

# 尖角突脐孢菌侵染过程及稗草反应超微结构观察\*

陈 勇<sup>1,2</sup> 倪汉文<sup>1\*\*</sup> 李晓晶<sup>1</sup> 张宏军<sup>1</sup>

(中国农业大学农学与生物技术学院农药和植物检疫系 北京 100094)<sup>1</sup>

(华南农业大学农学院 广州 510642)<sup>2</sup>

**摘要:** 为了解尖角突脐孢菌侵染稗草植株的致病机理,应用电镜观察了该菌侵染稗草植株过程和寄主细胞的超显微结构变化。结果表明:尖角突脐孢菌分生孢子于接种 8h 后从突脐孢的基部开始萌发菌丝,接种 13h 后菌丝直接穿透稗草叶表面细胞连接处或经气孔侵入,接种后 24~26h 完成侵染过程。被侵染的寄主,膜结构发生变形,同时细胞线粒体的嵴变形膨大,叶绿体内的淀粉粒消失,寄主细胞内有大量酚物质出现。

**关键词:** 稗草, 尖角突脐孢菌, 超显微结构

中图分类号: Q939. 9 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654 (2004) 03-0088-04

## Observation of Infection Process of *Exserohilum monoceras* and Alteration of Cellular Ultrastructure in Barnyardgrass

CHEN Yong<sup>1,2</sup> NI Han-Wen<sup>1</sup> LI Xiao-Jing<sup>1</sup> ZHANG Hong-Jun<sup>1</sup>

(Department of Pesticides and Plant Quarantine, College of Agronomy and biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100094)<sup>1</sup>

(College of Agronomy, South China Agricultural University, Guangzhou 510642)<sup>2</sup>

**Abstract:** The infection process of *Exserohilum monoceras* and alteration of cellular ultrastructure in infected barnyardgrass were observed by using scanning electron microscope and transmission electron microscope. The observation showed that the hypha began to form from the basal point of the conidia 8 hours after inoculation (HAI) and then penetrated barnyardgrass leaves through stomata 13 HAI. The infection process finished from 24 to 26 HAI. After infected, cell membranes of the host were dramatically changed; starch particles disappeared in chloroplasts and lots of phenolic compounds occurred in the infected cells.

**Key words:** *Exserohilum monoceras*, Infected barnyardgrass, Ultrastructure

水稻是我国的主要粮食作物,稗草是稻田的主要恶性杂草,目前稗草的防治措施主要采用化学防除方法。利用生物除草剂防治稗草是一个有效的新途径。据文献报道<sup>[1,2]</sup>和研究发现<sup>[3,4]</sup>,从稗草植株上分离到的尖角突脐孢菌,具有作为防治稗草的潜力。稗草被尖角突脐孢菌侵染后,细胞的超显微结构发生病理变化,对这种变化的观察有助于我们加深对该菌侵染机制的认识。本文对电镜切片的观察结果作初步报道。

## 1 材料与方法

从 PDA 平板培养基上分别取 1 cm × 1 cm 菌落块 (菌株 X27),接种于 PDB 液体培养基中,在 28℃, 180 r/min 摇床振荡培养 3 d。后接种于大米上进行固体培养两周,后用

\* 农业部“九五”高新技术与基础研究重点资助项目 (No.02-03-03)。

\*\* 联系人 Tel: 010-62891302 E-mail: hanwenni@cau.edu.cn

收稿日期: 2003-04-16 修回日期: 2003-06-15

200目筛子收集, 稀释成浓度为  $1 \times 10^6$  孢子/mL 悬浮液, 并加入 5‰ 的吐温 20。接种 2 叶 1 心至 3 叶 1 心期稗草植株 (喷雾施用量为 160 mL/m<sup>2</sup>), 置于恒温恒湿箱保湿 48 h, 然后转移到温室中生长。

接种后 2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、48 h 分别取样, 供扫描电镜样品制备。接种后 8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、48、72、120 h 分别取样, 供透射电镜样品制备。

扫描电镜制样<sup>[5,6]</sup>: 取上述接种不同时间的叶片, 去叶尖和叶基, 取叶片中部, 大小为 0.5 cm<sup>2</sup>, 用 2.5% 的戊二醛和 1% 的锇酸固定, 逐级乙醇脱水, 醋酸酯置换, 液体 CO<sub>2</sub> 临界点干燥, 离子溅射喷金, 日本夏普 S-450 扫描电镜观察, 并照相记录。

透射电镜制样<sup>[6,7]</sup>: 取上述接种不同时间的叶片, 用 2.5% 的戊二醛和 1% 的锇酸固定, 逐级乙醇脱水, 丙酮置换, 环氧树脂 618 浸透、包埋, NOVA 型超薄切片, 醋酸铀、柠檬酸铅双染色, 日本日立 H-500 电镜观察, 并照相记录。

## 2 结果与分析

### 2.1 尖角突脐孢菌对稗草叶片的侵染

在温室条件 28℃ 下, 病菌在稗草上的潜育期为 5d 左右。整个侵染过程可分为 3 个阶段: 初期, 在接种后约 8 h, 先从尖角突脐孢的基部开始萌发 (图 1a, b), 出现萌管, 13 h 后, 分生孢子的顶部也开始萌发菌丝 (图 1c); 35 h 后, 部分分生孢子由于萌发菌丝养分耗尽, 开始出现解体现象 (图 1d)。菌丝萌发后在寄主叶表面纵横扩展, 随机分枝, 逐步形成网状分布。部分菌丝开始生多根侧枝, 密集的侧枝相互聚集成团, 形成侵染垫 (图 1e)。侵染垫基部生出单根或多根菌丝。随后, 接种 13 h 后, 菌丝通过气孔或直接 (图 1c) 入侵寄主。这一阶段 1~2 d。菌丝侵入寄主细胞后, 迅速在受侵细胞内呈网状扩展, 并直接穿透毗邻细胞壁, 向其它细胞内扩展, 这一阶段 1~2 d。接种 48 h 后, 可发现叶片内菌丝从叶表面伤口伸出 (图 1f), 或从叶气孔伸出 (图 1g), 或直接穿透表皮伸出 (图 1h)。稗草接种后约 5 d 发病。

### 2.2 寄主细胞被尖角突脐孢侵染后的组织及化学变化

寄主细胞被侵染后, 细胞内的膜结构发生较大变化。接种 13h 后, 细胞出现质壁分离现象 (图 2a)。20h 后, 寄主细胞质壁分离现象加重 (图 2b)。26h 后, 被侵染的细胞叶绿体片层结构变松散, 部分叶绿体轮廓变得不清晰, 叶绿体膜破裂, 并出现崩解现象, 淀粉粒消失, 而且产生大量的酚类物质 (图 2c, d)。35 h 后, 有些寄主细胞已坏死。48h 后, 大部分细胞器消失, 残存少量叶绿体变形, 呈菊花或漩涡状 (图 2 e)。72h 时, 观察到寄主细胞的细胞核核膜溶解, 核内染色体凝聚 (图 2f)。120h 后, 稗草开始发病。

## 3 讨论

尖角突脐孢菌不仅能从稗草叶片的气孔或伤口侵入, 而且能直接穿透叶片表皮细胞侵入叶肉细胞, 并在叶肉组织内生长, 侵染后的稗草植株生长发育异常, 而导致病害。上述各特征均表明了该菌是稗草的强致病菌。具有作为真菌除草剂防除稗草的潜力。

膜对于维持生长、发育、运动和信号传导所需的离子和代谢物质来说, 是必不可

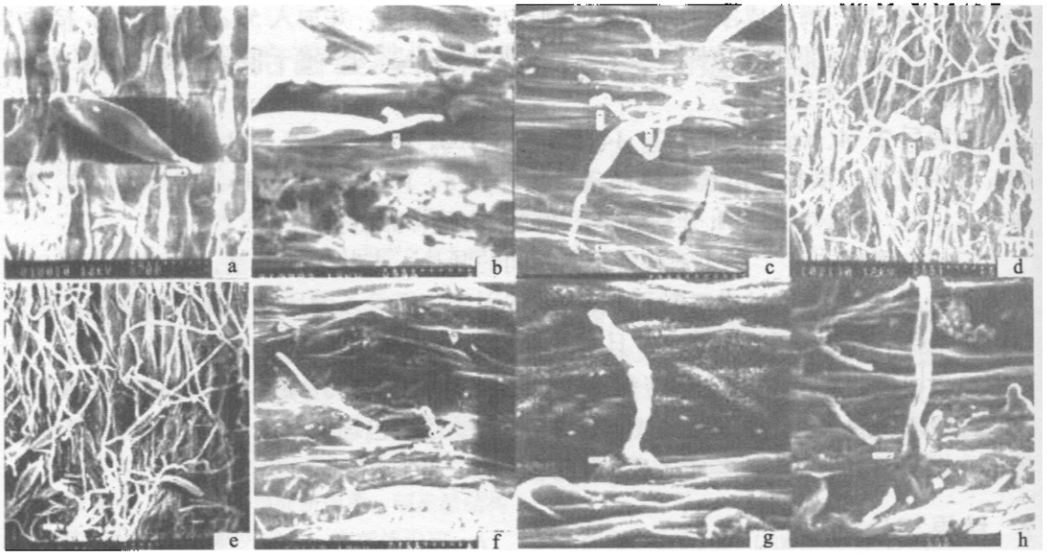


图 1 尖角突脐孢菌感染稗草叶片的扫描电镜观测结果

a 接种 8 h 后菌丝从分生孢子基萌发 ( $\times 700$ ), b 接种 10 h 后分生孢子在稗草叶表面的萌发状况 ( $\times 700$ ), c 接种 13 h 后菌丝通过气孔或叶表面胞间入侵寄主细胞 ( $\times 400$ ), d 接种 35 h 后部分分生孢子分解 ( $\times 221$ ), e 稗草叶表皮上形成的侵染垫 ( $\times 222$ ), f 接种 48 h 后寄主致病细胞内菌丝从稗草叶表面伤口伸出 ( $\times 600$ ), g 寄主致病细胞内菌丝从稗草叶表面气孔伸出 ( $\times 117$ ), h 寄主致病细胞内菌丝直接从稗草叶表皮细胞伸出 ( $\times 990$ )

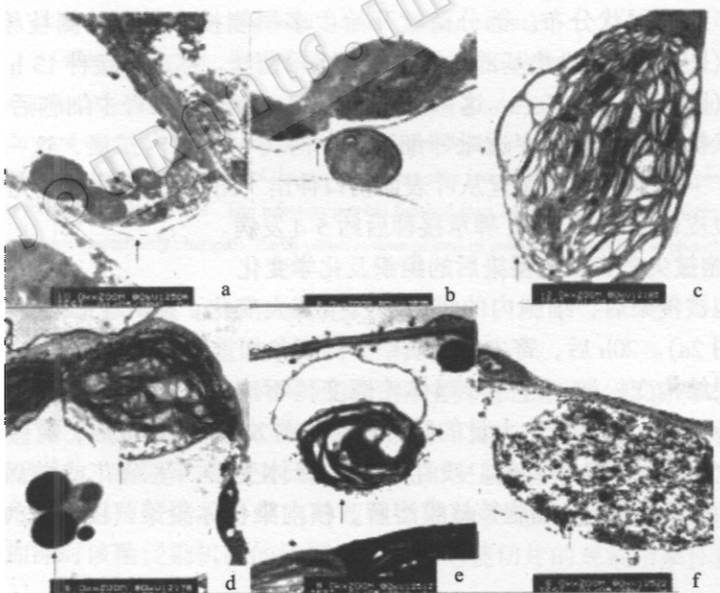


图 2 尖角突脐孢菌感染稗草叶片的透射电镜观测结果

a 接种 13 h 后稗草叶表皮细胞出现质壁分离 ( $\times 10,000$ ), b 接种 20 h 后入侵菌丝引起寄主细胞出现质壁分离 ( $\times 8,000$ ), c 接种 26 h 后叶绿体内膜及片层结构的变化 ( $\times 12,000$ ); d 叶绿体膜破裂 ( $\times 6,000$ ); e 接种 48 h 后菊花状叶绿体 ( $\times 8,000$ ); f 接种 72 h 后寄主细胞核膜破裂及染色体凝聚 ( $\times 6,000$ )

少的。膜结构的微小变化,都会引起细胞生长的紊乱<sup>[8]</sup>。膜结构的变化有可能是病原菌分泌的植物毒素的作用<sup>[9]</sup>。叶绿体内淀粉粒的消失可能有两个原因:由于病原真菌的产孢;由于寄主植物光合作用效率的降低<sup>[10]</sup>。侵染后寄主细胞出现大量的酚物质,可能是寄主细胞产生保护反应的表现。

本文首次报道了稗草致病菌尖角突脐孢菌侵染过程和寄主的组织病理变化,为进一步研究该病菌侵染及致病机理提供了第一手资料。

**致谢:**该稗草致病菌的鉴定和命名得到了中国科学院微生物所郭英兰老师指导,特此致谢。

### 参考文献

- [1] Zhang W M, Watson A K. *Weed Science*, 1997, **45**: 144 ~ 150.
- [2] Hetherington S D, Tuat N V, Auld B A, *et al.* Proceedings of the 18th Asian-Pacific Weed Science Society Conference. Beijing: Standards Press of China, 2001, 377 ~ 381.
- [3] 陈 勇,倪汉文.植物保护学报,2001, **28**: 75 ~ 78.
- [4] Chen Y, Ni H, Li X J. Proceedings of the 18th Asian-Pacific Weed Science Society Conference. Beijing: Standards Press of China, 2001, 377 ~ 381.
- [5] 冯东昕,朱国仁,李宝栋,等.植物病理学报,2000, **30**: 53 ~ 57.
- [6] 杨 谦, Fox R T V. 植物病理学报,1996, **26**: 325 ~ 329.
- [7] 冯东昕,朱国仁,李宝栋,等.电子显微学报,1999, **18**: 235 ~ 236.
- [8] Kohmoto K, Itoh Y, Shimomura N, *et al.* *Phytopathology*, 1993, **83**: 495 ~ 502.
- [9] Langsdorf G, Park P, Nishimura S. Annual Phytopathological Society of Japan, 1991, **57**: 32 ~ 40.
- [10] Sziraki I, Mustardy L A, Faludi-Daniel A, *et al.* *Phytopathology*, 1984, **74**: 77 ~ 84.