

褐飞虱取食对不同耐虫性水稻胼胝质沉积的影响

杨丽^{1,2} 陈建明^{1,*} 张海强^{1,2} 张珏锋¹ 何月平¹

(¹浙江省植物有害生物防控重点实验室省部共建国家重点实验室培育基地/浙江省农业科学院 植物保护与微生物研究所, 杭州 310021; ²杭州师范大学 生命与环境科学学院, 杭州 310036; * 通讯联系人, E-mail: chenjm63@163.com)

Effects of Brown Planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stål) (Homoptera: Delphacidae), Feeding on Callose Deposition in Rice with Different Tolerance

YANG Li^{1,2}, CHEN Jian-ming^{1,*}, ZHANG Hai-qiang^{1,2}, ZHANG Jue-feng¹, HE Yue-ping¹

(¹State Key Laboratory Breeding Base for Zhejiang Sustainable Pest and Disease Control/ Institute of Plant Protection and Microbiology, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China; ²College of Life and Environment Science, Hangzhou Normal University, Hangzhou 310036, China; * Corresponding author, E-mail: chenjm63@163.com)

YANG Li, CHEN Jianming, ZHANG Haiqiang, et al. Effects of brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stål) (Homoptera: Delphacidae), feeding on callose deposition in rice with different tolerance. Chin J Rice Sci, 2013, 27(6): 624-632.

Abstract: Effect of feeding of brown planthopper (BPH), *Nilaparvata lugens* (Stål), on depositional site, shape and numbers of callose in various leafsheath tissues were investigated using frozen section and fluorescence microscopy. The results showed that callose was mainly deposited in phloem, parenchyma, epidermal and xylem tissues, with phloem being dominant. Most calloses have a small granular shape. After treated with BPH feeding, manual acupuncture or injection of BPH saliva, numbers and distribution of callose in leafsheath increased evidently in each of the three rice varieties that have different tolerance, in particular in the susceptible variety TN1. As compared with healthy plants (control), after eight days recovery growth from BPH removal, callose number and distribution did not change significantly in TN1 leafsheaths, reduced evidently in the tolerant variety Utri Rajapan, and reduced slightly in the antibiosis variety Rathu Heenati. By contract, in the treatments of manual acupuncture or injection of BPH saliva, numbers and distribution of callose after eight days of recovery growth were significantly increased in the susceptible variety, changed little in tolerant variety, and increased slightly in antibiosis variety, as compared with control plants. It was concluded that tolerance of rice varieties were related to abundance of callose deposited in phloem tissue of leafsheath.

Key words: *Nilaparvata lugens*; rice; varieties with different tolerance; leaf sheath tissue; callose deposition

杨丽, 陈建明, 张海强, 等. 褐飞虱取食对不同耐虫性水稻叶鞘组织中胼胝质沉积的影响. 中国水稻科学, 2013, 27(6): 624-632.

摘要: 利用冷冻切片和荧光显微技术检测了褐飞虱取食对不同耐虫性水稻叶鞘组织中胼胝质的分布、形态和数量的影响, 发现胼胝质主要分布在韧皮部组织、薄壁组织、表皮组织和木质部组织中, 尤其以韧皮部筛管中的胼胝质沉积最多; 胼胝质的形态主要有丝状、颗粒状, 尤其是小颗粒占大多数。在褐飞虱取食、人工针刺或者注射褐飞虱唾液后, 不同耐虫性水稻叶鞘组织胼胝质的沉积数量和面积明显增加, 尤其是感虫品种 TN1 增加显著。移除褐飞虱后稻株恢复生长 8d, 与处理前比较, 感虫品种的胼胝质数量和面积无明显差异, 耐虫品种 Utri Rajapan 明显减少, 抗性品种 Rathu Heenati 略有减少。停止人工针刺或注射褐飞虱唾液后稻株恢复生长 8d, 感虫品种的胼胝质数量和面积显著增加, 耐虫品种无明显差异, 抗性品种有所增加。上述结果说明, 品种耐虫性与叶鞘维管束组织中胼胝质的沉积数量和沉积面积有关。

关键词: 褐飞虱; 水稻; 不同耐虫性品种; 叶鞘组织; 胼胝质沉积

中图分类号: S435.112⁺.3

文献标识码: A

文章编号: 1001-7216(2013)06-0624-09

胼胝质(callose)是一种以 β -1,3 键结合的葡聚糖,它围绕每个筛孔的边缘积累。当胼胝质在筛管端壁上越积越多时,会形成垫状物——胼胝体(callosity),将筛孔堵塞,筛管就暂时进入休眠状态而失

去输导作用,影响水稻植株正常生长发育。现有研究表明,胼胝质广泛存在于高等植物内,在植物维管组织的韧皮部筛板中含有胼胝质^[1],植物细胞壁及其相关结构如胞间连丝,在受到生物或非生物胁迫

收稿日期: 2013-04-12; 修改稿收到日期: 2013-08-08。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30971918); 浙江省重点科技创新团队项目(2010R50028)。

时可调节胞间连丝的瓶颈收缩或膨大,均与胼胝质的沉积和降解有关^[2]。在植物的生长发育过程中,胼胝质可及时合成和降解^[2-3],来应答外界的机械损伤^[1]、各种病原菌入侵引起的生物胁迫^[4-5],以及物理、化学、环境因子等引起的非生物胁迫^[2, 6]等。因此,胼胝质在植物的生命活动中起重要的调节作用。

对植物胼胝质的研究主要集中在植物孢子形成和发育过程中胼胝质的沉积过程,其中包括各种逆境胁迫下胼胝质积累与植物抗逆性的关系。近年,有关植物胼胝质沉积与其抗病性关系的研究不断增加,如田国忠等^[7]、杨和民等^[8]、张伟丽等^[9]、丁新伦等^[10]、李文龙^[11]、赵永山^[12]、吴思思^[13]和董玉梅等^[14]研究了在病原菌和病毒侵入下,作物体内胼胝质沉积量与抗病性的关系。李文龙^[11]证明了大豆在抵抗大豆花叶病毒侵染过程中产生的大量胼胝质限制了病毒在胞间的运输。吴思思^[13]发现胼胝质的沉积与大豆抗病毒侵染密切相关。董玉梅等^[14]发现,大豆作为玉米小斑病菌的非寄主植物,可受玉米小斑病菌诱导而产生胼胝质沉积的防御反应。植物体内胼胝质的积累与植物的抗虫性关系也有一些报道^[15-18]。Ecale 等^[15]发现马铃薯叶蝉(*Empoasca fabae*)为害后不同苜蓿品种胼胝质数量有差异。Hao 等^[16]的结果表明,褐飞虱为害后感虫品种上胼胝质数量较多,抗虫品种较少。Du 等^[17]和 Wei 等^[18]认为,转 *Bph14* 基因水稻上胼胝质积累和胰蛋白酶抑制剂产生抑制了褐飞虱取食,从而产生对褐飞虱的抗性。

褐飞虱 [*Nilaparvata lugens* (Stål)] 是我国及东南亚地区许多水稻生产国的主要害虫,主要通过吸取水稻植株汁液引起稻株枯萎,严重时导致水稻“虱烧”。同时,褐飞虱还能传播作物病毒病为害水稻^[19]。在褐飞虱的综合治理技术体系中,抗虫品种的选育和利用是最经济、安全、有效的防治途径^[20]。在植物抗虫性的三种机制非嗜性(nonpreference)、耐虫性(tolerance)、抗生性(antibiosis)^[21]中,耐虫性在植物与害虫之间的进化和生态平衡中起着重要作用,是植物的一种重要防御策略。目前已发现在粮、棉、油、果、蔬、茶等农作物中存在耐虫性品种,并对植物耐虫性机理进行了研究^[22-23]。研究结果表明,培矮 64S/E32、Triveni、Utri Rajipan 等品种对褐飞虱有较强的耐受性和抗虱烧特性,Rathu Heenati 对褐飞虱有较强的抗生性^[24],并发现水稻品种耐虫性与稻株内叶绿素、氨基酸含量和相关酶

活性等生理指标有关^[25]。以往对水稻品种耐虫性研究多从水稻株型结构、生理生化因子来分析,未涉及水稻输导组织的组织学和细胞学,如维管束组织的超微结构特征、维管束组织的流量面积和“流”的生理活性等与耐虫性的关系,而这方面的研究可解释为何耐虫水稻受害虫取食危害后仍能保持正常的生长势,而感虫水稻则出现受害症状,甚至虱烧枯死。

本研究通过比较褐飞虱取食后不同耐虫性水稻叶鞘中胼胝质的沉积部位、大小和数量,明确水稻胼胝质沉积与耐虫性的关系,进一步阐明水稻品种耐褐飞虱机制,为筛选、培育和利用耐虫水稻品种以及治理褐飞虱种群提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 水稻品种

TN1(感虫品种)、Utri Rajapan(耐虫品种)和 Rathu Heenati(抗性品种)^[24]种子分期分批播种,当秧苗生长至 4~5 叶期移至钵钵(高 7 cm,直径 8 cm)中,每钵移栽 1 株,并转移到罩有 100 目尼龙纱网的养苗笼中,移栽后 7 d 和 15 d 各施 1 次三元复合肥(每次 0.5 g/钵)。

1.1.2 褐飞虱

采集杭州田间种群,在温室 TN1 上越冬,并用 TN1 稻苗饲养 2 代后取褐飞虱 4 龄若虫用于试验。

1.1.3 褐飞虱唾液

先将褐飞虱雌成虫放置在一 20℃ 的低温下使其休克,再解剖头部,取头部唾液腺 1000 个左右,置于 1 mL 昆虫唾液提取液(0.01 mol/L, pH 7.2~7.4, 137 mmol/L NaCl, 12.7 mmol/L KCl, 10 mmol/L Na₂HPO₄, 2 mmol/L KH₂PO₄)中,充分研磨后,置于 3000 r/min 下离心 5 min,取上清液用孔径 0.45 μm 的膜过滤,过滤液保存于一 70℃ 下备用。

1.1.4 稻苗处理

取事先准备好的 45 d 苗龄的水稻植株进行下列处理:

1) 褐飞虱为害。在每株主茎中下部,用 parafilm 膜制成的小袋包扎叶鞘将褐飞虱限制在 2 cm 范围内取食,每根苗接 10 头褐飞虱 4 龄若虫,取食 24 h 后去虫,然后让稻苗继续生长 0、2、4、8 d 后取样。每个品种观察 10 根苗。不接虫稻苗为对照。

2) 人工针刺。用无菌拉丝毛细管的尖端在叶鞘

中部2 cm范围内24 h刺100次,模拟褐飞虱刺探,然后稻苗生长0、2、4、8 d后取样。每个品种观察10根苗。未针刺稻苗为对照。

3)注射褐飞虱唾液(模拟褐飞虱刺吸)。用无菌的自制微量注射器吸取褐飞虱唾液,注射到叶鞘维管束组织,每次注射唾液量为0.05 μL ,模拟害虫在刺吸过程中分泌唾液。在叶鞘中部2 cm范围内共注射100次(上午、下午各50次),稻苗生长0、2、4、8 d后取样。每个品种观察10根苗。不处理稻苗为对照。

1.2 方法

利用冷冻切片和苯胺蓝荧光染色法观察水稻叶鞘组织胼胝质的沉积(已申请国家发明专利^[26])。选取不同耐虫水稻植株叶鞘的处理部位,每根叶鞘在处理区域中部截取0.5 cm的小段,放入10%甘油抽气15 min左右,直至下沉。将材料取出包埋,固定。样品用Leica CM 1900冷冻超薄切片机切片,获得10 μm 的切片,放入96%乙醇溶液中浸泡过夜。置于磷酸缓冲液(1/15 mol/L, pH=7.0)中30 min。用0.1%苯胺蓝(1/15 mol/L, pH=7.0)染色60 min。在Olympus BX51荧光正置显微镜下,用紫外光激发观察叶鞘表皮组织、薄壁组织、韧皮部组织和木质部组织中胼胝质的沉积大小和数量。

1.3 数据分析

用Microsoft Office Excel 2003分析数据。胼胝质颗粒大小用Image-Pro Plus图像分析软件(5.1版)进行分析计算。根据检查的维管束数量及其上沉积的胼胝质的沉积部位、大小和数量,计算出平均每个维管束中胼胝质的沉积数量和沉积面积。每个品种每个处理镜检切片数49~135张(即245~675个维管束)。

2 结果与分析

2.1 不同耐虫性水稻叶鞘组织中胼胝质的大小和沉积部位比较

通过对大量切片的荧光显微观察,发现不同耐虫性水稻叶鞘组织中胼胝质的沉积部位绝大多数分布在韧皮部组织、薄壁组织、表皮组织和木质部组织中,其中韧皮部筛管中的胼胝质沉积最多(图1、表1、表2、表3)。胼胝质的形态多种多样,主要有颗粒状(大、中、小3种颗粒)和丝状两种,但以小颗粒的胼胝质为主。在一个维管束中经常观察到有2个或以上的胼胝质沉积(图1-I)。

对感虫品种TN1,在褐飞虱取食、人工针刺或注射褐飞虱唾液等处理前,胼胝质主要沉积在韧皮部组织中;其次在表皮组织和木质部组织;但在薄壁组织中未发现。褐飞虱取食后,胼胝质主要沉积在韧皮部组织,但表皮组织中沉积显著增加,薄壁组织也出现胼胝质(表1);人工针刺或注射褐飞虱唾液后,胼胝质主要沉积在韧皮部组织和薄壁组织中,表皮组织和木质部组织中沉积较少(表2、表3)。

对耐虫品种Utri Rajapan,处理前,胼胝质主要沉积在韧皮部组织,但薄壁组织中沉积也较多,但木质部组织未发现;处理后,胼胝质主要沉积在韧皮部组织和薄壁组织中(表1、表2、表3)。

对抗生性品种Rathu Heenati,处理前,胼胝质主要沉积在韧皮部组织,表皮组织和薄壁组织也较多。褐飞虱取食后,主要沉积在韧皮部组织中,其他组织较少(表1);人工针刺或注射褐飞虱唾液后,主要沉积在韧皮部组织,薄壁组织和表皮组织也较多(表2、表3)。

2.2 不同耐虫性水稻叶鞘组织中胼胝质沉积数量的比较

在褐飞虱取食、人工针刺或注射褐飞虱唾液前,感虫品种TN1、耐虫品种Utri Rajapan和抗生性品种Rathu Heenati每个维管束组织中胼胝质的沉积数量分别为0.17个、0.56个和0.35个,每个维管束组织中胼胝质的沉积面积分别为8.89、20.77和12.74 μm^2 。

褐飞虱取食2 d后,TN1、Utri Rajapan和Rathu Heenati的胼胝质的沉积数量显著上升到1.33个、1.61个和1.02个,沉积面积显著增加到54.79、64.99和37.35 μm^2 。去虫后稻株恢复生长2 d和4 d检查,发现3个品种的胼胝质数量和沉积面积又显著减少,TN1、Utri Rajapan和Rathu Heenati每维管束组织中胼胝质的数量分别下降至0.53个和0.47个、0.73个和0.65个、0.61个和0.54个,沉积面积减少至22.27 μm^2 和17.80 μm^2 、32.00 μm^2 和27.07 μm^2 、26.06 μm^2 和21.20 μm^2 。稻株恢复生长8 d后,3个品种的胼胝质的沉积数量和面积进一步下降,胼胝质数量减少到0.23个(TN1)、0.32个(Utri Rajapan)和0.22个(Rathu Heenati),胼胝质的面积接近处理前水平(TN1、Rathu Heenati)或明显低于处理水平(Utri Rajapan)(表1)。

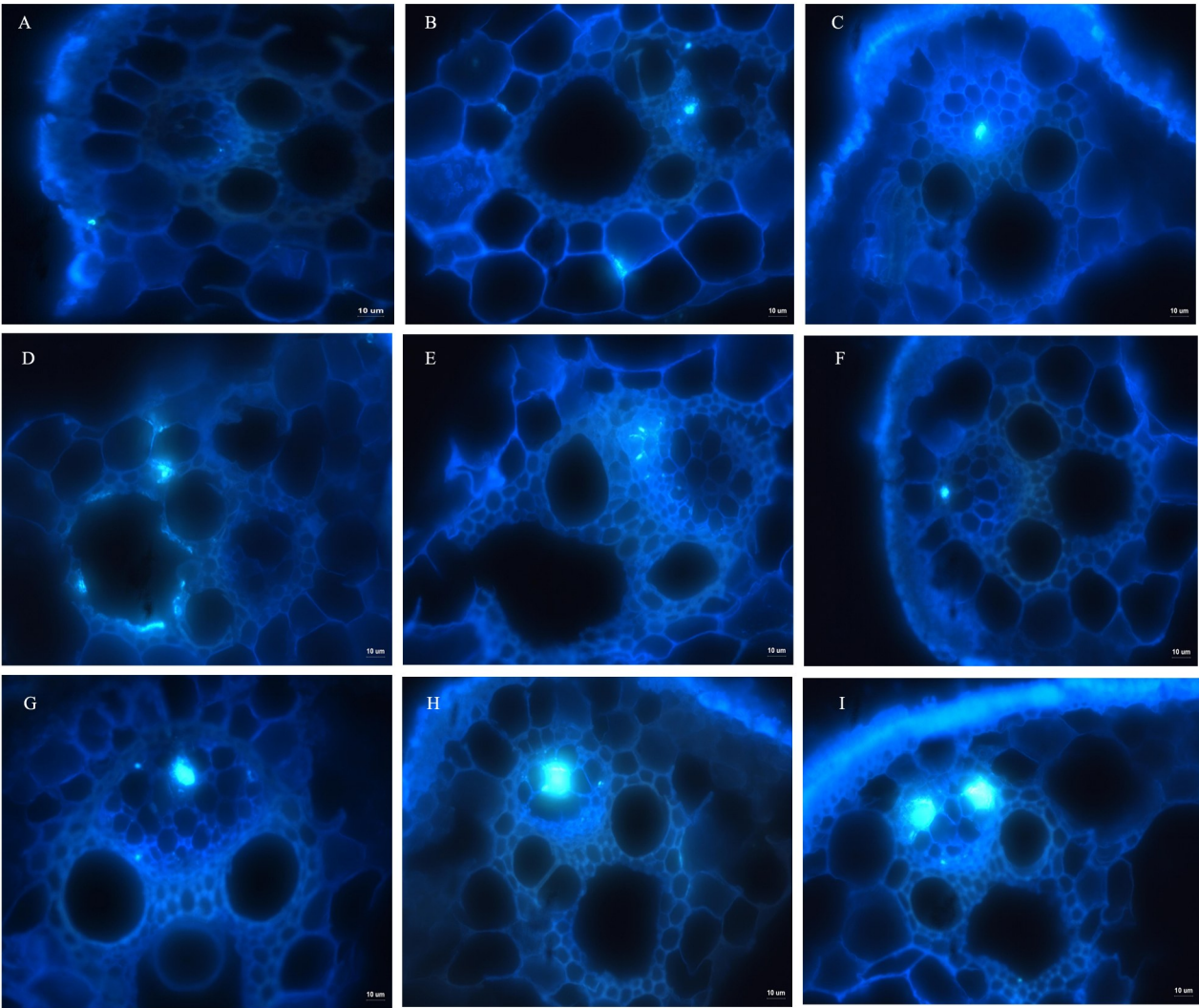
人工针刺后发现,3个品种的胼胝质数量显著增加至0.75个(TN1)、0.80个(Utri Rajapan)和

1.05个(Rathu Heenati),胼胝质的面积分别增加到 34.16、28.07 和 44.45 μm^2 。稻株恢复生长 2~8d 后,与处理前比较,TN1 的胼胝质数量和面积仍明显增加,Utri Rajapan 和 Rathu Heenati 的胼胝质数量下降至接近于处理前水平,尤其是 TN1 品种的胼胝质数量和面积分别增加了 4.47 和 3.45 倍(表 2)。

注射褐飞虱唾液后发现,3 个品种的胼胝质数量和面积也显著增加,胼胝质数量达到 0.72 个(TN1)、0.71 个(Utri Rajapan)和 1.16 个(Rathu

Heenati),胼胝质的面积增加到 30.14、25.16 和 31.84 μm^2 。稻株恢复生长 2~8 d 后,与处理前比较,TN1 的胼胝质数量和面积显著增加,Utri Rajapan 的胼胝质数量和面积无差异,Rathu Heenati 的胼胝质数量和面积略有增加(表 3)。

研究表明,无论褐飞虱取食为害、人工针刺或者注射褐飞虱唾液等处理,不同耐虫性水稻叶鞘组织中胼胝质的沉积数量和面积明显增加,尤其是感虫品种增加最显著;移除褐飞虱后稻株恢复生长 8 d,



荧光显微镜 800 倍;图中淡黄绿色亮斑为胼胝质;A—表皮组织;B—薄壁组织;C—韧皮部组织;D—木质部组织;E—韧皮部上丝状胼胝质;F—韧皮部上小颗粒胼胝质;G—韧皮部上中颗粒胼胝质;H—韧皮部上大颗粒胼胝质;I—韧皮部上 2 个大颗粒胼胝质。
Fluorescence microscope 800 \times ; Callose, Yellowish green fluorescence light spot; A, Epidermal tissue; B, Parenchyma; C, Phloem tissue; D, Xylem tissue; E, Filamentous callose in phloem tissue; F, Small particle of callose in phloem tissue; G, Middle particle of callose in phloem tissue; H, Great particle of callose in phloem tissue; I, Two great particles of callose in phloem tissue.

图 1 水稻叶鞘组织中胼胝质的分布部位(A~D)和大小(图 E~I)
Fig. 1. Distribution (Fig. A-D) and size (Fig. E-I) of callose in rice leaf sheath tissues.

表 1 褐飞虱为害及不同恢复时间对水稻叶鞘组织胼胝质沉积的影响

Table 1. Effects of BPH feeding and different recovery time on callose deposition in leaf sheath tissue of rice plants.

水稻品种与处理 Rice varieties and treatment	维管束数量 (镜检切片数) No. of vascular bundles (No. of slices)	胼胝质数量合计 (每维管束胼胝质数量) Total no. of callose (No. of callose per vascular bundle)	每个维管束上 胼胝质的沉积面积 [#] Area of callose per vascular bundle [#] / μm^2	木质部组织中 胼胝质数量(小颗粒 ^a) No. of callose in xylem tissue (Small particles ^a)
TN1				
未受害 NT(CK)	245(49)	43(0.17)	8.89±3.84	1
褐飞虱取食 2 d BPHFT	395(79)	528(1.34)	54.79±1.80	2
去虫后恢复生长 2 d TDRGRI	620(124)	328(0.53)	22.27±2.16	1
去虫后恢复生长 4 d FDRGRI	500(100)	233(0.47)	17.80±2.38	0
去虫后恢复生长 8 d EDRGRI	650(130)	149(0.23)	8.49±3.26	0
Utri Rajapan				
未受害 NT(CK)	340(68)	189(0.56)	20.77±2.38	0
褐飞虱取食 2 d BPHFT	410(82)	661(1.61)	64.99±1.56	0
去虫后恢复生长 2 d TDRGRI	415(83)	303(0.73)	32.00±2.75	1
去虫后恢复生长 4 d FDRGRI	520(104)	338(0.65)	27.07±2.25	2
去虫后恢复生长 8 d EDRGRI	525(125)	166(0.32)	13.40±3.32	2
Rathu Heenati				
未受害 NT (CK)	335(67)	118(0.35)	12.74±3.59	0
褐飞虱取食 2 d BPHFT	425(85)	434(1.02)	37.35±1.60	0
去虫后恢复生长 2 d TDRGI	595(119)	322(0.54)	26.06±2.76	0
去虫后恢复生长 4 d FDRGI	515(103)	314(0.61)	21.20±1.85	0
去虫后恢复生长 8 d EDRGI	675(135)	151(0.22)	11.04±4.65	0

水稻品种与处理 Rice varieties and treatment	韧皮部组织中胼胝质数量 No. of callose in phloem tissue				其他组织中胼胝质数量(小颗粒 ^a) No. of callose in other tissues (Small particles ^a)	
	丝状 ^d	小颗粒 ^a	中颗粒 ^b	大颗粒 ^c	表皮组织	薄壁组织
	Filamentary form ^d	Small particles ^a	Middle particles ^b	Great particles ^c	Epidermal tissue	Parenchyma tissue
TN1						
未受害 NT (CK)	4	21	9	4	4	0
褐飞虱取食 2 d BPHFT	25	228	64	30	177	2
去虫后恢复生长 2 d TDRGRI	21	216	61	15	2	12
去虫后恢复生长 4 d FDRGRI	18	160	32	9	4	10
去虫后恢复生长 8 d EDRGRI	10	79	9	8	30	13
Utri Rajapan						
未受害 NT (CK)	16	116	31	5	5	16
褐飞虱取食 2 d BPHFT	26	255	77	35	39	229
去虫后恢复生长 2 d TDRGRI	26	154	54	24	6	38
去虫后恢复生长 4 d FDRGRI	16	152	46	19	12	91
去虫后恢复生长 8 d EDRGRI	11	98	24	10	17	4
Rathu Heenati						
未受害 NT (CK)	10	55	7	6	16	24
褐飞虱取食 2 d BPHFT	36	297	59	13	28	1
去虫后恢复生长 2 d TDRGRI	12	193	48	29	24	16
去虫后恢复生长 4 d FDRGRI	142	28	10	16	96	
去虫后恢复生长 8 d EDRGRI	54	12	19	14	36	

^a 胼胝质小颗粒的面积(平均值±标准误)为(26.23±1.03) μm^2 ; ^b 中颗粒的面积为(76.69±3.24) μm^2 ; ^c 大颗粒的面积为(193.85±6.73) μm^2 ; ^d 丝状胼胝质的面积为(7.69±3.71) μm^2 ; [#] 平均值±标准误。

^a Area of small particle callose (average±SE) is (26.23±1.03) μm^2 ; ^b Area of middle particle callose (average±SE) is (76.69±3.24) μm^2 ; ^c Area of greater particle callose (average±SE) is (193.85±6.73) μm^2 ; ^d Area of filamentary form callose is (7.69±3.71) μm^2 ; [#] Average±SE.

NT, No Treatment; BPHFT, BPH feeding for 2 days; TDRGRI, Two days of recovery growth after insect removal; FDRGRI, Four days of recovery growth after insect removal; EDRGRI, Eight days of recovery growth after insect removal.

表 2 人工针刺及不同恢复时间对水稻植株叶鞘组织胼胝质沉积的影响

Table 2. Effects of manual acupuncture and different recovery time on callose deposition in leaf sheath tissue of rice plants.

水稻品种与处理 Rice varieties and treatment	维管束数量 (镜检切片数) No. of vascular bundles (No. of slices)	胼胝质数量合计 (每维管束胼胝质数量) Total no. of callose (No.of callose per vascular bundle)	每个维管束上 胼胝质的沉积面积 [#] Area of callose per vascular bundle [#] / μm^2	木质部组织中 胼胝质数量(小颗粒 ^a) No. of callose in xylem tissue (Small particles ^a)
TN1				
未受害 NT(CK)	245(49)	43(0.17)	8.89±3.84	1
人工针刺 MA	415(83)	313(0.75)	34.16±2.80	0
停止针刺后恢复生长 2 d TDRG	460(92)	413(0.90)	30.71±1.48	1
停止针刺后恢复生长 4 d FDRG	380(76)	352(0.93)	31.51±1.77	0
停止针刺后恢复生长 8 d EDRG	435(87)	406(0.93)	39.59±2.18	7
Utri Rajapan				
未受害 NT(CK)	340(68)	189(0.56)	20.77±2.38	0
人工针刺 MA	385(77)	307(0.80)	28.07±2.51	15
停止针刺后恢复生长 2 d TDRG	430(86)	243(0.57)	21.83±1.97	0
停止针刺后恢复生长 4 d FDRG	385(77)	348(0.90)	37.96±2.57	11
停止针刺后恢复生长 8 d EDRG	410(82)	217(0.53)	21.88±2.40	2
Rathu Heenati				
未受害 NT(CK)	335(67)	118(0.35)	12.74±3.59	0
人工针刺 MA	385(77)	406(1.05)	44.45±2.35	0
停止针刺后恢复生长 2 d TDRG	400(80)	360(0.90)	31.85±1.96	0
停止针刺后恢复生长 4 d FDRG	400(80)	288(0.72)	26.47±2.41	0
停止针刺后恢复生长 8 d EDRG	440(88)	207(0.47)	16.56±3.08	0

水稻品种与处理 Rice varieties and treatment	韧皮部组织中胼胝质数量 No. of callose in phloem tissue				其他组织中胼胝质数量(小颗粒 ^a) No. of callose in other tissues (Small particles ^a)	
	丝状 ^d	小颗粒 ^a	中颗粒 ^b	大颗粒 ^c	表皮组织	薄壁组织
	Filamentary form ^d	Small particles ^a	Middle particles ^b	Great particles ^c	Epidermal tissue	Parenchyma tissue
TN1						
未受害 NT(CK)	4	21	9	4	4	0
人工针刺 MA	52	131	51	26	4	49
停止针刺后恢复生长 2 d TDRG	27	52	42	10	17	264
停止针刺后恢复生长 4 d FDRG	26	77	24	12	2	211
停止针刺后恢复生长 8 d EDRG	33	128	56	26	5	151
Utri Rajapan						
未受害 NT(CK)	16	116	31	5	5	16
人工针刺 MA	27	79	28	11	3	144
停止针刺后恢复生长 2 d TDRG	15	54	22	13	5	134
停止针刺后恢复生长 4 d FDRG	9	71	29	25	11	192
停止针刺后恢复生长 8 d EDRG	24	70	24	15	4	78
Rathu Heenati						
未受害 NT(CK)	10	55	7	6	16	24
人工针刺 MA	75	109	56	30	52	84
停止针刺后恢复生长 2 d TDRG	35	84	25	16	62	138
停止针刺后恢复生长 4 d FDRG	51	59	29	15	36	98
停止针刺后恢复生长 8 d EDRG	71	78	23	12	11	12

^a 胼胝质小颗粒的面积(平均值±标准误)为(26.23±1.03) μm^2 ; ^b 中颗粒的面积为(76.69±3.24) μm^2 ; ^c 大颗粒的面积为(193.85±6.73) μm^2 ; ^d 丝状胼胝质的面积(7.69±3.71) μm^2 ; [#] 平均值±标准误。

^a Area of small particle callose (average±SE) is (26.23±1.03) μm^2 ; ^b Area of middle particle callose (average±SE) is (76.69±3.24) μm^2 ; ^c Area of great particle callose (average±SE) is (193.85±6.73) μm^2 ; ^dArea of filamentary form callose is (7.69±3.71) μm^2 ; [#] Average±SE.

MA, Manual acupuncture; TDRG, Two days of recovery growth after manual acupuncture; FDRG, Four days of recovery growth after manual acupuncture; EDRG, Eight days of recovery growth after manual acupuncture.

表 3 注射褐飞虱唾液(模拟褐飞虱为害)及不同恢复时间对水稻植株叶鞘组织胼胝质沉积的影响

Table 3. Effects of manual injection of BPH saliva and different recovery time on callose deposition in leaf sheath tissue of rice plants.

水稻品种与处理 Rice varieties and treatment	维管束数量 (镜检切片数) No. of vascular bundles (No. of slices)	胼胝质数量合计 (每维管束胼胝质数量) Total no. of callose (No of callose per vascular bundle)	每个维管束上 胼胝质的沉积面积 [#] Area of callose per vascular bundle [#] / μm^2	木质部组织中 胼胝质数量(小颗粒 ^a) No. of callose in xylem tissue (Small particles ^a)
TN1				
未受害 NT(CK)	245(49)	43(0.17)	8.89±3.84	1
注射褐飞虱唾液 IBPHS	445(89)	299(0.72)	30.14±2.95	1
模拟为害后恢复生长 2 d TDRG	410(82)	297(0.67)	26.66±2.21	1
模拟为害后恢复生长 4 d FDRG	435(87)	297(0.68)	25.02±2.25	0
模拟为害后恢复生长 8 d EDRG	425(85)	374(0.88)	34.33±2.02	1
Utri Rajapan				
未受害(CK)No Treatment (CK)	340(68)	189(0.56)	20.77±2.38	0
注射褐飞虱唾液 IBPHS	390(78)	276(0.71)	25.16±2.07	18
模拟为害后恢复生长 2 d TDRG	400(80)	371(0.93)	39.20±2.24	2
模拟为害后恢复生长 4 d FDRG	405(81)	294(0.73)	29.53±2.45	2
模拟为害后恢复生长 8 d EDRG	350(70)	196(0.56)	21.05±2.52	5
Rathu Heenati				
未受害 NT(CK)	335(67)	118(0.35)	12.74±3.59	0
注射褐飞虱唾液 IBPHS	380(76)	439(1.16)	31.84±1.11	3
模拟为害后恢复生长 2 d TDRG	365(73)	393(1.08)	39.31±1.98	1
模拟为害后恢复生长 4 d FDRG	405(81)	364(0.90)	28.25±1.57	5
模拟为害后恢复生长 8 d EDRG	415(83)	188(0.45)	16.76±3.55	7

水稻品种与处理 Rice varieties and treatment	韧皮部组织中胼胝质数量 No. of callose in phloem tissue				其他组织中胼胝质数量(小颗粒 ^a) No. of callose in other tissues (Small particles ^a)	
	丝状 ^d	小颗粒 ^a	中颗粒 ^b	大颗粒 ^c	表皮组织	薄壁组织
	Filamentary form ^d	Small particles ^a	Middle particles ^b	Great particles ^c	Epidermal tissue	Parenchyma tissue
TN						
未受害 NT(CK)	4	21	9	4	4	0
注射褐飞虱唾液 IBPHS	68	105	49	26	4	46
模拟为害后恢复生长 2 d TDRG	38	59	33	13	0	153
模拟为害后恢复生长 4 d FDRG	36	73	28	14	6	140
模拟为害后恢复生长 8 d EDRG	30	82	46	18	0	197
Utri Rajapan						
未受害 NT(CK)	16	116	31	5	5	16
注射褐飞虱唾液 IBPHS	17	82	24	10	4	121
模拟为害后恢复生长 2 d TDRG	26	83	51	23	8	178
模拟为害后恢复生长 4 d FDRG	7	63	27	18	6	171
模拟为害后恢复生长 8 d EDRG	14	48	26	7	3	93
Rathu Heenati						
未受害 NT(CK)	10	55	7	6	16	24
注射褐飞虱唾液 IBPHS	69	61	17	6	114	169
模拟为害后恢复生长 2 d TDRG	70	77	46	18	51	130
模拟为害后恢复生长 4 d FDRG	50	51	26	9	43	180
模拟为害后恢复生长 8 d EDRG	69	53	19	14	3	23

^a 胼胝质小颗粒的面积(平均值±标准误)为(26.23±1.03) μm^2 ; ^b 中颗粒的面积为(76.69±3.24) μm^2 ; ^c 大颗粒的面积为(193.85±6.73) μm^2 ; ^d 胼胝质丝状的面积(7.69±3.71) μm^2 ; [#] 平均值±标准误。

^a Area of small particle callose (average±SE) is (26.23±1.03) μm^2 ; ^b Area of middle particle callose (average±SE) is (76.69±3.24) μm^2 ; ^c Area of great particle callose (average±SE) is (193.85±6.73) μm^2 ; ^dArea of filamentary form callose is (7.69±3.71) μm^2 ; [#] Average±SE.

IBPHS, Injection of BPH saliva; TDRG, Two days of recovery growth after injection of BPH saliva; FDRG, Four days of recovery growth after injection of BPH saliva; EDRG, Eight days of recovery growth after injection of BPH saliva.

与处理前比较,感虫品种的胼胝质数量和面积无明显差异,耐虫品种明显减少,抗生性品种略有减少。停止人工针刺或注射褐飞虱唾液后稻株恢复生长 8 d,感虫品种的胼胝质数量和面积显著增加,耐虫品种无明显差异,抗生性品种有所增加。上述结果说明品种耐虫性与叶鞘维管束组织中胼胝质的沉积数量或沉积面积有关。

3 讨论

当植物受到伤害时,胼胝质在质膜和细胞壁之间沉积,在透射电镜下呈电子透明状^[27]。研究表明,许多刺激如伤口^[28]、轻微机械动摇^[29]、超声波胁迫^[30]、低温胁迫^[31]、热胁迫^[32]、重金属中毒^[33]、病原菌感染^[7-9, 12, 14]、病毒侵入^[10-11, 13]和害虫取食为害^[15-18]等,均能诱导植物体内胼胝质的沉积,并与植物的抗逆性关系密切。因此,研究害虫取食与寄主植物耐虫性的关系,具有重要意义。

目前,植物体内胼胝质的沉积与植物抗病性关系研究较多。在水稻中,杨和民等^[8]采用致病性不同的 3 个稻瘟菌株接种水稻 IR64,发现不同互作类型寄主细胞中多酚类物质、胼胝质和 PLD γ 产生和积累存在差异,表明这些物质在水稻的抗病性中起重要作用。丁新伦等^[10]研究了水稻条纹病毒(RSV)胁迫对抗、感病水稻品种胼胝质沉积的影响,发现感病品种(武育梗 3 号)水稻叶片组织中胼胝质的荧光强度与健株无显著差异,而抗病品种(KT95-418)水稻叶片组织中胼胝质的荧光强度则明显强于健株,且抗病水稻中的胼胝质荧光强度强于感病水稻。Hao 等^[16]的研究发现,褐飞虱口针刺诱导韧皮部筛管上胼胝质的沉积数量在感虫品种上较多,在含抗虫基因 *Bph14* 和 *Bph15* 水稻品种上较少。Du 等^[17]和 Wei 等^[18]的结果表明,胼胝质积累和胰蛋白酶抑制剂产生使得转 *Bph14* 基因水稻抑制了褐飞虱的取食,从而产生对褐飞虱的抗性。这些研究说明,水稻品种的抗病性、抗虫性与胼胝质的沉积有关。因此,本研究选用不同耐虫性水平的水稻作为研究材料,具充分的科学依据。

本研究表明,在褐飞虱取食、人工针刺或者注射褐飞虱唾液后,不同耐虫性水稻叶鞘组织胼胝质的沉积数量和面积明显增加,尤其是褐飞虱取食的处理。移除褐飞虱后稻株恢复生长 8 d,与处理前比较,感虫品种 TN1 的胼胝质数量和面积无明显差异,耐虫品种 Utri Rajapan 明显减少,抗生性品种

Rathu Heenati 略有减少。解除人工针刺或注射褐飞虱唾液后稻株恢复生长 8 d,感虫品种的胼胝质数量和面积显著增加,耐虫品种无明显差异,抗生性品种有所增加。本研究结果说明,水稻品种耐褐飞虱特性与其叶鞘组织胼胝质的沉积数量和沉积面积有关,故在应用上,可考虑根据胼胝质的沉积数量或沉积面积来比较品种的耐虫性。

由于机械损伤可诱导植物细胞合成胼胝质^[15],本研究采用了人工针刺和注射褐飞虱唾液的方法。这两种方法与褐飞虱直接取食有一定的差异。在刺吸式昆虫与植物的互作关系中,唾液成分起到重要作用。当刺吸式昆虫口针穿刺植物时,植物筛管分子会立即响应,形成胼胝质来封住筛管口^[34],为了抑制植物的虫伤反应,刺吸式昆虫分泌的胶状唾液填充口针穿刺取食时造成的细胞壁缝隙,形成一个兼容的生化组织平面代替细胞膜^[35],从而抑制了植物的伤信号反应。研究表明,褐飞虱唾液可分为口针鞘物质(蛋白质、不饱和脂、糖类等)和水样唾液(淀粉酶、糖苷酶等水解酶类)两大类^[19,36],在其口针刺探过程中常分泌凝固性唾液,并不断改变刺探方向,直至韧皮部才停止刺探开始吸食。据报道,褐飞虱在稻株上的 24 h 取食频率为 16~50 个^[37],在不同品种上的刺探频率和刺吸时间差异很大^[38]。而人工针刺只是单纯的机械损伤,没有唾液酶的作用;注射褐飞虱唾液既有机机械损伤,又有唾液酶的部分作用;同时,人工针刺对稻株的机械伤害重于褐飞虱口针刺探,针刺频率也高于褐飞虱取食频率^[37]。由于机械损伤可诱导植物细胞合成胼胝质^[15],本研究采用了人工针刺和注射褐飞虱唾液的方法。本研究比较了人工针刺、注射唾液和直接取食对不同耐虫水稻胼胝质沉积的影响差异,为今后开展类似研究提供了重要信息。

前人研究和本研究结果仅涉及胼胝质的沉积与水稻品种抗(耐)虫性的关系,至于水稻维管束组织的流量面积如筛管分子和导管分子大小以及“流”的生理活性如胼胝质合成酶活性等与品种耐虫性的关系有待深入研究。

参考文献:

- [1] Xie B, Wang X, Zhu M, et al. CalS7 encodes a callose synthase responsible for callose deposition in the phloem. *Plant J*, 2011, 65(1): 1-14.
- [2] Zavalie R, Ueki S, Epel B L, et al. Biology of callose(β -1,3-

- glucan) turnover at plasmodesmata. *Protoplasma*, 2011, 248(1): 117-130.
- [3] Barratt D H, Kölling K, Graf A, et al. Callose synthase GSL7 is necessary for normal phloem transport and inflorescence growth in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2011, 155(1): 328-341.
- [4] Chen X Y, Kim J Y. Callose synthesis in higher plants. *Plant Signal & Behav*, 2009, 4(6): 489-492.
- [5] Wan L, Zha W, Cheng X, et al. A rice β -1,3-glucanase gene *Osg1* is required for callose degradation in pollen development. *Planta*, 2011, 233(2): 309-323.
- [6] Luna E, Pastor V, Robert J, et al. Callose deposition: A multifaceted plant defense response. *Mol Plant Microbe*, 2011, 24(2): 183-193.
- [7] 田国忠, 张锡津, 熊耀国, 等. 泡桐筛管内胼胝质与抗丛枝病关系的研究. *植物病理学报*, 1994, 24: 352.
- [8] 杨和民, 郑重, Leach J E. 水稻受稻瘟菌侵染后发病初期的细胞学反应. *实验生物学报*, 2004, 37(5): 344-350.
- [9] 张伟丽, 郭振飞. 不同抗性品种柱花草接种炭疽菌后 CAT、SOD 活性及 H_2O_2 、胼胝质含量的变化. *扬州大学学报: 农业与生命科学版*, 2007, 28(2): 73-77, 94.
- [10] 丁新伦, 谢荔岩, 林奇英, 等. 水稻条纹病毒胁迫下抗、感病水稻品种胼胝质的沉积. *植物保护学报*, 2008, 35(1): 19-22.
- [11] 李文龙. 胼胝质在大豆抵抗大豆花叶病毒中的作用. 保定: 河北农业大学, 2008.
- [12] 赵永山. 胼胝质对胞间连丝的修饰在大豆抗病毒侵染过程中的作用. 保定: 河北农业大学, 2010.
- [13] 吴思思. 不同大豆与大豆花叶病毒组合中胼胝质的荧光标记及其功能的初步研究. 保定: 河北农业大学, 2012.
- [14] 董玉梅, 潘满华, 赵正龙, 等. 玉米小斑病菌诱导大豆叶片胼胝质沉积的初步研究. *云南农业大学学报*, 2013, 28(1): 16-20.
- [15] Ecalle C, Backus E A. Phloem injury and repair following potato leafhopper feeding on alfalfa stems. *Can J Bot*, 1999, 77(4): 537-547.
- [16] Hao P, Liu C, Wang Y, et al. Herbivore induced callose deposition on the sieve plates of rice: An important mechanism for host resistance. *Plant Physiol*, 2008, 146(4): 1810-1820.
- [17] Du B, Zhang W L, Liu B F, et al. Identification and characterization of *Bph14*, a gene conferring resistance to brown planthopper in rice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(52): 22163-22168.
- [18] Wei Z, Li R B, Li Y R, et al. Understanding rice plant resistance to the brown planthopper (*Nilaparvata lugens*): A proteomic approach. *Proteomics*, 2009, 9(10): 2798-2808.
- [19] 程遐年, 吴进才, 马飞. 褐飞虱发生与防治. 北京: 中国农业出版社, 2003.
- [20] Khush G S. Green revolution: The way forward. *Nat Rev Genet*, 2001, 2(10): 815-822.
- [21] Painter R H. Insect resistance in crop plants. New York: Macmillan Press, 1951: 520.
- [22] 陈建明, 俞晓平, 程家安, 等. 植物耐虫性研究进展. *昆虫学报*, 2005, 48(2): 262-272.
- [23] Juan N F, Juan F, Pedro L V. The evolution of resistance and tolerance to herbivores. *Annu Rev Ecol Evol Syst*, 2007, 38: 541-566.
- [24] 陈建明, 俞晓平, 程家安. 不同水稻品种对褐飞虱的耐虫特性研究. *作物学报*, 2009, 35(5): 795-801.
- [25] 陈建明. 水稻品种对褐飞虱为害的耐性及其生理机制研究. 杭州: 浙江大学, 2004.
- [26] 陈建明, 杨丽, 张珏峰, 等. 一种用于观察水稻叶鞘组织胼胝质的叶鞘组织制片方法. 中国, 201210048297. X.
- [27] Stone B A, Clarke A E. Chemistry and biology of (1,3)- β -glucanase. Bundoora, Vic: La Trobe University Press, 1992.
- [28] Radford J E, Vesik M, Overall R L. Callose deposition at plasmodesmata. *Protoplasma*, 1998, 201(1/2): 30-37.
- [29] Jaffe M J, Leopoda C. Callose deposition during garavotropism of *Zea mays* and *Pisum sativum* and its inhibition by 2-deoxy-D-glucose. *Planta*, 1984, 161(1): 20-26.
- [30] Currier H B, Webster D H. Callose formation and subsequent disappearance: Studies in ultrasound stimulation. *Plant Physiol*, 1964, 39: 843-847.
- [31] Majumder S K, Leopold A C. Callose formation in response to low temperature. *Plant Cell Physiol*, 1967, 8: 775-778.
- [32] McNairn R B. Phloem translocation and heat-induced callose formation in field grown *Gossypium hirsutum* L. *Plant Physiol*, 1972, 50(3): 366-370.
- [33] Sivaguru M, Fujiwara T, Samaj J, et al. Aluminum-induced 1-3- β -glucan inhibits cell-to-cell trafficking of molecules through plasmodesmata: A new mechanism of aluminum toxicity in plants. *Plant Physiol*, 2000, 124(3): 991-1005.
- [34] Knoblauch M, van Bel A J E. Sieve tubes in action. *Plant Cell*, 1998, 10(1): 35-50.
- [35] Will T, van Bel A J E. Physical and chemical interactions between aphids and plants. *J Exp Bot*, 2006, 57(4): 729-737.
- [36] 杜孟浩, 严兴成, 姜永根, 等. 褐飞虱唾液中诱导水稻释放挥发物的活性组分研究. *浙江大学学报: 农业与生命科学版*, 2005, 31(3): 237-244.
- [37] Sogawa K. Studies on feeding habits of the brown planthopper. I: Effects of nitrogen-deficiency of host plant on insect feeding. *Jpn J Appl Entomol Zool*, 1970, 14: 101-106.
- [38] 陈利, 陈建明, 何月平, 等. 抗感吡虫啉褐飞虱在不同水稻品种上的取食行为比较. *浙江农业学报*, 2011, 23(5): 924-931.