

# 核盘菌 (*Sclerotinia sclerotiorum*) 在大豆叶片上致病过程的初 步电镜观察\*

杨 谦

R. T. V. Fox

(东北农学院) (英国里丁大学园艺系)

## 摘 要

通过电子显微镜观察核盘菌在大豆叶片上的侵染过程,初步发现该病菌首先在大豆叶表面上形成复合附着器。该附着器可能产生某些酶类软化溶解大豆叶表面,以帮助该病菌侵入叶片内。侵入叶片以后,该病菌既能在叶肉细胞间又能在叶肉细胞内生长。在此过程中,该菌仍借助于酶的分解作用破坏寄主组织,直至再突破叶面角质层,出现在叶面上。然后该菌在叶面上形成菌核。在大豆不同生育期,该病原侵染寄主大豆的速度有所不同。苗期最快,花期最慢。

**关键词** 大豆;核盘菌;电子显微镜

## 前 言

核盘菌 (*Sclerotinia sclerotiorum*) 近十几年来在大豆上的危害日趋严重。一般情况下发病率为20—30%,重者可达50—90%甚至造成绝产<sup>[1]</sup>。因此,它给大豆生产造成了日益严重的经济损失,阻碍着大豆的稳产高产。所以有效地防治大豆菌核病就成了摆在我们面前的紧迫而又严峻的任务。观察该病菌在大豆上的侵染过程,了解它侵染大豆的致病机制是我们认识该病发生规律的理论基础之一,对于该病的防治也可以提供更多的理论依据。然而,这方面的研究在国内还较贫乏。本文对核盘菌在大豆叶片上的侵染过程,包括在大豆不同生育期的致病过程进行了初步观察。对大豆菌核病的致病机理在细胞水平上有了初步了解。

\* 本文于1992年4月25日收到

This paper was received on April 25, 1992.

## 材 料 和 方 法

### 1. 寄主

大豆(*Glycine max*)品种(Amsoy),由英国 ICI 公司提供,被种植在营养土(John Innes Potting Compost No. 2)中,约20℃温室里。在大豆生长的不同时期,将大豆最新叶片取下用蒸馏水冲洗后置于装有保鲜培养基(20mg 苯并咪唑,2.5g“Bacto-agar”,1000mg 无菌蒸馏水)的培养皿中。

### 2. 病原

核盘菌(*S. sclerotiorum*)的菌核分离于油菜菌核病株,由英国农业发展咨询服务组织(ADAS)提供。该菌核在 PDA 培养基上约22℃温度下培养三天。菌丝由5mm 打孔器在培养菌落边缘取下,然后用于不同的接种实验。

### 3. 接种

#### ①一般致病过程的观察

大豆在温室里生长两周后,将最新叶片取下进行离体接种—将准备好的菌块放在培养皿里的离体叶片中央,然后盖上培养皿,在室温下培养。分别在8,16,24,36小时后取样。

#### ②大豆不同生育期致病过程的比较

分别在大豆幼苗期(单叶期),3—5叶期,花期将新叶取下,进行离体接种,方法同上。分别在接种后8,16,20,24,36,48,60小时后取样。

### 4. 样品的制作及电镜观察

取接种的叶片5mm×2mm,每处理3—6块,在2%戊二醛中室温下固定4小时。然后用二甲胂酸缓冲液清洗。洗后在1%的锇酸中室温下再固定4小时。在丙酮系列中脱水。

#### ①扫描电镜的样品制作及观察

脱水后,进行CO<sub>2</sub>临界点干燥,镀金,用扫描电子显微镜(Jeol T20)在15KV的电压下,进行观察。

#### ②透射电镜的样品制作及观察

脱水后,用环氧树脂(Epon)进行浸透、包埋。制备的样品用 Reichart 超薄切片机切片。将超薄切片染色后,在日产 Hitachi—800型透射电子显微镜下进行观察,所用电压为100KV。

## 结 果

### 1. 一般致病过程的观察

大约在接种后8—16小时,生长在大豆叶面上的病菌菌丝开始生出多分枝的附着器,该附着器呈二岔分枝,属于复合附着器(图1—1)。这与前人在其它作物上的观察相似<sup>[2,3,4]</sup>。该菌在叶表面形成附着器以后,大豆叶表面形态发生了明显的变化(图1—1,1—2)。在接种之前,大豆叶表面角质层棱角分明,叶表皮毛刚劲挺拔。当接种后,菌丝在叶表

面形成附着器以后,叶表面的棱角荡然无存,表现为被软化了的症状,表皮毛也被软化而倒下,失去了刚劲。这表明,该病菌在叶表面生长,形成附着器以后,附着器可能产生某些酶类物质,软化了叶表面组织,以帮助该病菌侵入叶表面。

当病菌侵入叶片组织以后,菌丝既能在叶肉细胞间又能在叶肉细胞内生长(图2-1,2-2)。在这个过程中,大豆叶肉组织在病菌生长的作用下,被逐步瓦解。这时酶的作用表现得更为明显。开始时,一方面菌丝的生长对邻近的叶肉细胞产生一定的压力。例如:大豆叶肉细胞壁在菌丝生长的作用下表现为程度不同的凹入(图2-1,2-2)。这种压力对寄主大豆组织的破坏具有一定作用。另一方面,从叶肉细胞壁的瓦解方式和细胞内各种细胞器消失的情形看,(图2-2)各种酶的化学作用在破坏寄主组织过程中是时时存在的。当该菌在叶肉组织中生长的时候,寄主细胞的形状和排列都被明显地改变了(图3-1)。与开始时相比(图2-1),细胞壁表现为被软化,失去了对细胞的机械支持作用而变态。细胞壁还局部地出现了消失平滑的现象。细胞内细胞器的正常位置被打乱。原来和细胞壁紧靠在一起,分布在细胞内四周的细胞器(图2-1),此时与细胞壁游离开来,并且这些细胞器,例如:叶绿体已经失去了原有的形态,结构模糊(图3-1),所有这些都可能是被病菌产生的酶类所溶解造成。

进一步的发展,大豆叶肉细胞被彻底瓦解。细胞内几乎看不到细胞器的结构。这时,菌丝开始冲破叶表面残存的角质层,重新出现在叶表面上(图3-2)。这些菌丝在叶表面上集结,首先表现为白色棉絮状霉层。接着,经过约一周时间,在叶面上形成黑色的菌核。

在此观察中,没有发现菌丝通过气孔等自然孔口侵入大豆叶的现象。

## 2. 不同生育期大豆叶片被侵染过程的比较

在大豆的不同生育期,该病原侵染大豆叶的速度有所不同。苗期最快:该菌大约在接种后10小时,在叶面上形成附着器,开始侵入大豆叶表皮。大约在接种24—36小时后,叶肉组织基本被瓦解并在叶表面上重新出现菌丝。在3—5叶期和花期,侵染的速度均比苗期慢。以在叶面上形成附着器,开始侵入大豆表面所需时间为例:3—5叶期所需时间20小时;花期需要24—36小时。但在各个生育期都没有发现寄主大豆对病菌侵入的过敏性局部坏死反应。

## 讨 论

和前人在其它作物上观察到的结果相似<sup>[2,3,4]</sup>附着器在此观察中,也是该菌侵入大豆叶时的必要器官。然而这和 Sutton 和 Deverall 在大豆上的观察结果略有不同<sup>[5]</sup>。在他们的观察中,没有发现任何类型的附着器在侵入大豆表皮之前形成。造成这个差别的原因可能是多方面的。首先所采用的大豆品种的不同可能会对该菌的致病机制发生影响。其次,所使用的病菌接种体不同也可能是造成结果不同的原因之一。在 Sutton 和 Deverall 的研究中,他们采用的是子囊孢子接种,而在此观察中,采用的是菌丝体接种。另外,侵染时其它因素(如环境的,营养的等等)也可能影响该菌侵染过程的异同<sup>[3]</sup>。不管怎样,此观察结果在附着器的形成方面,是对已有报道的重要补充。

关于附着器的功能,即在侵入寄主表皮时是否产生酶类物质来软化寄主表面角质层,历来存在着争论。许多人认为没有酶的作用;但也有人观察到了酶的作用的存在。例如:Prior 和 Owen<sup>[7]</sup>在观察与该菌同属病原—*S. trifoliorum* 在三叶草和苜蓿上的侵染过程时发现,附着器可以产生酶类物质来帮助其自身侵入寄主表面的角质层。本观察结果,与 Prior 和 Owen 的结果相接近。从该病原侵入叶肉细胞之前,叶肉细胞壁的反应,到该菌侵入叶肉细胞后,各种细胞器及细胞结构被瓦解的形式,都可以看到酶的作用的存在。这与前人在其它作物上的观察也很相似<sup>[8,9]</sup>。

据报道,运用某些酶的抑制剂,可以阻止病原侵入寄主以达到保护寄主作物,防止病害发生的目的<sup>[10]</sup>。对大豆来说,如果能在现有观察的基础上,进一步弄清究竟有哪些酶在该病原侵入大豆表面时起作用?这些酶具有哪些特性?就可以为制造这些酶的抑制剂提供理论依据。

该病原在大豆不同生育期侵染速度的不同与其在大豆不同生育期致病力上存在的差异相吻合。在有关不同生育期大豆对该病感病性的比较研究中<sup>[11]</sup>,作者发现,大豆的感病性随着它的成熟而下降。此次电镜观察比较表明,该菌侵染大豆的速度以苗期最快。花期最慢,因此,为大豆感病性随生育期不同而变化提供了一定的组织病理学上的解释。然而要了解为什么大豆生育期不同会造成该病原侵染速度的不同还需要进一步的研究。

### 参 考 文 献

- [1] 李勇,姚浩然 1988. 黑龙江大豆菌核病发生及防治. 中国油料 (4):64-65
- [2] 吴纯仁,刘后利, 1991. 油菜菌核病致病机理的研究 V I 抗(耐)病性的组织病理学. 中国油料. (1):27-29
- [3] Lumsden R D L Wergin W P 1980 Scanning electron microscopy of infection of bean by species of *Sclerotinia* Mycologia 72:1200-1209
- [4] Tarig V-N & Jeffries P. 1984 Appressorium formation by *Sclerotinia sclerotiorum*: scanning electron microscopy. Transaction of British Mycological Society 82:645-651
- [5] Sutton D. C. & Deverall B. J. 1983 Studies on infection of bean (*phaseolus vulgaris*) and soybean (*Glycine max*) by ascospores of *Sclerotinia sclerotiorum* Plant Pathology 32:251-261
- [6] Purdy L. H. 1985 Some factors affecting penetration and infection by *Sclerotinia sclerotiorum*. Phytopathology 48: 605-609
- [7] Prior G. D. & Owen J. H. 1964 Pathological anatomy of *Sclerotinia trifoliorum* on clover and alfalfa. Phytopathology 54:784-787
- [8] Lumsden R. D. 1969 *Sclerotinia sclerotiorum* infection of bean and the production of cellulase. Phytopathology 59: 653-657
- [9] Shama S. L. Shazma R. C. & Indu Shanma 1983 Cellulase activity of *Sclerotinia sclerotiorum* causing stalk rot of cauliflower. Indian Journal of Mycological and Plant Pathology. 13(3):286-289
- [10] Kolattukudy P. E. & Koller W. 1983 Fungal penetration of the first line defensive barriers of plants. Biochemical plant pathology John Wiley & Sons Ltd USA (Chapter 6) 94-95
- [11] Yang Qian Interaction of Some crops with *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Bazy. PhD Thesis. Reading University UK

## ELECTRON MICROSCOPY OF INFECTION OF SOYBEAN BY

*Sclerotinia sclerotiorum*

Yang Qian

(Northeast Agricultural College)

R. T. V. FOX

(Reading University UK)

## Abstract

Observation of infection process of soybean leaves by *Sclerotinia sclerotiorum* by using electron microscopy showed that the fungus formed appressoria on the leaf surface before their penetration through leaf cuticle. The appressoria were able to produce some enzyme (s) to modify the surface cuticle of soybean leaves in order to help their penetration. After the penetration, the pathogen could grow in mesophyll of soybean leaves both inter and intra-cellularly. During colonization, the enzymic modification of the mesophyll by the pathogen was also essential to disintegrate soybean leaf tissue. Finally the fungus grew out of the leaf surface and formed sclerotia on the leaf surface.

Key words Electron microscopy; Soybean; *Sclerotinia sclerotiorum*

## 图 版 说 明

- 1-1扫描电镜照片,核盘菌菌丝在大豆叶面(s)上形成复合附着器(A)(1cm=12um)。  
F—倒下的叶表皮毛
- 1-2扫描电镜照片,无核盘菌菌丝生长的大豆叶表面形态:叶表面(S)和叶表皮毛(T)的原来状态(1cm=24um)。
- 2-1透射电镜照片,核盘菌丝在大豆叶肉细胞(M)间生长(1cm=2um)。W—细胞壁  
C—叶绿体 H—菌丝
- 2-2透射电镜照片,核盘菌丝侵入大豆叶肉细胞壁后在细胞内生长(1cm=2um)。W—细胞壁;H—菌丝;R—细胞内含物残体
- 3-1透射电镜照片,核盘菌丝(H)在大豆叶肉组织中生长(1cm=2um)。  
W—细胞壁;R—细胞内含物残体

3-2扫描电镜照片,核盘菌丝(H)突破叶表面角质层(F),重新出现在大豆叶上(1cm=12um)。

### Explanations of Plates

- Fig. 1-1 SEM micrograph of a compound appressorium (A) formed by *S. sclerotiorum* on leaf surface(s) of soybean (Bar=12um). F-trichome fallen down.
- Fig. 1-2 SEM micrograph of the leaf surface(s) of soybean before the hyphae growing on . Both the trichomes (T) and leaf surface showing their original shapes (Bar=24um).
- Fig. 2-1 TEM micrograph of intercellular growth of the hyphal (H) of *S. sclerotiorum* (Bar=2um). W-cell wall; C-chloroplast;
- 2-2 TEM micrograph of the hyphae having penetrated the mesophyll cell wall(w) and growing in mesophyll cell of soybean leaf (Bar=2um). R-Remains of cell.
- Fig. 3-1 TEM micrograph of the hyphae (H) growing in mesophyll tissue of soybean leaf (Bar=2um). W-cell wall; R-remains of cell.
- Fig. 3-2 SEM micrograph of the hyphae (H) appearing on the surface of rotted soybean leaf after breaking the epidermal cuticle(Bar=12um).

各位乡长:

元旦已过,春耕在即,不知93年贵乡种子准备情况如何,如需要什么帮助可来函告诉详情,我们会尽力的。贵乡都种些什么作物,需要什么品种、数量。另外本院还有些新技术、新产品均可帮助联系购买。其中:应用赤眼蜂防治玉米螟;水稻旱育苗壮秧营养剂;新型大豆专用肥硼钼微复肥、大豆重迎茬乐、马铃薯脱毒核心种小种薯等。这些产品都具有良好效果且已通过科技成果鉴定。资料介绍将陆续在“大豆科学”杂志上刊出(有的已刊出)。有事请多联系,我们竭诚为您服务,同时欢迎订购“大豆科学”杂志。邮发代号14—95,也可与本刊直接联系订阅。

黑龙江省农科院“大豆科学”编辑部

杨谦等:核盘菌( *Sclerotinia sclerotiorum* )在大豆叶片上致病过程的初步电镜观察  
Yang Qian et al:Electron Microscopy of Infection of Soybean by *Sclerotinia sclerotiorum*

