

宿根矮化病菌对甘蔗茎细胞超微结构的影响

陈明辉¹, 谢晓娜¹, 杨丽涛^{1,2}, 李杨瑞^{1,2}

(1 广西大学农学院, 亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室, 广西 南宁 530005; 2 中国农业科学院甘蔗研究中心, 农业部广西甘蔗生物技术与遗传改良重点实验室/广西甘蔗遗传改良重点实验室, 广西作物遗传改良生物技术重点开放实验室, 广西 南宁 530007)

摘要:甘蔗宿根矮化病(Ratoon stunting disease, RSD)病原细菌一般集中在甘蔗基部2~3节间处. 利用透射电镜对感染RSD的甘蔗茎组织细胞进行超微结构观察, 结果显示细胞内和细胞壁都发生了明显的病理变化. 甘蔗茎细胞被RSD病原细菌侵染后, 细胞内积累有大量分布不均的电子致密物质, 这种物质可能与甘蔗茎细胞抵抗、减少或延迟RSD病原菌入侵的抗性机制相关. 这些电子致密物质在感病细胞内均有出现, 而正常细胞内没有. 维管束导管细胞壁增厚, 表面附着一层胶黏物质; 有的细胞壁厚薄不均, 局部变形断裂, 成为细胞壁碎屑和纤维丝.

关键词:甘蔗宿根矮化病(RSD); 超微结构; 病理变化
中图分类号:S566.1 文献标志码:A 文章编号:1001-411X(2013)03-0336-04

Effects of Ratoon Stunting Disease on Ultrastructural in Sugarcane Stem Cells

CHEN Minghui¹, XIE Xiaona¹, YANG Litao^{1,2}, LI Yangrui^{1,2}

(1 State Key Laboratory of Subtropical Bioresources Conservation and Utilization, College of Agronomy, Guangxi University, Nanning 530005, China; 2 Key Laboratory of Sugarcane Biotechnology and Genetic Improvement, Ministry of Agriculture/ Guangxi Key Laboratory of Sugarcane Genetic Improvement / Guangxi Crop Genetic Improvement and Biotechnology Lab, Sugarcane Research Center Chinese Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007, China)

Abstract:The bacterium associated with ratoon stunting disease of sugarcane usually gather in the 2 – 3 internodes of base stem section of sugarcane. The ultrastructures of the stem tissue infected by ratoon stunting disease were observed with electron microscopy. The results suggested that cytopathological alteration apparently occurred inside cells and on the cell wall. A large amount of electron-dense substances accumulated in the infected cells, which was presumed to be associated resisting, reducing or delaying the invasion of this disease. The electron-densed substances were only found in the infected cells. The cell wall was thickened and there was a layer of adhesive materials in the vessels of vascular bundle. Some cell walls were uneven with different thickness, and parts of them were broken into crumbs and fiber silks.

Key words:ratoon stunting disease(RSD); ultrastructure; cytopathological alteration

甘蔗宿根矮化病(Ratoon stunting disease, RSD) 是世界植蔗地区一种普遍发生的种苗传播病害^[1].

收稿日期:2012-11-04 网络出版时间:2013-06-13
网络出版地址:<http://www.cnki.net/kcms/detail/44.1110.S.20130613.1347.011.html>
作者简介:陈明辉(1974—),男,博士;通信作者:杨丽涛(1961—),女,教授,博士, E-mail: liyr@gxu.edu.cn; 李杨瑞(1957—),男,教授,博士, E-mail: liyr@gxaas.net
基金项目:广西自然科学基金(2012GXNSFDA053011);自治区主席科技资金项目(11166-02);科技部国际合作项目(2009DFA30820);广西自然科学基金创新团队项目(2011GXNSFF018002);广西科学研究与技术开发计划项目(桂科产 1123008-1、桂科能 0815011)

该病于1944年在澳大利亚昆士兰州甘蔗品种 Q28 上被首次发现^[2]. 我国大陆于1986年首次报道该病害^[3], 随后广东、福建、广西、云南对蔗区进行普查, 结果表明均存在甘蔗 RSD^[4-7]. 该病是由一种寄生维管束木质部的棒状杆菌属细菌 *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx) 引起的, 该种细菌较难进行人工培养^[8-9]. 蔗株感染 RSD 病菌后, 表现为蔗株矮化、蔗茎变细 (尤其是宿根蔗)、宿根分蘖率降低, 且蔗株矮化会随甘蔗宿根年限延长而加重^[10]. 由于 RSD 病原菌侵染蔗株后没有典型外部症状, 通过观察蔗株症状诊断该病害相当困难^[11], 虽然 RSD 病原细菌的 PCR 检测技术已非常成熟^[12], 但应用于田间的大批量检测还存在很多困难; 再加上 RSD 病原细菌特别小, 难以分离、培养和去除^[13], 从而使得该病害经种茎进行无意识的传播, 病害蔓延, 对甘蔗产量和品质影响极大. 一般情况下蔗区感染该病害产量下降 5%, 遇到干旱的环境条件, 产量下降达 50%^[14]. 本文以感染 RSD 病菌后的甘蔗茎维管束导管细胞和健康植株茎维管束导管细胞为研究材料, 应用组织超薄切片技术, 从亚细胞水平揭示 RSD 病原菌侵染甘蔗后, 茎维管束导管细胞的超微病变规律, 为进一步研究 RSD 病原菌与甘蔗寄主互作关系及生产上防治 RSD 病害提供理论依据.

1 材料与方法

1.1 材料

2009 年 12 月从广西大学农学院甘蔗试验田采

集甘蔗品种 ROC22 生长后期(300 d)疑似 RSD 病症的植株和从广西农业科学院组培中心隔离温室中采集甘蔗品种 ROC22 生长后期(300 d)健康脱毒苗植株作为试验材料. 取其基部 2~3 节, 经过 PCR 检测^[15], 确定采集的病症植株感染了 RSD 病原菌, 健康脱毒苗植株没有感染 RSD 病原菌. 以健康甘蔗品种 ROC22 为对照, 感染 RSD 甘蔗品种 ROC22 为处理, 取其茎基部 2~3 节为试验样品材料, 每个处理重复 3 次.

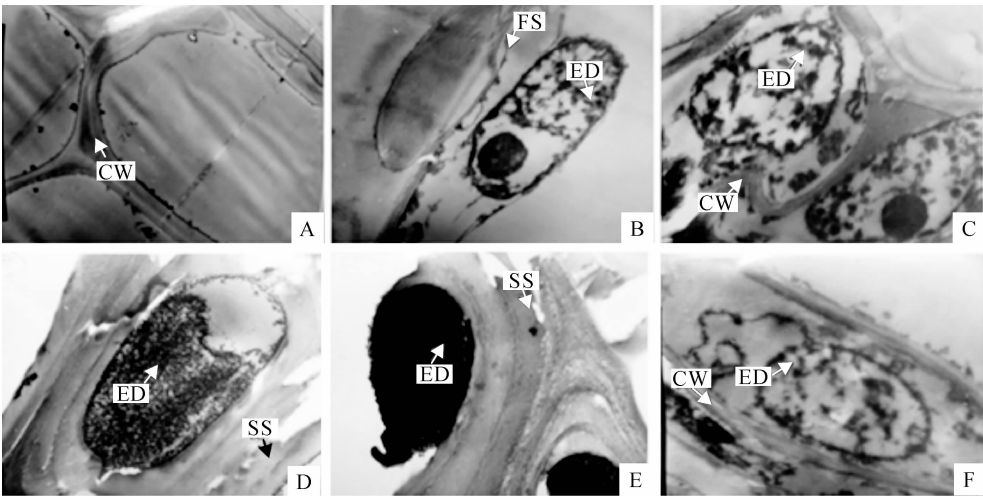
1.2 方法

将采集的茎节间样品去皮后, 用小刀切成长 (3~5) mm × (1~2) mm 的小块. 样品材料用 φ 为 2.5% 的戊二醛预固定, 0.2 mol · L⁻¹ 的磷酸缓冲液 (pH 6.8) 冲洗 2 次, 再用 ρ 为 10 g · L⁻¹ 的四氧化锇固定, 经常规方法乙醇、丙酮脱水, 醋酸铀染色、渗透后, 用 Eopon 树脂包埋. 包埋材料在德国产 Reichert-Jung ULTR ACUTE 型超薄切片机上切片, 超薄切片在日本产日立 H-7250 透射电镜下观察并拍照.

2 结果与分析

2.1 茎细胞内部的变化

与健康植株茎细胞相比较, 感染 RSD 的甘蔗茎细胞内部发生了明显的病理变化. 健康甘蔗植株的茎细胞排列整齐, 细胞内没有填充物质 (图 1A). 而在感染了 RSD 病菌的甘蔗茎维管束导管细胞中, 细胞内积累有大量的、分布不均的电子致密物质 (图 1B、1C、1D、1E、1F).



CW: 细胞壁; ED: 电子致密物质; FS: 纤维丝; SS: 黏性物质.

A: 正常茎维管束导管细胞, 细胞排列整齐、结构完整, ×8 000; B、C: 感染 RSD 茎维管束导管细胞, 细胞内积累电子致密物质, 细胞壁断裂、脱落, ×15 000; D、E: 导管细胞内积累大量电子致密物质, 细胞壁附着黏性物质, ×15 000; F: 导管细胞内积累电子致密物质, 细胞壁开始溶解断裂, ×15 000.

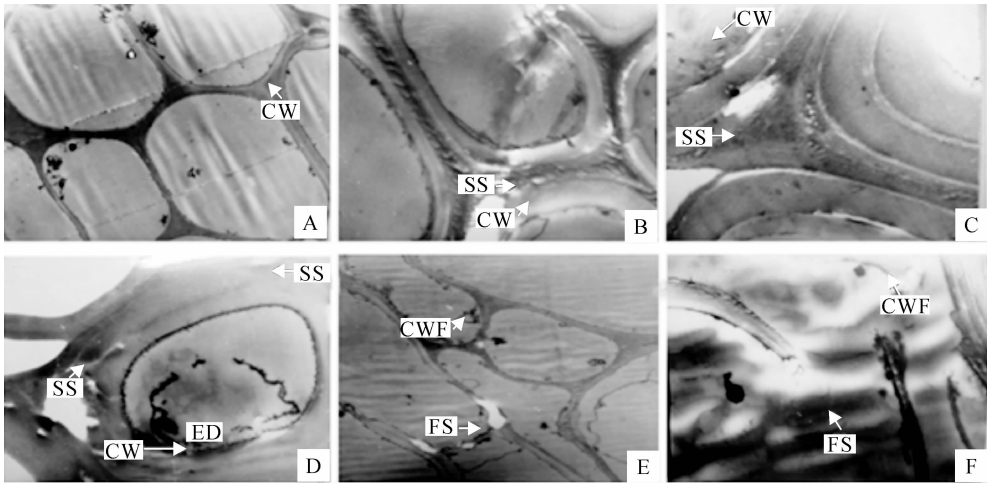
图 1 感染 RSD 甘蔗植株茎维管束导管细胞内部超微结构变化

Fig. 1 Ultrastructural alteration inside the vessel cells in vascular bundles of sugarcane stalks infected by RSD

2.2 茎细胞壁的变化

与健康植株相比,感染 RSD 病原菌的甘蔗茎细胞壁发生了较大的变化. 健康植株茎细胞排列整齐,细胞壁厚薄均匀,结合紧密(图 2A). 感染 RSD 病原

菌的甘蔗茎细胞壁有的表面附着一层胶黏物质(图 1D、1E 和图 2B、2C、2D). 而有的细胞壁粗细不均,排列松散,局部变形断裂,被分解成细胞壁碎屑和纤维丝(图 1B、1C、1D 和图 2D、2E、2F).



CW:细胞壁;SS:黏性物质;ED:电子致密物质;FS:纤维丝;CWF:细胞壁碎片.

A:正常茎维管束导管细胞,细胞排列整齐、结构完整,×5 000;B(×6 000)、C:(×20 000):感染 RSD 茎维管束导管细胞,细胞壁外面附着黏性物质,细胞壁增厚;D:细胞内开始积累电子致密物,细胞壁溶解,外面附着黏性物质,×15 000;E(×5 000)、F(×8 000):细胞壁断裂成片断,或被分解为纤维丝.

图 2 感染 RSD 甘蔗植株茎维管束导管细胞壁超微结构的变化

Fig. 2 Ultrastructural alteration in cell wall of vessel cells in vascular bundles of sugarcane stalks infected by RSD

3 讨论与结论

RSD 侵染甘蔗植株后,主要集中在其基部茎 2 ~ 3 节间处. 甘蔗维管束导管是运输营养物质和水分的主要通道. 由于 RSD 病原菌的侵染,甘蔗茎维管束导管细胞遭到破坏,势必会影响到甘蔗植株的正常生长,从而影响到糖分积累和甘蔗产量. 本研究通过电镜超薄切片观察发现,感染 RSD 病原菌的茎维管束导管细胞内出现了电子密度大的物质,这与 Gillaspie 等^[16]报道的结果一致. 这种物质可能与甘蔗茎维管束导管细胞抵抗、减少或延迟 RSD 病原菌侵染的一种抗性机制有关. 这些物质可能是 RSD 病原菌诱导产生的酚类或酶类物质,但还需要进一步研究证实.

Montero-Vitorello 等^[17]研究发现,在 Lxx 的基因中存在基因岛,这些基因岛包含可能的假基因,能够产生果胶酶和纤维素酶的同系物,这些物质都和细胞壁的降解有关,这可能是 Lxx 从甘蔗中吸取营养的一条途径,并且它们可能触发寄主的防御;Kao 等^[18]研究也曾指出,感染宿根矮化病甘蔗植株的矮化症状和较弱的宿根能力是导管被堵塞的结果;这些是根据 Lxx 的基因特性推断的结果,没有解剖学上的证据. 本研究通过超薄切片结构观察,发现 RSD

病原菌侵染甘蔗后,果胶酶和纤维素酶首先降解细胞壁中胶层,然后逐渐降解细胞壁,细胞壁被分解,产生大量的碎屑和纤维丝,使寄主维管束导管细胞的纹孔膜堵塞,导致甘蔗茎维管束导管对营养物质和水分的运输能力降低,造成甘蔗植株生长缓慢,植株矮小;有的感病植株茎维管束导管细胞壁增厚,细胞壁附着胶黏物质,堵塞导管,这从解剖学方面为 Lxx 的致病性提供了证据. 这些胶黏物质是由 Lxx 产生的一些物质引起的,还是甘蔗的自身防御机制,或者二者皆有,有待进一步研究.

综上所述,本研究从解剖学角度证明了在 RSD 胁迫下,感染 RSD 的甘蔗植株导管细胞壁厚薄不均,局部变形断裂,被分解成细胞壁碎屑,细胞内积累有大量的电子致密物质. 这可能是造成甘蔗植株生长缓慢,植株矮化的原因.

参考文献:

[1] JOHNSON S S, TYAGI A P. Effect of ratoon stunting disease (RSD) on sugarcane yield in Fiji[J]. South Pacific Nat Appl Sci, 2010, 28(1): 69-73.

[2] 马丁 J P, 阿伯特 E V, 休兹 C G. 世界甘蔗病害[M]. 陈庆龙,译. 北京:农业出版社,1982.

[3] 伍承芳,黄孟群. 我国大陆发现甘蔗宿根矮化病[J].

- 甘蔗糖业, 1986(7): 29-30.
- [4] 黄孟群, 肖镇杰. 广东甘蔗宿根矮化病调查报告[J]. 甘蔗糖业, 1987(6): 39-40.
- [5] 郑加协, 甘勇辉. 福建甘蔗宿根矮化病的发生及其诊断[J]. 甘蔗糖业, 1998(5): 20-24.
- [6] 邓展云, 王伯辉, 刘海斌, 等. 广西甘蔗宿根矮化病的发生及病原检测[J]. 中国糖料, 2004(3): 35-38.
- [7] 黄应昆, 李文凤, 赵俊, 等. 云南甘蔗宿根矮化病病原检测[J]. 云南农业大学学报, 2007, 22(5): 762-765.
- [8] EVTUSHENKO L I, DOROFEEVA L V, SUBBOTIN S A, et al. *Leifsonia poae* gen. nov, sp. nov, isolated from nematode galls on *Poa annua*, and reclassification of '*Corynebacterium aquaticum*' Leifson 1962 as *Leifsonia aquatica* (ex Leifson 1962) gen. nov., nom. rev., comb. nov. and *Clavibacter xyli* Davis et al. 1984 with two subspecies as *Leifsonia xyli* (Davis et al. 1984) gen. nov., comb. Nov[J]. Int J Syst Evol Micr, 2000, 50(1): 371-380.
- [9] DAVIS M J, DEAN J L. Comparison of diagnostic techniques for determining incidence of ratoon stunting disease of sugarcane in Florida[J]. Plant Dis, 1984, 68(10): 896-899.
- [10] GRISHAM M P. Effect on ratoon stunting disease on yield of sugarcane grown in multiple three-year plantings[J]. Phytopathology, 1991, 81(3): 337-340.
- [11] YOUNG A J, PETRASOVITS L A, CROFT B J, et al. Genetic uniformity of international isolates of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, causal agent of catoon stunting disease of sugarcane[J]. Australas Plant Path, 2006, 35(5): 503-511.
- [12] 周丹, 谢晓娜, 陈明辉, 等. 甘蔗宿根矮化病 PCR 检测技术优化分析[J]. 南方农业学报, 2012, 43(5): 616-620
- [13] TAYLOR P W J, PETRASOVITS L A, VAN D B R, et al. Development of PCR-based markers for detection of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* in fibrovascular fluid of infected sugarcane plants[J]. Australas Plant Path, 2003, 32(3): 367-375.
- [14] BAILEY R A, BECHET G R. Further evidence of the effects of ratoon stunting disease on production under irrigated and rained condition[J]. Pro S African Sugar Tech, 1997, 71(6): 97-101.
- [15] PAN Y B, GRISHAM M P, BURNER D M, et al. A polymerase chain reaction protocol for the detection of *Clavibacter xyli* subsp. *xyli*, the causal bacterium of ratoon stunting disease[J]. Plant Dis, 1998, 82(3): 258-290.
- [16] GILLASPIE A G, TEAKLE D S. Ratoon stunting disease: In 'disease of sugarcane' [M]. Amsterdam: Elsevier Publishing Company, 1989: 59-80.
- [17] MONTERO-VITORELLO C B, CAMARGO L E A, VAN S M A, et al. The genome sequence of the gram-positive sugarcane pathogen *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*[J]. Mol Pl Micr, 2004, 17(8): 827-836.
- [18] KAO J, DAMANN K E J. In situ localization and morphology of the bacterium associated with ratoon stunting disease of sugarcane[J]. Can J Botan, 1980, 58(3): 310-315.

【责任编辑 霍 欢】