

哈密瓜在致病菌侵染前后细胞超微结构的变化

单春会^{1,2}, 陈卫^{*1}, 唐凤仙², 马伟荣², 柳涛²

(1. 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122; 2. 石河子大学 食品学院, 新疆 石河子 832003)

摘要: 病原真菌通常会产生侵染垫、附着胞和吸器等侵染结构来完成对寄主的侵染。通过电镜观察不同时间不同病原菌对哈密瓜的侵染状况。试验结果表明, 病原菌会导致哈密瓜细胞结构变化, 例如细胞壁变薄, 叶绿体解体, 细胞结构遭到破坏, 出现空泡化等一系列发病特征。研究结果为哈密瓜病原菌侵染过程, 以及哈密瓜侵染性病害的防治提供了理论依据。

关键词: 哈密瓜; 病原菌侵染; 超微结构; 电镜

中图分类号: S 432.4; TS 201.3 文献标志码: A 文章编号: 1673—1689(2015)03—0232—07

Observation on Alteration of Cellar Ultrastructure of Cantaloupe Before and After Infected by Pathogen

SHAN Chunhui^{1,2}, CHEN Wei¹, TANG Fengxian², MA Weirong², LIU Tao²

(1. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Food College, Shihezi University, Shihezi 832003, China)

Abstract: In recent years, more and more studies of concentrated on the plant pathogenic fungi infects plant structure. Pathogenic fungi usually produce infection pad, attached to infect cells and absorbing structures, etc. to complete the host infection process. The infection status of cantaloupe infected by different pathogen at different times was observed through electron microscope. The results showed that the incidence of pathogens can cause cantaloupe changes in cell structure, such as cell wall thin, chloroplasts disintegration, destruction of the cell structure, vacuoles and a series of clinical characteristics. The research conclusion will provide theoretical basis for the cantaloupe pathogen infection process, and infectious disease prevention and control, it has a certain reference value.

Keyword: cantaloupe, pathogen infection, ultrastructure, electron microscopy

哈密瓜是新疆的特色果蔬, 其在生长发育以及贮藏过程中容易被病原真菌侵染而导致腐烂变质,

带来极大的经济损失。目前已发现的主要致病菌有青霉菌, 曲霉菌, 链格孢菌。植物病原真菌侵入寄主

收稿日期: 2014-03-25

基金项目: 国家自然科学基金项目(31360412)。

作者简介: 单春会(1978—), 男, 新疆石河子人, 工学博士, 副教授, 主要从事食品生物技术的研究。E-mail: 350077747@qq.com

* 通信作者: 陈卫(1966—), 男, 江苏扬州人, 工学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事食品微生物学研究。

E-mail: weichen@jiangnan.edu.cn

并在寄主组织中生长是其致病的先决条件。病原菌在入侵寄主时,通常会产生一些由特化的菌丝形成的侵染结构,如侵染垫、附着胞、侵染钉和吸器等,帮助入侵并与寄主建立寄生关系。这些侵染结构对病原真菌的生存及扩展,乃至植物侵染性病害的发生具有重要的作用^[1]。

作者通过电子显微镜对不同致病菌对哈密瓜的侵染过程进行观察,更深入地了解病原菌的侵染途径,以及侵染过程中细胞结构的变化情况,为哈密瓜的贮藏保鲜及对哈密瓜病原菌的防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

样品为大田种植的新疆哈密瓜厚皮品种八成熟伽师瓜,大小均匀,无虫眼,无损伤。病原菌来自石河子大学食品学院已分离纯化的菌株。液态培养基培养 2~3 d,待菌液浑浊时开始接菌。

1.2 试验方法

1.2.1 取样方法 将哈密瓜表皮用干净的湿布擦干净,晾干。每种致病菌分 3 种方法接菌:一是用直径为 1 cm 的打孔器打深约 2 cm 的孔,用微量注射器吸取菌液注射至孔内,并用保鲜膜包裹接菌处;二是用已消毒的牙签在哈密瓜表皮划出深约 1 cm 的 Z 型或 S 型曲线,用微量注射器吸取菌液注射至孔内,并用保鲜膜包裹接菌处;三是将哈密瓜表皮轻轻刮去,滴 3~5 滴菌液,用涂抹棒涂抹均匀,并用保鲜膜包裹接菌处。实验所用器具均用高温杀菌或

酒精灯加热杀菌,每种方法做 3 个平行,观察不同时间内病原菌的生长情况。分别在 0、48、96 h 取样,取样时分别在患处菌株生长明显部位作横切和纵切,切片为约 0.5 cm×0.2 cm×0.1 cm 的小块,未接菌的哈密瓜样品作对照。

1.2.2 制片方法 将切出的小块材料放入盛有质量分数 4% 戊二醛的玻璃容器内,固定 4 h,用磷酸缓冲液浸洗 4 次,15 min/次。用质量分数 1% 饿酸固定 2 h,磷酸缓冲液浸洗 3 次,15 min/次^[2]。用体积分数 30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100% 乙醇,逐级脱水,每级 15 min。用醋酸异戊醋置换 2 次,第 1 次停留置换 15 min,第 2 次停留置换 30 min,将玻璃容器内过多的醋酸异戊醋倒掉,余液盖过样品表面。然后连同玻璃容器一起放入真空钟罩内,慢慢打开真空排气阀,保持 1 h,让醋酸异戊醋在真空状态下蒸发而达到样品干燥的目的。最后将样品置于电子显微镜下,扫描观察哈密瓜不同致病菌的侵染情况^[3]。

2 结果与分析

2.1 未接菌哈密瓜切片电镜图

由图 1(a)(b)(c)(d)中可以看出:切口方向为从右向左,细胞壁没有降解,依然保持着完整性,整体细胞没有明显受到侵蚀的特征,叶绿体有个别因成熟解体,细胞内各项细胞器较完整,可以看到叶绿体周围附着的线粒体,所有细胞都保持着成熟细胞的完整特性。

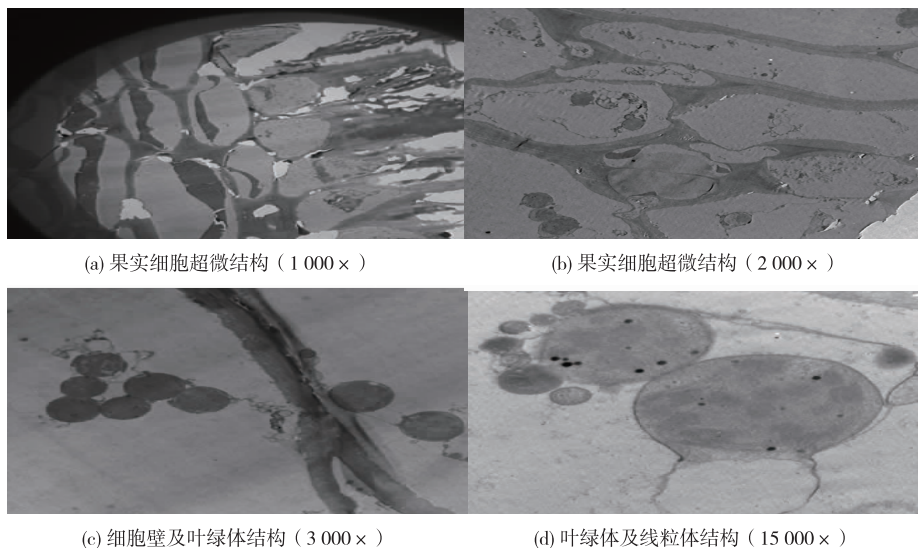


图 1 未接菌哈密瓜的电镜观察图

Fig. 1 SEM observation of cantaloupe without inoculation

2.2 接种毛霉 48 h 哈密瓜切片电镜图

由图 2(a)处可明显看出菌丝存在,根据菌丝的分布,可以看出侵染路径为右上→左下。由图 2(b)可以看到菌丝存在,细胞器解体,细胞壁被侵蚀。从

图 2(c)可以看出众多细胞器已经解体,细胞壁出现空泡化,菌丝集中在细胞壁周围,细胞壁变得酥松。图 2(d)质体空泡化严重,细胞质变得非常稀薄,各种细胞器正在解体,菌丝比较明显。

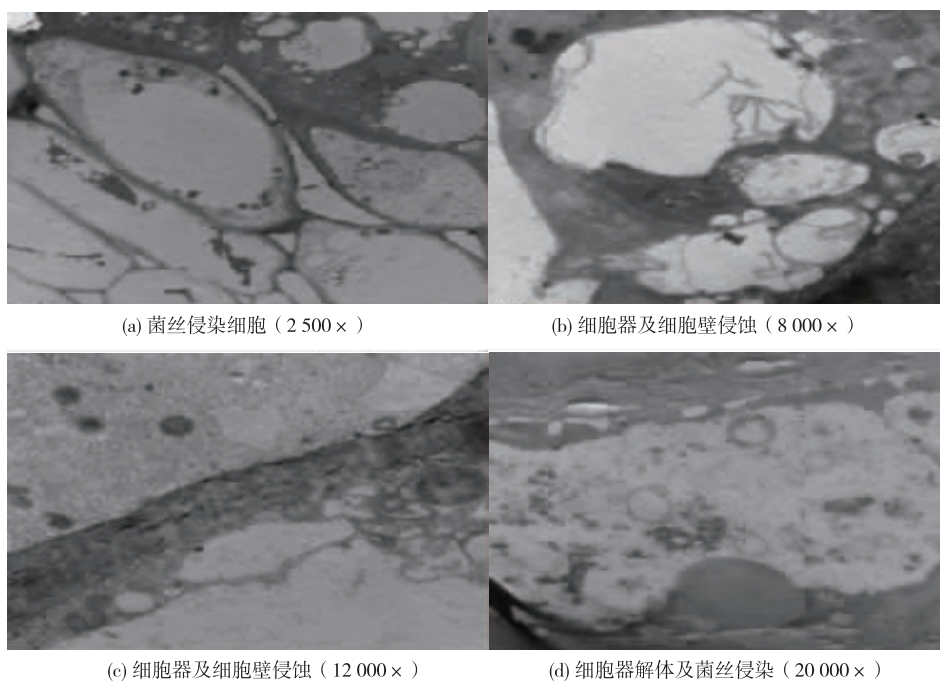


图 2 接种毛霉 48 h 的哈密瓜电镜观察图

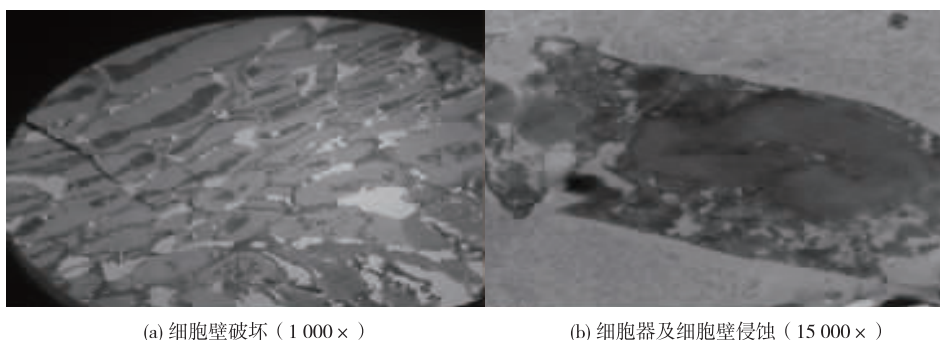
Fig. 2 SEM observation of cantaloupe inoculated Mucor at 48 hours

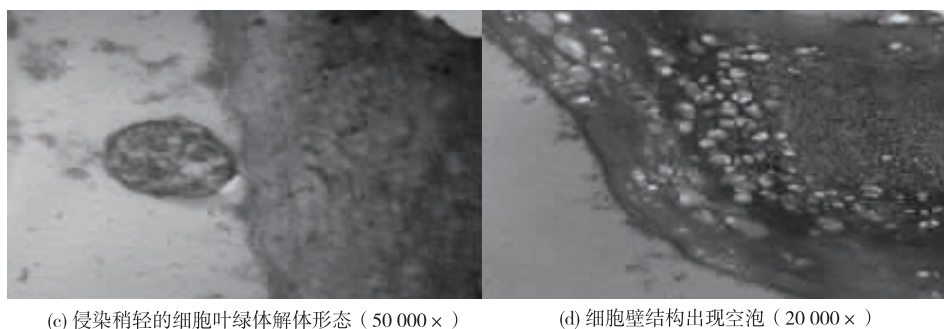
2.3 接种毛霉 96 h 哈密瓜切片电镜图

由图 3(a)中可看出,哈密瓜经过毛霉 96 h 的侵染,细胞破坏情况严重,有些已经不呈现细胞结构,细胞壁胞间层消失。图 3(b)中可看出,毛霉的菌丝大量存在,细胞已经丧失结构,细胞器已经无法分辨。图 3(c)是一个侵染情况稍轻的细胞,但是细胞壁的情况依旧不容乐观,叶绿体呈现解体状态。图 3(d)是哈密瓜细胞中的细胞壁结构,可以明显看到,细胞壁出现空泡,说明毛霉的侵染性较强,导致细胞壁已经失去其应有的形态。

2.4 接种青霉 48 h 哈密瓜切片电镜图

从图 4(a)中可看出,青霉是由右下方→左上侵染,但 48 h 的侵染时间不是很长,所以侵染现象不是特别明显,哈密瓜的整体细胞还是呈现典型的成熟细胞特性。图 4(b)中可看出,菌丝集结在导管附近,可判断青霉菌的侵染路径是经由导管而感染到其他细胞中。图 4(c)可观察到细胞壁侵蚀情况严重,呈拉丝状,细胞壁中胶层正在消失。图 4(d)可以看出有明显菌丝,细胞壁呈拉丝状,且明显变薄。



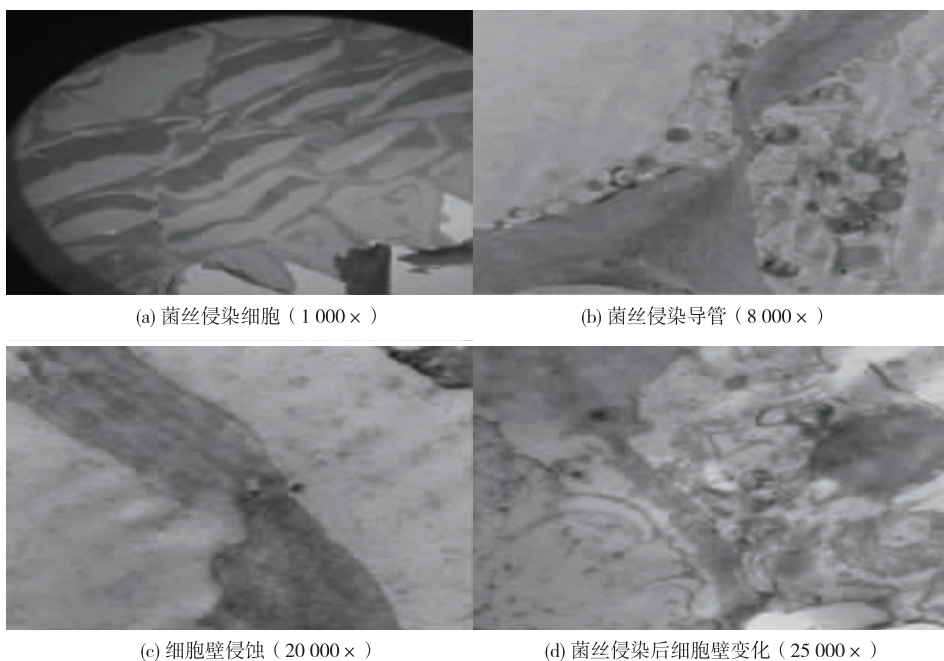


(c) 侵染较轻的细胞叶绿体解体形态 (50 000 ×)

(d) 细胞壁结构出现空泡 (20 000 ×)

图 3 接菌毛霉 96 h 的哈密瓜电镜观察图

Fig. 3 SEM observation of cantaloup inoculated Mucor at 96 hours



(a) 菌丝侵染细胞 (1 000 ×)

(b) 菌丝侵染导管 (8 000 ×)

(c) 细胞壁侵蚀 (20 000 ×)

(d) 菌丝侵染后细胞壁变化 (25 000 ×)

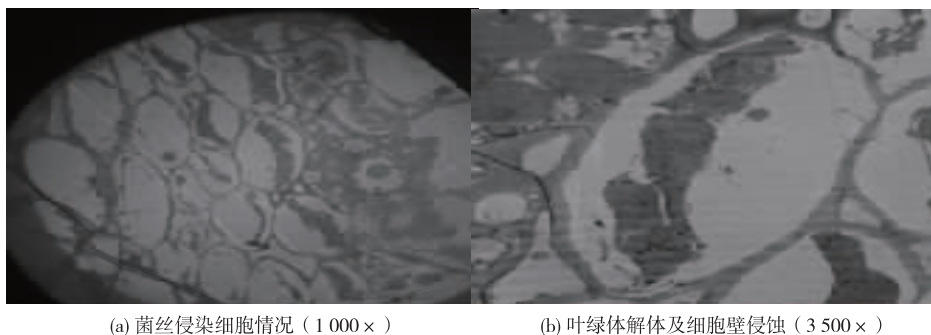
图 4 接菌青霉 48 h 哈密瓜切片电镜观察图

Fig. 4 SEM observation of cantaloup inoculated Penicillium at 48 hours

2.5 接种青霉 96 h 哈密瓜切片电镜图

从图 5(a)中可看出,青霉侵染方向是从右上到左下,侵染路径明显,细胞整体状况良好,胞间层完好。图 5(b)中可看出,细胞壁变薄,叶绿体解体,有

明显的成熟细胞的特征,有大液泡存在。图 5(c)发现明显菌丝,细胞器解体严重。图 5(d)中显示细胞核内发现菌丝,说明侵染程度较深,但对细胞整体形态影响并不大。



(a) 菌丝侵染细胞情况 (1 000 ×)

(b) 叶绿体解体及细胞壁侵蚀 (3 500 ×)

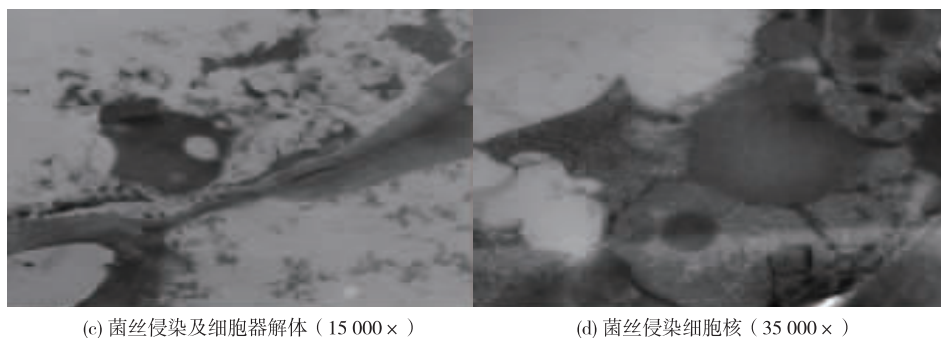


图 5 接种青霉 96 h 哈密瓜电镜结果图

Fig. 5 SEM observation of cantaloupe inoculated *Penicillium* at 96 hours

2.6 接种黑曲霉 48 h 哈密瓜切片电镜图

图 6(a)显示,经过黑曲霉 48 h 的侵染,哈密瓜果实细胞解体情况非常严重,细胞整体形态被严重破坏,样本解体严重。从图 6(b)可以看出,在一个细胞形态相对完整的细胞中,叶绿体已经开始解体,

并且发现了菌丝,线粒体依附在叶绿体的边缘。图 6(c)(d)中可以发现,跟其他的样本一样,哈密瓜果实经过侵蚀之后细胞壁明显变薄,呈拉丝状,细胞壁中间层消失。

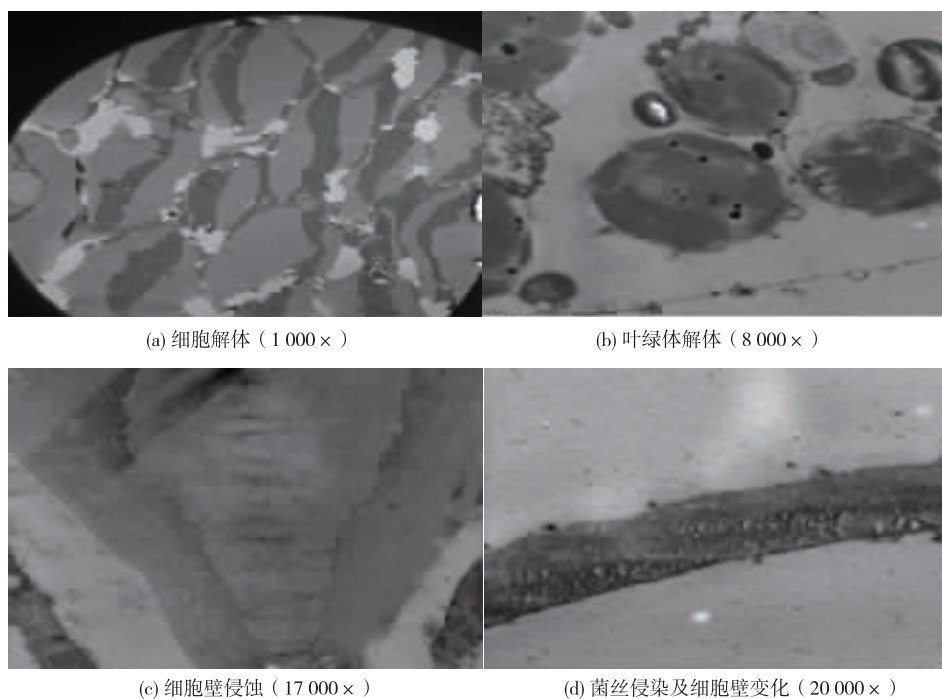


图 6 接种黑曲霉 48 h 哈密瓜电镜结果图

Fig. 6 SEM observation of cantaloupe inoculated *Aspergillus Niger* at 48 hours

2.7 接种黑曲霉 96 h 哈密瓜切片电镜图

图 7(a),根据细胞解体的严重情形可看出,黑曲霉的侵染方向是从右向左。图 7(b)显示,细胞的叶绿体呈现解体的状态,叶绿体基质中出现菌丝。从图 7(c)中可以看出,两细胞之间出现空泡,胞间质解体严重,导致细胞分离。图 7(d)中可以看出,在

细胞的导管附近,发现大量菌丝以及解体的细胞器,说明黑曲霉有可能也经此处侵染。

通过对不同病原菌的侵染情况进行观察,可以看出能导致哈密瓜发病的病原菌一般均能导致细胞结构的破坏。其中毛霉的发病时间较慢,菌丝侵染过程较缓慢,菌丝不明显,但仍能看到明显的细

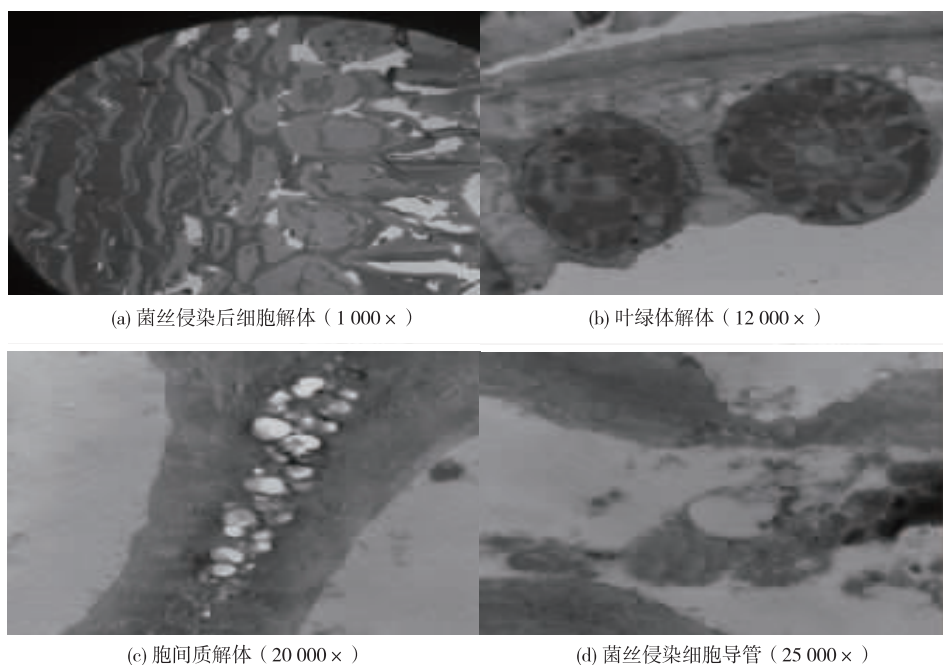


图7 接种黑曲霉 96 h 哈密瓜电镜结果图

Fig. 7 SEM observation of cantaloup inoculated *Aspergillus Niger* at 96 hours

胞破坏现象。青霉菌侵染效果较明显,表明在同等时间下,青霉菌发病较快,菌丝侵染迅速,对细胞破坏严重,细胞内看到有明显的菌丝存在,细胞器变薄,最终破裂。黑曲霉 48 h 发病明显,细胞器虽有破坏但总体细胞器存在;96 h 时可以看到细胞壁上出现空泡化,细胞内发现明显菌丝,细胞壁变薄。从以上电镜结果图可以看出,3 种菌的侵染快慢分别为青霉菌、黑曲霉、毛霉菌。

3 讨论

在植物病原真菌的侵染过程中,侵入期可能是最重要的阶段。侵染性植物病害能否发生,关键是侵染能否成功。因此,病菌侵染结构的形成与扩展,对侵染性病害的发生起着极其重要的作用。病原真菌的侵入过程一般包含:分生孢子粘附在寄主表面、孢子萌发、附着胞形成、附着胞黑色素化,直至最终进入寄主组织。真菌附着胞的产生对病害的发生非常重要,它直接影响病原真菌与寄主植物的分子识别,并介导病原菌的侵入和寄主植物防御反应的发生^[5]。对附着胞和吸器进行细胞、亚细胞水平的

超微结构、生理生化性质,以及基因分子水平的研究^[1,6],了解其作用机制,不仅可以对真菌病害的防治提供理论依据,而且在仿生学、机械制造及其他工业领域都将有很高的参考价值。

植物果肉在透射电镜下表现的微形态特征,有一定的参考价值,但值得注意的是,植物组织的某些性状易受环境条件的影响,所以在选择观察时不仅要注意它的稳定性,而且还要参考其他性状进行综合研究,才能得到客观、正确的结论^[4-10]。

4 结语

目前,国内针对采后哈密瓜对病原菌侵染的反应机制、病原菌的侵染过程,以及侵染机制的研究较少。与哈密瓜贮藏保鲜密切相关的一个基础科学问题是采后哈密瓜对霉菌侵染应答的分子机制如何?超微结构变化是怎样的?因此,研究病原菌侵染前后哈密瓜表皮显微结构变化,将有助于了解病原菌的侵染过程,揭示病原菌致病和采后哈密瓜抗病的调控机制,进而为哈密瓜采后病害的无污染防治技术和绿色保鲜技术,提供理论支持和依据。

参考文献:

- [1] 郑玲,吴小芹. 植物病原真菌侵染结构研究进展[J]. 南京林业大学学报:自然科学版,2007,31(1):90-93.

- ZHENG Ling, WU Xiaoqin. Advances on infection structures of plant pathogenic fungi [J]. **Journal of Nanjing Forestry University: Natural Sciences Edition**, 2007, 31(1): 90–93. (in Chinese)
- [2] 林均安, 文锦梁, 洪健. 实用生物电子显微术[M]. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 1989.
- [3] 周建良, 宋碧云. 电镜观察镰刀菌在四季豆植株内侵染过程[J]. 植物保护, 2004, 30(3): 46–47.
- ZHOU Jianliang, SONG Biyun. Observations on green beans infected by *Fusarium* using scanning electron microscope [J]. **Plant Protection**, 2004, 30(3): 46–47. (in Chinese)
- [4] 王任翔, 梁盛业, 李洁荣, 等. 金花茶组植物叶表皮特征的扫描电镜观察[J]. 广西林业科学, 2003, 32(1): 12.
- WANG Renxiang, LIANG Shiye, LI Jierong, et al. SEM observation on features of plant leaf of *C. chrysantha* [J]. **Guangxi Forestry Science**, 2003, 32(1): 12. (in Chinese)
- [5] Deising H B, Wnener S. The role of fungal appressoria in plant infection[J]. **Microbes and Infection**, 2000, 2(13): 1631–1641.
- [6] 吕英民, 张大鹏, 严海燕. 苹果果实韧皮部及其周围薄壁细胞的超微结构观察和功能分析[J]. 植物学报, 2000, 42(1): 32–42.
- LU Yingmin, ZHANG Dapeng, YAN Haiyan. Ultrastructure of phloem and its surrounding parenchyma cells in the developing apple fruit[J]. **Acta Botanica Sinica**, 2000, 42(1): 32–42. (in Chinese)
- [7] 康振生. 植物病原真菌的超微结构[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 1995.
- [8] 刘雪梅, 肖建国. 小麦纹枯病菌侵染过程的组织学研究[J]. 菌物系统, 1999, 18(3): 288–293.
- LIU Xuemei, XIAO Jianguo. Histopathological studies on infection process of wheat sheath blight *Rhizoctonia cerealis* [J]. **Mycosystema**, 1999, 18(3): 288–293. (in Chinese)
- [9] 陈捷, 唐朝荣, 宋佐衡, 等. 玉米纹枯病菌侵染过程研究[J]. 沈阳农业大学学报, 2000, 31(5): 503–506.
- CHEN Jie, TANG Chaorong, SONG Zuoheng, et al. On penetration process of sheath blight pathogen in maize [J]. **Journal of Shenyang Agricultural University**, 2000, 31(5): 503–506. (in Chinese)
- [10] 陈勇, 倪汉文, 李晓晶, 等. 尖角突脐孢菌侵染过程及稗草反应超微结构观察[J]. 微生物学通报, 2004, 31(3): 88–91.
- CHEN Yong, NI Hanwen, LI Xiaojing, et al. Observation of infection process of *Exserohilum monoceras* and alteration of cellular ultrastructure in Barnyardgrass[J]. **Microbiology China**, 2004, 31(3): 88–91. (in Chinese)

会 议 信 息

会议名称: International Conference on Nanomedicine and NanoBiotechnology, China 2015

开始日期: 2015-04-06

结束日期: 2015-04-09

所在城市: 浙江省 杭州市

主办单位: 中国药学会药剂委员会、中国毒理学会纳米毒理学委员会、中国化学会纳米化学委员会

承办单位: 浙江大学

联系电话: 86-571-87953925

E-MAIL: shengroup@zju.edu.cn or nanomedicine@zju.edu.cn 会议网站: <http://www.nanomedicine.cn/>

会议背景介绍: On behalf of the organizing committee, we would like to invite you to participate in the International Conference on Nanomedicine and NanoBiotechnology, China 2015 (ChinaNanomedicine 2015) to be held on April 6–9, 2015 in Hangzhou, China.

Nanomedicine is innovating our healthcare and impacting our society, but is still in its infancy in clinical performance and applications. The aim of this conference is to bring together leading academic, clinical and industrial experts to discuss development of innovative cutting-edge nanomedicine and challenges in nanomedicine clinical translation. The conference topics includes but not limited to innovative nanomaterials for nanomedicine, nanomedicine for therapy, translational and personalized nanomedicine, nanobiosensors and biochips, and nanomedical chemistry and toxicology. The diverse technical program is planned to foster interactions and collaborations among the participants. The outmost goal is through inspiring multidisciplinary discussion to Promote Science and Clinical Translation of Nanomedicine.

Besides the science program, an important event during this conference is the Global Forum for Presidents of Nanomedicine Societies, which is to provide the platform for discussing the current difficulties/ strategic planning/future directions and trends/clinic translation and other issues of nanomedicine. Presidents of the International and European nanomedicine societies and the organizations from China, France, Korea, Japan, Switzerland, UK and US will present their points of view on the forum.