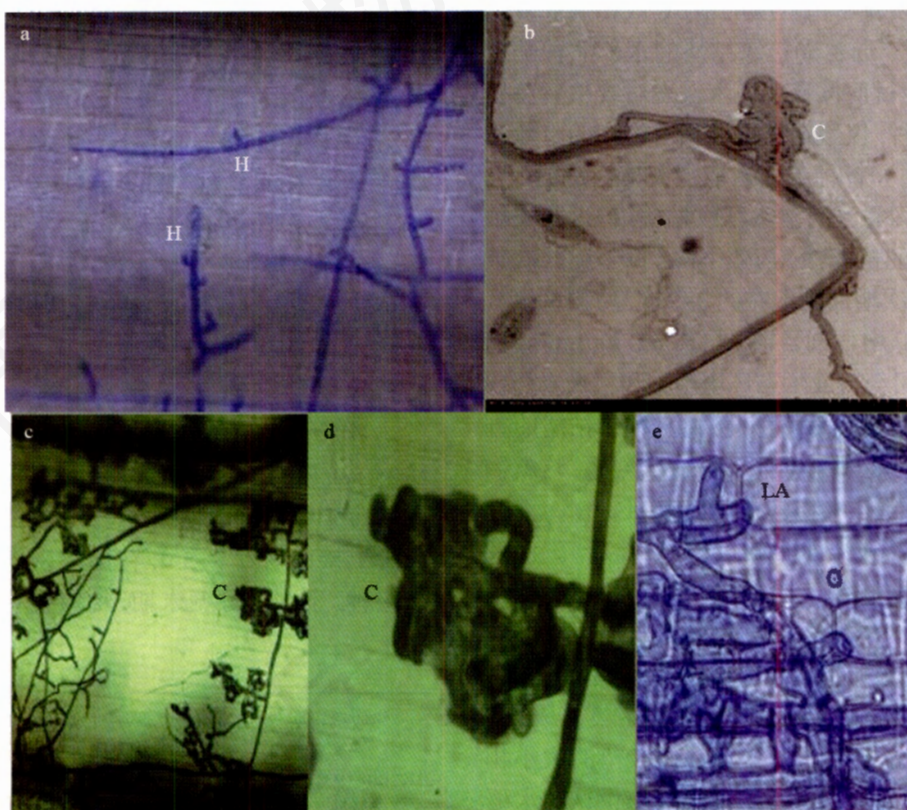


Fig. 1 The hyphae of *Rhizoctonia solani* growing on the rice leaf sheath surface

a: the hyphae branches on the leaf sheath surface (fluorescence excitation wave length was 488 nm, emission wave length was 515 nm); b: transmission electron microscope image of the hyphae on the leaf sheath surface; c, d, e: the infection structures.

Abbreviations: H, hyphae; C, infection cushion; LA, lobate appressoria.

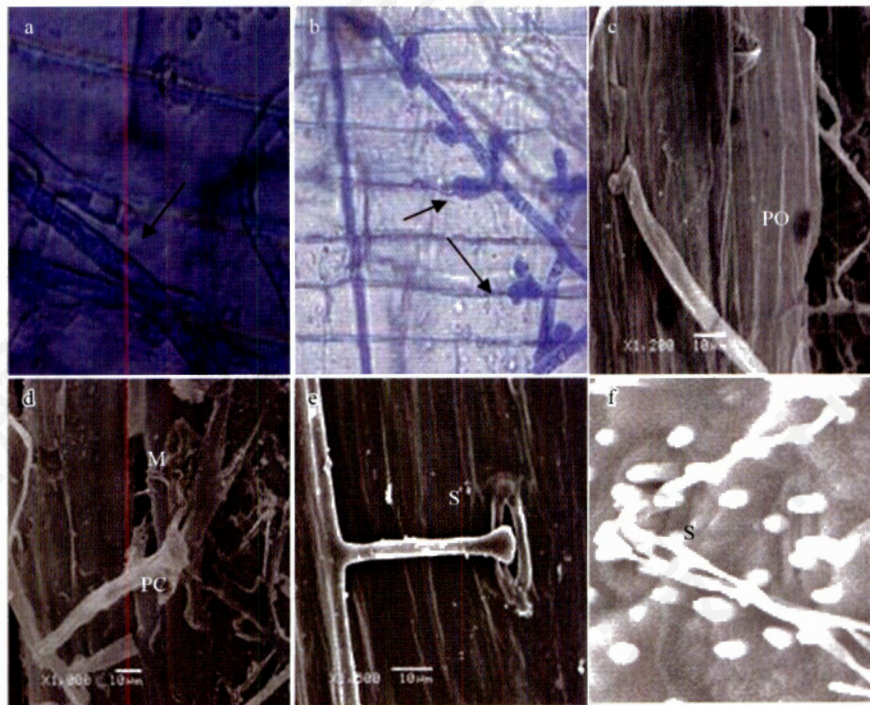


Fig. 2 The ways of hyphae of *Rhizoctonia solani* penetrating the rice leaf sheath surface

a: the hyphae penetrated through host epidermis directly; b: the hyphae entered the cell from the intercellular space; c: the penetration pore; d: penetration claw; e: the hyphae entered the cell from the stomata; f: the hyphae stretched out from the stomata.
Abbreviations: PO, penetration pore; PC, penetration claw; M, mucilagelike material; S, stomata.

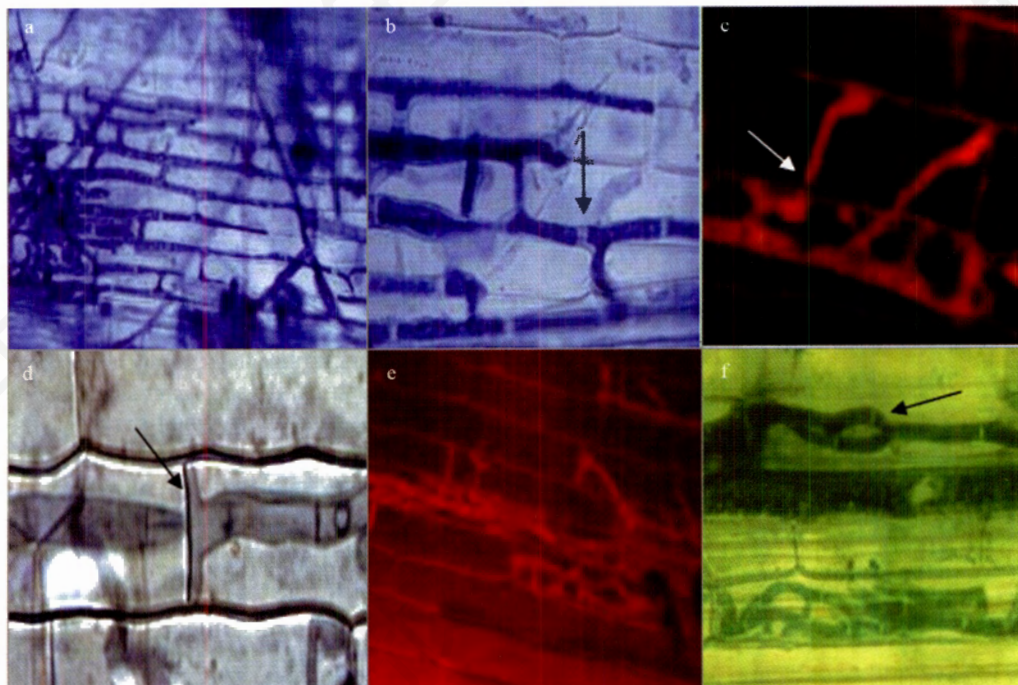


Fig. 3 The expansion of hyphae of *Rhizoctonia solani* invasion in the intercellular space and between the rice leaf sheath cell
a、b: the expansion of hyphae in the intercellular space of leaf sheath; c、d: the hyphae penetrated through the cell wall; e、f: the expansion of hyphae in the cell and intercellular space of leaf sheath (fluorescence excitation wave length of c and e was 488 nm, emission wave length was 515 nm; excitation wave length of f was 515nm, emission wave length was 590 nm).

2f), 说明菌丝在叶鞘内表面侵染进入组织后, 可以从外侧的气孔伸出。

2.3 纹枯病菌在叶鞘细胞内和细胞间的扩展

纹枯病菌以初生菌丝的形式进入水稻叶鞘细胞后, 在细胞内生长产生分枝, 称为次生菌丝。次生菌丝在细胞内进一步生长, 也可以侵染邻近的细胞(图 3e、图 3f)。次生菌丝和初生菌丝间形成可见的隔膜(图 3b、图 3f 箭头所指处), 次生菌丝在胞内生长可充满整个细胞(图 3f)。纹枯病菌侵入叶鞘后, 一方面在胞间隙扩展(图 3a、图 3b), 另一方面在胞间进行穿壁扩展(图 3c、图 3d)。在胞间扩展时, 其穿壁方式有两种, 一种是菌丝在穿过胞壁时明显变细, 进入邻近细胞后又恢复原来的大小(图 3c 箭头所指处); 另一种是在穿壁时菌丝膨大覆盖胞壁一侧, 穿过胞壁后菌丝很细, 然后再变宽恢复至穿壁前菌丝大小(图 3d 箭头所指处)。

3 讨论

水稻纹枯病是生产上一种重要的常发性病害, 对水稻危害极大, 对其侵染的细胞学过程, Marshall 等^[9]发现纹枯病菌丝在叶鞘表面形成侵染垫和附着孢两种侵染结构; Matsuura 等^[10]发现在侵染垫下存在侵入钉和侵入孔, 在侵入钉接触的叶鞘表面有类似粘液的物质, 在叶鞘表面侵入钉先变细, 侵入细胞后再恢复成原来的直径大小; 陶家凤^[11]发现除了形成侵染垫和附着孢以外, 菌丝可以直接穿透水稻表皮或从气孔侵入; Amita 等^[12]发现, 在水稻细胞内菌丝很粗, 也会变形。本研究中水稻叶鞘接种纹枯病菌后, 菌丝在叶鞘内表面形成侵染垫和附着孢, 侵染垫这种侵染结构可能有利于纹枯病菌集中营养和能量进行侵染和抵抗寄主的防卫系统, 并从寄主细胞中获取较多营养和水分, 以供病菌大量繁殖之用。除了形成侵染垫和裂状附着孢这两种专化结构以外, 菌丝还可以通过直接穿透表皮细胞或者从胞间隙处侵入水稻叶鞘细胞, 少部分菌丝也可从气孔侵入寄主细胞。此外, 菌丝也可形成穿透爪侵入细胞, 形成穿透爪这种结构可能有利于产生较大压力, 便于菌丝侵入叶鞘细胞。

在接种后 1~2d, 肉眼可见水渍状病斑, 接种 2~3 d 后, 病斑在茎秆上纵向扩展, 向上位叶鞘发展^[13]。大田中也会发现菌丝在叶鞘外表面蔓延危害, 菌丝如

何从叶鞘内表面扩展到外侧的, 我们在试验中发现: 菌丝在侵入叶鞘内表皮细胞后, 经过一段时间后从外侧气孔处伸出和蔓延, 这可能是菌丝从叶鞘内侧扩展到外侧的一条重要途径。

Matsuura 等^[10]发现侵入钉在侵入叶鞘内表面表皮细胞时先变细, 侵入后再恢复成原来的直径大小。本研究发现, 纹枯病菌丝侵入细胞后在细胞间扩展, 存在类似机制。除此以外, 有的菌丝在穿壁时菌丝膨大覆盖胞壁一侧, 穿过胞壁后菌丝很细, 然后再变宽恢复穿壁前菌丝大小。除了在细胞间穿壁外, 菌丝还能在胞间隙进行扩展。

参考文献 (References)

- 1 全国农业技术推广服务中心. 2002 年农作物重大病虫害发生趋势. 世界农业 2002; 6: 24-5.
- 2 Sharma M, Gupta SK, Sharma TR. Characterization of variability in *Rhizoctonia solani* by using morphological and molecular markers. *Phytopathology* 2005; 153(7-8): 449-56.
- 3 Eizenga, GC, Lee FN, Rutger JN. Screening *Oryza* species plants for rice sheath blight resistance. *Plant Dis* 2002; 86(7): 808-12.
- 4 Che KP, Zhan QC, Xing QH, Wang ZP, Jin DM, He DJ, *et al.* Tagging and mapping of rice sheath blight resistant gene. *Theor Appl Genet* 2003; 106(2): 293-7.
- 5 Zhao CJ, Wang AR, Shi YJ, Wang LQ, Liu WD, Wang ZH, *et al.* Identification of defense-related genes in rice responding to challenge by *Rhizoctonia solani*. *Theor Appl Genet* 2008; 116(4): 501-16.
- 6 Zuo SM, Zhang L, Wang H, Yin YJ, Zhang YF, Chen ZX, *et al.* Prospect of the QTL-qSB-9Tq utilized in molecular breeding program of japonica rice against sheath blight. *J. Genet. Genomics* 2008; 35(8): 499-505.
- 7 鄂志国, 张丽靖, 黄世文, 王磊. 水稻纹枯病抗性研究进展. *核农学报* 2009; 23(6): 997-1000.
- 8 任小平, 谢关林, 赵丽涵. 稻纹枯病拮抗细菌的筛选与利用. *植物保护学报* 2005; 32(4): 337-42.
- 9 Marshall DS, Rush MC. Infection cushion formation on rice sheaths by *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 1980; 70 (10): 947-50.
- 10 Matsuura K. Scanning electron microscopy of the infection process of *Rhizoctonia solani* in leaf sheaths of rice plants. *Phytopathology* 1986; 76(8): 811-4.
- 11 陶家凤. 纹枯病菌对水稻侵染过程的研究. *四川农业大学学报* 1992; 10(3): 471-7.
- 12 Amita S, Rashmi R, Savary S, Willocquet L, Singh US. Infection process in sheath blight of rice caused by *Rhizoctonia solani*. *Indian Phytopathology* 2003; 56(4): 434-8.
- 13 左示敏, 张亚芳, 殷跃军, 陈宗祥, 潘学彪. 田间水稻纹枯病抗性鉴定体系的确立与完善. *扬州大学学报(农业与生命科学版)* 2006; 27(4): 57-61.

Cytological Characteristics of Infection Process by *Rhizoctonia solani* in Rice

Guo-Liang Zhang^{1,2*}, Da-Wei Yan², Zu-Hua He^{2*}

(¹College of Life Science and Chemistry Engineering, Huaiyin Institute of Technology, Huai'an 223003, China; ²Institute of Plant Physiology and Ecology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China)

Abstract Cytological characteristics of infection process by *Rhizoctonia solani* in rice were observed by fluorescence microscope, scanning electron microscope and transmission electron microscope. The results showed that after inoculation, infection cushions and appressoria formed at 24 h. The hyphae could penetrate through host epidermis directly, and invade host cells by intercellular space or stomata. Among the above ways, direct penetration into epidermis was the major way. The hyphae may form penetration claw to enter cell, and there were mucilage like structures underneath it. The primary hyphae invaded into plant cells and then formed secondary hyphae, which could grow in the cells or in intercellular space. Two patterns of the ways how hyphae penetrating into the adjacent host cell through the cell wall were observed. One was that the hyphae became slender when it penetrated the cell wall into the adjacent cells, and then resumed normal thickness. The other was that the hyphae expanded and covered the side of cell wall, and then became slender after penetrating the cell wall. Finally the hyphae grew like the original size.

Key words rice; *Rhizoctonia solani*; invasion; cytological characteristic

Received: March 2, 2010 Accepted: May 21, 2010

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30571090), the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (No.BK2008193), the Research Project of the National Key Laboratory of Plant Molecular Genetics (2008), the Provincial Science and Technology Extension Project of the National Integrated Agricultural Development of Land Management (No.2010KJ-04), the Outstanding Young Backbone Teachers Foundation Projects of Jiangsu Provincial "Qing Lan Project" for Colleges and Universities (2006), the Teaching-research-production Cooperative Project (No.HAC0823), the Agricultural Science and Technology Support Projects in Huaian City (No.SN0939)

*Corresponding author. Tel: 86-517-83559044, Fax: 86-517-83591100, E-mail: hgzgl@sina.com