

灰霉病菌侵染垫侵染油菜叶片的超微结构观察

曹剑波¹ 张静² 张蕾³ 陈千思⁴ 秦利鸿¹ 李国庆²

1. 华中农业大学科学技术发展研究院电镜平台, 武汉 430070;

2. 华中农业大学植物科学技术学院, 武汉 430070;

3. 四川省农业科学院植物保护研究所, 成都 610066;

4. 中国烟草总公司郑州烟草研究院烟草基因研究中心, 郑州 450001

摘要 利用透射电镜和扫描电镜观察灰霉病菌灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*)侵染垫侵入油菜叶片的过程。观察结果发现:灰霉病菌顶端菌丝聚集通过形成侵染垫,侵染垫分泌胶状物质降解表皮细胞的细胞壁,菌丝通过破损的表皮细胞进入叶片并在叶肉细胞间及细胞内生长;侵入的菌丝进一步降解叶肉细胞的细胞壁并在叶肉组织中生长繁殖,造成叶肉细胞的细胞质凝聚、细胞器破裂等细胞坏死症状。研究结果表明:灰霉病菌侵染垫通过降解植物细胞壁侵染植物,并且在植物组织内生长过程中也会降解细胞壁,细胞壁的降解在灰霉病菌侵染和生长过程中起着重要作用。

关键词 灰霉病菌; 菌丝; 侵染垫; 超微结构; 细胞壁降解

中图分类号 Q 248; S 432.4⁺4 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2013)06-0046-05

灰霉病(gray mould disease)是由灰霉病菌灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*)引起的。灰霉病菌属于坏死型(necrotrophic)病原真菌,能侵染 200 多种植物,危害油菜、蔬菜、瓜果等经济作物,造成重大经济损失^[1]。在自然条件下,灰霉病菌主要通过分生孢子进行侵染和传播^[2]。病菌分生孢子识别寄主植物后,在适宜的情况下萌发出芽管,芽管生长通过植物表面气孔或伤口侵入植物,或者由芽管形成类附着胞(appressorium-like)直接侵入寄主植物表皮细胞^[3-4]。被灰霉病菌侵染的植物组织上都能观察到爪状结构的侵染垫(infection cushion)^[5],病菌通过侵染垫结构侵染植物组织,侵染垫在病菌侵染及致病过程中起着重要作用^[4]。分生孢子芽管形成的类附着胞能通过分泌一些细胞壁降解酶类物质(cell wall-degrading enzymes)直接穿透寄主植物表皮,进入寄主植物体内^[6]。但是,关于灰霉病菌侵染垫的侵染过程及其在植物组织中的生长过程现知之甚少。笔者利用透射电镜和扫描电镜观察了灰霉病菌灰葡萄孢侵染垫侵入油菜叶片的过程,旨在探讨灰霉病菌侵染垫的侵染机理,为有效防治灰霉病害提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

灰霉病菌菌株 CanBC-2 分离于油菜叶片^[7],在 20℃下培养,在 4℃冰箱中保存。实验室温室中种植感病品种为中油杂 2 号。取 60 d 苗龄油菜植株中部的幼嫩叶片用于接种试验。

1.2 接种方法

采用离体叶片接种法^[4]接种灰霉病菌。菌株 CanBC-2 生长在马铃薯葡萄糖琼脂固体培养基上,将菌落边缘含有菌丝的琼脂块,分别接种到新采下的油菜叶片中部主脉的两侧,并将接种后的叶片置于保湿环境 20℃下培养。

1.3 电镜材料取样

分别于接种后 12、24、48、72 h 取长有菌丝的叶片并剪成 0.2 cm×0.2 cm 块状,用 2.5%戊二醛固定,抽真空沉底后 4℃冰箱保存待用。

1.4 扫描电镜观察

将固定好的叶片用 0.1 mol/L 磷酸缓冲液清洗 3 次,每次 10 min,然后分别在梯度乙醇(30%、50%、70%、80%、90%、100%、100%)中脱水各

10 min,并在乙醇与乙酸异戊酯 1:1、1:2(体积比)混合液和纯乙酸异戊酯各置换 10 min。HITACHI HCP-2 型 CO₂ 临界点干燥仪干燥后,在 JEOL JFC-1600 型离子溅射仪上喷金 5 min,将样品分别置于 JEOL JEM-6390LV 型扫描电镜下观察并拍照^[8]。

1.5 透射电镜观察

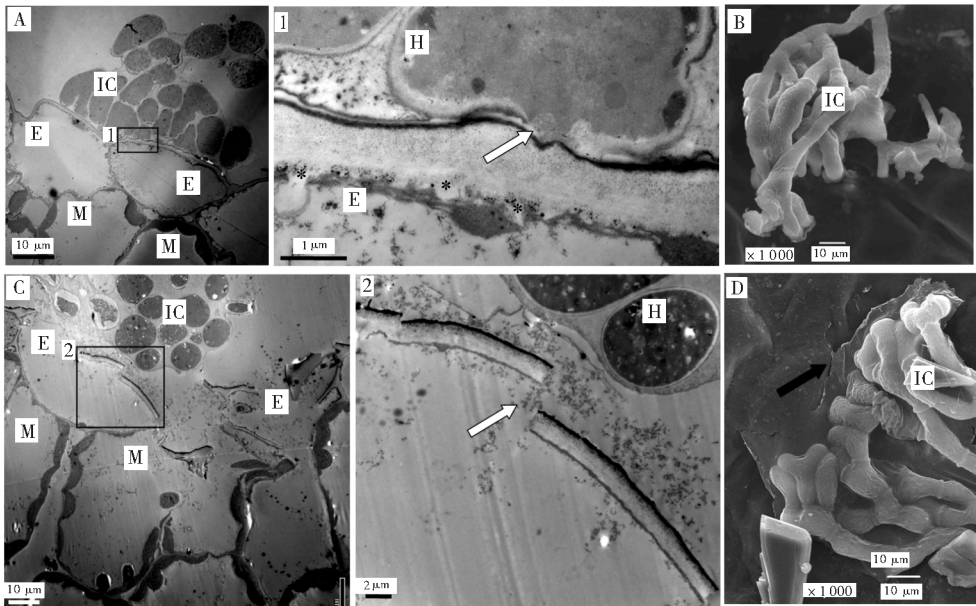
将固定好的叶片用 0.1 mol/L 磷酸缓冲液清洗 3 次,每次 30 min。用 1% 锇酸固定 2 h 后分别在梯度丙酮(30%、50%、70%、80%、90%、100%、100%)中脱水各 30 min,再用 SPI-812 树脂与丙酮混合液渗透、包埋。

包埋块聚合后,用 Leica UC6 超薄切片机进行切片,再分别用醋酸铀-柠檬酸铅染色液各染色 30 min。将切片分别置于 HITACHI H-7650 型透射电镜下观察,采用 Gatan 832 数字成像系统记录并拍照^[9]。

2 结果与分析

2.1 灰霉菌菌侵染垫侵入表皮细胞

观察结果显示:灰霉菌菌接种油菜叶片 12 h 后,侵染垫在叶片表面形成,侵染垫的菌丝呈分支状,细胞较短(图 1-A,B),侵染垫的菌丝间有胶状物质填充(图 1-A/1),侵染垫侵入部位的叶片表面上也有胶状物质附着(图 1-B);侵染垫的菌丝顶端紧贴叶片表皮细胞的细胞壁,菌丝顶端细胞壁破裂形成小孔,叶片表皮细胞的部分细胞膜破裂(图 1-A/1);叶肉细胞完整,叶绿体完整且紧贴细胞壁(图 1-A)。灰霉菌菌接种油菜叶片 24 h 后,在侵染垫侵入部位,叶片表皮细胞的细胞壁常出现断裂(图 1-C,D),靠近表皮的叶肉细胞的细胞壁也出现断裂(图 1-C);断裂的细胞壁表面积累了大量的高电子密度物质,表皮细胞的细胞质及细胞器等内容物消失(图 1-C/2)。



A. 侵染垫的菌丝聚集在表皮细胞表面,表皮细胞的部分细胞膜破裂(星号所示),菌丝顶端细胞壁破裂形成小孔(白箭头所示)。Infection cushion aggregating on the epidermal cell with partial cell membrane rupture (asterisk) and a pore appearing in the centre of hyphae (white arrow); B. 侵染垫附着在叶片表面的扫描电镜图。SEM micrograph of infection cushion on the epidermal cell; C. 侵染垫的菌丝聚集在表皮细胞表面,表皮细胞的细胞壁断裂(白箭头所示)。Cell wall of epidermal cell broken at the infection cushion site (white arrow); D. 侵染垫导致表皮破裂(黑箭头所示)的扫描电镜图。Epidermis broken in SEM micrograph (black arrow); IC:侵染垫 Infection cushion; E:表皮细胞 Epidermal cell; M:叶肉细胞 Mesophyll cell; H:侵染垫的菌丝细胞 Infection cushion hypha cell.

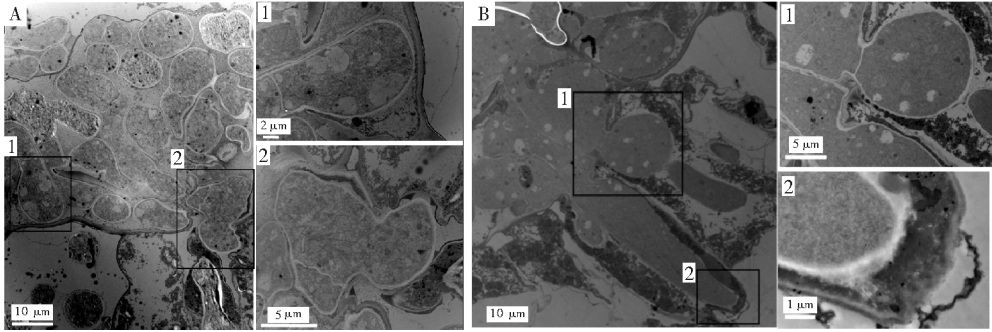
图 1 侵染垫破坏叶片表皮细胞

Fig.1 Infection cushion invaded epidermal cell

2.2 灰霉菌菌丝进入叶肉细胞

观察结果显示:灰霉菌接种油菜叶片 48 h 后,侵染垫前端的菌丝穿透叶片表皮细胞,侵入叶肉细胞(图 2-A/1),有的菌丝通过叶肉细胞间进入叶肉组织(图 2-A/2);菌丝穿透叶肉细胞的细胞壁,菌丝顶端膨大、在细胞壁破裂处形成隔膜(图 2-B/1),

菌丝在叶肉细胞中生长,顶端的叶肉细胞的细胞壁部分溶解(图 2-B/2);菌丝侵入位点处,叶肉细胞的细胞壁断裂,呈锥子状,靠近菌丝处细小、远离菌丝处宽厚,叶肉细胞的细胞壁并未呈现压痕状(图 2-A 和图 2-B/1~2);叶肉细胞的细胞质凝聚,电子密度升高,细胞膜破裂,叶绿体外膜破裂(图 2-A,B)。



A. 侵染垫的菌丝突破表皮细胞,通过细胞间隙进入叶肉组织 Hyphae broke epidermal cell and one hyphae invade into mesophyll tissue through the space between cells; B. 侵染垫的菌丝突破叶肉细胞的细胞壁并在叶肉细胞中生长 Hyphae broke down the cell wall of mesophyll cell and one grew in mesophyll cell.

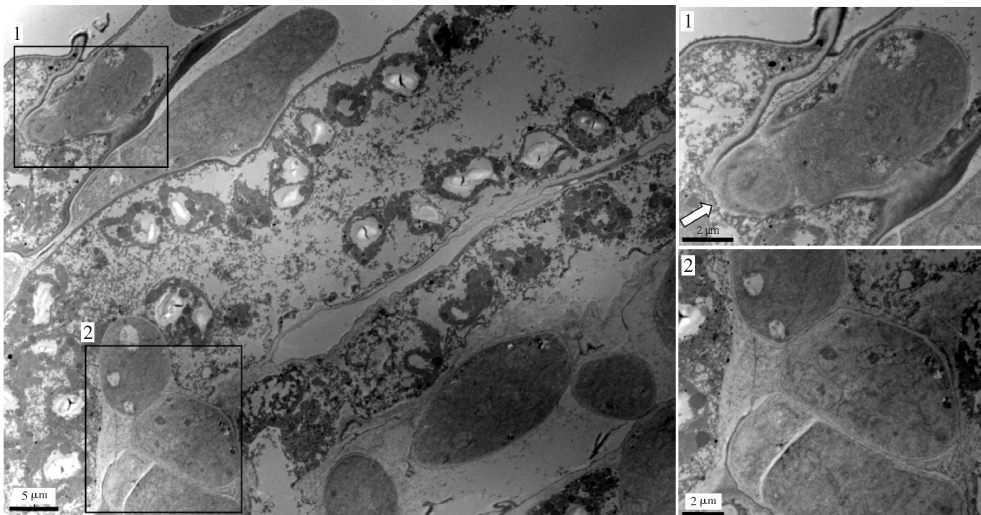
图 2 侵染垫的菌丝侵入叶肉细胞

Fig. 2 Hyphae of infection cushion invade into mesophyll cell

2.3 灰霉菌在叶片中生长

观察结果显示:灰霉菌接种油菜叶片 72 h 后,菌丝在叶肉组织中大量生长,靠近菌丝的叶肉细胞其细胞壁变薄、溶解甚至消失(图 3),菌丝顶端叶肉细胞的细胞壁溶解现象较明显(图3/1);部分菌

丝突破叶肉细胞的细胞壁进入或准备进入叶肉细胞,与菌丝接触位置的叶肉细胞的细胞壁变薄、无明显的压痕出现(图 3/1)。另外,观察时还发现,叶肉细胞中细胞质凝聚、电子密度升高,细胞膜和叶绿体外膜破裂(图 3)。



菌丝在叶肉组织中大量生长,叶肉细胞的细胞壁溶解(1:白箭头所示),菌丝突破叶肉细胞的细胞壁进入叶肉细胞(2)。Many hyphae grew in mesophyll tissue, the mesophyll cell wall dissolved (1:white arrow) and broken by the hypha(2).

图 3 灰霉菌的菌丝在叶肉组织中生长

Fig. 3 Hyphae of *Botrytis cinerea* grew in mesophyll tissue

3 讨论

真菌病原物通常会形成附着胞和侵染垫两种特化的结构穿透植物表面,从而侵入植物体内进行增殖^[10-12]。稻瘟病菌(*Pyricularia grisea*)的附着胞通过细胞内产生的渗透压形成巨大的机械压力刺穿植物表面,进入植物细胞内并在破损的植物细胞壁上留下明显的压痕^[11]。灰霉菌菌(*Botrytis cinerea*)孢子形成的类附着胞分泌角质酶、果胶酶、脂肪酶等细胞壁降解酶类降解植物表皮细胞的角质层和细胞壁进入植物细胞^[13-15]。

本试验结果表明,灰霉菌菌以菌丝形式侵染寄主植物时,会形成多菌丝聚集的侵染垫(图1)。灰霉菌菌孢子侵染蚕豆(*Vicia faba*)叶片过程中,脂肪酶可导致芽管顶端中心部位形成小孔^[16];侵染垫的菌丝同样会在顶端中心部位形成小孔(图1-A/1)。灰霉菌菌侵染蜡花(*Chamaelucium* spp.)花瓣时,造成花瓣表皮细胞的细胞壁断裂^[17];灰霉菌菌侵染垫的菌丝间有大量胶状物质存在,侵入位点处常出现表皮细胞的细胞壁断裂,断裂的细胞壁无明显压痕存在(图1)。侵入叶肉细胞中的菌丝也能造成细胞壁的降解(图2-B/2,图3/2)。研究结果表明,灰霉菌菌侵染垫通过降解寄主植物的细胞壁侵入植物细胞,而不是通过机械压力直接刺入植物细胞。灰霉菌菌侵染垫的侵染过程与孢子类附着胞的侵染过程类似,也可能通过分泌细胞壁降解酶类来降解细胞壁。在病菌侵染早期,侵染垫分泌细胞壁降解酶类可能不足以完全降解细胞壁而是降低细胞壁的机械性能^[17],机械性能的改变可能造成了细胞壁的断裂。

另一个典型的腐生型油菜病害核盘菌(*Scelrotinia sclerotiorum*)也能通过分泌细胞壁降解酶和毒素,完成侵染和生长过程,这些细胞壁降解酶通过降解细胞壁可为核盘菌生长提供碳源^[18]。本试验结果表明,灰霉菌菌也是通过降解油菜叶片细胞的细胞壁,在细胞间生长或进入细胞内获取营养(图2,图3)。因此,灰霉菌菌对植物细胞壁的降解在侵染垫侵染和菌丝生长中都起着重要作用。在灰霉菌菌侵染过程中,油菜叶片细胞的细胞壁被降解、细胞膜和叶绿体外膜破裂(图3),叶肉细胞坏死导致叶片变软进而腐烂。由此可见,抑制或清除菌丝释放的细胞壁降解物质可以作为防治灰霉菌病害的重要手段。

参 考 文 献

- [1] WILLIAMSON B, TUDZYNSKI B, TUDZYNSKI P, et al. *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease [J]. *Molecular Plant Pathology*, 2007, 8(5): 561-580.
- [2] STAPLES R C, MAYER A M. Putative virulence factors of *Botrytis cinerea* acting as a wound pathogen [J]. *FEMS Microbiological Letter*, 1995, 134(2): 1-7.
- [3] VIRET O, KELLER M, JAUDZEMS V G, et al. *Botrytis cinerea* infection of grape flowers: light and electron microscopical studies of infection sites [J]. *Phytopathology*, 2004, 94(8): 850-857.
- [4] ZHANG L, WU M D, GUO Q L, et al. Effect of mitovirus infection on formation of infection cushions and virulence of *Botrytis cinerea* [J]. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2010, 75(2): 71-80.
- [5] CHOQUER M, FOURNIER E, KUNZ C, et al. *Botrytis cinerea* virulence factors: new insights into a necrotrophic and polyphagous pathogen [J]. *FEMS Microbiological Letter*, 2007, 277(1): 1-10.
- [6] RIJKENBERG F H, DE LEEUW G T. Light and microscopy studies on the infection of tomato fruits by *Botrytis cinerea* [J]. *Canadian Journal of Botany*, 1980, 58(3): 1394-1404.
- [7] LI G Q, HUANG H, ERICHSON R S, et al. Biological control of blossom blight of alfalfa caused by *Botrytis cinerea* under environmentally controlled and field conditions [J]. *Plant disease*, 88(11): 1246-1251.
- [8] 曹剑波, 秦利鸿, 吴华, 等. 悬铃木成熟球果及果毛的形态学观察[J]. *华中农业大学学报*, 2008, 27(2): 313-316.
- [9] 曹剑波, 李彬, 陈焕春, 等. 高致病性猪繁殖与呼吸障碍综合征病毒感染猪主要脏器的超微结构变化[J]. *华中农业大学学报*, 2009, 28(3): 330-333.
- [10] SHARMAN S, HEALE J B. Penetration of carrot roots by the grey mould fungus *Botrytis cinerea* Pers. ex Pers [J]. *Physiology Plant Pathology*, 1977, 10(1): 63-71.
- [11] HOWARD R J, FERRARI M A, ROACH D H, et al. Penetration of hard substrates by a fungus employing enormous turgor pressures [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 1991, 88(24): 11281-11284.
- [12] DEISING H B, WERNER S, WERNITZ M. The role of fungal appressoria in plant infection [J]. *Microbes and Infection*, 2000, 2(13): 1631-1641.
- [13] BACKHOUSE D, WILLETS H J. Development and structure of infection cushions of *Botrytis cinerea* [J]. *Trans Br Mycol Soc*, 1987, 89(1): 89-95.
- [14] REIS H, PFIFFI S, HAHN M. Molecular and functional characterization of a secreted lipase from *Botrytis cinerea* [J]. *Molecular Plant Pathology*, 2005, 6(3): 257-267.
- [15] GARCIA-ARENAL F, SAGASTA E M. Scanning electron mi-

- croscopy of *Botrytis cinerea* penetration of bean (*Phaseolus vulgaris*) hypocotyls [J]. *Phytopathology*, 1980, 99(1): 37-42.
- [16] MCKEEN W. Mode of penetration of epidermal cell walls of *Vicia faba* by *Botrytis cinerea* [J]. *Phytopathology*, 1973, 64(1): 461-467.
- [17] QINH S Q, JOYCE D C, IRVING D E, et al. Histology of wax-flower (*Chamelaucium* spp.) flower infection by *Botrytis cinerea* [J]. *Plant Pathology*, 2011, 60(2): 278-287.
- [18] HUANG L, BUCHENAUER H, HAN Q, et al. Ultrastructural and cytochemical studies on the infection process of *Scelrotinia sclerotiorum* in oilseed rape [J]. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 2008, 115(1): 9-16

Ultrastructural observation on infection cushion of grey mould fungus penetration the leaf of oilseed rape

CAO Jian-bo¹ ZHANG Jing² ZHANG Lei³ CHEN Qian-si⁴ QIN Li-hong¹ LI Guo-qing²

1. *Public Laboratory of Electron Microscopy, Office of Scientific Research and Development, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;*

2. *Plant Science and Technology College, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;*

3. *Institute of Plant Protection, Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Chengdu 610066, China;*

4. *Gene Research Center of Zhenzhou Tobacco Research Institute, China National Tobacco Corporation, Zhenzhou 450001, China*

Abstract The infection cushion of penetration the leaf of oilseed rape was investigated by transmission electron microscopy and scanning electron microscopy. During the initial infection process, the hypha of grey mould fungus (*Botrytis cinerea*) which formed infection cushions broken down the cell wall then penetrated into the leaf tissue of oilseed rape. After invading into the leaf epidermis cells, the hypha of infection cushions multiplied between the mesophyll cells or grew in mesophyll cells through breaking the cell wall. These results will illustrate the degradation of plant cell wall plays an important role in the infection and development of grey mould fungus infection cushion and provide clues to explain pathogenicity of grey mould fungus.

Key words grey mould fungus (*Botrytis cinerea*); hypha; infection cushion; ultrastructure; cell wall degradation

(责任编辑:陈红叶)