

# 杨树溃疡病菌毒素对杨树树皮愈伤组织 超微结构的影响\*

赵仕光 朱 玮 岳红艳

**摘要** 用 2 种浓度的杨树溃疡病菌毒素处理具有不同抗性的杨树愈伤组织, 引起了显著的超微结构变化。其变化包括: 细胞壁变形消解, 中胶层分解; 质壁分离, 质膜破裂, 线粒体局部破裂、分解成颗粒甚至空胞化; 细胞核在处理的后期核膜破裂, 核仁亦部分分解。损害发生得最早、最严重的是细胞膜。杨树未处理的愈伤组织具有健康组织细胞所具有的完整结构。经过毒素处理, 抗病品种比感病品种膜系列受害轻, 对细胞损伤高浓度毒素处理比低浓度的要大。

**关键词** 杨树溃疡病菌 毒素 愈伤组织 超微结构

杨树溃疡病(*Dothiorella gregaria* Sacc.) 为杨树(*Populus* spp.) 的主要干部病害, 目前已扩展至我国的大部分杨树栽培区, 可危害 200 多个杨树种、杂交种和无性系<sup>[1]</sup>, 同时还可寄生在核桃(*Juglans regia* L.)、雪松[*Cedrus deodara* (Roxb.) G. Don] 等树种上<sup>[2,3]</sup>。对该病的研究较多, 有关的论文、著作和教材共达百余篇, 其范围涉及病原学、病理学、流行病学和防治学等方面, 其中也包括通过用愈伤组织来测定杨树抗病性和病原菌致病性方面的研究<sup>[4-6]</sup>。关于毒素在树木病害致病机理中的作用, 国内外均有较多的研究报道<sup>[7-13]</sup>, 而通过毒素处理杨树愈伤组织来探究病害致病机理的研究在国内仍无报道。毒素是病原菌的非酶类产物或病原菌与寄主相互作用的产物, 其对寄主的酶、核酸代谢, 蛋白质合成等有抑制作用, 可引起膜透性增加, 使茎的液体流动降低, 干扰蒸腾作用并使叶片萎蔫<sup>[7]</sup>。本研究是用溃疡病菌的毒素粗提物处理不同抗性杨树的树皮愈伤组织, 观察毒素对寄主细胞超微结构的影响, 研究毒素对寄主细胞的作用方式, 从而搞清楚毒素在杨树溃疡病致病机理中的作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 愈伤组织培养

本研究采用了对溃疡病分别表现为抗病、中等抗病和感病的毛白杨(*Populus tomentosa* Carr.)、陕林 4 号杨(*P. deltoides* Bartr. cl. 'Lux' × *P. cathayana* Rehd. —1062) 和北京杨(*P. × beijingensis* Hsu) 为供试树种。分别取 3 种杨树的先年生枝条, 剪成 10 cm 长的段, 表面消毒, 在小段的表皮上削去一块 4 mm × 6 mm 大小的树皮, 然后将小段置于三角瓶中, 在 27 黑暗条件下培养, 大约 10 d 后, 从削去树皮的地方长出愈伤组织即可用于毒素处理。

### 1.2 病原菌培养

溃疡病菌分离自北京杨。病菌在 PDA 培养基上培养 4 d 后, 从所培养的菌落周缘取直径

1998—01—12 收稿。

赵仕光讲师, 朱玮, 岳红艳(西北林学院 陕西杨陵 712100)。

\* 本文为第一作者博士论文的一部分, 得到 1993 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 年西北林学院自上课题“杨树溃疡病致病机理研究”的资助。

为 4 mm 的菌饼,接入装有改良的 Fries 液体培养液(蔗糖 20 g,酒石酸铵 5 g,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  1 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5 g,  $\text{NaCl}$  0.1 g,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.13 g, 酵母浸膏 1 g, 蒸馏水 1 000 mL)的 250 mL 的三角瓶中,每瓶 20 块,置摇床于 25 ℃、黑暗条件下培养 30 d。

### 1.3 毒素粗提物的提取

将上述培养的溃疡病菌的滤液 1 000 mL 在 38 ~ 40 ℃ 下用旋转薄膜蒸发仪浓缩至 100 mL,在浓缩液中加入 4 倍体积的丙酮(400 mL),在 4 ℃ 下冷藏 24 h,过滤,用 80% 丙酮(冷藏)洗 3 次,风干,加水定容至 1 000 mL。

### 1.4 愈伤组织的处理

将愈伤组织分别置于用毒素原液(高浓度)和 4 倍稀释液(低浓度)浸泡处理的滤纸上,在 3、6、12、24 h 后分别在愈伤组织面取样,另以无菌水处理愈伤组织块作为对照。

### 1.5 电镜样品制备及观察

将所取样品在 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(Epon 812)进行渗透包埋,超薄切片,醋酸铀和柠檬酸铅染色, JEM-100 CX 透射电镜观察。

## 2 结果与分析

### 2.1 对照的愈伤组织

在对照组织中,细胞中具有完整且丰富的细胞器。细胞膜完整,具有大量的液泡、线粒体和粗面内质网,胞内淀粉粒亦较多;细胞核核膜和核仁结构完整;高尔基体在细胞中常可见到,复合高尔基体则较少;细胞壁和中胶层正常(图 1-1 ~ 4)。

### 2.2 毒素处理的愈伤组织

毒素处理后,各树种愈伤组织细胞结构均受到不同程度的影响和破坏。具体体现在:

2.2.1 毒素可使细胞膜破裂分解 其对质膜的最初作用(3 h 和 6 h)是使细胞质膜破裂,形成小的片断(图版 -1)。随着处理时间的延长(12 h 和 24 h),质膜分解,沉积于细胞壁附近(图版 -2, 3)。质膜被破坏后的另一个后果是胞间连丝结构解体,并最终从细胞壁外挤出(图版 -4)。

2.2.2 细胞器的破坏与分解 在所有的细胞器中,最先受到影响的是内质网和线粒体。毒素可使内质网膨大、分离或分解(图版 -5 ~ 7),线粒体膨胀、膜分解且缺乏内部结构(图版 -5, 8)。

高尔基体在毒素处理的早期受影响较小,即使在內质网、线粒体和质膜受到严重破坏的情况下,其仍然可保持较为完整的结构;但在处理较长时间后(12 h),其开始膨胀(图版 -1),在 24 h 后,高尔基体很难观察到。复合高尔基体在毒素处理的中期也膨胀成囊状且裂解(图版 -2)。

淀粉粒在毒素处理的初期较为丰富,但在毒素处理 6 h 后则很难见到。

细胞核结构受影响的时间相对较晚。中抗树种陕林 4 号杨,在高浓度处理 3 h 后,细胞质膜已破裂,但核膜仍然保持正常(图版 -3);随着时间的延长,核膜破裂,核内物质外泄,核仁开始分解并消散(图版 -4, 5)。



图 1 对照愈伤组织

(图 1 和图版 1、2 原图全部缩至 8 折)

1. 北京杨 12 h 对照 (7 200 ×, 丰富的线粒体和液泡); 2. 陕林 4 号杨 3 h 对照 (7 200 ×, 完整的膜系统); 3. 北京杨 6 h 对照 (10 000 ×, 淀粉粒); 4. 陕林 4 号杨 12 h 对照 (29 000 ×, 完整的核膜)。

图中所标字母: CW (cell wall) 示细胞壁; M (mitochondrion) 示线粒体; ST (starch grain) 示淀粉粒; V (vacuole) 示液泡; N (nucleus) 示细胞核; n (nucleolus) 示核仁; NM (nuclear membrane) 示核膜; PM (plasmic membrane) 示质膜; ER (endoplasmic reticulum) 示内质网; ML (middle lamella) 示中胶层; PL (plasmodesmata) 示胞间连丝。

不论感病树种还是抗病树种, 在被毒素处理的后期 (24 h), 其细胞内细胞器结构均被分解和破坏并与颗粒化的细胞质一并沉积于细胞壁附近 (图版 6, 7)。

2. 2.3 细胞壁的分解和破坏 处理初期, 细胞壁未受到大的影响, 但在处理 6 h 后, 细胞壁开始受到侵蚀, 中胶层被分解, 细胞壁颗粒化程度增加并被不同程度地分解 (图版 2, 7, 8)。

就整体来说, 高浓度毒素处理比低浓度的对细胞作用的时间进程快, 对细胞结构破坏的强度亦大。抗病树种和感病树种以及高浓度与低浓度处理之间的不同是: 在同样处理时间下, 感病树种与抗病树种相比, 其愈伤组织细胞结构的破坏更为严重; 高浓度比低浓度处理对愈伤组织细胞结构的破坏更为严重 (图版 5, 6)。例如, 感病的北京杨的愈伤组织在低浓度处理 12 h 后其细胞结构基本解体 (图版 2), 而抗病的毛白杨和中抗的陕林 4 号杨愈伤组织中仍然可见某些完整的细胞器 (图版 4, 7)。

### 3 结论和讨论

杨树未处理的愈伤组织具有健康组织细胞所具有的完整结构。用两种浓度的杨树溃疡病菌毒素处理杨树愈伤组织, 引起了显著的超微结构变化, 包括细胞壁变形, 中间层分解; 质膜内陷, 质壁分离, 线粒体局部破裂, 颗粒化甚至空胞化; 细胞核在处理的后期核膜破裂, 核仁亦部

分分解。损害发生得最早最严重的是细胞膜,抗病品种比感病品种膜系列受害轻,但在近细胞壁处没有观察到电子密集物沉积。感病的表现出线粒体和细胞质破坏,可能是细胞膜被损的结果。

朱玮等<sup>[8,9]</sup>分别测定了溃疡病菌代谢产物及毒素粗提物对杨树的影响,结果是两者均可使寄主叶子出现黑斑和萎蔫,使组织细胞膜透性增大,脯氨酸含量增加,而且感病品种北京杨所受的影响大于抗病品种毛白杨。但笔者在用毒素处理杨树一年生幼枝时,却出现了中抗的陕林4号杨比感病的北京杨叶子受损更为严重的现象。究其原因可能是这两种杨树存在着不同的抗病机理。Ouellette<sup>[11]</sup>指出,由榆树枯萎病菌[*Ceratocystis ulmi* (Buism.) Moreau]侵染的榆树木质部组织中细胞壁强烈分解和破坏,中胶层和次生壁亦经常分解和破坏。降解的细胞质保留着许多液泡区并包含着许多质体和线粒体的残余物,同时,在抗性榆树中出现并沉积了电子密度大的似酚类沉积物。本研究中虽然有许多质体和线粒体的残余物沉积于细胞壁附近,但未见有电子密度大的似酚类沉积物,这可能是由于愈伤组织在毒素中处理时间相对较短,形成似酚类沉积物的过程未能体现出来的原因。Paolao<sup>[12]</sup>研究了榆树枯萎病菌对榆树愈伤组织结构的影响,认为毒素主要作用位点在线粒体以及膜系统上,在结构上体现为在感病品种线粒体膨胀且缺乏内部结构,细胞膜受破坏。本研究中所用的不同抗性的树种是根据田间抗病性调查结果选择出来的<sup>[6]</sup>,其未处理的愈伤组织超微结构在不同抗性树种之间也无特殊不同,只是在毒素处理后,抗病树种比感病树种愈伤组织细胞结构受影响的程度小,在时间进程上稍晚。因此,在结构与抗性的关系未完全搞清楚之前,有必要进一步进行超微结构变化的研究,特别是树皮组织病理过程和超微结构的研究。有关这方面的研究笔者将另作报道。

## 参 考 文 献

- 1 赵仕光. 杨树溃疡病菌研究现状. 西北林学院学报, 1992, 7(4): 122 ~ 128.
- 2 景耀, 刘香慧. 杨树和核桃溃疡病菌交叉接种试验. 森林病虫通讯, 1987, (2): 4 ~ 9.
- 3 王玉峰, 张君达. 河南发现雪松枝枯病. 森林病虫通讯, 1994, (4): 38.
- 4 张立钦. 杨树组织培养愈伤组织对水泡型溃疡病的抗性. 南京林业大学学报, 1989, 13(4): 9 ~ 15.
- 5 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): 1 ~ 4.
- 6 赵仕光, 景耀. 杨树对溃疡病的抗性研究. 西北林学院学报, 1997, 12(3): 35 ~ 40.
- 7 海蒂弗斯 R. 植物病理生理学. 北京: 农业出版社, 1991.
- 8 朱玮, 胡景江, 马希汉, 等. 杨树与溃疡病相互作用的生理病理化学研究( ) 溃疡病菌代谢产物对寄主的影响. 西北林学院学报, 1997, 12(3): 1 ~ 6.
- 9 朱玮, 胡景江, 马希汉, 等. 杨树与溃疡病相互作用的生理病理化学研究( ) 溃疡病菌毒粗提物对寄主的影响. 西北林学院学报, 1997, 12(3): 7 ~ 13.
- 10 高必达, 无畏, 程挥. 麦根腐长孺孢对感病小麦品种叶组织超微结构的影响. 植物病理学报, 1993, 23(2): 107 ~ 113.
- 11 Ouelettes G B. Ultrastructural observation on pit membrane alternations and associated effects in elm xylem tissues infected by *Ceratocystis ulmi*. Can. J. Bot., 1978, 56: 2567 ~ 2588.
- 12 Paula M, Pijut R, Daniel Lineberger, et al. Ultrastructure of cells of *Ulmus americana* cultured in vitro and exposed to the culture filtrate of *Ceratocystis ulmi*. Phytopathology, 1990, 80(9): 764 ~ 767.
- 13 Pinon J, Manion P D. *Hypoxylon mammatum* and its toxins—recent advances in understanding their relationships with canker disease of poplar. Eur. J. For. Path., 1991, 21: 202 ~ 209.

## Ultrastructure of Calli Cells of Poplar Exposed to Toxin Produced by *Dothiorella gregaria*

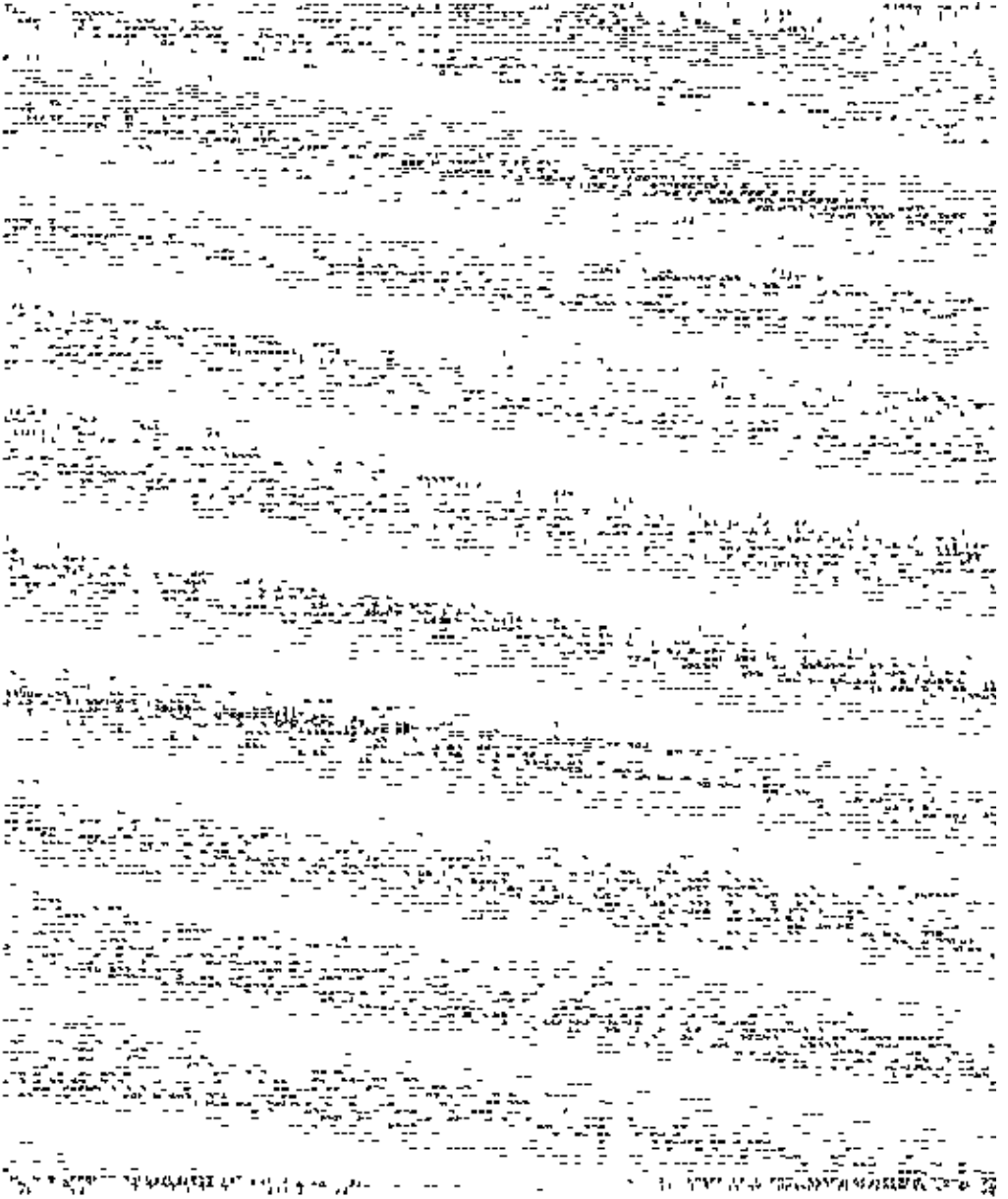
Zhao Shiguang Zhu Wei Yue Hongyan

**Abstract** Calli of poplar susceptible and resistant to poplar blister canker disease were exposed to the toxin produced by a pathogenic isolate of *Dothiorella gregaria* at two concentrations. All the cells exposed to toxin showed a series of sub-cellular ultra-structural changes such as distorted and collapsed cell walls and plasmolysis; ruptured plasma membranes; disrupted outer-membranes of mitochondria, some of them even broke down and became granular or hollowed; membrane of nucleolus dilated and part of it decomposed. Cells from the susceptible poplar displayed mitochondria and cytoplasmic disruption. Plasma membranes appear to be the first organs to be attacked seriously. Cells from the untreated tissue exhibited typical internal composition associated with healthy, actively growing cells. The differences between the susceptible and resistant poplar, which were exposed to high level and low level of toxin concentration are that: at the same time after exposed to toxin, the ultrastructure of susceptible poplar were more serious disturbed than that of the resistant one, and the same influences showed in the high level of toxin concentration.

**Key words** *Dothiorella gregaria* toxin calli ultrastructure

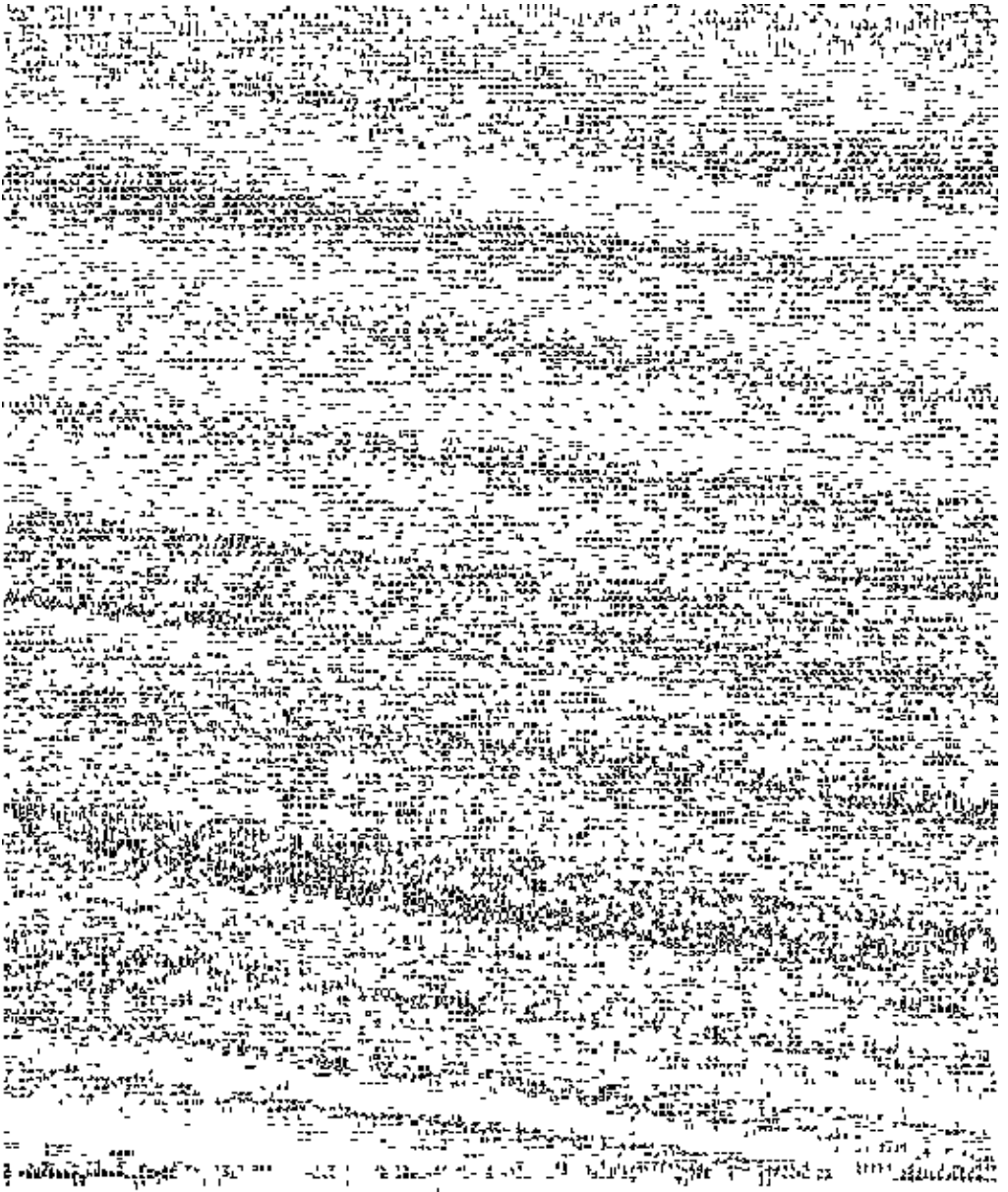
---

Zhao Shiguang, Lecture, Zhu Wei, Yue Hongyan (Northwestern Forestry College Yangling, Shanxi 712100).



图版 毒素处理愈伤组织

1. 毛白杨, 高浓度毒素处理 6 h (19 000 ×, 细胞质膜破裂并卷曲);
  2. 北京杨, 低浓度毒素处理 12 h (58 000 ×, 细胞质膜断裂分解并沉积于细胞壁附近, 细胞壁亦受到侵蚀);
  3. 毛白杨, 低浓度毒素处理 24 h (36 000 ×, 细胞质分解并与破裂的质膜一并沉积于细胞壁附近);
  4. 毛白杨, 低浓度毒素处理 12 h (48 000 ×, 胞间连丝从破裂的质膜处被挤出);
  5. 北京杨, 高浓度处理 6 h (36 000 ×, 溶解的细胞膜、细胞壁和膨胀并部分分解的内质网);
  6. 毛白杨, 高浓度处理 6 h (29 000 ×, 部分破裂的细胞膜和膨胀的内质网, 但液泡仍然丰富);
  7. 陕林 4 号杨, 高浓度处理 12 h (14 000 ×, 内质网膨胀, 细胞器较多且结构仍可见);
  8. 毛白杨, 高浓度处理 24 h (29 000 ×, 分解的线粒体残体和细胞质一并沉积于细胞壁附近)。
- 图版 、 中中英文字母所示内容同图 1。



图版 毒素处理愈伤组织

1. 北京杨, 低浓度处理 12 h (100 000 ×, 膨胀的高尔基体沉积于细胞壁附近);
2. 北京杨, 低浓度处理 12 h (14 000 ×, 膨胀且分离的复合高尔基体);
3. 陕林 4 号杨, 高浓度处理 3 h (14 000 ×, 细胞膜破裂, 但细胞核结构仍然完整);
4. 北京杨, 高浓度处理 6 h (14 000 ×, 核膜破裂, 核内物质向外扩散);
5. 陕林 4 号杨, 高浓度处理 24 h (10 000 ×, 细胞核破裂, 核仁分解);
6. 毛白杨, 低浓度处理 24 h (36 000 ×, 细胞核破裂, 核仁分解);
7. 毛白杨, 高浓度处理 24 h (36 000 ×, 细胞核破裂, 核仁分解);
8. 北京杨, 高浓度处理 24 h (29 000 ×, 细胞核破裂, 核仁分解)。