

溃疡病菌在杨树树皮组织中的扩展和 对寄主细胞超微结构的影响*

赵仕光 朱 玮 岳红艳

(西北林学院, 712100, 陕西杨陵; 第一作者 35 岁, 男, 讲师)

摘要 病理解剖和超微结构研究发现, 溃疡病菌是在胞间隙和被分解了的细胞壁中穿行的; 其对寄主组织最直接的危害是分解并利用细胞壁, 破坏寄主组织细胞结构; 抗病的毛白杨在被病菌侵害后, 细胞内形成高电子密度的羽形结晶状沉积物, 细胞壁膨胀而不疏散, 而感病的北京杨和中抗的陕林 4 号杨在被病菌侵害后, 细胞内并不形成类似毛白杨的沉积物, 它们的细胞壁因感染而变得膨胀且松散, 毛白杨与北京杨、陕林 4 号杨在细胞壁结构上的不同, 可能是毛白杨产生抗病性的原因之一。

关键词 杨树溃疡病菌; 杨树; 组织病理; 超微结构

分类号 S763.150.1

杨树溃疡病为杨树 (*Populus* spp.) 上的一种主要干部病害, 其病原菌葡萄座腔菌 (*Botryosphaeria dothidea* (Mong ex Fr.) Ces. et de Not), 无性阶段为群生小穴壳 (*Dothiorella gregaria* Sacc.)^[1], 可危害多种阔叶树、灌木^[2] 以及雪松 (*Cedrus deodara* (Roxb.) Loud.)^[3], 对杨属不同派的近 100 多个种、杂交种和无性系均有一定程度的致病性^[4]。在国内, 与该病菌的组织病理学有关的研究主要集中在病菌的侵入方式上。在阳传和^[5] 接种实验中, 用菌丝在刺伤和烫伤的树皮上接种可发病, 而在皮孔处刺伤、无伤表皮处接种均未成功; 钟兆康^[6] 用菌丝和孢子悬液在皮孔处接种均可发病; 向玉英^[7] 研究表明, 不仅用菌丝和孢子悬液在皮孔处接种均可发病, 而且用孢子悬液通过无伤表皮接种也可发病, 其接种发病率在室内为 28.6%, 在室外可高达 58.7%, 并认为在自然状态下, 孢子主要通过树皮表面的机械伤口侵入, 也可从皮孔或表皮直接侵入。赵仕光^[8] 通过对 18 个杨树品种的调查表明, 自然界皮孔处形成的病斑率在 70%~100% 之间, 说明皮孔为病菌的主要侵入途径。在国外, 有关 *B. dothidea* 及其 *Botryosphaeria* 属内其它真菌的组织病理学研究报道较多。Brown^[9] 研究了 *B. dothidea* 在苹果 (*Malus pumila* Mill) 枝干上的组织病理过程; Milholland^[10,11] 分别研究了 *B. dothidea* 和 *B. corticis* (Demaree & Wilcox) Arx & Muller 在乌饭树 (*Vaccinium corymbosum* L.) 上的病理过程; Biggs 等^[12] 研究了 *B. dothidea* 和 *B. obtusa* (Schw.) Cooke 在桃树 (*Prunus persica* (L.) Batsch) 上的致病过程。但关于 *D. gregaria* 在杨树溃疡病中的致病过程的研究, 无论在国外还是国内目前尚未见这方面的报道。本论文是在研究了杨树溃疡病菌毒素对杨树树皮愈伤组织超微结构影响的基础上^[13], 进一步研究溃疡病菌在杨树树皮中的病理过程和对寄主细胞超微结构的影响, 以便对杨树溃疡病菌的致病机理有一个较为全面的了解。

* 本文为第一作者博士论文的一部分, 受到 1994 年国家自然科学基金项目“杨树溃疡病生理病理化学研究”和 1997 年西北林学院课题“杨树溃疡病致病机理研究”的资助。

1 材料和方法

1.1 植物材料

本研究采用了3个对溃疡病在田间分别表现为抗病、中等抗病和感病的杨树树种,分别为毛白杨(*Populus tomentosa* Carr.)、陕林4号杨(*P. deltoides* Bartr. cv. 'Lux' × *P. cathayana* Rehd-1062)和北京杨(*P. × beijingensis* Hsu)。

1.2 接种体

本实验中使用的*B. dothidea*菌株分离自北京杨。病菌在PDA培养基上27℃黑暗条件下培养10 d后用于接种。

1.3 接种

采用菌饼接种法。将先年生的杨树扦插苗剪成30 cm长的小段(其直径均在1.5~2.0 cm之间),树皮表面用清水冲洗干净后用石蜡封顶,表面消毒。用打孔器在树皮上打直径为0.3 cm小孔,再用同样大小的菌饼接种在小孔中,保鲜膜包扎后在室温(26℃)水培培养。每种杨树接种12个枝条,每枝条6个接种点,以PDA培养基接种为对照。

1.4 取样和观察

每4天测量并记录一次病斑的扩展范围,同时取样作切片,以苯胺蓝、苏丹Ⅲ和蕃红等分别染色后,在光镜下观察菌丝在树皮中的扩展状态以及树皮结构的组织化学变化;30 d时在距接种孔边缘0.5 cm的病斑处取样,戊二醛中固定,用于电镜切片观察。

1.5 电镜样品制备及观察

将处理样品在 $w = 4\%$ 的戊二醛磷酸缓冲液中室温固定12 h,按常规戊二醛—锇酸双固定,经丙酮系列脱水,环氧树脂(Epon812)进行渗透包埋,超薄切片,醋酸铀和柠檬酸铅染色, JEM-100CX透射电镜观察。

2 结果与分析

2.1 病斑扩展

接种后第4天,即第一次检查病斑扩展情况时就去掉保鲜膜,此时即可看到病斑从接种点向周围有所扩展。但在接种后的20 d时间内,病斑扩展很慢(表1)。在此过程中,枝条上长出了新的小枝。从第24天后,病斑扩展速度加快,在第28天检查时,许多枝条上病斑扩展环绕枝条一周,致使新长出的小枝枯萎死亡,第44天时,一些枝条枯死,有些病斑处产生分生孢子器。

表1 接种后病斑在枝条上的扩展

接种后天数/d	mm					
	北京杨		陕林4号杨		毛白杨	
	接种	对照	接种	对照	接种	对照
4	4.2×6.0	3.5×5.3	3.9×6.2	3.0×4.9	3.5×4.7	3.4×4.0
8	4.2×6.4	3.5×5.5	4.0×6.2	3.5×5.2	4.1×5.9	4.0×5.5
12	4.4×6.8	4.0×5.5	4.0×6.3	3.5×5.5	4.1×6.8	4.0×6.5
16	4.4×6.8	4.0×5.6	4.2×6.5	3.5×6.0	4.3×6.9	4.0×6.5
20	4.4×6.8	4.1×5.6	4.4×6.8	3.5×6.0	4.5×9.2	4.0×6.5
24	7.8×13.4	4.1×5.6	8.2×14.8	3.5×6.0	7.0×15.2	4.1×6.5
28	环斑	4.1×5.6	环斑	3.5×6.0	环斑	4.1×6.5

注:“环斑”指病斑扩展环绕枝条一周。

从表中还可以看出, 3种杨树之间在病斑大小上没有明显的差异。

2.2 病组织切片和染色

对病组织作徒手切片, 经苯胺蓝染色并脱色后, 感病的树皮组织即被染成深蓝色或蓝黑色, 健康组织无色或淡天蓝色(图版 1-1)。从切片中可见, 杨树树皮组织有着丰富的胞间隙, 病菌菌丝在最初的侵染过程中(4~8 d)总是通过胞间隙来扩展的(图版 1-2)。凡菌丝所到之处, 寄主细胞及相邻的4~6层细胞均受到影响, 细胞内原生质凝结成一整块集结于细胞中央(紧邻周皮层下的薄壁细胞), 或形成大小不等的胶质粒状体沉积于细胞壁的周围(紧邻木质纤维束的薄壁细胞)或散布于细胞之中(图版 1-2)。次生韧皮部受侵染后, 其纺锤状原始细胞间形成胶质状物质, 被苯胺蓝染成蓝黑色(图版 1-3)。在接种20~24 d后, 细胞壁发生膨胀、松散及部分解体等现象, 胞间隙中菌丝数量增加。32 d时, 未形成环斑的枝条上的病斑基本停止扩展。48 d时, 在毛白杨病斑与健康组织交界处形成了6~8层细胞组成的木栓层, 该层被苏丹染成黄色, 同时, 在与病组织相邻的木栓层外层有2~3层细胞, 其细胞中充满着或正在被充满着一种被苯胺蓝染成蓝黑色的物质(图版 1-4)。与之相邻的病组织细胞壁被蕃红染成红色。72 d时, 几乎所有的木栓层细胞都为被苯胺蓝染成蓝黑色的物质所填充, 形成了一个由12~20层具有这种填充物的木栓细胞组成的蓝黑色隔离带, 将病组织和健康组织完全隔离开(图版 1-5)。

对照接种点在32 d时即在坏死组织与健康组织之间形成了木栓层, 但3种杨树之间有所不同。其中毛白杨具有2~3层细胞的木栓形成层, 3~4层木栓层细胞, 细胞较小, 结构紧凑而相对整齐; 北京杨具有一层木栓形成层, 5~8层木栓层细胞, 细胞大而相对松散; 陕林4号杨木栓形成层结构不明显, 具有1~2层木栓层细胞, 松散而不整齐。3种杨树对照组织的木栓层细胞中均未见到被苯胺蓝染成蓝黑色的胞内填充物质。

2.3 病组织超微结构

病菌的菌丝体在胞间隙中存在最多, 其次在胞间层和松散的细胞壁中(图版 2-1, 3, 5, 6), 在细胞壁和细胞质之间较少(图版 2-2, 4), 但很少观察到菌丝体在细胞腔中存在, 即使有, 菌丝体也被一层高电子密度物质所包围。当菌丝体在胞间隙或胞间层或细胞壁中穿行时因胞壁的挤压而变形(图版 2-1), 在菌丝体的表面也会有电子密度大的颗粒状沉积物(图版 2-6)。菌丝体在胞间层和细胞壁中的穿行可以依赖菌丝生长的机械力(或者酶)的作用, 使得胞间层溶解或破裂, 细胞壁松散或消解(图版 2-1, 3, 5, 6)。

寄主细胞在接种后其主要表现在以下几个方面的变化: (1) 细胞质凝结成电子密度高的块状物质, 沉积于细胞质膜周围或集结于细胞腔中央, 或分布于细胞的两端及胞间连丝处(图版 3-1, 2, 3), 沉积物中包括线粒体、微晶体、淀粉粒(图版 2-2)和叶绿体(图版 3-2), 但叶绿体仍然可见基本结构, 淀粉粒仍有完整的轮廓。总之, 受侵染细胞内包括细胞质膜在内的所有细胞器都变成了高电子密度物质, 或者在其表面沉积了一层高电子密度物质。(2) 细胞壁变得膨胀、松散, 成为如散发状的胞壁纤维束丝(图版 2-4, 5, 6; 图版 3-1), 或者被局部分解成短发状纤维浆流入胞间隙(图版 3-6)。由于菌丝生长的机械力使得胞间层分离、破裂(图版 2-1, 3), 细胞壁也可因为生长着的菌丝的挤压而变形(图版 2-3)。(3) 在细胞腔中有纤羽状或者发状高电子密度晶体形成, 这些晶体主要沉积于胶质团状的细胞质上或别的细胞器上, 或者沉积于细胞腔周围的细胞壁附近及胞间连丝处(图版 3-3)。

就 3 个树种来说,其变化不尽相同:(1) 菌丝体的数量以陕林 4 号杨中最多,北京杨中较少,而在毛白杨中病菌菌丝体极少,很难见到。这种情形与在徒手切片中观察到的相一致。(2) 受病菌侵染后,北京杨细胞壁变得膨胀、松散,结构被破坏,成为如散长发状的胞壁纤维束丝后再被消解,陕林 4 号杨也是如此;但毛白杨的细胞壁在变得膨胀后并不形成如散长发状的胞壁纤维束丝(图版 2-4, 5; 图版 3-1, 4, 5),有时被病菌分泌的酶直接分解成如短发状的纤维丝(图版 3-6)。(3) 北京杨和陕林 4 号杨在病菌侵染后,细胞质多形成大的胶质团块状,而毛白杨细胞中的细胞器,如叶绿体和内质网等,则是散布于细胞腔中的。(4) 在毛白杨细胞腔中有纤羽状或者发状高电子密度结晶体形成,但在北京杨和陕林 4 号杨中未见到这种结晶状物质。

3 讨 论

(1) *B. dothidea* 被描述为一种伤口和非伤口寄生菌,通过在大量寄主上接种证明其致病性^[14]。Witcher^[15] 研究认为,只有在伤口处接种,才能在乌饭树上产生溃疡和坏死斑,但 Milholland^[10, 11] 后来证明非伤口接种也能成功。Brown^[9] 指出,在苹果枝干上非伤口接种只有 12% 的形成溃疡斑。对 *B. dothidea* 在杨树上的接种方法研究也较多^[5-7],目前一般采用牙签法,但该方法接种后发病率较低。本实验中采用菌饼法接种可以保证接种的发病率,有利于进行病菌在不同寄主上扩展速度测定的实验。

(2) 有关植物病理组织结构化学,富山宏平^[16]和铃木直治^[17]等均有过论述,主要讨论了感病组织的木栓化和木质素化过程的试剂鉴定问题。但并未对苯胺蓝在病组织鉴定中的作用作过讨论。Milholland^[11] 在研究 *B. dothidea* 对乌饭树的侵染过程时发现,当病菌沿主茎发展时,填充体形成并导致木质部导管完全或部分堵塞。除填充体外,一种性质未明的被固绿染成黑色的突出物也在木质化茎的木质部导管中出现。由于健康植株中未见这种结构,故认为突出物的形成是由于病菌的侵染刺激寄主组织所引起的。苯胺蓝在植物病理学的实验中主要用于真菌菌丝体和孢子的染色^[18],本实验中用其对病组织染色,不但可以将病组织与健康组织完全区分开,而且可以鉴定出病健组织交界处所形成的木栓层细胞中的一种蓝黑色填充物的存在,这种填充物在受伤组织与健康组织交界处形成的木栓层细胞中并不存在,由此推测这种填充物可能是由于病菌刺激所产生的一种抗病性物质。本研究中黑色填充物是在新形成的木栓层细胞腔中形成的,而 Milholland 所提出的突出物是在木质部导管中形成,所以两者的性质可能是完全不同的。由于在以往有关组织病理解剖的文献中还未见到过关于这种填充物的报道,因此对其产生的机制及化学结构还需进一步研究。

(3) 无论是从病组织的徒手切片还是超薄切片中,均可见菌丝体存在于胞间隙、胞间层及细胞壁之中,但在细胞质中并未见到菌丝体的存在。通过对产生子实体的老病斑解剖可见,在黑色胶质化的细胞质团粒之间充满着菌丝,但此时已看不到细胞壁的存在。因此可以说明,溃疡病菌对杨树的寄生性主要体现在其对树皮细胞壁物质分解和利用上,而对细胞质物质不能利用。在徒手切片结果中提到的细胞质胶质化和超薄切片中提到的团块状高电子密度物质,可能是当细胞受侵害后,氧化物酶活性增高,将细胞质中的某些物质氧化成的酚类物质。从叶绿体所具有的清晰的结构和淀粉粒具有的明显的轮廓可以说明,这种氧化作用可能是迅速完成的,其机理则可能是由抗病性讯号分子的传递而使得远离侵染点的细胞也产生防卫反应^[19]。细胞质被氧化成酚类物质后不但不能被病菌吸收利用,而且对病菌菌丝体有毒害作用。因此,

从病组织结构解剖上可进一步证明, 氧化酶活性增高是抗病性反应的一种表现^[20, 21]。

(4) 田间抗病性与室内抗病性测定结果不一定一致。寄主体内菌丝体数量的多少也可作为抗病性的一个标志。Tessier^[22]的研究表明, *Fusarium oxysporum* Schlecht f. sp. *pisi* 在侵染了不同抗性的豌豆(*Pisum sativum* L.) 后, 感病品种导管中菌丝密集, 而抗病品种中则菌丝稀疏。在本实验中, 陕林4号杨病组织中菌丝体最丰富, 北京杨较少, 而毛白杨最少, 从这一指标来说, 陕林4号杨最感病, 北京杨却相对较抗病。这与田间抗病性调查结果不相符^[8]。对陕林4号杨来说, 树皮结构在抗病性中可能发挥着主要作用, 使得病菌不容易侵入。

在这3种杨树中, 毛白杨为抗病树种, 其表现在不仅病组织中菌丝体的数量极少, 而且其细胞壁受侵染后的变化与感病的北京杨和中抗的陕林4号杨均不同, 说明其细胞壁的结构与后两者不同, 这也可能是毛白杨具有较高抗病性的原因之一。关于毛白杨细胞壁的结构, 很有必要通过病理学、结构化学及电子显微镜等方法作更深入的研究。

参 考 文 献

- 1 向玉英, 花晓梅. 杨树水泡性溃疡病的病原鉴定. 微生物学报, 1979, 19(1): 57~63.
- 2 Smith C O. Inoculations showing the wide hostrange of *Botryosph aercaribis*. Jour. Agric. Res., 1934, 49: 467~476.
- 3 王玉峰, 张君达, 陈志宽. 河南发现雪松枯枝病. 森林病虫通讯, 1994(4): 38.
- 4 杨俊秀, 李武汉, 符毓秦. 抗溃疡病杨树种类的调查研究. 西北林学院学报, 1990, 5(4): 1~10
- 5 阳传和. 杨树溃疡病接种方法比较. 北京林学院学报, 1985, 7(2): 76~81.
- 6 钟兆康, 高雅. 杨树水泡型溃疡病菌的致病性研究. 植物病理学报, 1981, 12(1): 45~48.
- 7 向玉英, 花晓梅, 赵经周. 杨树溃疡病的发生及病原菌的生物学特性的研究. 植物病理学报, 1981, 11(4): 27~33.
- 8 赵仕光, 景耀. 杨树对溃疡病的抗性研究 () 树龄及形态结构与抗病性. 西北林学院学报, 1997, 12(3): 35~40.
- 9 Brown E A, Hendrix F F. Pathogenicity and histopathology of *Botryosp haeria dothidea* on apple stems. Phytopathology, 1981, 71(4): 375~379.
- 10 Milholland R D. Histopathology and pathogenicity of *Botryosp haeria dothidea* on bluebeny stem. Phytopathology, 1972, 62(6): 654~660.
- 11 Millholland R D. Histology of *Botryosp haeria canker* of susceptible and resistant highbush bluebenies. Phytopathology, 1970, 60(7): 70~74.
- 12 Biggs A R, Britton K O. Presymptom histopathology of peach trees inoculated with *Botryosp haeria obtusa* and *B. dothidea*. Phytopathology, 1988, 78(8): 1109~1118.
- 13 赵仕光, 朱玮, 岳红艳. 杨树溃疡病菌对杨树树皮愈伤组织超微结构的影响. 林业科学研究, 1998, 11(3): 257~264.
- 14 Smith C O. Inoculations showing the wide host range of *Botryosp haeria ribes*. Jour. Agric. Res., 1934, 49: 467~476.
- 15 Witcher W, Clayton C N. Blueberry stem blight caused by *Botryosp haeria dothidea*. Phytopathology, 1963, 53: 705~712.
- 16 富山宏平. 植物感染生理. 尹福祥译. 北京: 农业出版社, 1986.
- 17 铃木直治等. 近代植物病理化学. 张际中等译. 上海: 上海科学技术出版社, 1985.
- 18 方中达. 植病研究方法. 北京: 农业出版社, 1979.
- 19 林中平. 植物病害和损伤的讯号传递及相关基因的表达. 植物学通报, 1995, 12(2): 9~14.
- 20 赵仕光, 景耀, 杨俊秀. 用愈伤组织测定杨树对溃疡病的抗性. 森林病虫通讯, 1993(4): 1~4.
- 21 赵仕光, 景耀, 杨俊秀. 杨树树皮内过氧化物酶和多酚氧化酶活性与抗溃疡病的关系. 西北林学院学报, 1993, 8(3): 11~17.
- 22 Tessier J, Mueller W C, Morgham A T. Histopathology and ultrastructure of vascular responses in peas resistant or susceptible to *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi*. Phytopathology, 1990, 80(8): 756~767.

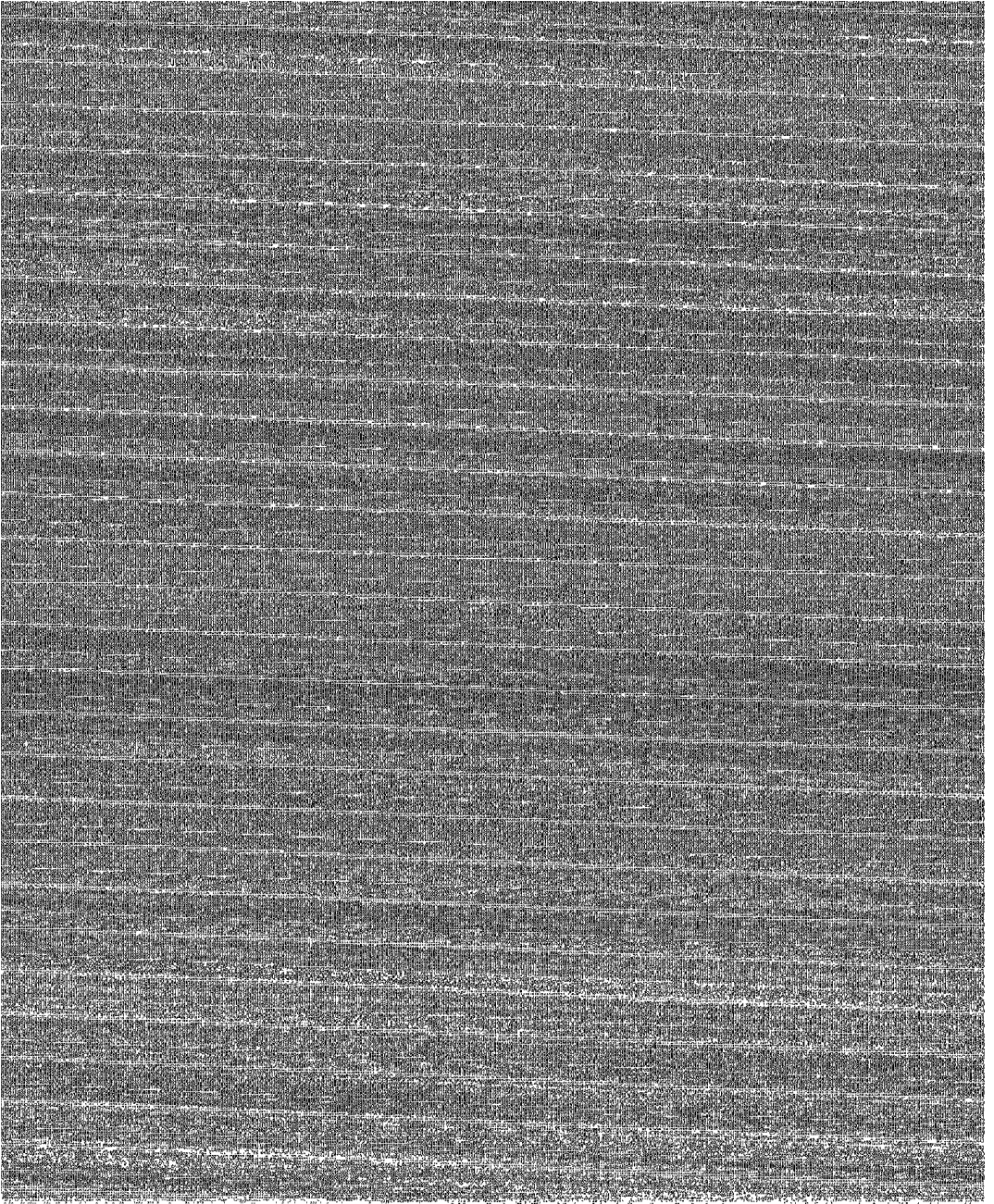
Histopathology and Ultrastructure of Periderm Parenchyma Cells on Poplar Stem in Response to the Infection of *Botryosphaeria dothidea*

Zhao Shiguang Zhu Wei Yue Hongyan

(North-western Forestry College, 712100, Yangling, Shanxi, China)

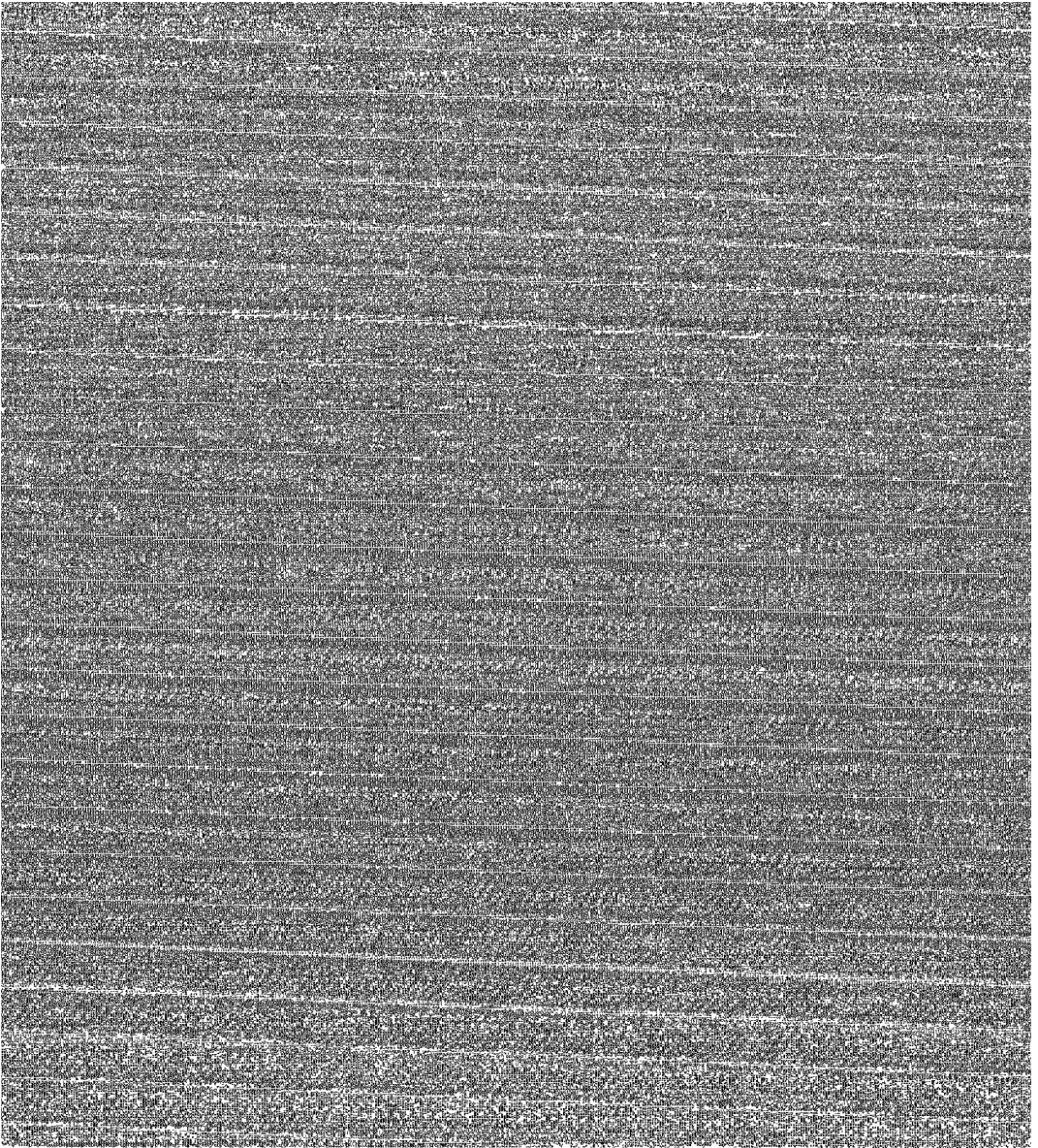
Abstract The infection process of *Botryosphaeria dothidea* in the bark of poplar and the response of poplar bark to the infection were studied. By the use of phenoamonia blue, the infected and response cells can be stained blue and thus differed from the normal cells. As the fungus progressed in the periderma, they were always intercelluse of mycothirum cells, cells 4 ~ 6 layers around can be affected and cytoplasm condensed into protrusions. After 40 days, phenoderma formed between the necotic tissues and normal cells, and the resistant poplar have a thicker new periderm than that of the susceptible one. Above all, the resistant poplar can form a boundary of stin-dark tyloses in the new periderm cells which may take the role as to restructured the hyphae from continued expansion. There is no such a boundary in the wounded but uninoculated controls. Ultrastructure study by electron micrographs showed that mycelium were abounded in the susceptible cultivars and always exist between cells or in the swollen and thickened or dissolved cell walls. In the cells of resistant poplars, a kind of electron dense, hair-like, crystal deposit were formed.

Key words *Botryosphaeria dothidea*; poplar; histopathology; ultrastructure



图版 1 菌丝在树皮组织中的扩展和组织反应(原图缩至 6.5 折)

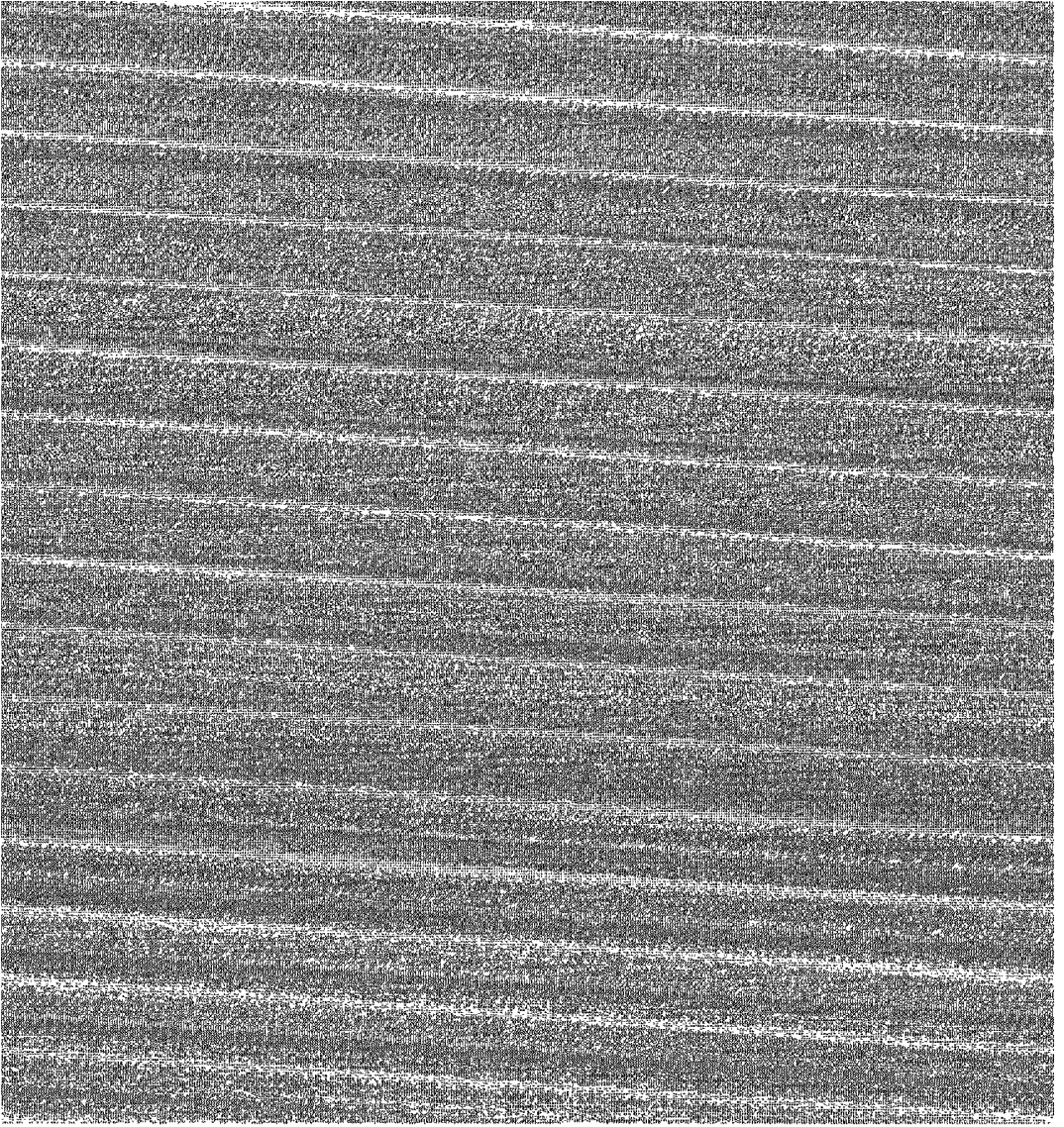
1. 胞间隙中的菌丝及相邻细胞的反应; 2. 胞间隙中的菌丝及相邻细胞中细胞质凝结成的胶质粒状物; 3. 纺锤状原始细胞对侵染的反应; 4. 病斑边缘的健康组织、木栓层、黑色填充层和病组织层; 5. 病健组织交界处形成的木栓层和黑色填充层。



图版 菌丝在树皮组织中的存在状态(原图缩至 8.5 折)

1. 陕林 4 号杨(10 000 \times 在胞间层中的菌丝体); 2. 陕林 4 号杨(19 000 \times 在被分解了的细胞壁和细胞质间生长的菌丝); 3. 陕林 4 号杨(14 000 \times 菌丝生长使胞间层破裂, 胞壁被分解和变形); 4. 陕林 4 号杨(3 600 \times 被分解了的细胞壁和在细胞壁中生长的菌丝); 5. 陕林 4 号杨(19 000 \times 在疏松的细胞壁中间的菌丝); 6. 陕林 4 号杨(14 000 \times 菌丝表面的沉积物)。

图中所标字母: CW (cell wall): 细胞壁; M (mitochondrion): 线粒体; ST (starch grain): 淀粉粒; PM (plasmic membrane): 细胞质膜; ER (endoplasmic reticulum): 内质网; ML (middle lamella): 中胶层; PL (plasmodesm): 胞间连丝; H (hypha): 菌丝; C (crystallite): 晶体; CH (chloroplast): 叶绿体。



图版 菌丝侵染对树皮组织的破坏作用(原图缩至 8.5 折)

1. 北京杨(7 200× 分解的细胞壁和胶质团状高电子密度沉积物); 2. 毛白杨(19 000× 沉积于胞间连丝处的细胞质和叶绿体); 3. 毛白杨(19 000× 羽状结晶体沉积物); 4. 北京杨(10 000× 被分解了的细胞壁); 5. 毛白杨(58 000× 被分解了的细胞壁); 6. 毛白杨(14 000× 细胞壁被分解成短发状纤维流入胞间隙)。

图中所标字母注释见图版。