

三裂叶豚草锈菌侵染寄主叶片的显微和超微观察

曲 波¹, 王学治¹, 吕国忠², 翟 强¹, 陈旭辉¹, 杨 红²

¹沈阳农业大学生物技术学院, 辽宁 沈阳 110866; ²大连民族学院生命科学学院, 辽宁 大连 116600

摘要:【背景】三裂叶豚草是我国重要的外来入侵植物之一,其传播速度快,已给我国造成巨大的经济损失。近年来发现的三裂叶豚草锈菌是一种对其具有生物防治潜力的病原菌。【方法】本文利用显微技术研究了三裂叶豚草锈菌的侵染过程及其对寄主结构的影响。【结果】三裂叶豚草锈菌菌丝可从多处侵入同一个叶肉细胞,胞间菌丝与叶肉细胞相接触可使部分细胞壁增厚。锈菌侵染使三裂叶豚草叶脉末梢导管分枝增多,造成三裂叶豚草水分代谢失调;叶片细胞内膜系统破碎化,细胞器结构受到不同程度的破坏,导致细胞内膜系统紊乱,细胞器结构稳定性降低。【结论与意义】豚草锈菌侵染破坏了三裂叶豚草叶片的细胞结构。本研究为深入研究豚草锈菌的致病机理奠定了基础。

关键词: 三裂叶豚草; 锈菌; 侵染过程; 显微观察

Microscopic and ultramicroscopic investigation into the infection process of giant ragweed rust (*Puccinia xanthii* f. sp. *ambrosiae-trifidae*)

Bo QU¹, Xue-zhi WANG¹, Guo-zhong LÜ², Qiang ZHAI¹, Xu-hui CHEN¹, Hong YANG²

¹College of Biological Technology, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110866, China;

²College of Life Science, Dalian Nationalities University, Dalian, Liaoning 116600, China

Abstract: 【Background】Giant ragweed is one of main invasive plants in China and has caused great economic losses. The giant ragweed rust (*Puccinia xanthi* f. sp. *ambrosiae-trifida*), a phytopathogenic fungus is a potential new agent for biological control of this invasive plant, but its infection process is not well understood. 【Method】The infection mechanisms of the rust (*Puccinia xanthii* sp. *ambrosiae-trifidae*) and its effect on the leaf structure of giant ragweed (*Ambrosia trifida*) were studied by means of light microscopy, scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM). 【Result】After the rust formed haustoria, the mycelium grew into the intercellular space of the mesophyll cells. The mycelium could infect one mesophyll cell, the cell wall of which was thickened at the contact position. The branches of peripheral ragweed leaf veins were increased by infection, which led the ragweed leaves to moisture decompensation. Further, membrane damage and, organelle structure instability resulted in the cellular endomembrane system falling into disorder and the organelles becoming destabilized. 【Conclusion and significance】The leaf cell structure was destroyed in the process of ragweed rust infecting, which will provide reference for control of the ragweed.

Key words: *Ambrosia trifida*; *Puccinia xanthii* f. sp. *ambrosiae-trifidae*; infection mechanisms; microscopic investigation

三裂叶豚草是一种入侵我国的恶性杂草,我国最早的三裂叶豚草标本为刘慎铎先生于1949年采于沈阳。目前已蔓延到东北大部分地区,尤以辽宁省发生面积最大,危害最重,主要依赖人工拔除与除草剂防治。人工拔除费时费力,且研究发现,部分三裂叶豚草种群对磺草胺类除草剂具有抗药性,使化学防治也面临严峻挑战(Jason,2010; Patzoldt, 2002)。2004年,Lü *et al.* 发现苍耳柄锈菌三裂叶豚草专业型(简称豚草锈菌)*Puccinia xanthii* f. sp. *ambrosiae-trifidae*,为利用病原菌防治豚草提供了可靠依据。通过近几年的调查发现,豚草锈病对三裂

叶豚草表现为专性寄生,只侵染三裂叶豚草,不侵染其他植物,高温高湿条件下易于发病,使叶片受害,影响其有机物合成和种子产量,严重时可致三裂叶豚草植株死亡。由此可见,豚草锈菌对三裂叶豚草的滋生蔓延与危害具有明显抑制作用(曲波等,2009、2010、2011)。从超微结构和分子细胞学角度研究锈菌与寄主的相互关系是当代植物病理学中极受重视的研究领域之一(黄国红等,2002;田呈明等,2001、2002;郑玲和吴小芹,2007)。为了有效利用该锈菌防治三裂叶豚草,明确锈菌对寄主植物——三裂叶豚草的侵染特性(康振生,1995),本

文利用生物电镜技术和细胞化学方法对豚草锈菌的侵染过程及其对寄主叶片细胞结构的影响进行研究。

1 材料与方法

1.1 试验材料

2008~2010 年春季将三裂叶豚草种子种植于温室中,待幼苗长至 2~4 对叶时接种。豚草锈菌冬孢子由沈阳农业大学生物技术学院提供,加水配制成 10^5 个 $\cdot$ mL $^{-1}$ 孢子悬浮液,采用喷雾法接种,每天保湿 12 h 后取叶片进行显微与超微结构观察。

1.2 显微结构观察

1.2.1 乳酚油透明法 选取新鲜的带有冬孢子堆的三裂叶豚草病叶,用打孔器(直径 0.5 cm)打取圆片,将圆片置于烧杯中,加入少许乳酚油试剂,煮沸 15~30 min,至叶片透明但未消解为止。加 0.1% 苯胺蓝(棉蓝)染色后,用乳酚油作浮载剂,然后进行显微观察(方中达,1998)。

1.2.2 石蜡切片法 取病叶,FAA 固定,用常规石蜡切片方法制作切片,然后进行显微观察(李正理,1987)。

1.2.3 棉蓝染色 取病叶,用 70% 乙醇固定 24 h,

做徒手横切片,1% 棉蓝染色,然后进行显微观察(方中达,1998)。

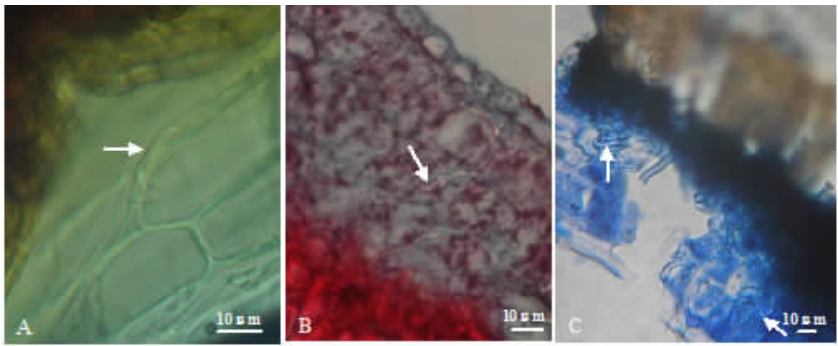
1.3 透射电镜样品的制备及观察

透射电镜样品的制备参考付洪兰(2004)的方法。取新鲜的带有冬孢子堆的病叶,将其切成 1~2 mm 的样品。用 1%~5% 戊二醛前固定、1% 锇酸后固定,经丙酮逐级脱水、环氧树脂浸透、包埋剂包埋,通过超薄切片机制作 $5\times 10^{-1}\sim 7\times 10^{-1}$ nm 的切片,自然干燥。用 4% 醋酸双氧铀与枸橼酸铅滴染后,进行 JEOL 透射电子显微镜观察。

2 结果与分析

2.1 豚草锈菌侵染叶片细胞的显微观察

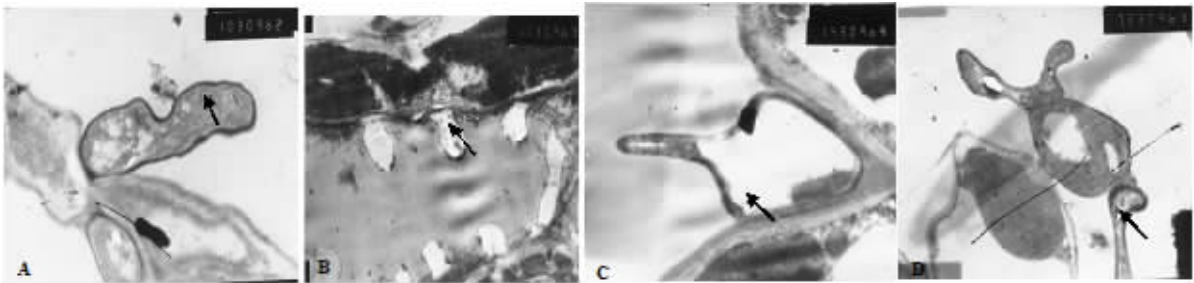
对显症后病叶的显微结构与超微结构观察表明,锈菌菌丝产生吸器后,沿叶肉细胞胞间隙生长(图 1A)。在排列紧密的细胞间生长时,菌丝末端膨大(图 1B),与叶肉细胞相接并对其挤压(图 1C、图 2A),有些产生分枝。通过透射电镜观察,菌丝可从多处侵入一个叶肉细胞(图 2B),菌丝有分枝(图 2C),胞间菌丝与叶肉细胞相接触使部分细胞壁增厚(图 2D)。



A: 乳酚油透明; B: 石蜡切片; C: 苯胺蓝染色。箭头表示菌丝。
A: Lactophenol clearing; B: Paraffin section; C: Azure dyeing. Arrow indicate hyphae.

图 1 在叶肉细胞间生长的菌丝

Fig. 1 Hyphae growing in leaf tissue of giant ragweeds



A: 菌丝与叶表皮细胞($\times 10000$); B: 菌丝侵入叶肉细胞($\times 10000$); C: 菌丝末端膨大($\times 14000$); D: 菌丝与叶肉细胞($\times 7200$)。箭头表示菌丝。
A: Hyphae and epidermal cells ($\times 10000$); B: Hyphae infected mesophyllous cells ($\times 10000$); C: Racquet mycelium ($\times 14000$); D: Hyphae and mesophyllous cells ($\times 7200$). Arrow indicate hyphae.

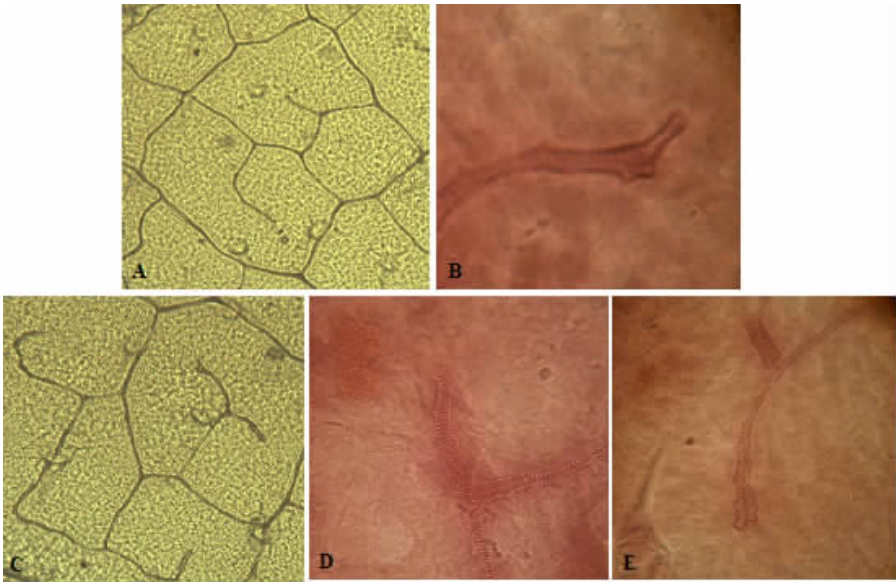
图 2 菌丝侵入叶表皮及叶肉细胞

Fig. 2 A transmission elecctron microscopis photo of the giant ragweed rust hyphae infecting the epidermal and mesophyllous cells of the host plan, *A. trifida*

2.2 锈菌侵入后三裂叶豚草叶脉末端导管的变化

正常叶片的末端导管由粗到细,由 1 个导管或管胞组成(图 3A、B);锈菌侵入叶片后叶脉末端导管形态发生变化,维管束末端导管管径增大(图 3C、D),

有的维管束末端出现多导管化(图 3E),这可能是由于锈菌影响了三裂叶豚草的水分代谢,使叶片内组织通过增大导管管径或导管数量来平衡水分代谢。



A:正常叶片(×100); B:正常叶片导管末端(×400); C:罹病叶片(×100); D:末端导管细胞膨大(×400); E:维管束末端双导管细胞(×400)。
A: Natural leaf (×100); B: End of vessel of natural leaf (×400); C: Infected leaf (×100); D: Oncoides at the end of vessel(×400); E: Double vessel cell at the end of vascular bundle(×400).

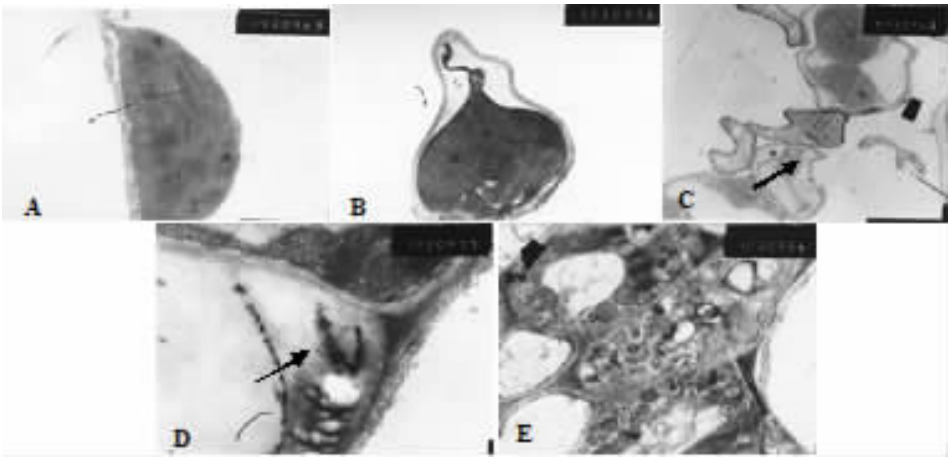
图 3 锈菌侵染对三裂叶豚草叶片维管束的影响

Fig.3 Structural observation of vascular bundle after infection by *Puccinia xanthii* f. sp. *ambrosiae-trifidae*

2.3 锈菌侵入后三裂叶豚草叶片超微结构的变化

通过观察锈菌侵染的三裂叶豚草叶片的超微结构,发现锈菌可以破坏叶片组织,使有的细胞内容物流失,叶绿体内淀粉粒减少,叶绿体变形(图 4A、B),有的细胞内膜系统破碎,线粒体、高尔基体

等细胞器数量减少,结构被破坏(图 4C、D),从而导致叶片的光合能力降低,营养物质减少,植株生长受到抑制。而正常细胞中的细胞器较多,叶绿体形状完整,片层多(图 4E)。



A:正常叶绿体(×14000); B:细胞内容物流失,叶绿体变形(×7200); C:解体的细胞器(×4800); D:叶绿体解体(×19000); E:正常细胞(×1000)。箭头表示遭破坏的细胞器。

A: Normal chloroplast (×14000); B: Cellular content erosion and anamorphic chloroplast (×7200); C: Disintegrated cellular organ (×4800); D: Disintegrated chloroplast (×19000); E: Normal cell (×1000). Arrow indicate destructive organelles.

图 4 锈菌侵染后三裂叶豚草叶片组织的超微观察

Fig.4 Ultra-structural observation of giant ragweed leaf after infection by *Puccinia xanthii* f. sp. *ambrosiae-trifidae*

3 讨论

锈菌吸器在菌丝与寄主细胞营养成分的相互交换中及与寄主间确立寄生关系方面均起着重要作用。锈菌侵染寄主细胞后,由于其吸器的存在而诱导出特定的管状复合体,该结构在多种锈菌中已有报道,但不同的锈菌所诱导的管状复合体,在形态上存在差异,有的呈球状,有的呈卵球形等,并且在吸器体上可产生凸起或分枝(康振生等,1993; Coffey & Allen,1983)。本研究发现,豚草锈菌产生的吸器具有多种形状,呈棍棒状或椭圆形,有的有凸起。这与菜豆锈菌 *Uromyces appendiculatus* 产生的多种形态的吸器有相似之处(冯东昕等,2000)。小麦锈菌 *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* 吸器的细胞核有 1 至多个(康振生等,1994),但本试验并未观察到豚草锈菌吸器细胞具有多核现象。

通过对锈菌侵染后三裂叶豚草叶片结构的观察,发现锈菌侵染对三裂叶豚草叶片的水分代谢和光合代谢产生了较大影响。在被锈菌侵染后,三裂叶豚草叶片的维管束木质素增多,孔径加大,末端导管加粗或导管数增多。通过对三裂叶豚草病叶超微结构的观察,发现叶片细胞受锈菌侵染后的变化与其他植物(康振生等,1993)相似。吸器进入叶肉细胞初期,对细胞结构没有明显影响;后期随着菌丝的生长,叶片细胞结构被破坏;当叶片细胞即将坏死时,其他细胞器如线粒体、高尔基体等已先于叶绿体解体,使叶绿体中的淀粉粒逐渐减少,最终随叶绿体的解体而迅速消失,进而改变了细胞膜的通透性,使细胞内容物流失,最后导致细胞崩解,严重破坏三裂叶豚草的生长发育。目前,豚草锈菌不能离体纯培养,只能利用寄主繁殖,其发病条件会受到各种环境因子的影响。因此,有关锈菌侵染三裂叶豚草的组织细胞学变化还需深入研究,特别是有关豚草锈菌与三裂叶豚草之间的互作关系,将是充分发挥其生物防治潜力的保障,也是入侵生物学学科的重要研究内容(万方浩等,2011)。

参考文献

方中达. 1998. 植病研究方法. 第 3 版. 北京:中国农业出版社.
冯东昕,朱国仁,李宝栋. 2000. 菜豆锈菌侵染过程的显微和超微观察. 植物病理学报,30(1):53-58.

付洪兰. 2004. 实用电子显微镜技术. 北京:高等教育出版社.
黄国红,康振生,朱之堉,李振歧. 2003. 小麦叶锈菌在感病寄主上发育的组织病理学和超微结构研究. 植物病理学报,33(1):52-56.
康振生. 1995. 植物病原真菌的超微结构. 北京:中国科学技术出版社.
康振生,李振歧,商鸿生, Chong J, Rohringer R. 1993. 小麦条锈菌胞间菌丝的超微结构和细胞化学研究. 真菌学报,12(3):208-213.
康振生,李振歧, Chong J, Rohringer R. 1994. 小麦条锈菌吸器超微结构和细胞化学的研究. 真菌学报,13(1):52-57.
李正理. 1987. 植物制片技术. 第 2 版. 北京:科学出版社.
曲波,黄佳丽,张微,杨红,陈旭辉,吕国忠. 2010. 三裂叶豚草锈菌寄主专化性的研究. 辽宁农业科学,(5):50-52.
曲波,吕国忠,杨红,董淑萍. 2009. 三裂叶豚草锈病发生和流行规律的研究. 菌物研究,7(3-4):180-184.
曲波,杨红,陈旭辉,翟强,董淑平,吕国忠. 2011. 豚草锈菌对三裂叶豚草光合生理特性的影响. 生物安全学报,20(3):227-231.
田呈明,康振生. 2001. 杨树叶锈病组织病理学和细胞学研究. 西北林学院学报,16(2):43-49.
田呈明,梁英梅,康振生,李振歧,赵彦修. 2002. 青杨叶锈病菌(*Melampsora larici-populina* Kleb.) 侵染过程的超微结构研究. 植物病理学报,32(1):71-78.
万方浩,严盈,王瑞,杨国庆. 2011. 中国入侵生物学学科的构建与发展. 生物安全学报,20(1):1-19.
郑玲,吴小芹. 2007. 植物病原真菌侵染结构研究进展. 南京林业大学学报:自然科学版,30(1):90-94.
Coffey M D and Allen P J. 1983. A quantitative histological and ultrastructural analysis of interactions between the flax rust and near-isogenic host lines varying in their degree of incompatibility. *Canadian Journal of Botany*, 61(7):183-185.
Jason K N, Prashant J, Lawrence E S and Robert C S. 2010. Confirmation and control of glyphosate-resistant giant ragweed (*Ambrosia trifida*) in Tennessee. *Weed Technology*, 24:64-70.
Lü G Z, Yang H, Sun X D, Yang R X and Zhao Z H. 2004. *Puccinia xanthii* Schwein. f. sp. *ambrosiae-trifidiae*, a newly recorded rust taxon on *Ambrosia* in China. 菌物学报,23(2):310-311.
Patzoldt W L and Tranel P J. 2002. Molecular analysis of clo-ransulam resistance in a population of giant ragweed. *Weed Science*, 50:299-305.

(责任编辑:杨郁霞)