

类菌原体的侵入对泡桐组织和细胞的影响*

宋晓斌 郑文锋 张学武 马松涛

摘要 通过类菌原体 MLO 侵入泡桐筛管,引起寄主细胞变化的观察和对细胞差别透性的分析、病健组织结构的观察,研究了 MLO 侵入泡桐后对寄主组织和细胞的影响。结果表明:MLO 的侵入使筛管细胞产生胼胝质,胼胝质的聚集堵塞了筛板孔和由胞间连丝连接筛管与相邻细胞的通道,使得皮部细胞的差别透性增大,木质部的差别透性减小,形成层相对厚度变薄。

关键词 泡桐 类菌原体 细胞差别透性

许多植物病理工作者对泡桐丛枝病 MLO 做了大量的研究,并在病原、病害的发生规律及防治技术方面取得了一定的进展。但对 MLO 侵入泡桐后寄主组织细胞等方面的变化研究不多,为了揭示这种变化,作者在这方面进行了研究,现将取得的结果总结报道如下。

1 材料与方法

1.1 植株与病原材料

试验材料均为陕西省林科所栽植的豫杂 1 号(*Paulownia tomentosa* (Thunb.) × *P. fortunei* (Seem.) Hemsl.)。MLO 侵入寄主后的细胞反应观察材料采自该株当年生病枝。不同部位细胞差别透性变化的分析都取自该株的当年生枝条,取材部位为从顶芽起 10 cm 的一段。组织结构观察材料取自该株当年生枝条。为了确保生长期的一致,在距顶芽 5 cm 处取材。对照为与之相邻的一棵豫杂 1 号,取材部位相同。

1.2 电子显微镜检查

1987 年 5 月采回观察材料并用自来水冲洗干净,剥下皮部后切成 1 mm³ 的小块,分别在 40% 的戊二醛磷酸缓冲液中固定 4 h,而后换洗三次,置于 1% 的锇酸中固定 3 h,经过系列浓度丙酮脱水后包埋,而后作超薄切片,经电子染色后置于日本产 JEM100-CX- 电子显微镜下观察。用健康材料做相同的处理与观察,以此作为对照。

1.3 不同部位细胞差别透性的研究

把采回的材料用自来水冲洗干净后,再用去离子水冲洗三次,晾干表面。取病、健枝皮部和木质部,剪成 0.3 cm 长的小段。皮部、木质部各分为病、健两组,为了保持试材基础状况一致,每组做甲、乙两种处理,每种重复三次,每份 1 g,把材料置入已编号的小烧杯中及时加入 20 mL 去离子水。甲组处理放入真空干燥器内,减压至 0.05 mPa 时增至常压,如此重复三次,最后一次减压至 0.05 mPa 时,保持 30 min,而后增至常压。乙组材料置于 100 的水浴锅中保

1996-10-24 收稿。

宋晓斌助理研究员,郑文锋,张学武,马松涛(陕西省林业科学研究所 陕西杨陵 712100)。

* 本研究为 1986~1996 年陕西省林业攻关课题“泡桐抗丛枝病综合防治技术研究”、“泡桐抗丛枝病品系选育及病原研究”中的部分内容。

持 15 min, 取出后在常压下静置 2 h, 每组材料在处理前后各测一次电导率。电导率用 DOS-A 电导率仪测定。用 Varian 型原子吸收光谱仪测定测 K^+ 浓度。为了消除因组织和细胞损伤而渗出的电解质和 K^+ 对分析结果的影响, 对谭常等^[1]的计算公式作了修改。以电解质外渗率与 K^+ 外渗率来反映细胞的差别透性。

谭常等的计算公式:

$$\text{电解质外渗率}(\%) = \frac{\text{甲组外渗液的电解质的电导率}}{\text{乙组外渗液的电解质的电导率}} \times 100 \quad (1)$$

$$K^+ \text{ 外渗率}(\%) = \frac{\text{甲组外渗液的 } K^+ \text{ 浓度}(\mu\text{g/g})}{\text{乙组外渗液的 } K^+ \text{ 浓度}(\mu\text{g/g})} \times 100 \quad (2)$$

修改后的计算公式:

$$\text{电解质外渗率}(\%) = \frac{\text{甲组处理后电导率} - \text{甲组处理前电导率}(\mu\Omega/\text{cm})}{\text{乙组处理后电导率} - \text{乙组处理前电导率}(\mu\Omega/\text{cm})} \times 100 \quad (3)$$

$$K^+ \text{ 外渗率}(\%) = \frac{\text{甲组处理 } K^+ \text{ 浓度} - \text{丙组(对照)} K^+ \text{ 浓度}(\mu\text{g/g})}{\text{乙组处理 } K^+ \text{ 浓度} - \text{丙组(对照)} K^+ \text{ 浓度}(\mu\text{g/g})} \times 100 \quad (4)$$

1.4 对泡桐枝条组织结构的影响

观察 MLO 侵入枝条后枝条组织结构的变化在宋晓斌等^[2]方法的基础上, 在距顶芽 5 cm 处取样。试样经石腊包埋后切片, 切片用迪纳氏液染色 5 min, 水洗, 再用 70% 的高锰酸钾染色 3 min 后水洗。所作切片置于日产 OLYMPUS BH-2 型显微镜下观察测量, 并进行记录。

2 结果与分析

2.1 MLO 的侵入对泡桐筛管的影响

从图 1 中可以清楚地看出, “MLO”侵入泡桐枝条韧皮部后, 筛管细胞中有胼胝质(C)产生, 这些胼胝质在筛板孔周围聚积, 并堵塞了筛板孔, 阻断了筛管细胞与相邻筛管细胞的联系, 这一点和 PVX 病毒侵入千日红(*Gomphrena globosa* L.) 组织细胞时, 寄主细胞的变化以及 TMV 病毒侵入三叶草(*Trifolium pratense* T.) 时, 细胞的变化情况相似^[3]。从图 2 看出, 由于 MLO 的侵入, 有些细胞的胞间连丝一端也有葡聚糖产生, 呈絮状分布, 堵死了该细胞与相邻细胞的联系。说明了 MLO 的侵入确实影响了筛管内物质的交换和运送, 这一点和作者多次对泡桐病韧皮部的观察结果是相同的^[4], 在对照观察中没有见到 MLO 及相应的现象。以前对泡桐的病筛管的电子显微镜观察多局限在对类菌原体的观察^[5], 有人^[3]对 PVX 侵入千日红的叶子后寄主细胞的变化作过电子显微镜观察, 在细胞壁与质膜间有胼胝质在其中积累, 这一点与本文的观察结果相似。

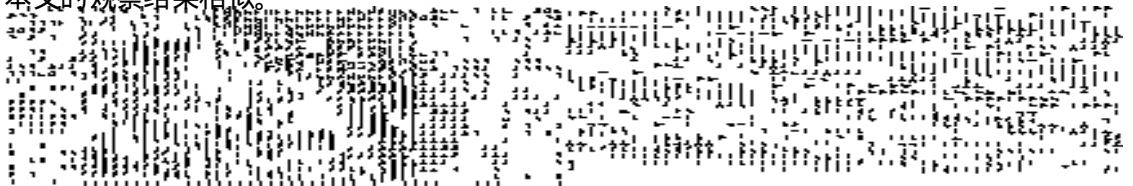


图 1 “MLO”引起胼胝质堵塞筛板孔(×1 500)
C: 胼胝质; M: “MLO”; H: 筛板孔

图 2 “MLO”引起胼胝质堵塞胞间连丝通道(×1 500)
M: “MLO”; C: 胼胝质

2.2 对不同部位细胞差别透性的影响

2.2.1 病、健枝条不同部位电解质外渗率 从表 1 的测定结果可以看出,乙组健木质部和皮层的电导率在处理之前分别为 28.33 $\mu\Omega/\text{cm}$ 和 27.00 $\mu\Omega/\text{cm}$, 近乎相等。在组织细胞完全被破坏后(即乙组处理),在电解质完全外渗的情况下,健皮层的电导率为 71.33 $\mu\Omega/\text{cm}$,木质部的电导率为 44.67 $\mu\Omega/\text{cm}$,前者高出后者 59.68%,差异性分析后表明这两者之间差异显著。说明正常健康的木质部的电解质含量少,皮层的电解质含量高。病枝木质部和皮层的电导率与之相比下,处理前分别为 36 $\mu\Omega/\text{cm}$ 和 25 $\mu\Omega/\text{cm}$,木质部高出皮层 44%,处理之后分别为 58.67 $\mu\Omega/\text{cm}$ 和 61.67 $\mu\Omega/\text{cm}$,差异性分析表明两者之间无显著性差异。说明在电解质完全外渗的情况下,木质部和皮层的电解质含量相近。这是因为健康皮层中,筛管细胞没有受到类菌原体的侵害,组织细胞的功能没有被破坏,能够保持该部位与木质部之间各自的渗压,而在病皮层中,筛管细胞由于受到类菌原体的侵害,细胞中产生了大量的胍胍质,使皮层细胞维持正常

表 1 病、健枝条不同部位细胞电解质外渗率(差别透性)

部 位	甲组平均电导率($\mu\Omega/\text{cm}$)		乙组平均电导率($\mu\Omega/\text{cm}$)		电解质外渗率(%)
	处理后	处理前	处理后	处理前	
健皮层	28.00	27.00	71.33	27.00	2.26
健木质部	38.00	28.33	44.67	28.33	59.17
病皮层	33.00	25.00	61.67	25.00	21.81
病木质部	38.00	36.00	58.67	36.00	8.82

渗压的功能遭到破坏,从而使木质部和皮层的电解质含量趋同。从电解质外渗率的计算结果看,病皮层为 21.81%,健枝皮层为 2.25%,前者明显高于后者。枝条木质部细胞电解质外渗率为 8.82%,健木质部为 59.17%,前者明显低于后者。统计分析结果表明,病、健皮层及木质部的电解质外渗率之间存在着明显的差异。这是由于在排除因创伤造成的电解质外渗的影响后,健皮层增加的电导率值大,而甲组增加的电导率值小,病皮层增加的电导率值小,而甲组病皮层增加的电导率值大造成的,反映了健皮层的电解质外渗少,病皮层电解质外渗多。这是因为类菌原体对皮层细胞的侵害,致使细胞产生胍胍质,胍胍质具有调节筛管成分的渗透梯度和水度的作用^[5],说明由于类菌原体对枝条的侵入,破坏了枝条的木质部和皮层细胞之间原来应有的细胞差别透性,使皮部细胞差别透性增大,使木质部细胞差别透性减小。这一结论与公式(1)计算结果所得结论一致,但测定结果更为明显。

表 2 病、健枝条不同部位细胞 K^+ 外渗率

部 位	K^+ 平均外渗浓度($\mu\text{g}/\text{g}$)			外渗率(%)
	甲组处理	乙组处理	丙组(对照)	
健皮层	1 100.00	1 793.30	1 020.00	10.34
健木质部	1 673.30	2 013.30	1 293.30	52.77
病皮层	1 440.00	2 760.00	1 126.70	19.18
病木质部	1 633.30	3 573.30	1 360.00	12.30

2.2.2 病、健不同部位 K^+ 外渗率 从原子光谱吸收测定结果(见表 2)可以看出,在乙组组织细胞被破坏后,在 K^+ 完全外渗的情况下,健康枝条皮层细胞 K^+ 外渗浓度为 1 793.3 $\mu\text{g}/\text{g}$,木质部的 2 013.3 $\mu\text{g}/\text{g}$,除去因创伤渗出的 K^+ 浓度后,净渗出 K^+ 浓度分别为 773.3 $\mu\text{g}/\text{g}$ 和

720.3 $\mu\text{g/g}$, 差异性检验表明, 这两者之间无显著性差异。在甲组处理的健枝皮层组织细胞的 K^+ 浓度为 1 100 $\mu\text{g/g}$, 木质部的为 1 673.3 $\mu\text{g/g}$, 除去因创伤渗出的 K^+ 浓度后, 净渗出的 K^+ 浓度分别为 80 $\mu\text{g/g}$ 和 379.7 $\mu\text{g/g}$, 差异性检验表明, 这两者之间差异性显著, 说明在同一条件下, 皮层细胞渗出的 K^+ 少, 木质部渗出的 K^+ 多。这是因为木质部是运输矿物质包括 K^+ 在内的组织部位, 除含量高外, 导管的通透性比较好。在乙组组织细胞被破坏后, 在 K^+ 完全外渗的情况下, 病枝条皮层细胞 K^+ 外渗浓度为 1 126.7 $\mu\text{g/g}$, 木质部的为 1 360.00 $\mu\text{g/g}$, 除去因创伤渗出的 K^+ 浓度后, 净渗出 K^+ 浓度分别为 1 633.3 $\mu\text{g/g}$ 和 2 213.3 $\mu\text{g/g}$, 这一结果经差异性分析表明, 两者差异显著。说明病枝皮层细胞 K^+ 浓度低, 木质部 K^+ 的含量高。这是因为类菌原体的侵害使筛管细胞内产生了大量的胼胝质, 从而使蔗糖在皮层细胞中的运输和积累减缓^[6], 在筛管细胞中, 蔗糖与 K^+ 之间有一种平衡关系, 蔗糖的运输和积累减缓, 必然使病皮层组织细胞内 K^+ 的浓度降低, 加之木质部是运输矿物质包括 K^+ 在内的组织部位, 本来就含大量的 K^+ 。在甲组处理的病枝皮层组织细胞的 K^+ 浓度为 1 440.00 $\mu\text{g/g}$, 木质部的为 1 633.3 $\mu\text{g/g}$, 除去因创伤渗出的 K^+ 浓度后, 净渗出的 K^+ 浓度分别为 313.3 $\mu\text{g/g}$ 和 273.0 $\mu\text{g/g}$, 差异性检验表明, 两者之间差异不显著, 这是因为病枝条木质部的导管较细^[2], 输送矿物质包括 K^+ 的能力差, 相应的外渗性能也差。从计算的 K^+ 外渗率来看, 健皮层为 10.34%, 病皮层为 19.18%, 增加了 8.84%。病木质部细胞 K^+ 外渗率为 12.30%, 健木质部为 52.77%, 降低了 40.47%。经过差异检验分析, 健皮层、病皮层、健木质部、病木质部的 K^+ 外渗率之间差异显著。其原因也是病皮层组织细胞中有大量的胼胝质产生, 引起蔗糖在细胞内的运输和积累减缓, K^+ 浓度上升, 打破枝条应有的 K^+ 与蔗糖之间的平衡, 而使 K^+ 更易外渗。表明了由于 MLO 在枝体内的存在, 使枝条应有的差别透性发生了改变, 使皮部的差别透性增大, 木质部的差别透性降低。这一结论与公式(2)计算结果所下结论一致。

2.3 对泡桐枝条组织结构的影响

对病、健枝条的组织结构观察, 有病的韧皮部被染为蓝色, 形成层被染成深褐色, 镜检测量结果见表 3。经过平均数的差异性检验分析, 病、健形成层的相对厚度(占总厚度的百分比)之间存在着显著的差异, 而病、健木质部的相对厚度之间无显著性差异, 说明 MLO 对枝条的侵害使枝条的组织结构发生了变化, 使形成层的组织厚度相对变薄, 韧皮部的相对厚度增加, 次

表 3 健、病枝条横切组织厚度

结构部位	病 枝		健 枝	
	平均厚度(um)	形成层占观察部位比例(%)	平均厚度(um)	形成层占观察部位比例(%)
形 成 层	28.33	6.71	52.63	10.28
次生木质部	264.30	62.66	318.89	62.31
韧 皮 部	129.20	30.63	140.53	27.46
观 察 部 位	421.83		512.05	

生木质部的相对厚度保持不变。这是因为病枝在 MLO 的侵害下, 其正常的生长受到影响, 使整个粗度变小, 因而引起各部位的厚度变薄。胼胝质在筛管细胞中的产生和积累, 使蔗糖等同化物的运输受到影响, 韧皮部对于运输到的同化物优先利用, 因而生长受到的影响小, 其厚度必然相对变厚。形成层距筛管有一定的距离, 在同化物运输不畅的条件下, 不能优先利用同化物, 因而生长受到的影响较大, 其厚度也就相对变薄。次生木质部的相对厚度保持不变, 可能是

因为观察的部位还没有达到产生差异的时期, 随着树体的进一步生长, 这种差异就会表现出来。形成层是生命活动最活跃的部位, 其厚度的薄化势必会对皮层和木质部的进一步正常分化产生影响, 继而影响枝条的正常生长。

3 小结与讨论

在 MLO 侵入泡桐韧皮部筛管, 继而对其细胞产生影响, 使泡桐筛管细胞产生大量的胼胝质(葡聚糖), 并堵塞筛板孔和胞间连丝通道。对于寄主细胞来说, 这是一种保护反应, 也与泡桐的抗性有一定的关系^[7], 但极有可能影响泡桐筛管细胞对物质的交换和运输, 这种影响在无花果叶瓜(*Cucurbita ficifolia* Ser.) 的筛管中是存在的^[9]。细胞运输通道的堵塞很可能会影响到细胞的渗透压的变化, 细胞差别透性的测定结果证明了这一点。皮层部位(包括韧皮部)差别透性的增大, 说明细胞 K^+ 容易外渗, 从而使蔗糖出现反渗。 K^+ 和蔗糖浓度的变化会影响其它部位细胞渗透压的变化, 可能会涉及到形成层。结构观察的结果说明了形成层发生了明显的变化, 间接地证明了这种推测。除此之外, 本文还有几个问题说明如下:

(1) 在多种不利情况下, 许多植物都有胼胝质在细胞中产生和积累的现象^[6], 作者的多次对比观察结果说明, 在泡桐筛管细胞中发生的变化是由 MLO 侵入所致。因为在健康的对照材料观察中没有发现 MLO 及细胞内的相应变化。

(2) 电解质外渗率和 K^+ 浓度不仅能反映细胞的差别透性, 也反映了植物抗寒性和其它抗性^[1, 8], 本文的测定结果既说明了 MLO 侵入泡桐后细胞的差别透性的变化, 而且也说明 MLO 的侵入导致了泡桐抗逆性降低。这完全与病枝条或罹病幼树提前死亡的事实相吻合。

参 考 文 献

- 1 上海植物生理学会. 植物生理学实验手册. 上海: 上海科学技术出版社, 1985. 67 ~ 70.
- 2 宋晓斌, 张学武, 郑文锋. 罹丛枝病泡桐组织结构的解剖观察. 陕西林业科技, 1993, (3): 38 ~ 40.
- 3 [日] 铃木直治等(张际中, 齐显章, 许泳峰, 等译). 植物近代病理化学. 上海: 上海出版社, 1985. 23 ~ 32.
- 4 宋晓斌, 郑文锋, 任锁堂, 等. 罹丛枝病泡桐 MLO 的观察. 陕西农业科学, 1994, (6): 29, 封三.
- 5 郑文锋, 宋晓斌, 任锁堂, 等. 泡桐丛枝病病原及传播途径的研究. 陕西林业科技, 1990, (1): 23 ~ 25.
- 6 [苏] A. 库尔萨诺夫(韩锦锋, 王瑞新, 贾志旺译). 植物体内同化物的运输. 北京: 科学出版社, 1986. 210 ~ 252.
- 7 田国忠, 张锡津, 熊耀国. 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(4): 352 ~ 355.
- 8 毛远, 周永学, 于梦杰, 等. 两种新选泡桐无性系抗寒性的测定. 西北林学院学报, 1994, (2): 50 ~ 54.
- 9 Eschrich W. Beziehungen zwischendem Auftreten von callose und der Feinstruktur desprimären Phloems bei *Cucurbita ficifolia*. planta, 1963, 59: 243 ~ 261.

Influence of Infection by *Mycoplasma like Organism*(MLO) on *Paulownia* Tissues and Cells

Song Xiaobin Zheng Wenfeng Zhang Xuewu Ma Songtao

Abstract This paper deals with affection to tissues and cells of *Paulownia* which is infected by MLO. By means of electron microscopy, it is found that a large amount of callose accumulate in the infected cells and fill in sieve mesh and path between cells. By means of atomic absorption spectrometry, the rate of electrolytic out-seeping was measured, the result shows that the rate of electrolytic out-seeping in the healthy xylem is 59.17%, but in the infected xylem is 8.82%, the rate of electrolytic out-seeping in the healthy cortex is 2.26%, but in the infected cortex is 21.81%. By means of microscopy, the tissues structure of branches was measured, the result shows that the cambium relativity thickness in the healthy branch is 10.28 μm , but in the infected branch is 6.71 μm , cortex and xylem relativity thickness are unchanged basically.

Key words *Paulownia* MLO differential permeability of cell

Song Xiaobin, Assistant Professor, Zheng Wenfeng, Zhang Xuewu, Ma Songtao (The Forestry Research Institute of Shanxi Province Yangling, Shanxi 712100).