

摘 要

核盘菌[*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Bary]是引起多种植物发生病害的病原真菌。为了探索亚麻菌核病菌的致病机理,本文对该菌侵染亚麻的微观过程中菌体形态进行了大量观察,对该菌菌丝和子囊孢子对亚麻侵染过程的异同也进行了比较,并对不同侵染时期的菌丝形态变化进行了观察,这些对于丰富核盘菌致病机理的认识和侵染致病的组织病理学研究有重要的理论意义。

通过实验观察,结果如下:

1. 核盘菌对亚麻进行侵染,菌丝既能在细胞内生长,又能在细胞间生长。这一点上在菌丝侵染叶片和子囊孢子侵染花瓣没有差异。
2. 核盘菌子囊孢子不能直接侵染亚麻引起寄主发病。
3. 在侵染过程中,侵染主要靠酶的作用核盘菌来侵入寄主细胞。同时,菌丝生长所产生的生长压力对破坏细胞的结构也有一定影响。
4. 菌丝直径大小与侵染时期有关,在侵染初期菌丝直径较小,而在后期菌丝直径较大。
5. 菌丝侵染亚麻细胞过程中,菌丝和亚麻细胞之间相互作用,相互影响。从而导致亚麻细胞受到菌丝的生长压力而发生细胞壁产生凹陷的现象,而菌丝也由于受到寄主细胞的抵抗而形态发生变化。
6. 核盘菌侵染亚麻细胞时,无论是菌丝侵染叶片还是子囊孢子侵染花瓣,菌丝均出现凹陷现象;分析认为:这是菌丝侵染亚麻细胞所具备的特殊侵染机制,与其他核盘菌侵染植物通常形成突起或形成分枝,靠机械压力和分泌酶类侵入寄主细胞的报道不同。

关键词 核盘菌; 亚麻; 致病机理; 电镜观察

Abstract

Sclerotinia sclerotiorum(Lib) de Bary is a plant pathogen which can infect many plant hosts. To discovery more infection about the infection mechanisms by the pathogen,morphologic change in the microprocess of linseed infection by the fungus was observed in this study, and the differences between hypha and ascospore's in the process of infection to linseed were compared. The research of the paper can make more realization on *Sclerotinia*.

Sclerotium infection mechanism, and its also important to the theory study in the area. Through observation the result is as following:

1. when *Sclerotinia sclerotiorum* infect linseed, it can grow in cells, and between cells. It is same between hypha infecting leaf and ascospore infecting petal.
2. The ascospores of *Sclerotinia sclerotiorum* can not infect the leaf of linseed directly.
3. The process of infection depend most on enzyme to make *Sclerotinia sclerotiorum* entry into the host. At the same time, the growth stress of hypha also play some role in the destruction of cell structure.
4. Diameter of hypha is related to infection period, in the initial stage of infection, the diameter is small, in later stage, it is bigger.
5. In the process of hypha infection to linseed cell, hypha and linseed cell is interacted each other, that result in incisure of linseed cell wall through hypha's growth pression, hypha also changed its appearance.
6. When *Sclerotinia sclerotiorum* infects linseed cell, no matter hypha infect leaf or ascospore infect petal incisure of the hypha appearance all the time, it is analyzed that: it may be special mechanism of hypha to infect linseed cell, it is different from *Sclerotinia sclerotiorum* infecting host cell observed by others.

Keywords *Sclerotinia sclerotiorum*; linseed; infection mechanism; EM observation

目 录

└─┬─文摘

└─┬─英文文摘

└─┬─第 1 章绪论

└─┬─┬─1.1 课题背景

└─┬─┬─┬─1.1.1 植物病害与防治研究

└─┬─┬─┬─1.1.2 菌核病的研究与防治

└─┬─┬─1.2 核盘菌的生物学特性

└─┬─┬─┬─1.2.1 核盘菌概述

└─┬─┬─┬─1.2.2 核盘菌的形态学及生理学特性

└─┬─┬─1.3 核盘菌的致病机理研究

└─┬─┬─┬─1.3.1 组织病理学

└─┬─┬─┬─1.3.2 致病的生理生化机制

└─┬─┬─1.4 寄主抗菌核病研究

└─┬─┬─┬─1.4.1 抗病机理

└─┬─┬─┬─1.4.2 抗性遗传和抗病育种途径

└─┬─┬─1.5 本课题的研究目的及意义

└─┬─第 2 章实验材料与方法

└─┬─┬─2.1 材料

└─┬─┬─2.2 接种方法

└─┬─┬─┬─2.2.1 菌丝接种

└─┬─┬─┬─2.2.2 子囊孢子接种

└─┬─┬─2.3 透射电镜的样品制作

└─┬─┬─┬─2.3.1 取样与固定

└─┬─┬─┬─2.3.2 脱水

└─┬─┬─┬─2.3.3 渗透与包埋

└─┬─┬─┬─2.3.4 制作超薄切片

└─┬─┬─┬─2.3.5 染色

└─┬─┬─2.4 透射电镜的观察方法

└─┬─┬─┬─2.4.1 使用的仪器及设置

└─┬─第 3 章结果与分析

└─┬─┬─3.1 菌丝的侵染过程

└─┬─┬─┬─3.1.1 侵染 8 小时

└─┬─┬─┬─3.1.2 侵染 16 小时

└─┬─┬─┬─3.1.3 侵染 24 小时

└─┬─┬─3.2 子囊孢子的侵染过程

└─┬─┬─┬─3.2.1 侵染的花瓣

└─┬─┬─┬─3.2.2 侵染的叶片

└─┬─┬─3.3 侵染过程中菌丝形态的变化

└─┬─┬─┬─3.3.1 菌丝内含物的变化

└─┬─┬─┬─3.3.2 菌丝直径大小的变化

└─┬─┬─3.4 侵染过程中菌丝与寄主亚麻细胞之间的相互作用

□结论与下一步研究打算

□一、 结论

□二、 下一步研究打算

□参考文献

□哈尔滨工业大学硕士学位论文原创性声明及授权书

□致谢

第1章 绪论

1.1 课题背景

1.1.1 植物病害与防治研究

植物在生长发育及产品贮运过程中，常因致病生物侵犯或不适宜的环境条件不断的影响、干扰，破坏其正常的新陈代谢作用，使生理上、组织上和形态上发生一系列反常变化，造成产量降低，品质变劣，甚至整株死亡。这种违背人们栽培目的现象，称为植物病害。在作物种植中，病害是经常发生的，也是长期以来农业、林业等生产上最困扰的问题。如 1845 年爱尔兰马铃薯晚疫病大流行造成上百万人饿死和流亡；1943 年孟加拉邦水稻胡麻斑病大流行造成严重饥馑，竟导致二百余万人死亡。我国 1950 年小麦条锈病大流行，导致减产 120 亿斤，折合三千万人一年口粮。1983 年的枣疯病曾使淮河流域的枣树一株不留。据估计，每年因病害导致的农作物减产达成 10%以上^[1]。

不少病害除在田间危害外，还在产后的储藏、加工、运输的过程中继续发展，造成更大危害，使商贸部门和消费者遭受损失。植物病害除造成作物产量损失外，还降低产品品质，这在果品、蔬菜上为人熟知，有些病害甚至使产品含有毒素，食用后使人畜中毒，例如小麦赤霉病及病麦磨出的面粉食用后，轻则头疼、呕吐，重则有生命危险。又如以甘薯黑斑病薯作饲料，曾造成大量耕牛因患中毒性气喘病而死亡。黑麦和牧草的麦角若混入产品被食用，则会导致人畜中毒和流产。凡此种种，引起了社会上对植物防治的关切和重视。

由此可见，植物病害的流行不仅降低产量，有损品质而且会干扰作物栽培和品种使用，甚至有时会直接危害人体健康和恶化生活环境。局部田块的病害发生只减少当地农民的收成和经济收入，而大面积的病害流行则会影响到国计民生和社会生活的各个方面。

因此，研究植物的致病机制和防治机理，不仅理论上具有意义，在生产上更具有重大的经济价值。因此许多科学家一直努力研究植物的致病机制和防治机理，并在病害的综合防治上均取得了不少成就。造成病害的主要病原

有真菌、细菌、病毒、类病毒等几类^[2]。不同种类的病原物对寄主的致病破坏途径不同,目前已研究发现以下几种破坏方式:真菌产生破坏寄主细胞的酶类(如角质酶、果胶酶、纤维素酶、磷酸酶、蛋白酶等),使寄主组织软腐坏死;利用寄主的蛋白和核酸合成系统作为自身的增殖原料,多数病毒属于此类;分泌破坏寄主细胞膜和正常代谢的毒素;分泌阻塞寄主导管的物质,致使植株因养分运输被中断而枯萎;将自身的 DNA 片段整合到寄主 DNA 上,迫使寄主合成供自己生长的物质;产生植物激素,破坏寄主原有的激素平衡,导致生长异常。

对植物病害的防治,国际上均主张进行综合防治,即以农业防治为基础,同时因地制宜,合理运用化学防治、生物防治、物理防治等措施,兼治多种有害生物。但现在主要还是靠化学防治,化学防治也是迄今为止比较有效的防治手段;但化学防治存在很多弊端,不仅造成环境污染,而且防效不佳。现在人们已把注意力主要集中在植物病害的生物防治上。利用有益微生物制约有害微生物,是开发、利用微生物资源的重要研究领域之一,也是植物病害防治中最有潜力、应用前景最为广阔的有效途径之一。

目前,在国内外还有不少植物病害,其防治还未能尽如人意,其规律还未能完全掌握,对其致病机理还不甚了解,还有不少问题有待进一步研究解决。如菌核病的流行,一般发病率在 10%~30%,严重者达 80%以上^[3];对作物的产量和质量均造成很大的影响。

1.1.2 菌核病的研究与防治

菌核病是一种真菌性病害,其主要特征是菌丝体能形成菌核病在菌核上产生长柄子囊盘。子囊盘盘状,呈褐色。盘上有外露的子囊和侧丝组成的子实层。菌核是传播侵染的主要病原。它由菌丝密集硬化而形成,外表灰黑色,形如鼠粪。当年形成的菌核潜伏在病株残体,或随腐烂的残秸散落在田里。菌核在土壤中可存活 10 年。菌核经冬眠,翌年在适宜的条件下,萌发产生菌丝体和子囊盘^[4],盘上子囊内有 8 个无色椭圆形子囊孢子,其大小 $6 \sim 13\mu\text{m} \times 4 \sim 6\mu\text{m}$ 。成熟的孢子随气流、雨水传播、侵染;菌丝体随鸟粪、昆虫及气流传播,造成植物发病。

核盘菌可以侵染很多种植物。近 20 年来,菌核病造成的经济损失越来越大。在美国内布拉斯加^[5],1973 年由于菌核病的发生,造成了 20% 的蚕豆颗粒无收,经济损失达 1200 万美元。在塔斯马尼亚,菌核病曾经造成了

30%以上的莴苣死亡。在欧洲,由于油菜、豌豆种植面积的扩大,菌核病已经成为一个潜在的危险性病害。在我国,核盘菌几乎在全国都有分布。为害犹大。

核盘菌可以给寄主带来各种各样的危害。它可以引起寄主茎腐、叶腐、果实腐烂和根系的腐烂。该病的主要症状(以油菜为例)是在叶的表面上产生圆形或不规则形水浸状病斑,病斑中心灰褐色,中层暗青色,外围具黄晕。空气干燥时,病斑破裂穿孔,发展缓慢;空气潮湿时,病斑上菌丝蔓延迅速,全叶腐烂。在茎秆上产生梭形或长条形病斑,后期病部皮层破裂,维管束外露似麻。发病组织在空气干燥时萎缩干枯,潮湿时则长出白色棉絮状菌丝。病害中后期,在病部器官内部或表面形成黑色粪状菌核。

当环境条件适宜于病原时,上面各种情况均可发展成寄主整株的死亡,死亡率高时,可导致作物产量的严重损失。据报道,在我国东北菌核病发生严重时可使向日葵产量下降45%以上,百粒重降低31%,容重和种仁重也随之下降,而皮壳率却增加32.37%。油菜菌核病能导致油菜籽千粒重的降低。在我国南方一般情况下,引起减产15%左右,严重时超过30%。大豆菌核病在黑龙江省引起的产量和损失日趋严重据统计,1986年减产7546万公斤;1987年减产1.029亿公斤。油菜菌核病是南通市油菜上主要病害之一^[6]。常年自然病株率20%~30%,自然病指10~15。2001年该病特大发生,病情为历史上所罕见。全市5月中旬309块典型田块调查,自然病株率1%~100%,平均76.7%,自然病指0.3~100,平均62.3,造成产量损失平均在3成以上,严重影响了油菜的产量和品质。

菌核病还能导致种子质量的改变。它能使葵花籽的含油量、脂肪酸含量发生变化,只有蛋白质含量相对稳定。另外,在吉林省菌核病使葵花籽的含油量下降27.05%,蛋白质含量下降17.14%。对油菜种子来说,种子感病后,使其表面粗糙、失去光泽、干瘪灰白、体积变小。

研究和防治菌核病已经成了广大科技工作者当务之急的一项大任务。防治菌核病除了常规的农业轮作、深耕、中耕、把种子进行处理,用火烧去地面的作物残体并进行合理施肥。并采取一些合理的规避,时间上花期避开子囊盘萌发期,或形态上不出现可以造成侵染的部位,如无花瓣。但更主要的方法还是化学防治。如使用杀菌剂、除草剂和能够抑制菌核形成或子囊盘萌发的化学药剂。多菌灵曾在实验室内有效地抑制了黄瓜菌核病的蔓延而得到广泛的应用^[7]。菌核净、复方菌核净超微粉对油菜菌核病有很好的防治效果,亩有26.7克有效成分时防效均达80%以上^[8]。但化学防治弊端较多,

相反,生物防治则受到较多的关注。

迄今为止,对核盘菌生物防治的研究主要集中在从土壤中筛选拮抗真菌以及测定这些真菌对土壤中菌核存活的影响。据报道现在已知有 30 种以上的真菌、细菌或其他生物对核盘菌具有寄生性或拮抗作用^[9]。研究主要集中在木霉、粘帚霉、盾壳霉等属的一些种,尤其绿色木霉已被用于多种作物。绿色木霉能产生短分枝或类似稀奇的结构作用与向日葵菌核菌的敏感菌丝,损害细胞或使之解体,能产生木霉素^[10]及抗菌素肽等抗菌物质,还可分泌几丁质酶和 β -1,3-葡聚糖等细胞壁降解酶。

1.2 核盘菌的生物学特性

1.2.1 核盘菌概述

核盘菌[*Sclerotinia sclerotiorum*(Lib)de Bary]属于真菌门(Eumycota)子囊菌亚门(Ascomycotina)盘菌纲(Discomycetes)柔膜菌目(Helotiales)核盘菌属(*Sclerotinia*)。

关于对该菌的研究,自 1837 年 M. A. Liber 开始为它命名到现在,已有 150 多年的历史。在我国,对核盘菌的研究开始于 1927 年,至今也有 60 多年。

核盘菌在世界上分布很广,在英国、德国、法国、意大利、爱尔兰、芬兰、波兰、前苏联、罗马尼亚、希腊、瑞典、荷兰、美国、见阿达、秘鲁、巴西、智利、澳大利亚、埃及、刚果、肯尼亚、毛里求斯等许多国家都有该菌的危害。该菌虽然属于世界性病害,但在温带地区发生的更频繁、危害更严重。

核盘菌是一种兼性寄生真菌。它可以广泛地侵染很多种单子叶和双子叶植物。除危害多种栽培作物外,还能寄生在野生植物上。它不仅在植物生长发育期危害,在贮藏期间以及在许多种植物的残枯上都能营腐生生活,并形成菌核。核盘菌的寄主范围非常广泛。核盘菌能够侵染 75 个科 278 个属 408 个种及 42 个亚种或变种植物^[11],包括重要的经济作物如油菜、大豆、向日葵、莴苣及十字花科蔬菜。

核盘菌的生活周期,核盘菌可以通过菌核萌发或被侵染寄主上的菌丝侵染寄主,也可以通过子囊盘喷射的子囊孢子侵染寄主。菌丝侵染是某些作物的主要途径,但对多数作物来说,子囊孢子侵染更为重要。子囊孢子侵染寄

主的时候,对营养条件有比较特殊的要求。例如:子囊孢子往往要通过侵染寄主的花瓣去侵染寄主的其他健康部位,而不能直接侵入寄主健康的茎叶。

在高湿的条件下该菌侵染寄主比较迅速,开始时在寄主表面引起水渍状病斑,逐渐扩展并在寄主表面生出白色棉絮状霉层,很像棉花。同时,寄主组织因菌丝的生长而瓦解腐烂。最后,菌丝在寄主体内或体表集结,变黑,逐渐形成菌核。落入土壤的菌核度过休眠阶段后,即可萌发菌丝又能萌发子囊盘,产生子囊孢子。菌丝和子囊孢子在适当的条件下,再侵染寄主。

1.2.2 核盘菌的形态学及生理学特性

在电子显微镜下,人们在该菌侵染寄主的过程中,观察到了大小不同的两类菌丝:①侵入丝,其直径较大,约 $17\mu\text{m}$,主要分布在细胞间;②由侵入丝分枝而来的菌丝,其直径较小,约 $8.5\mu\text{m}$,既分布于细胞间又可钻进细胞内。

该菌的菌丝还能在培养基和寄主表面形成一种叫附着器的机构。附着器是由菌丝的末端,以二歧分枝方式进行多次分枝而形成的。它们是膜质的,着色较深。具有紧紧地附着在寄主表面或其他物体表面上的功能。

菌丝的生长温度一般在 $0\sim 32^{\circ}\text{C}$ [12],然而不同地区不同菌株可能有所不同。最适生长温度在 $15\sim 25^{\circ}\text{C}$,菌丝侵染寄主的温度范围在 $0\sim 29^{\circ}\text{C}$,以 $12\sim 25^{\circ}\text{C}$ 为最适, 10°C 以下菌丝的侵染能力显著降低, 30°C 以上完全不能侵染寄主。

该菌能够生长的酸碱度范围较宽,从 $\text{pH}2\sim 12$ 均能生长,最适生长范围偏酸性,草酸就是该菌在侵染寄主组织和在培养基上生长时产生的,它可以降低基质中的碱性,以利于菌丝对寄主的侵染。

许多研究表明,只要培养基里含有基本元素和简单的碳原,该菌的菌丝就能生长。还有相对湿度和空气中二氧化碳与氧气的含量对该菌菌丝也有不同的影响。

该菌的菌核为黑色,椭圆、肾形、圆柱形或不规则形。菌核都由菌丝组成。在初始阶段,菌丝集结形成分散的菌核原基,菌核原基白色、颗粒状。在生长阶段,菌核原基迅速长大,直到长到菌核的大小。在成熟的阶段,菌核的大小不再增长,这时期的特点是在其内部进行一系列代谢活动,如脱水作用、表面着色等。当菌核完全成熟时,就能抵抗各种不良环境的影响了。另外,菌核还能作为休眠体在该菌的生活史中起重要作用。

菌核的一个重要特点和功能就是能够在不利的环境条件下长期存活。与菌核相比,该菌的菌丝和子囊孢子的存活时间要短得多。据 Newton (1972) 观察,子囊孢子在干燥的条件下可以存活几个月,菌丝在寄主里比在培养基上存活的时间长,然而菌核的存活时间可达数年之久。尽管菌核不能直接侵染寄主,但由于菌核可以形成少量的二代菌核,土壤里的菌核数目可能有所增加,这无疑对该菌菌原的增加、菌核病的流行具有一定的作用。

有许多因素对菌核存活时间的长短有影响,如不同的土壤对菌核存活时间有影响;据 Schmidt, H. H. (1970) 观察,菌核在种植作物的土壤里要比在未种植作物的土壤里存活期长。菌核的大小和形状对菌核的存活时间也有不同程度的影响。菌核的大小主要影响其贮存营养物质的多少,而菌核的形状主要影响其表面积的大小,从而通过增加或减少接触干燥环境和寄生性微生物的机会来间接地影响菌和自身的存活。

还有一些生物影响菌核的存活时间,如土壤中存在的土壤微生物。根据 Adams^[13]、Ayesy^[13]、Watson^[14] 等人的观点,影响土壤中核盘菌菌核存活的最主要因素是土壤微生物。因而推测,环境因素对土壤中核盘菌菌核存活的影响更可能是通过影响土壤微生物区系的活动而实现。土壤巾存在着多种与核盘菌菌核存活有关的真菌、细菌、放线菌。李金秀等用菌核埋植法研究油菜土壤巾存在着与核盘菌菌核存活有关的真菌区系^[15]。从四川省内江、简阳和雅安三地土壤中共分离到菌核重寄生真菌 117 株,分布于 10 个属内:曲霉 (*Aspergillus* spp.)、交链孢属 (*Alternaria* spp.)、小盾壳霉 (*Coniothyrium minitans*)、镰刀菌 (*Fusarium* spp.)、粘帚霉 (*Gliocladium* spp.)、毛霉 (*Mucor* spp.)、青霉 (*Penicillium* spp.)、根霉 (*Rhizopus* spp.)、木霉 (*Trichoderma* spp.) 和轮枝菌 (*Verticillium* spp.)。盾壳霉是发现最早的菌核寄生菌。由于其在菌核病生物防治上的意义,近年来的研究进展很快。小盾壳霉对不同寄主上的核盘菌菌有寄生作用^[16]。小盾壳霉是以其菌丝的顶端部分直接侵入寄主菌丝,并不形成附着孢^[17]。在侵入寄主菌丝不久就看到寄主菌丝逐渐收缩、崩溃^[18]。被寄生的菌核既不能产生菌丝,也不能产生子囊盘。

食菌核甚孢霉也是一种很有潜力的菌核生防菌,其孢子萌发后,芽管可向寄主菌核所在的位置继续生长^[19]。电镜观察表明,该菌在与菌核接触后并不形成特殊的侵染结构,推测也无酶类参与,而可能主要是靠机械的力量侵入皮层。侵入后,该菌菌丝可在皮层和髓部的细胞间活跃地生长,并在皮层和髓部细胞内形成菌丝状、末端具数量不等的分枝的结构。该结构可穿透

寄主细胞壁，并致细胞壁在穿透位点发生领状加厚，但寄主细胞膜并不破裂。该结构的活跃代谢期是在接种后 15 到 30 天，这与该菌的产孢高峰期相吻合。40 天以后，该结构基本消解，产孢过程也基本结束。

杨谦、张翼鹏的研究表明^[20]，营养、温度、干燥、土壤深度等因素对核盘菌萌发子囊盘、形成子囊孢子有影响。PDA 培养基上培养的四种菌株的菌核均未萌发产生子囊盘柄。麦粒培养基上培养的试验菌株的菌核，在 20℃ 下保湿培养 3~7 周后，陆续开始萌发出子囊盘柄。5 周后各菌株菌核的平均萌发率为 53%。据 Bedi (1963) 报道，营养条件对菌核能否萌发子囊盘影响很大。他指出，只有在营养适中的条件下培养出来的菌核才能正常萌发产生子囊盘；当营养不足时，只能产生发育不正常的子囊孢子；而营养过剩时，菌核完全不能产生子囊盘。根据观察结果，PDA 培养基对试验菌株来说，可能不适合培养菌核产生子囊盘。按照 Bedi 的论点，PDA 应属营养过剩型。

他们还认为，该菌的不同地区的菌株的菌核对低温处理的反应不一样，这与 Willetts 和 Wong (1980) 的低温处理并不是核盘菌萌发产生子囊盘所必需的论断一致。此外，从菌核对（保湿培养时）温度的反应来看，20℃ 要比 10℃ 时萌发产生子囊盘快些。

干燥后的菌核都失去了产生子囊孢子的能力，这与 Grogan 和 Abawi (1974) 的报道一致，干燥后的菌核虽然还保持着生命力，但却不能萌发出子囊孢子。

菌核在土壤中的不同深度，对其萌发的子囊盘的能力有所影响。随着土壤深度的增加萌发率降低。这位结合耕作措施进行该病的防治，提供了更好的根据。

菌核在有光条件下才能产生子囊盘。郑焕铸^[21]指出：油菜菌核病发生的严重度与植物疏密有关，密植发病轻，疏植发病重。他们分析认为可能是单位面积上株数增加以后个体植株所占营养面积缩小，其所得养分也就少了，在此情况下，植株组织生长粗老，病原菌不易侵入，故发病率就相对减少了。徐卫东认为，密植后地面上的光照强度就减弱了，菌核产生的子囊盘少或不产生，这样菌源少，故菌核病就轻。

1.3 核盘菌的致病机理研究

病害的发生是一个非常复杂的动态过程，一方面它取决于病菌侵入寄主

的内在能力, 另一方面寄主存在一定的抵抗能力, 而且外界环境条件也有一定的影响, 弄清三者之间的关系及作用机理对防治菌核病害具有重要的意义。

1.3.1 组织病理学

菌核菌通过两种方式侵入寄主: 萌发的子囊孢子和由子囊孢子及菌核所形成的菌丝。前者只有在营养条件允许的情况下才能形成附着胞进入寄主。DeBary^[22]首先试验, 将菌核菌子囊孢子放在加有营养物质的寄主表面时, 它能萌发产生菌丝并侵入寄主, 但如果只放一滴水则尽管孢子能萌发却不能进入寄主。随后 Purdy^[23], Abawi^[24]等证明了这一现象, 而且尽管子囊孢子萌发时产生一些可扩散物质进入张开的气孔, 但它只能通过角质层直接进入寄主。菌丝体是菌核菌侵入寄主的基本方式。20 世纪 70 年代大量研究报道了菌核菌的侵染过程, 包括接触、侵入、侵染的早期阶段和侵染的后期阶段。与豆科作物上病菌能从寄主的角质层和表皮细胞侵入, 也能通过张开的气孔侵入有所不同, 油菜菌核菌丝体除从寄主表皮直接侵入外, 还可沿着保卫细胞内侧间接侵入表皮细胞。病菌侵入前能形成单一菌丝顶端膨大的单附着胞和多细胞组成的复合侵染垫两种结构。杨谦^[25]的观察结果是: 该菌首先在叶片上形成复合附着器, 每个分枝末一般生出一个侵染钉, 侵染钉侵入叶面腊质、角质层和表皮细胞壁时, 不仅靠附着器的压力而且借助于酶对寄生表面的软化、消解作用。该菌通过角质层和表皮细胞壁侵入油菜叶片, 尚未发现通过气孔侵入的现象。侵入叶片后该菌的继续生长导致油菜组织溃烂。吴纯仁^[26]进一步研究指出, 病菌侵染过程包括叶片表面形成侵染垫、机械侵入寄主表皮、侵染菌丝细胞间扩展及分枝菌丝的胞间扩展。

1.3.2 致病的生理生化机制

菌核病致病机理比较复杂, 但病原菌致病基因编码着一系列侵染寄主植物所必须的产物, 包括降解寄主细胞壁和角质的酶类, 破坏寄主细胞结构的真菌吸器以及分泌破坏寄主细胞膜和正常代谢的毒素等。尽管菌核菌致病因子及各因子的作用机理还有许多需要探索的地方, 而细胞壁水解酶和草酸在致病中有一定的作用则广泛被人们所接受, 围绕这两方面的研究也在不断展开。

1.3.2.1 细胞壁水解酶

(1) 果胶酶: 果胶酶被认为与病菌的致病力密切相关, 它们能较迅速广泛地降解寄主细胞壁组成成分, 导致寄主发病。多聚半乳糖醛酸酶 PG(Polygalacturonase) 是包括菌核菌在内许多真菌产生的细胞壁降解酶, 对其研究亦较多。Lumsden^[27] 在接种菜豆 12h 后, 检测到 PG, 24h 后, 酶活性达到高峰, 并建立了不可逆转的侵染关系。随后酶活性下降, 直至 48h 形成了病斑, 酶活性又开始升高。酶活性第一高峰为内切 PG(endo-PG)。RaiJN 等^[28] 以抗感芥菜型油菜品种各 1 个为材料, 接种菌核菌(茎)7d 后测定 PG, 结果表明, 健康组织中无 PG, 抗病品种 PG 活性低于感病品种。JohnPR 等^[29] 通过培养(菌)分离纯化 PG 后确定了其一系列的生化参数: 分子量为 43000, k_m 为 0.69mg/mL, V_{max} 为 620 μ mol/min.mg, 最适温度为 42℃, 最适 pH 值为 4.2。Shashi^[30] 等报导了培养的病菌和被侵染的芥菜型油菜植株中, 果胶转硝酶 PTE(Pectintranseliminase) 和 PG 的活性与病菌的致病力有关, 在抗病寄主中活性比在感病寄主中活性低, PME(Pectinmethylesterase, 果胶甲脂酶), 也是早期发现与菌核病发生有关的酶, 其最适 pH 为 5.0。

(2) 半纤维素酶和纤维素酶: 纤维素为细胞壁的组成成分, 而病菌分泌的 Cl 酶和 Cx 酶将纤维素降解为可溶性纤维二糖, 再由 β -葡萄糖苷酶将纤维二糖降解为葡萄糖^[31], Cx 最适 pH 值为 3.0^[30]。另外, 病菌还分泌一些酶如磷酸脂酶、蛋白质水解酶等与其致病力有关。

1.3.2.2 草酸

DeBary 首次认为草酸与菌核菌的侵染有关, 以后 MaxWell^[32] 和 Lumsdem^[30] 从菌核菌侵染的大豆组织中检测到草酸盐的存在。而 Rai 首次证实了油菜菌核病中草酸毒素的存在。吴纯仁^[33] 对罹病组织中草酸积累和分布晶体结构进行了研究, 进一步证明了草酸在油菜菌核病致病中的作用。GodoyG^[34] 等将大豆上采集的菌核诱导产生子囊孢子, 然后对子囊孢子进行紫外光照射诱变产生了不产草酸的突变体, 以突变体对大豆叶、荚进行接种发现, 两者都不发病, 然而病菌在离体培养时却产生 PG, PME, Cx 三种降解酶, 由此他认为草酸是菌核菌致病的决定因子而水解酶则在致病中几乎不起作用。不过草酸的作用机理至今尚不清楚, 据推测主要有以下几点: 1 草酸降低了寄主细胞的 pH 值, 从而有利于病菌的细胞壁降解酶的活性, 加速了寄主细胞解体。因为这些酶如内或外 PG、纤维素酶、半纤维素酶都是酸性酶, 病组织中在 pH4 条件下这些酶的活性是 pH6 条件下的 3~7 倍。2 草酸抑制了与抗性有关的酶和光合作用的酶活性。3 草酸和钙结合成草酸钙

晶体有可能堵塞导管或维管束而导致萎蔫。4 草酸对寄主细胞的直接毒害作用,表现在草酸有强的离子螯合能力,能改变寄主细胞膜透性,引起电解质丧失,破坏叶绿体结构,为病菌提供了营养和生存环境。

1.3.2.3 致病机理

菌核病致病机理比较复杂,但病原菌致病基因编码着一系列侵染寄主植物所必须的产物,包括降解寄主细胞壁和角质的酶类,破坏寄主细胞结构的真菌吸器以及分泌破坏寄主细胞膜和正常代谢的毒素等。果胶酶与病原菌的致病力密切相关,能迅速降解寄主细胞壁的组成成分,导致寄主发病;病原菌侵染寄主时,为摄取所需要的营养物质,产生内源多聚半乳糖醛酸酶(PG)来分解寄主细胞壁的主要成分高聚半乳糖醛酸,形成降解产物低聚半乳糖醛酸。当病菌侵染菌丝通过组织的细胞侵入时,产生 3 种果胶酶降解细胞壁中胶层,在病程的早期主要是内 PG,通过 PME 使果胶脱甲基后再由 PG 水解,使病菌在细胞间迅速扩展。在发病后期 PME 也有活性,此时外 PEM 更活跃,外 PG 水解果胶盐比果胶更迅速,外 PG 和 PEM 除有降解中胶层果胶的作用外,还可能对侵入组织的病菌的营养和发育起作用。Singh^[35]以抗、感油菜品种为材料,接种病原菌后测定 PG,结果表明抗病材料 PG 活性低于感病材料,健康组织中没有 PG。在整个病程中,病菌的营养可能是决定病菌在寄主中建立寄生关系成败的重要因素。侵染前基物的可利用性是侵染成功的先决条件。病菌侵入组织后,需要大量的能源,只有丰富的易利用的营养才能提供,纤维素酶、半纤维素酶、外 PG、磷脂酶、蛋白质水解酶和其他酶类在发病过程中可能起一种分解寄主组织提供营养的作用。当侵染菌丝通过寄主组织迅速扩展时,这些酶类对细胞壁和细胞内含物的作用,基本上为病菌提供了丰富的碳源和氮源。降解细胞壁的酶类、各纤维素酶可由病菌的分枝菌丝产生,使细胞广泛被降解,因而提供了丰富的可利用的碳水化合物,使侵染菌丝尖端后的分支菌丝能在细胞间充分分支与定植,接种后第二天侵染组织中纤维素含量稍减少,就是一个例证,半纤维素酶也一样。病菌生长和产生细胞外酶所需的氮源可能由磷脂酶和蛋白酶提供。

1.4 寄主抗菌核病研究

1.4.1 抗病机理

1.4.1.1 预存防卫系统

包括有 5 种机制：

(1)细胞壁加固。植物受到菌核病侵染时，细胞壁产生快速木质化和羟脯氨酸蛋白积累，增加寄主细胞壁的强度，提高对病原菌的抵抗力^[36]。此外，更重要的是可能阻止病原菌与寄主某些识别作用有关的信号分子的渗透和交换，从而阻止或延迟病原菌侵染垫和附着胞形成，使寄主表现抗病。

(2)合成酚类氧化物。植物被病原菌侵入后产生自身保护反应，寄主体内积累酚类化合物，使某些酶活性增强，特别是能提高或诱导一些病程相关蛋白。酚类化合物氧化产生的酚类氧化物对病原菌有一定的毒性，而酚类氧化物与多酚氧化酶(PPO)和过氧化酶(PO)有关。PPO 和 PO 含量的增加会提高酚类化合物的含量，参与寄主抵抗病原菌的保卫反应^[37]。同时，过氧化酶在酚类聚合成木质素中起着重要作用，木质素含量的增加为阻止病原菌侵染寄主提供了有效的保护圈。

(3)合成植保素。植物受到病原菌侵入后常产生一些具有抑菌活性的小分子化合物—植保素，其积累浓度与寄主对特定病原菌的抗性呈正相关。植保素在寄主受病原菌侵染的细胞周围起化学屏障作用^[38]，抗病植株积累植保素的速度较快，感病初期可达高峰，而感病品种积累速度较慢。因此，通过导入植保素合成所需的有关酶基因，可提高寄主体内植保素合成和积累水平，即提高抗病性。

(4)木质素含量增加。病原菌侵染寄主后会引引起寄主细胞壁改变，主要表现为木质化过程加强，即木质素含量增加加大了病原菌穿透细胞膜的壓力，增强了细胞壁抗酶溶作用，产生低分子酚类前体及多聚产物以钝化和破坏病原菌膜，限制病原菌酶和毒素向寄主体内的扩散，也限制寄主细胞内水分及营养物质向病原菌扩散，导致病原菌得不到营养而死亡^[39]。木质素作为细胞阻止病原菌入侵的第一道屏障，在植物防卫反应中起着重要作用。

(5)几丁质酶和 β -1, 3-葡聚糖苷酶。这 2 种酶能水解菌核病菌丝细胞壁的主要成分几丁质和葡聚糖。不少体外实验表明，几丁质酶活性增加对于细胞壁中含有几丁质的真菌有抑制作用^[40]。在丝状真菌的顶端生长中，几丁质和 β -1, 3-葡聚糖在菌丝顶端同时合成。多糖交联形成了几丁质，葡聚糖或其它多糖。顶端暴露的几丁质链会被几丁质酶所水解，但在成熟细胞壁中，几丁质却能抗几丁质酶的降解。用几丁质酶作用于真菌未成熟的细胞壁，顶端出现了膨胀和溶解。这两种酶有 3 种以上的类型：第 I 类为碱性酶，分布在液泡中，在体外有较强的抑菌活性，可直接破坏菌核病菌丝顶端新合成的几丁质而抑制病原菌的生长；水解几丁质，致使病原菌死亡；产生

的细胞壁碎片具有诱导物作用，刺激植物的抗病反应。第Ⅱ、Ⅲ类为酸性酶，分布在细胞间隙内，体外几乎无抑菌活性，可能与诱导早期防卫反应有关^[41]。

1.4.1.2 诱导防卫系统

由病原物侵染形成的诱导防卫系统包括过敏反应和系统抗性。过敏反应是指寄主受到非亲和病原菌侵染后，在侵染部位出现局部保护反应，表现侵染部位产生枯斑，细胞出现程序死亡，从而导致病原菌不易获得营养，同时诱导周围细胞积累抑制病原菌侵入的物质，限制病原菌增殖。寄主中存在一种与物理或化学障碍、植保素合成和过敏性反应不同的抗病机制，即系统获得性抗性，某种可移动转导的信号因子可引起一些编码抗微生物活性蛋白基因的表达，如蛋白酶抑制等病原相关蛋白基因。目前的研究集中在水杨酸(SA)上，因为它是介导寄主由局部过敏反应到产生系统获得抗性的信号分子。Chen 等纯化得到的 SA 结合蛋白是过氧化氢酶，而过氧化氢酶和各种形式的活性酶在病原—寄主识别反应的早期就会积累，所以过氧化氢酶在寄主抗病反应中也起着重要的作用^[42]。Neuenschwande 等^[43]认为寄主受病原菌侵染后，体内 SA 水平提高，SA 与 SA 受体结合，抑制过氧化氢酶的活性，导致体内过氧化氢水平提高及自由基产生，从而激活抗病反应途径中相关抗病基因的表达。

1.4.2 抗性遗传和抗病育种途径

1.4.2.1 抗性遗传

尽管对菌核病原菌免疫的油菜品种还没有发现，但是寄主品种或种质的抗性变异是广泛存在的。抗感品种杂交研究^[44]、过氧化物酶及抗病斑扩展速率的研究^[42]表明抗性可以遗传，由多基因控制，广义遗传力在 40%~70%。DicksonMH^[45]在甘蓝和花椰菜抗性遗传研究中结果为，抗性受隐性基因控制，其遗传力分别为 $h=0.82$ 和 0.58 。而 Baswana^[46]对花椰菜抗菌核病遗传研究指出，抗性受隐性多基因控制，有加性效应。从目前油菜和其它十字花科作物对菌核病抗性遗传研究结果来看，抗性不是受简单的一对或几对基因控制，故直接通过遗传工程方式导入抗性基因是困难的，但是可以通过杂交和选择来提高油菜品种的抗性。

1.4.2.2 抗病育种途径

(1) 杂交和选择：利用目前筛选出的高抗(耐)品种进行杂交以及根据

抗性与其形态性状的关系进行选择仍是一条有效的途径,如中油 821、中双 821 均达一定抗性水平,在生产上推广。法国向日葵杂交种 INRA4701 和美国杂交种 896 均耐菌核病。原苏联遗传所选育的杂交种黎明和奥德萨 63 对菌核抗性较强。

(2) 无花瓣育种:花瓣是传播油菜病害(如菌核病等)的重要媒介,它不仅是病原菌的初次侵染源,为病原菌的生长提供重要的能源,而且随着花瓣飘落在叶片上,形成再次侵染,为病害的扩展和蔓延提供条件^{[47][48]}。Jamaux 等利用扫描电镜观察证明,油菜菌核病菌子囊孢子只有落在花瓣上才能萌发形成菌丝,并侵染叶片和茎秆,如果子囊孢子直接落在叶片上则无法萌发生长^[49]。陈玉卿等观察油菜花器带菌率发现,花瓣带菌率平均达 92.3%,其它花器官如花萼和雄蕊的带菌率也在 90%以上,无花瓣油菜因缺少花瓣,花器官的总带菌率比常规品种平均下降 34.1%,从而大大降低了病害的发生机率。傅寿仲等报道,无花瓣品种发病率明显低于有花瓣品种,田间发病率下降 80.2%~94.8%^[50]。Rakow 等调查表明,无花瓣品种菌核病发病率和严重度分别为 9.0%和 6.6%,而对照品种“ACEExcel”分别为 32.5%和 27.5%。因此,无花瓣油菜的形态避病作用十分明显。但在菌丝块接种条件下,无花瓣品种的抗病性并不优于有花瓣品种。在目前油菜菌核病抗源缺乏的条件下,避病性值得高度重视。

油菜花瓣的形成、伸展和呼吸都需要消耗大量的光合产物^[51]。花期正是油菜生长最旺盛的时期,无花瓣油菜因无需发育形成花瓣,从而可以节省大量能量,如果这些节省的能量全部流向籽粒,则理论上可增产 15.6%。油菜的产量潜力与开花前的干物质积累密切相关,而是否能实现这一产量潜力,则取决于开花后的光合作用及同化产物向种子的转移,而无花瓣则可以提高光能利用率,理论上可以提高产量。因此,花期是正常油菜由于存在花瓣,对花粉的扩散和传播产生一定的影响;而无花瓣材料因去除了花瓣,使花粉更易扩散,有利于传粉和结实。油菜无花瓣性状优点突出,因此被作为构建油菜理想株型的重要性状之一。在无花瓣常规品种选育方面,Advanta 种子集团的 Pacific 种子子公司利用 Buzza 等获得的无花瓣突变体与双低品种杂交,通过多代选育,于 1999 年育成无花瓣品种“Hylite200TT”,已在澳大利亚登记。该品种属早熟甘蓝型双低无花瓣品种,耐除草剂(Trizine),但感黑胫病,且长势较弱,产量不突出。Advanta 集团 2000 年还在加拿大育成了双低无花瓣品种“Hylite201”,该品种特早熟、矮秆、抗倒,易于收获,抗黑胫病,中耐菌核病,长势有所改善,产量在早熟品种中表现较好。

傅寿仲、张洁夫等利用无花瓣材料 APL 0256 与单、双低油菜品种杂交, 已育成优良无花瓣品系“无花瓣 1 号”、“无花瓣 2 号”和“无花瓣 3 号”, 并获得了 2 对无花瓣近等基因系“NIL APL01”、“NIL PL01”和“NIL APL02”、“NIL PL02”。

在甘蓝型油菜 (*Brassica napus*) 中, Buzza^[52] 首次报道了从 Canola 中获得了几乎没有花瓣的突变品系。刘后利等^[53] 从甘白杂种的白菜型后代中, 也发现了无花瓣的突变体, 从全株花朵均无花瓣到大部分花朵无花瓣。蔡明等^[54] 以甘蓝型油菜与埃塞俄比亚芥种间杂交得到了一批无花瓣性状的油菜, 其菌核病发病率大大降低。傅寿仲^[55] 从遗传、生理、抗性 & 农艺性状等方面对无花瓣种质进行了系统研究, 发现无花瓣遗传性稳定, 受 2-4 对隐生基因控制, 在形态避病、生态抑病等方面具有极高的育种潜能, 是进一步选育抗菌核病油菜品种的重要种质资源。

将无花瓣性状与杂种优势利用相结合, 选育无花瓣杂交油菜, 是解决现有无花瓣材料长势普遍较差的有效途径。主要包括无花瓣细胞质雄性不育三系杂交种与无花瓣细胞核雄性不育二系或三系杂交种的选育。傅寿仲等已将无花瓣性状导入 MICMS 细胞质雄性不育三系, 获得了无花瓣 MICMS 系统细胞质雄性不育系、相应保持系及其恢复系, 正在进行强优势组合的筛选工作, 另外已获得无花瓣显性细胞核雄性不育系, 正在转育恢复系, 无花瓣隐性细胞核雄性不育系也正在选育之中。

(3) 组织培养: 组织培养作为克服远缘杂交不育性和创造新的变异类型的人工方法已广泛地应用抗病育种。已有许多研究指出草酸可以作为选择剂用于油菜愈伤组织抗菌核病突变体的筛选^{[56][57]}。WuCR^[58] 研究表明, 草酸对抗病品种 083 愈伤组织的抑制明显比感病品种 Hua8 弱。吴力游和高必达^[59] 以草酸作为筛选剂处理油菜愈伤组织, 获得耐草酸毒素的突变体, 分化培养后得到少量再生植株。黄剑华^[60] 采用小孢子花药培养, 平阳毒素诱变和草酸胁迫相结合的方法, 诱导和筛选出油菜抗病突变体。赵云等^[61] 用 EMS、NaH₃ 诱变处理甘蓝型油菜愈伤组织, 以草酸为选择剂进行抗性筛选, 经 2%EMS 处理油菜愈伤组织并扩增 3 代后, 从 872 块油菜愈伤组织中筛选到 7 块抗草酸愈伤组织, 且愈伤组织中多酚氧化酶和过氧化酶活性都有显著提高。由此看来, 以当前筛选出来的高抗品种为材料进行组织培养诱导产生突变体有可能产生更好的抗病材料。

(4) 基因工程: 因未发现免疫材料, 而且抗性不是受简单的几对基因控制, 所以还不能采取基因工程的方法将抗性基因从一个寄主品种引入到另

一个寄主品种中。

近年来,随着基因工程技术的发展以及油菜转化体系的建立,许多学者通过基因工程的手段研究油菜的抗病性。郭学兰等^[62]将玉米转座子导入甘蓝型油菜的具柄子叶,获得转基因植株。通过对 T0 代及其自交后代 T1 分析,发现转座因子在转基因油菜中具转座活性,田间调查表明转座因子阳性比例的提高与菌核病病情指数的下降呈线性相关。然而,已知几丁质是许多真菌细胞壁的构成成份,一些杀菌剂的作用机制是抑制几丁质合成真菌除卵菌外,细胞壁都含有几丁质,其中子囊菌、担子菌和半知菌的细胞壁含有几丁质和葡聚糖,接合菌的细胞壁含几丁质和聚氨基葡萄糖。一些杀菌剂如异稻瘟净的作用机制已查明是抑制几丁质合成。而几丁质酶基因可以催化其水解,从而抑制病菌的生长繁殖,所以人们试图将几丁质酶基因转入寄主品种中来达到抗病的目的。1991 年, Broglie 等首次报道转几丁质酶基因的植物抗真菌病^[63]。他们将菜豆几丁质酶基因置于 CaMV35S 启动子控制下,转入烟草和油菜,转基因植物组成型表达菜豆几丁质酶基因,死苗率大大降低,病情发展减慢。Grison 等^[64]将几丁质酶基因通过农杆菌转入冬油菜品种中,其抗病性显著提高。Broglie^[65]从菜豆中分离出几丁质酶基因,并将其与 CaMV35S 启动子相连构建植物表达载体转化油菜,结果转基因植株对菌核病具有一定的抗性,几丁质酶表达量越高其抗性也越强。蓝海燕利用农杆菌介导转化方法将抗菌核病的 β -1, 3-葡聚糖苷酶基因导入油菜中,获得了保持优良性状的抗菌核病的转基因植株[30];进一步将组成型表达 β -1, 3-葡聚糖苷酶基因和几丁质酶基因的双价植物表达载体转化甘蓝型油菜,得到了再生植株,活体接种油菜菌核病结果表明,部分转基因植株比对照植株的抗病性显著增强。Oppenheim 等^[66]已构建了转几丁质酶基因的油菜植株。中国科学院遗传研究所张丽华^[67]等利用农杆菌介导法,构建的携带菜豆几丁质酶基因的植物表达载体 pBch 成功地导入优质、高产的“双低”(低芥酸、低硫苷)甘蓝型油菜 H165 品种中,获得抗菌核病的转基因植株。分子检测证实几丁质酶基因已整合到转基因植株的基因组中,并能稳定地传递给后代。菌核接种试验和菌核病高发区的田间种植实验表明,转基因植株比对照表现出明显的抗菌核病的性能。

1.5 本课题的研究目的及意义

关于核盘菌在不同作物上的侵染致病的微观过程已经有了一些研究。但

是报道仅限于初步的形态观察，并且研究尚少，特别是对该菌在侵染过程中的形态变化观察得更少，这限制了人们对该菌侵染致病的组织病理学研究。为了探索亚麻菌核病菌的致病机理，本文对该菌侵染亚麻的微观过程中菌体形态观察进行了大量观察，对该菌菌丝和子囊孢子对亚麻侵染过程的异同也进行了比较，这些对于丰富对核盘菌致病机理的认识、对该菌侵染致病的组织病理学研究有重要的理论意义。

第2章 实验材料与方法

2.1 材料

亚麻 (*Linum usitatissimum* Antares) 来自英国种子子公司, 该品种属于油料作物品种。核盘菌菌种由英国里丁大学提供。

2.2 接种方法

2.2.1 菌丝接种

对于接种试验, 即将菌核培养的菌丝体, 通过不同的途径接种到所要接种寄主的茎、叶或离体叶片上鉴定抗性^[68]。最初, Thomson 和 Kondra 将菌核菌培养在大麦粒上, 然后把带菌的大麦粒用薄膜捆在油菜茎秆上, 对成株进行鉴定。在很长一段时间, 都是采用这种方法鉴定。随后用 PDA 代替麦粒培养病菌在苗期鉴定则更方便易行, 即将病菌培养在固体培养基上, 接种时将 PDA 均匀划成 5mm×5mm 的小块, 或用打孔器打成半径为 2mm 的圆块, 将小块反贴于展开的第三、四叶片上, 在室内保温保湿进行鉴定。菌丝体亦可培养在液体培养基上, 振荡培养 1 周后, 用组织捣碎机匀浆, 稀释 1 倍成菌丝体悬浮液, 在寄主苗期将菌丝体悬浮液均匀地喷洒于植株叶片上, 然后在一定温度和湿度条件下进行鉴定。此外还可以将病菌培养在牙签上, 再将牙签插入寄主茎秆内, 并保温保湿对成株进行鉴定。目前, 菌丝体接种是应用比较广泛的鉴定方法。其优点是鉴定周期短, 方法易于掌握, 不受自然环境影响, 适于鉴定大量供试材料, 特别是苗期菌丝体接种, 所占用空间更小。

本次实验采用将病菌培养在固体培养基上, 接种时将 PDA 均匀划成 5mm×5mm 的小块, 接于亚麻离体叶上在室内保温保湿培养。

2.2.2 子囊孢子接种

子囊孢子接种法, 将子囊孢子配成一定浓度的孢子悬浮液进行喷雾接种。它包括子囊孢子的收集和接种。子囊孢子收集多采用自然弹射、水洗或

自然放射法。

本实验具体作法是：将菌核在 10℃ 黑暗、湿润条件下放两个月以上进行诱导处理后，在 15 ~ 20℃ 自然散光下即可产生子囊盘，然后采用真空抽气法可收到洁净、干燥的新鲜子囊孢子。

接种，分别将子囊孢子收集并加无菌蒸馏水制成浓度为 5000-10000 孢子/ml 的子囊孢子悬浮液，然后将 1 滴悬浮液接种在离体叶片上；将花瓣置于离体叶片上，将 1 滴孢子悬浮液接在花瓣上。

上述每个处理均接种 15 片叶，重复二次。在室温下培养。

2.3 透射电镜的样品制作

试剂：0.1M 磷酸缓冲液配的 3% 戊二醛固定液(pH7.0)，0.1M 磷酸缓冲液配的 1% 四氧化锇固定液(pH7.0)，0.1M 磷酸缓冲液(pH7.0)，50%、70%、80%、90%、95%、100% 系列乙酞环氧丙烷，双蒸馏水，Epon 812 环氧树脂，MNA，DDSA，DMP-30。

器材：青霉素小瓶，载玻片，注射器，量筒，烧杯，试剂瓶，玻棒，滴管，单面或双面刀片，手术刀，手术剪，普通镊子，牙签，酸度计或 pH 试纸，2 号医用胶囊，胶囊架，塑料包埋模板，聚合器或烘箱，冰箱，真空抽气泵。

2.3.1 取样与固定

取材与预固定^[69]：分别将菌丝接种后 8h、16h、24h 的叶片及子囊孢子接种 16h 的花瓣和接种 24h 的叶片立即放在用冰块预冷的载玻片上，并滴上数滴冷的 3% 戊二醛固定液，用锋利的刀片分别在接种和显症部位切下 5mm × 2mm 小块，然后用牙签将小条轻轻地逐一拨入盛有冷的 3% 戊二醛固定液的小瓶中(小瓶置冰 0—4℃)，盖紧瓶塞后用注射器多次抽气直至样品沉落瓶底。

前固定(保持 0—4℃)：更换新鲜的 3% 戊二醛固定液，固定 3 小时，用吸管吸出固定液，加入 0.1M 磷酸缓冲液漂洗 1 小时，换液 3—4 次。

后固定：吸去漂洗液，在通风橱中加入 1% 四氧化锇固定液，固定 2 小时后，吸出固定液。加入 0.1M 磷酸缓冲液漂洗 1 小时，换液 3—4 次。

2.3.2 脱水

脱水置换：吸去缓冲液，注入乙醇，逐级梯度脱水，50%乙醇，0—4℃，15分钟；70%乙醇，0—4℃，15分钟；80%乙醇，0—4℃，15分钟；90%乙醇，室温，15分钟；95%乙醇，室温，15分钟；100%乙醇，室温，30分钟(换液一次)。移入环氧丙烷，室温30分钟(换液一次)。

2.3.3 渗透与包埋

浸透：按照 Epon 812 包埋剂^[70]配方配制包埋剂，注意需充分搅拌，混匀后按下列步骤注入瓶中：过氧丙烷：包埋剂=3：1 浸1小时；环氧丙烷：包埋剂=1：1 浸1小时；环氧丙烷：包埋剂=1：3 浸2小时；纯包埋剂浸5小时或过夜。

Epon 812 包埋剂配方：

Epon 812 是一种进口树脂，它是一种长链的脂肪族环氧化合物，是目前国际上普遍采用的一种优良包埋剂，粘度为150—210厘泊(在25℃)。该包埋剂的配制方法甚多，按1961年Lun提出的配方进行。其配方：

A 液：Epon812	62 毫升
DDSA	100 毫升
B 液：Epon812	100 毫升
MNA	89 毫升

包埋：将药用胶囊立于已打好孔的胶囊架上，把样品放入胶囊。

底部正中，注入包埋剂，插入标签。若进行定向包埋，则剪一宽度与胶囊直径相同的长方形夹层硬纸，马上编号，将其下端剥成两层，用牙签挑一浸透好的条形材料置入夹层中间，垂直插入胶囊，使材料正好直立在囊胶底部中间，随后注满包埋剂。

聚合：将胶囊架或塑料模板放入恒温箱中加热聚合。在37℃、45℃、60℃下分别聚合17小时、24小时、17小时，取出后去掉胶囊，即为样品包埋块。

2.3.4 制作超薄切片

材料：制备好的包埋块。

试剂：50%乙醇配制的2%醋酸双氧铀染色液(pH4.2)，柠檬酸铅染色

液(pH12), 50%乙醇, 1N NaOH, 双蒸水, 2%亚甲蓝染色液。

器材: 超薄切片机, 玻璃制刀机, 实体显微镜, 光学显微镜, 制刀专用玻璃条(25 mm × 6 mm × 400mm)单面刀片, 修块底座, 胶带, 玻璃刀定型水槽, 手术剪, 镊子, 铜网镊子, 注射器, 培养皿, 小烧杯, 滴管, 载玻片, 睫毛针, 细玻璃棒, 蜡片, 蜡盘, 滤纸, 100 目带膜铜网。

做法:

一、包埋块的修整

1. 剥去胶囊, 将包埋块安装在样品夹上, 将顶端露出 3—5mm。用单面刀片水平横切包埋块顶端的包埋介质, 露出样品。在包埋块顶部四周的侧面切四刀, 将包埋块上部切成金字塔形, 塔顶为面积约 1mm^2 的平面。

2. 在实体显微镜下用新单面刀片进一步修整顶面, 使其光滑平整, 面积约 $0.5 \times 0.5\text{mm}^2$, 呈梯形, 上下两边平行, 四个斜面坡度为 45° 。

二、玻璃刀的制作

1. 制方形玻璃块: 将制刀用的长玻璃条一端插入夹头底部, 转动固定杆使夹头下落, 夹紧玻璃条; 拉动玻璃划割器, 使下部的碳化钨砂轮划割玻璃条; 向右转动断裂旋钮对玻璃条加压, 使玻璃条沿划痕断裂, 转动固定杆抬起夹头, 取出剩余玻璃条。

2. 制玻璃刀: 用托架取下方形玻璃块, 旋转 45° 角之后, 将方形玻璃块置于夹头下; 转动固定杆使夹头下落压紧方形玻璃块, 拉动划割器, 转动断裂旋钮, 对方形玻璃块加压, 使其沿对角线断裂成两块三角形玻璃刀; 用托架取下玻璃刀。

三、超薄切片

1. 安装玻璃刀与包埋块: 按照超薄切片机的操作程序, 打开电源接通照明。将玻璃刀安装在刀座上, 使刀口高度与刀座上的高度标杆相等, 刀的前角值为 4° 左右, 夹紧。将样品包埋块装在样品臂上, 夹紧。通过超薄切片机上的双筒显微镜边观察, 边调整样品块与刀的相对位置, 旋转样品头夹具, 调整刀座位置, 使样品包埋块端面与刀刃在 X、Y、Z 三个方向上都平行。往玻璃刀水槽中注入双蒸水, 用注射器整调液面高度, 使其与刀刃一致。

2. 切片: 切片厚度选择在 0.5—2mm 左右, 以手动推进或半薄推进方式切出若干半薄切片。用细玻璃棒将切片捞于载玻片上的水滴中, 将载玻片放在烘片台上加热, 并滴加 2%亚甲蓝染色 1—2 分钟, 再用水冲去多余染液, 烘干后光镜检查。根据观察的情况, 对包埋块作适当的定位修整。更新

选择最佳刀刃，将切片速度调至 2—3mm / s，切片厚度选择在 50nm 左右，进行超薄切片。

3. 展片与捞片用滤纸片沾取少许氯仿溶液，在切片上方停留片刻，利用有机溶剂的挥发气体使切片展平。用睫毛针将切片带断成几截，将灰色和银白色的切片拨在一起，然后用镊子夹持载网，胶面朝下，使载网与切片所在水面相平行，迅速与切片接触，沾取切片。捞取的切片经自然干燥后即可进行染色

2.3.5 染色

1. 铀染：将醋酸双氧铀染液滴入蜡盘中，将有切片的载网膜面朝下漂浮在染液液滴的表面上。30 分钟后用镊子持载网，依次在四个盛有双蒸水的小烧杯中各清洗 20—30 次，然后将载网放在干净的滤纸上。

2. 铅染：在另一蜡盘中的四周放上一些固体氢氧化钠，用注射器吸取柠檬酸铅染液，滴于蜡盘中，然后把经铀染后尚处于半湿半干状态的载网膜面朝下漂浮在染液液滴表面进行染色。为了减少 CO_2 的污染，可在小称量瓶中放 $2/3$ 高度的固体氢氧化钠，留很小空间，放一用硫酸纸做的小蜡盒，将铅染液滴在小蜡盒中进行染色；也可在白制的可抽气的小瓶中染色。10—15 分钟后，用镊子夹持载网立即浸入盛有 0.01N NaOH 的小烧杯中清洗 20—30 次，再依次在另外三个装有双蒸水的小烧杯中各清洗 20—30 次，然后放在干净的滤纸上，自然干燥后即可观察。

本次实验采用铅染进行染色。

2.4 透射电镜的观察方法

2.4.1 使用的仪器及设置

1. 基本操作 启动接通真空泵和各种电源，使之预热并达到稳定状态；预抽镜筒；最后位镜筒达到高真空。启动后接通高压、接通灯丝，并把它粗略地调到工作温度，将电子源聚焦到终屏上，并将它合轴；对中和使电子枪饱和。调节电子枪控制器对中和使电子枪饱和，调节像的亮度、调节照明系统；装入样品和获得像并进行低倍下的样品普查，插入并对中物镜光阑，低倍下的聚焦，改变放大倍数进行再观察，看到所需要的片子进行拍摄，摄取

显微照片。

2. 所有核盘菌侵染亚麻微观过程的观察均在透射电镜 JEM - 1200EX (日本电子公司制造) 下进行, 并进行照像记录。

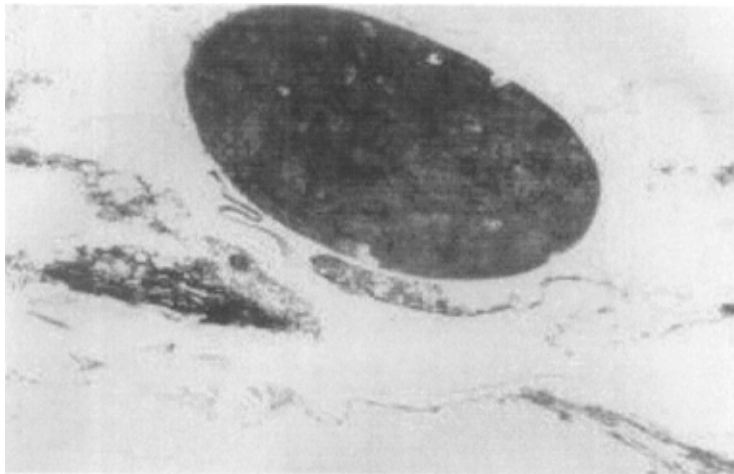
第3章 结果与分析

3.1 菌丝的侵染过程

3.1.1 侵染 8 小时

1. 菌丝侵染进入亚麻寄主细胞内，在寄主细胞内生长（图 3-1）。寄主细胞壁游离或平滑地断裂消失，细胞器形态、结构发生变化，甚至消失（图 3-1，图 3-2）。在图 3-3、图 3-4 中可以看到遭到破坏和已变形的叶绿体，片层结构已经解体或已变形，位置发生变化。有些细胞器还集结成团，形成一种稠密物质（图 3-5），作用和功能还不得而知。同时相邻的寄主细胞也发生一定的变化，诸如细胞壁变薄，细胞器与细胞壁的结合不再紧密。

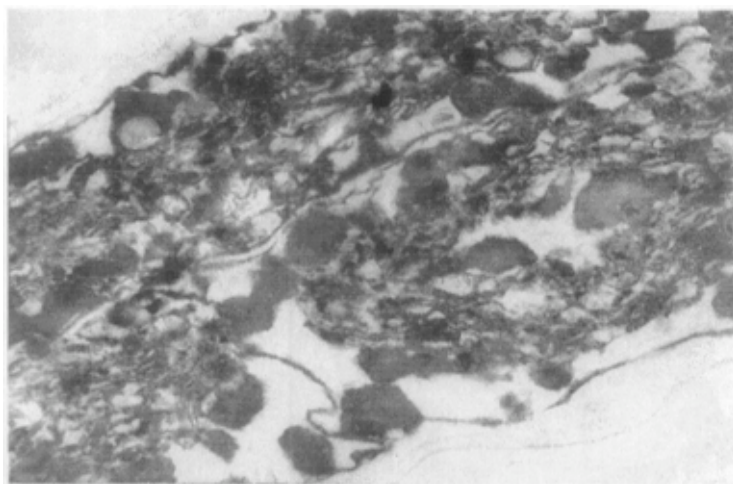
2. 菌丝细胞壁出现小的凹陷（图 3-5，图 3-6），在寄主细胞内生长的菌丝细胞壁很齐整，但个别出现一两个凹陷，并且凹陷中含有一定物质。其中机制不甚了解。可能是寄主细胞内的物质，菌丝形成凹陷进行吸收，使之成为菌丝生长所需要的物质。



核盘菌侵染亚麻叶片，菌丝在亚麻细胞内生长（ $\times 6500$ ）

图 3-1 菌丝侵染叶片 8h 透射电镜照片

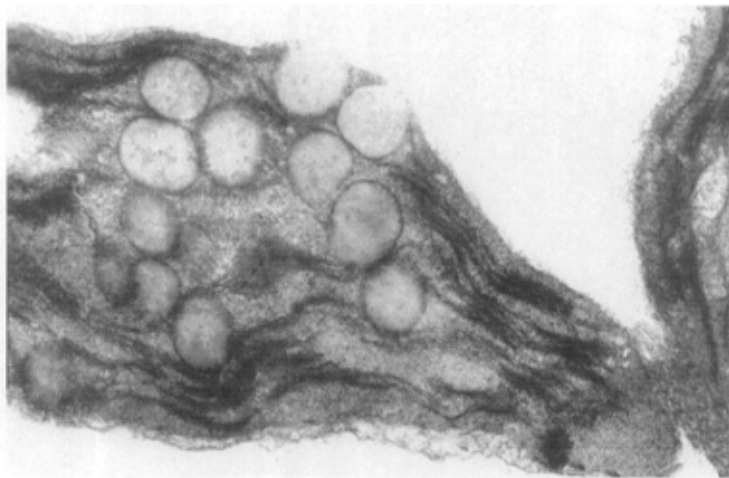
Figure 3-1 TEM photograph of infection of linseed by mycelium for 8h



亚麻细胞壁变薄，细胞器形态、结构发生变化，甚至消失（ $\times 20K$ ）

图 3-2 菌丝侵染叶片 8h 透射电镜照片

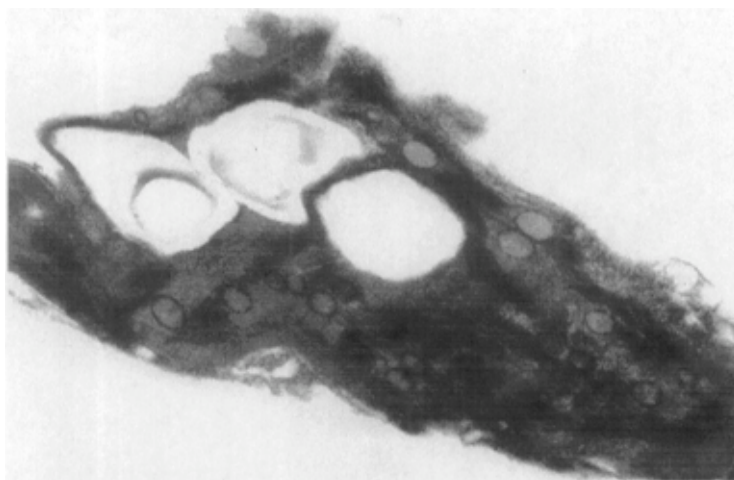
Figure 3-2 TEM photograph of infection of linseed by mycelium for 8h



叶绿体已变形，片层结构已经解体、位置发生变化（ $\times 33K$ ）

图 3-3 菌丝侵染叶片 8h 透射电镜照片

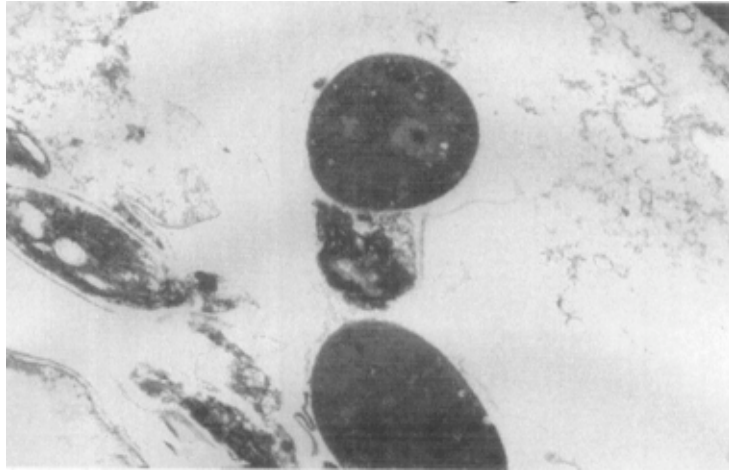
Figure 3-3 TEM photograph of infection of linseed by mycelium for 8h



叶绿体遭破坏严重，已看不到片层结构（ $\times 13K$ ）

图 3-4 菌丝侵染叶片 8h 透射电镜照片

Figure 3-4 TEM photograph of infection of linseed by mycelium for 8h



菌丝周围形成一种稠密物质，并出现凹陷 ($\times 4K$)

图 3-5 菌丝侵染叶片 8h 透射电镜照片

Figure 3-5 TEM photograph of infection of linseed by mycelium for 8h



菌丝周围出现凹陷 ($\times 8K$)

图 3-6 菌丝侵染叶片 8h 透射电镜照片

Figure 3-6 TEM photograph of infection of linseed by mycelium for 8h

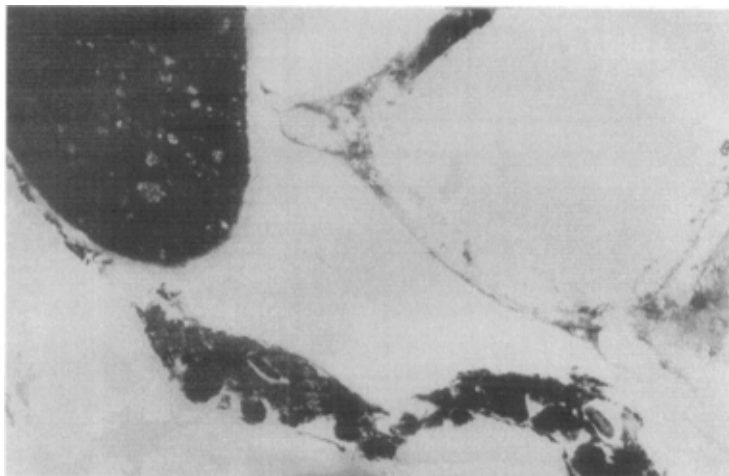
3.1.2 侵染 16 小时

1. 从以往的资料来看,在其他寄主上,菌丝既能在细胞内生长(图 3-7, 图 3-8),又能在细胞间生长。此次观察验证了核盘菌在侵染亚麻时,也是如此(图 3-9)。菌丝在细胞间生长时生成细的菌丝(图 3-10),图 3-9 是菌丝的横切面,图 3-10 则是菌丝的纵切面。

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,亚麻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 3-9),这种压力对寄主亚麻组织的破坏具有一定作用。还可看到,菌丝的细胞壁与亚麻细胞的细胞壁的界限已不太明显,出现了融合的前兆,并且细胞内的细胞器正常位置发生改变,细胞器变得结构模糊。与此相反,可以看到与菌丝接触不太紧密的另一细胞,细胞壁完整、整齐,细胞内的细胞器清晰可见,形状完整,相对位置规则。除了压力之外,这些变化最有可能是病菌产生的某些酶类的作用所造成。从图 3-11、图 3-12 中也可看到类似的变化:细胞壁已经消失,细胞质集结,细胞器变形或破坏;在图 3-11 中可看到已经变形但还未完全破坏的叶绿体。

2. 在细胞间生长的菌丝还能够产生新的分枝(图 3-10),而新的分枝直径明显小于原菌丝。分枝的生成,其生长压力迫使寄主细胞向内产生凹陷,并且细胞壁变薄,最终将导致细胞壁的破裂,菌丝的侵入。

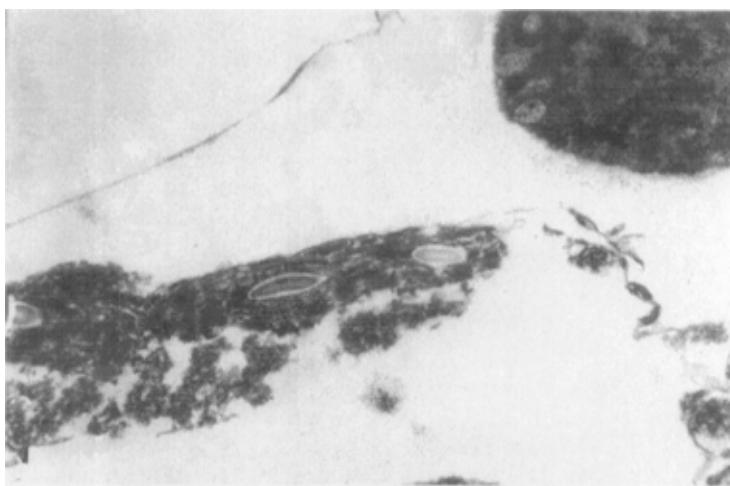
3. 很多前人认为,在侵染过程中,由于酶的帮助,核盘菌才能侵入寄主细胞。在此观察中,核盘菌在侵入亚麻叶表面角质层时的表现与此种意见相吻合。寄主细胞并未与菌丝直接接触,而细胞的角质层平滑消失,细胞内的一些细胞器形状结构发生改变,甚至消失(图 3-9)。在图 3-9 中,菌丝上侧寄主细胞边缘模糊,细胞器不规则;而菌丝下侧寄主细胞边缘清晰可见,细胞器规则整齐,破坏程度很轻。而在细胞边缘模糊的地方,菌丝边缘也很模糊、不规则。



菌丝侵染叶片 16h 时，菌丝在细胞内生长 ($\times 8K$)

图 3-7 菌丝侵染叶片 16h 透射电镜照片

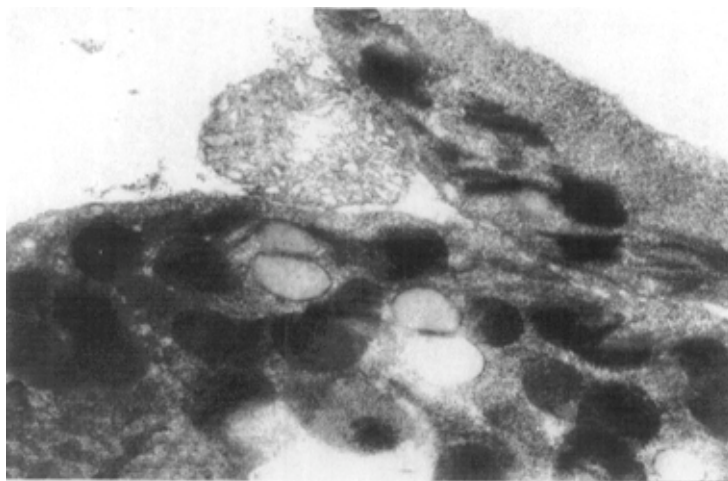
Figure 3-7 TEM photograph of infection of linseed by mycelium for 16h



菌丝在细胞内生长 ($\times 10K$)

图 3-8 菌丝侵染叶片 16h 透射电镜照片

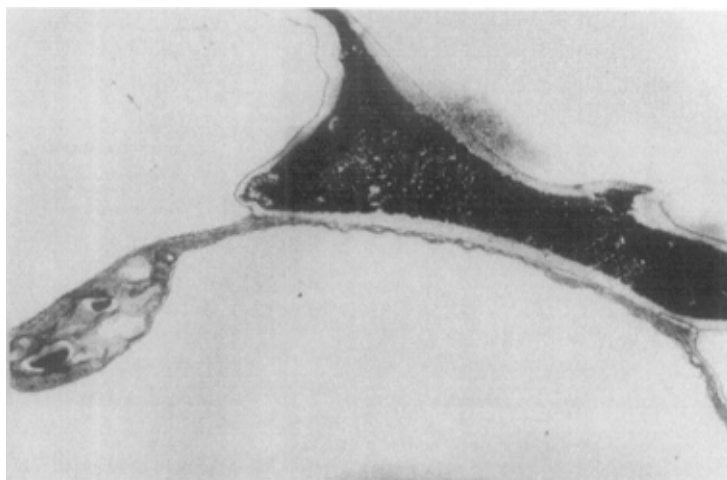
Figure 3-8 TEM photograph of infection of linseed by mycelium for 16h



菌丝侵染叶片 16h 时，菌丝在细胞间生长（标尺：× 25K）

图 3-9 菌丝侵染叶片 16h 透射电镜照片

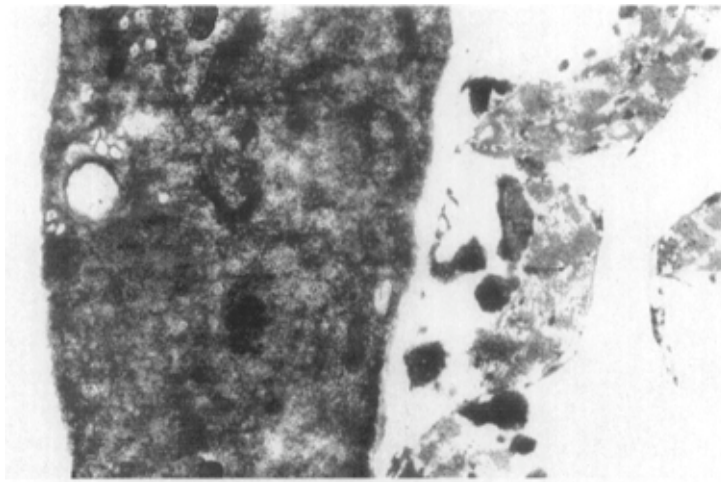
Figure 3-9 TEM photograph of infection of linseed by mycelium for 16h



菌丝侵染叶片 16h 时，菌丝在细胞间生长（× 4K）

图 3-10 菌丝侵染叶片 16h 透射电镜照片

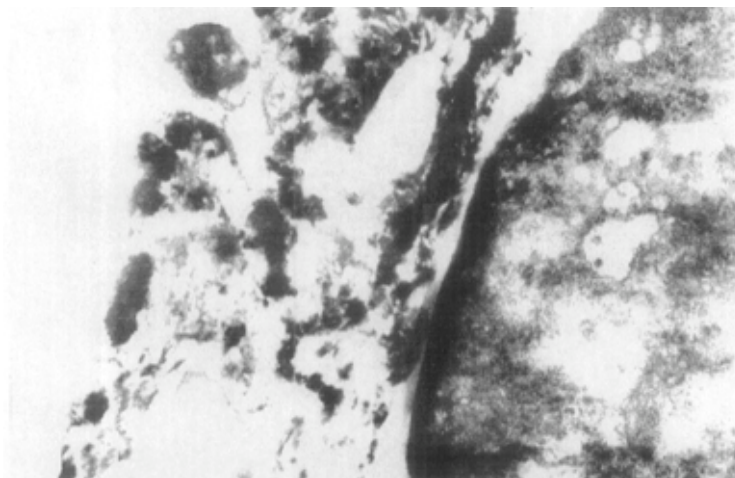
Figure 3-10 TEM photograph of infection of linseed by mycelium for 16h



菌丝侵染叶片，寄主细胞壁消失，叶绿体变形（ $\times 13K$ ）

图 3 - 11 菌丝侵染叶片 16h 透射电镜照片

Figure 3-11 TEM photograph of infection of linseed by mycelium for 16h



菌丝侵染叶片，细胞质集结，细胞器破坏严重（ $\times 25K$ ）

图 3 - 12 菌丝侵染叶片 16h 透射电镜照片

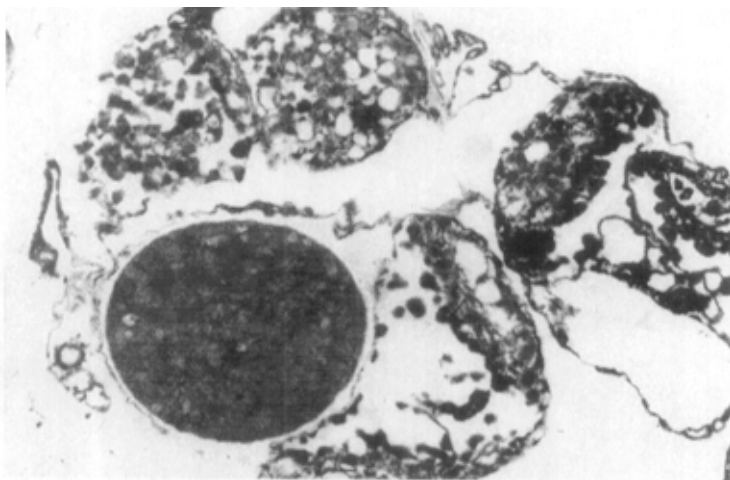
Figure 3-12 TEM photograph of infection of linseed by mycelium for 16h

3.1.3 侵染 24 小时

1. 同样在侵染 24h 的寄主细胞内找到了侵染其中的菌丝（图 3-13，图 3-14），无论在 8h、16h 还是 24h，都发现在寄主细胞内生长的菌丝，这说明菌丝确实可以在亚麻细胞中生长。菌丝周围的一些亚麻细胞开始出现细胞壁平滑消失，细胞器变形。菌丝在寄主细胞内生长，细胞内细胞器的正常位置被改变。原来和细胞壁紧靠在一起，此时与细胞壁游离开来，并且这些细胞器，已经失去了原来的形态，变得结构模糊。所有这些变化都可能是病菌产生的酶类的溶解作用所造成，同时也可能与该病原侵入寄主时产生的草酸有关系。

同时还发现 8h 曾发现的出现凹陷现象（图 3-15，图 3-16）；这说明它不是个偶然现象，而是存在着某种机制。从图 3-15、图 3-17 看，菌丝细胞细胞壁平滑完整，而只有下部尖端出现模糊，可能是核盘菌与亚麻发生相互作用的活跃区域。

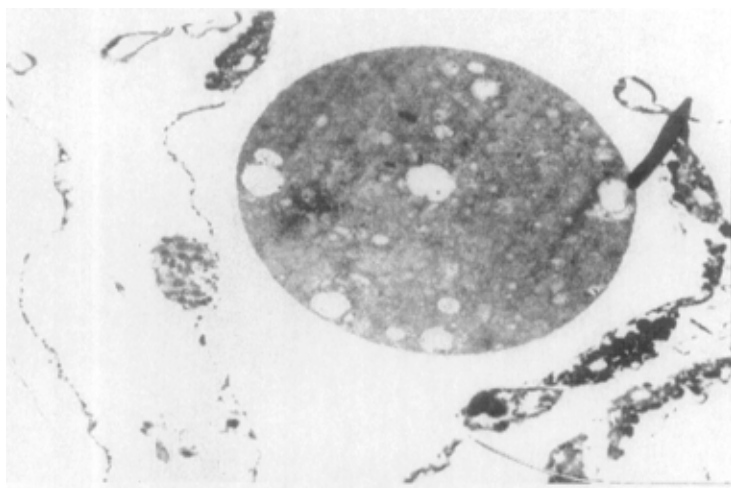
2. 另外发现：虽然细胞壁消失了，细胞器形态结构也发生了变化；可是一些细胞器并不全部瓦解消失，而是和一些变化了的细胞质转化成了一种致密的高电子穿透性物质，往往分布在菌丝的周围（图 3-18，图 3-19，图 3-20）。这些物质似乎在限制菌丝生长方面有一定作用。



周围的一些亚麻细胞开始出现细胞壁平滑消失，细胞器变形（ $\times 5K$ ）

图 3-13 菌丝侵染叶片 24h 透射电镜照片

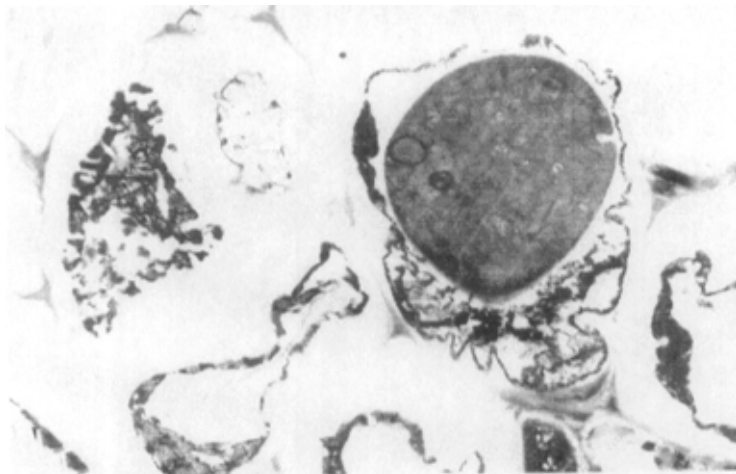
Figure 3-13 TEM photograph of infection of linseed by mycelium for 24h



亚麻细胞壁平滑消失，细胞器变形（ $\times 4K$ ）

图 3-14 菌丝侵染叶片 24h 透射电镜照片

Figure 3-14 TEM photograph of infection of linseed by mycelium for 24h



菌丝在细胞内生长并出现小的凹陷 ($\times 4K$)

图 3-15 菌丝侵染叶片 24h 透射电镜照片

Figure 3-15 TEM photograph of infection of linseed by mycelium for 24h



图 3-15 下部放大图 ($\times 13K$)

图 3-16 菌丝侵染叶片 24h 透射电镜照片

Figure 3-16 TEM photograph of infection of linseed by mycelium for 24h

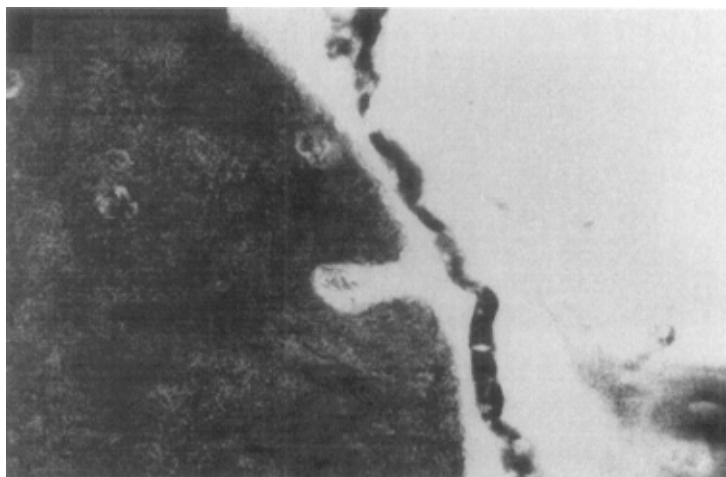
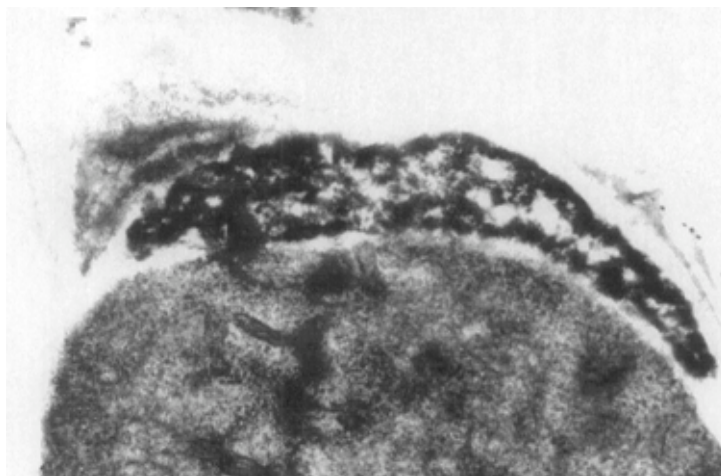


图 3 - 15 右上部放大图 ($\times 25K$)

图 3 - 17 菌丝侵染叶片 24h 透射电镜照片

Figure 3-17 TEM photograph of infection of linseed by mycelium for 24h



细胞质转化成一种致密的高电子穿透性物质, 分布在菌丝的周围 ($\times 16K$)

图 3 - 18 菌丝侵染叶片 24h 透射电镜照片

Figure 3-18 TEM photograph of infection of linseed by mycelium for 24h



细胞质形成一种致密的高电子穿透性物质 ($\times 5K$)

图 3 - 19 菌丝侵染叶片 24h 透射电镜照片

Figure 3-19 TEM photograph of infection of linseed by mycelium for 24h

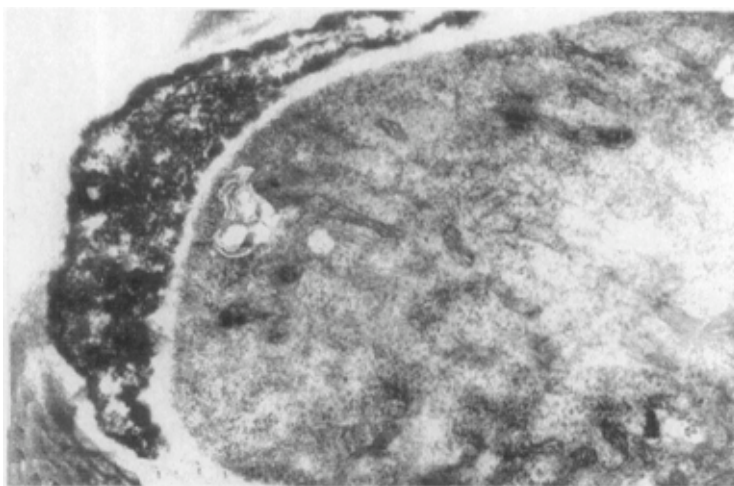


图 3 - 19 局部放大图 ($\times 13K$)

图 3 - 20 菌丝侵染叶片 24h 透射电镜照片

Figure 3-20 TEM photograph of infection of linseed by mycelium for 24h

3.2 子囊孢子的侵染过程

3.2.1 侵染的花瓣

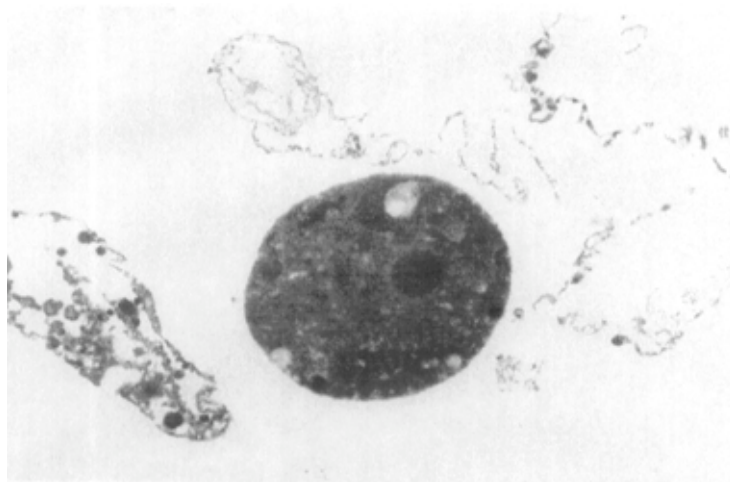
1. 在图 3-21、图 3-22 中同样可以看到在花瓣细胞内生长的菌丝细胞，花瓣的细胞壁已经消失，只残留有一些集结的细胞质和破坏的细胞器。在图 3-23 也可验证这种现象。这与菌丝直接侵染叶片可以在叶片细胞内生长一致。

2. 在图 3-24 中我们可以看到侵入花瓣的菌丝在细胞间生长，此时亚麻花瓣细胞没有受到太大的影响，可以看到远离菌丝的细胞内清晰完整的细胞器和细胞结构。同时还可看到，侵入的菌丝在细胞间的生长似乎受到了一定的压力，形状各异。在细胞间呈三角形等形状生长。

3. 子囊孢子可以侵染花瓣，能够在细胞间生长，这与菌丝侵染叶片过程很相似。并在细胞间靠近寄主细胞的地方形成较大的凹陷（图 3-24，图 3-25，图 3-26）。与菌丝侵染叶片时形成的凹陷相比，明显较大并且中间没有看到其他物质。而与凹陷相靠近的寄主细胞壁，要么平滑消失，要么细胞器发生变化，原来的位置、形态和结构都已改变，原来与细胞壁紧密相连的细胞器现在与细胞器分离开来。分析有两种可能：第一种观点，菌丝在与寄主细胞相互作用当中，侵染受到寄主细胞的抵抗，寄主细胞分泌出某些酶，迫使菌丝作出让步，形成凹陷。第二种观点，这是菌丝侵染亚麻细胞而所具备的特殊侵染机制，与核盘菌侵染其他植物通常形成突起或形成分枝，靠机械压力和分泌酶类侵入寄主细胞不同，此种是形成凹陷，靠分泌酶类来达到破坏寄主细胞壁的目的。从图 3-27、图 3-28、图 3-29、图 3-30 中看，与凹陷相连的寄主细胞壁时断时续，有的已经消失，有的还有薄薄一层，有的细胞壁则较厚、结构完整。实验中造成的缺陷可能性不大。而且凹陷较大的与之相连的寄主细胞壁破坏得更迅速、明显。这些现象更加倾向第二种观点。这一现象的确切解释还需要进一步的研究。

4. 另外发现，菌丝与寄主细胞之间会产生一个细的通道（图 3-24），具体的功能和机制尚不清楚。分析认为：此为菌丝与寄主细胞紧密接触，从而导致菌丝产生某些酶，破坏寄主细胞壁，形成一个物质、能量通道。菌丝得以从寄主细胞里获取生长所需的物质能量。但这只是一种可能，还无确实可靠的证据，还须进一步观察研究。

5. 与菌丝侵染叶部相比,子囊孢子侵染花瓣时产生的菌丝中泡状结构和凹陷明显增多,而且体积明显增大。侵染叶片时见图 3-1,图 3-31;子囊孢子侵染花瓣时见图 3-24,图 3-32,图 3-33。



花瓣细胞壁已经消失,只残留有一些集结的细胞质和破坏的细胞器($\times 7K$)

图 3-21 子囊孢子侵染花瓣透射电镜照片

Figure 3-21 TEM photograph of infection of petal by ascospore

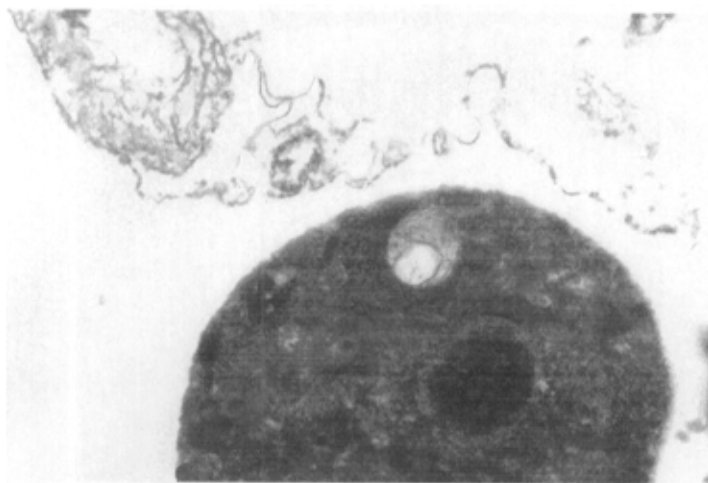
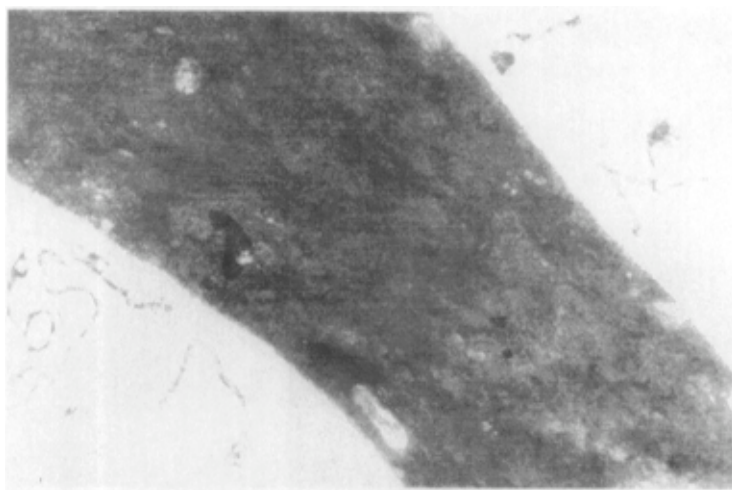


图 3-21 右上部的局部放大图 ($\times 13K$)

图 3-22 子囊孢子侵染花瓣透射电镜照片

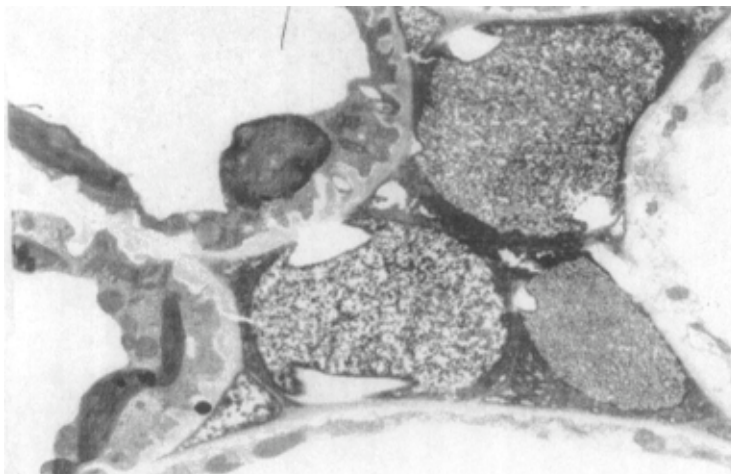
Figure 3-22 TEM photograph of infection of petal by ascospore



菌丝细胞在花瓣细胞内生长 ($\times 20K$)

图 3-23 子囊孢子侵染花瓣透射电镜照片

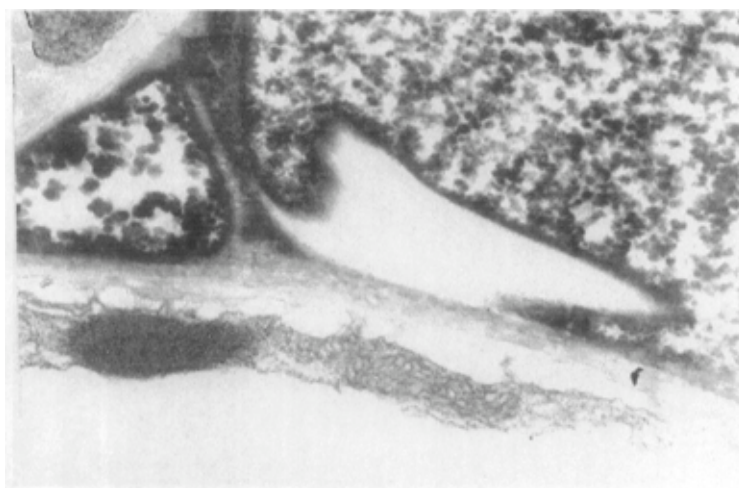
Figure 3-23 TEM photograph of infection of petal by ascospore



亚麻花瓣细胞没有受到太大的破坏，叶绿体结构清晰完整（ $\times 6K$ ）

图 3-24 子囊孢子侵染花瓣透射电镜照片

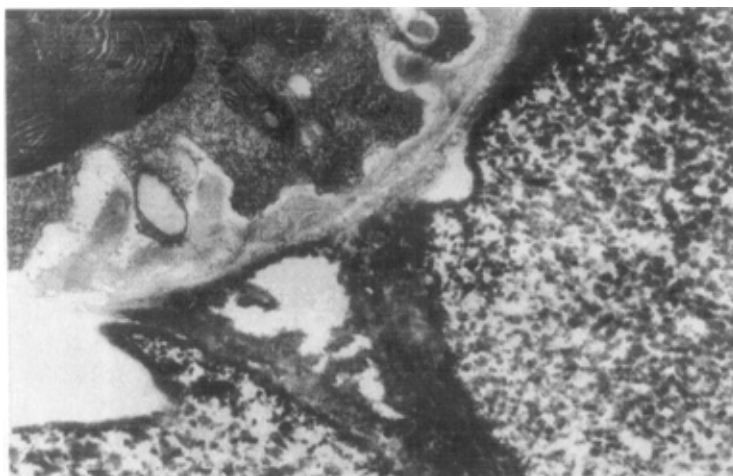
Figure 3-24 TEM photograph of infection of petal by ascospore



细胞间靠近寄主细胞的地方形成较大的凹陷（ $\times 20K$ ）

图 3-25 子囊孢子侵染花瓣透射电镜照片

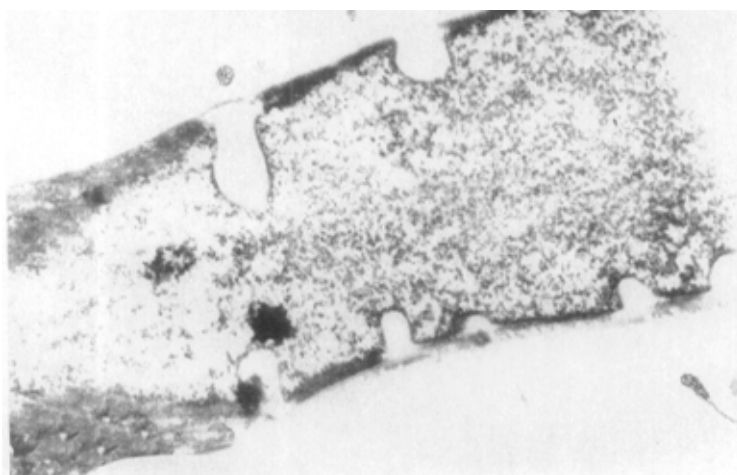
Figure 3-25 TEM photograph of infection of petal by ascospore



与凹陷相靠近的寄主细胞壁，要么平滑消失（ $\times 20K$ ）

图 3-26 子囊孢子侵染花瓣透射电镜照片

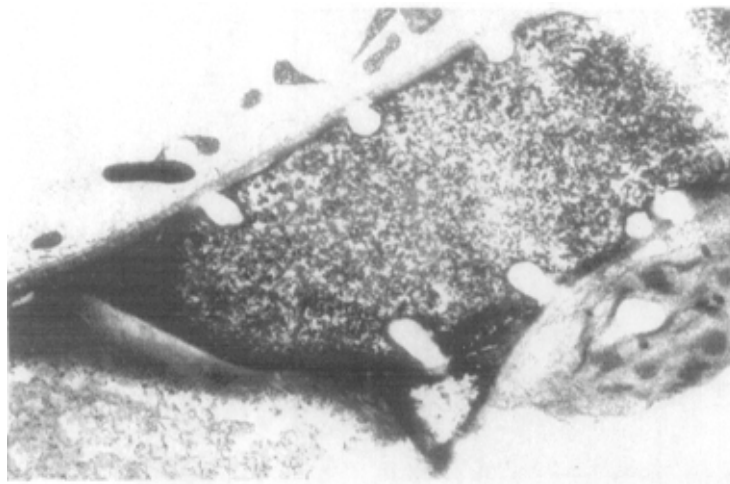
Figure 3-26 TEM photograph of infection of petal by ascospore



与凹陷相连的寄主细胞壁时断时续（ $\times 10K$ ）

图 3-27 子囊孢子侵染花瓣透射电镜照片

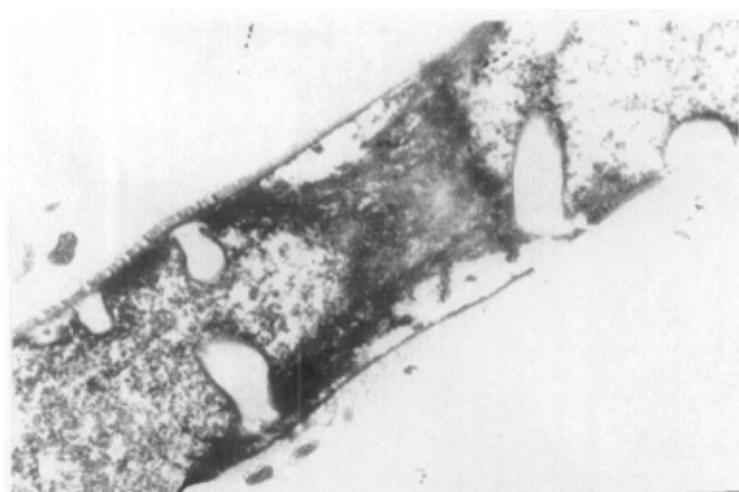
Figure 3-27 TEM photograph of infection of petal by ascospore



与凹陷相连的寄主细胞器游离或消失 ($\times 8K$)

图 3-28 子囊孢子侵染花瓣透射电镜照片

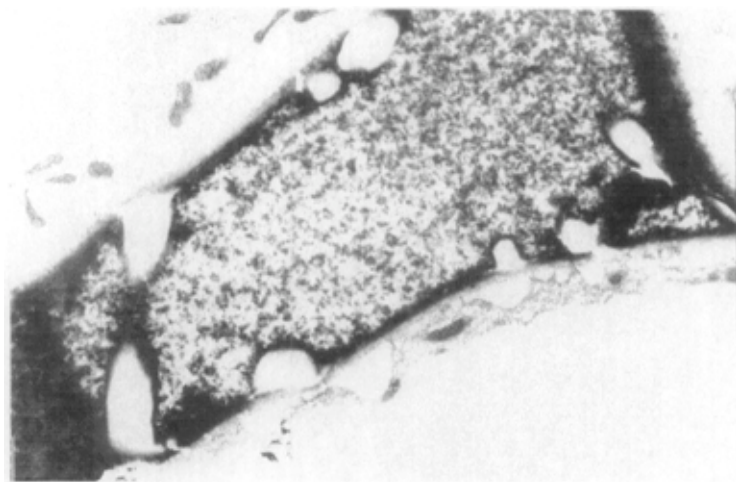
Figure 3-28 TEM photograph of infection of petal by ascospore



泡状结构有的已成为凹陷 ($\times 8K$)

图 3-29 子囊孢子侵染花瓣透射电镜照片

Figure 3-29 TEM photograph of infection of petal by ascospore



与凹陷相连的寄主细胞壁变薄细胞器游离或消失 (×8K)

图 3-30 子囊孢子侵染花瓣透射电镜照片

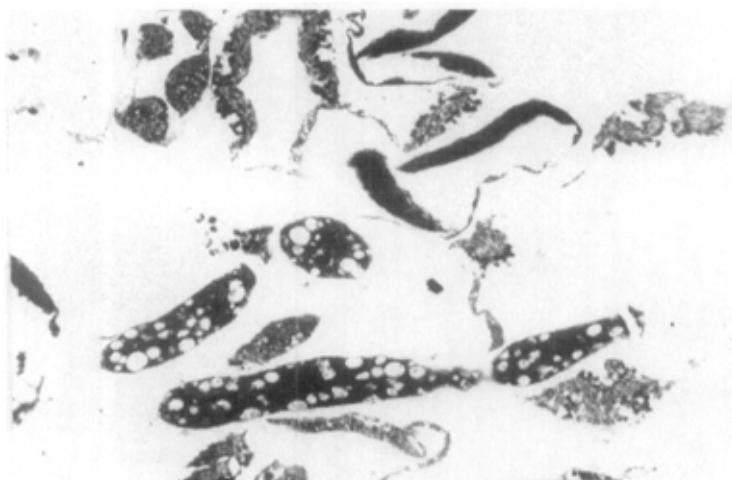
Figure 3-30 TEM photograph of infection of petal by ascospore



侵染叶片时，菌丝内泡状结构和凹陷较少且体积较小(×4K)

图 3-31 子囊孢子侵染花瓣透射电镜照片

Figure 3-31 TEM photograph of infection of petal by ascospore



侵染花瓣时，菌丝内泡状结构和凹陷明显增多且体积较大($\times 2K$)

图 3-32 子囊孢子侵染花瓣透射电镜照片

Figure 3-32 TEM photograph of infection of petal by ascospore



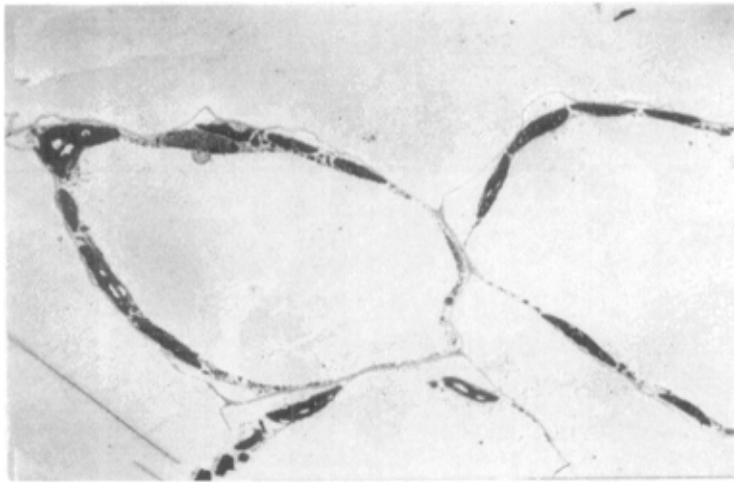
侵染花瓣时，菌丝内泡状结构和凹陷明显增多、体积较大($\times 4K$)

图 3-33 子囊孢子侵染花瓣透射电镜照片

Figure 3-33 TEM photograph of infection of petal by ascospore

3.2.2 侵染的叶片

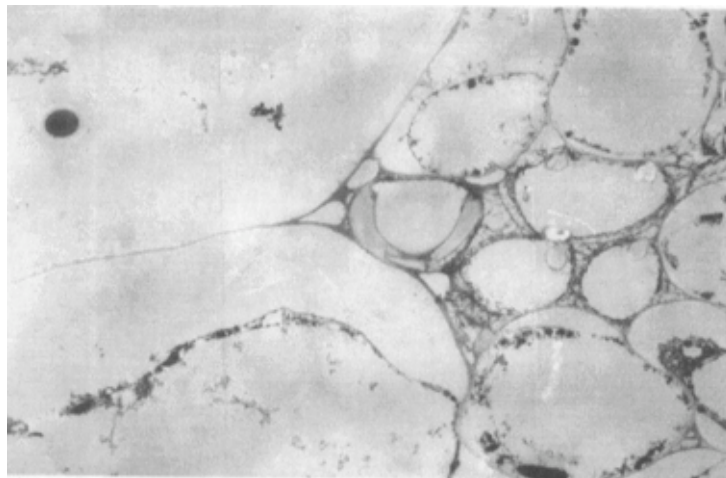
子囊孢子直接接种亚麻离体叶片，不能引起寄主发病。在图 3-34，图 3-35 中观察，可以看到完整的亚麻细胞，形态规则完整，细胞壁完好无损，可以清晰地看到叶绿体的片层结构（图 3-36）。无菌丝侵染迹象（图 3-36，图 3-37）。



亚麻细胞形态规则完整，细胞壁完好无损（ $\times 1600$ ）

图 3-34 子囊孢子侵染叶片透射电镜照片

Figure 3-34 TEM photograph of infection of leaf by ascospore



完整的亚麻细胞，细胞器清晰可见（ $\times 3300$ ）

图 3-35 子囊孢子侵染叶片透射电镜照片

Figure 3-35 TEM photograph of infection of leaf by ascospore



细胞未遭破坏，叶绿体的片层结构很清楚（ $\times 16K$ ）

图 3-36 子囊孢子侵染叶片透射电镜照片

Figure 3-36 TEM photograph of infection of leaf by ascospore



叶绿体结构完整 (×40K)

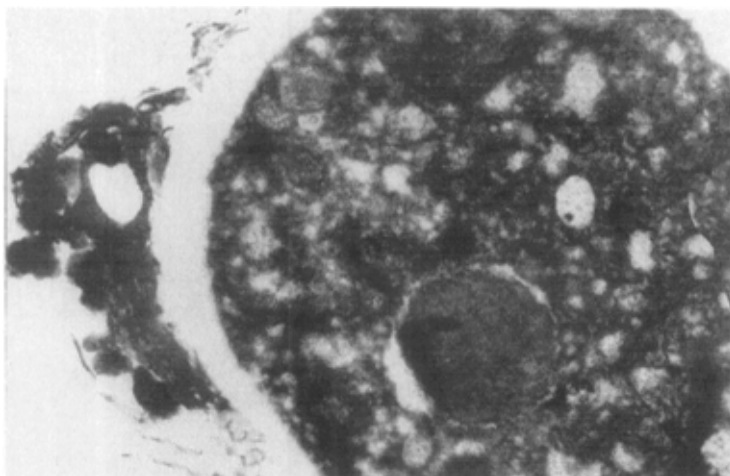
图 3-37 子囊孢子侵染叶片透射电镜照片

Figure 3-37 TEM photograph of infection of leaf by ascospore

3.3 侵染过程中菌丝形态的变化

3.3.1 菌丝内含物的变化

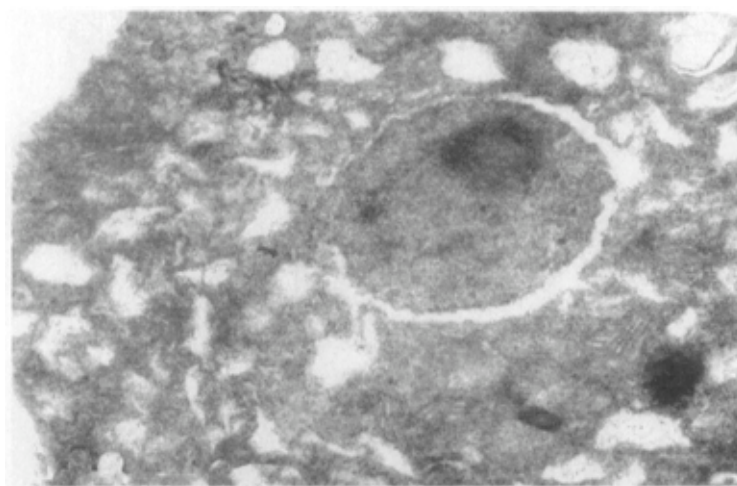
1. 菌丝侵染：能从菌丝的结构可以看出，其中致密染色较深的团状物质可能是菌丝细胞的核物质，或称为核（图 3-38）。有的菌丝细胞中可以看到这种清晰结构的核（图 3-39），而有的则看不到；可能的原因是切片时未过核区，所以看不到明显的核结构。如，在 8h 时有的菌丝细胞就看不到核结构（图 3-40），而有的菌丝细胞则可看到 2 到多个核结构，见图 3-5。在 16h 和 24h 时也是如此（图 3-41，图 3-42，图 3-43，图 3-44，图 3-45，图 3-46）。在上述不同侵染时期可以看到这种核数量的变化，前期较少，后期较多。



侵染 16h 时在菌丝细胞中一个致密核结构 (×13K)

图 3-38 侵染时菌丝形态透射电镜照片

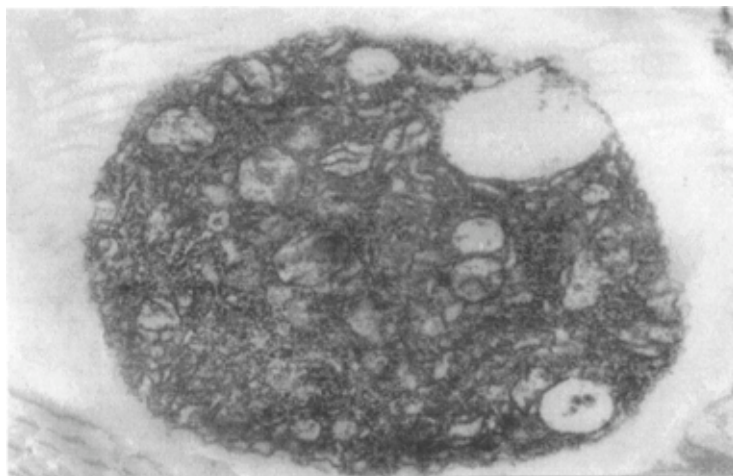
Figure 3-38 TEM photograph of mycelium during the infection



菌丝侵染 16h 时的核结构 (×25K)

图 3-39 侵染时菌丝形态透射电镜照片

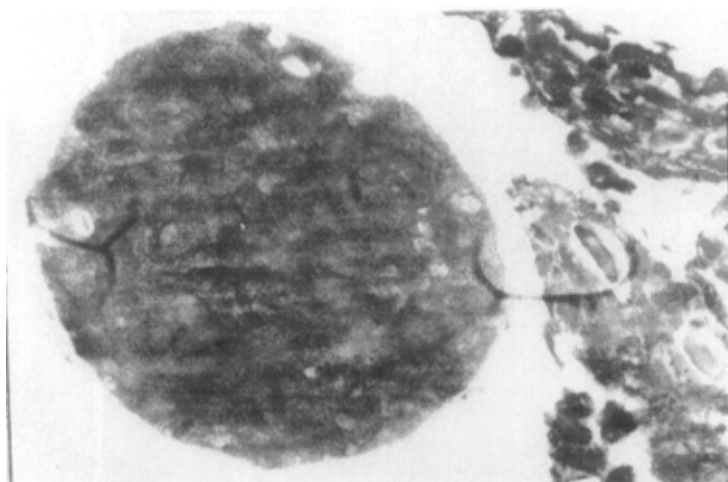
Figure 3-39 TEM photograph of mycelium during the infection



侵染 8h 时此菌丝内看不到明显的核结构 ($\times 20K$)

图 3-40 侵染时菌丝形态透射电镜照片

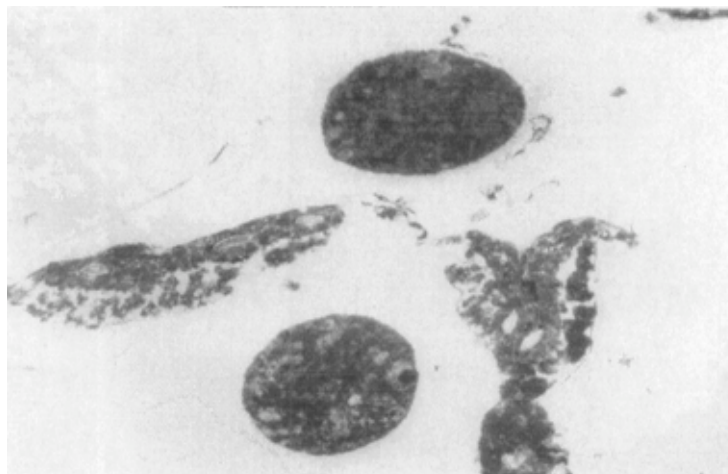
Figure 3-40 TEM photograph of mycelium during the infection



菌丝侵染 16h 时看不到明显的核结构 ($\times 13K$)

图 3-41 侵染时菌丝形态透射电镜照片

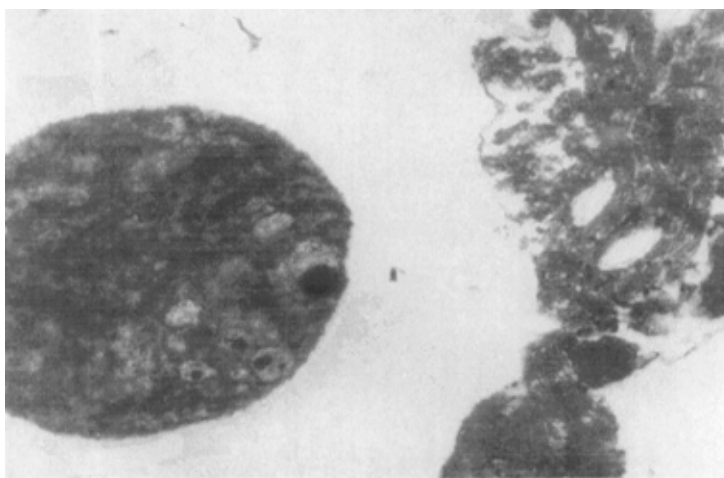
Figure 3-41 TEM photograph of mycelium during the infection



菌丝侵染 16h 时菌丝里存在 2 到多个明显的核结构 (×5K)

图 3-42 侵染时菌丝形态透射电镜照片

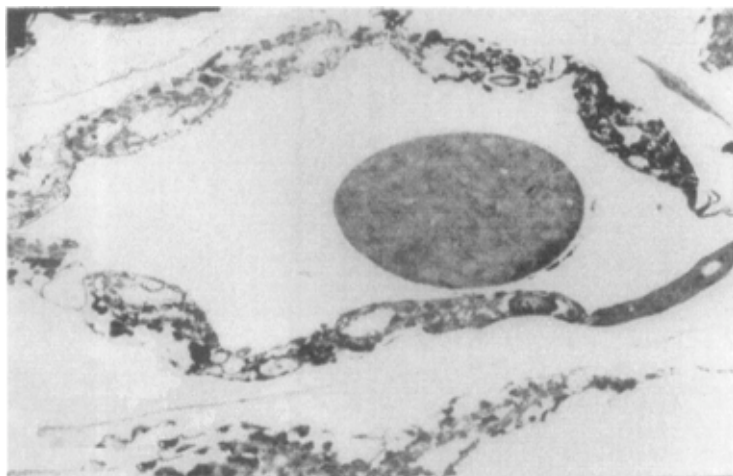
Figure 3-42 TEM photograph of mycelium during the infection



上图的放大图 (×13K)

图 3-43 侵染时菌丝形态透射电镜照片

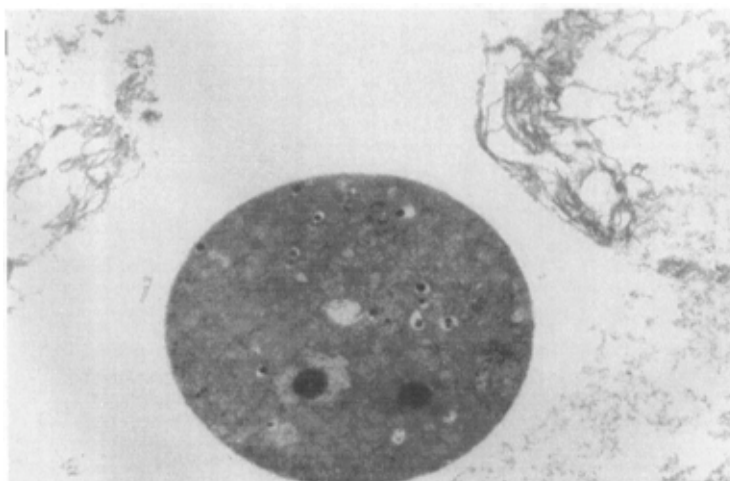
Figure 3-43 TEM photograph of mycelium during the infection



菌丝侵染 24h 时看不到明显的核结构 ($\times 4K$)

图 3-44 侵染时菌丝形态透射电镜照片

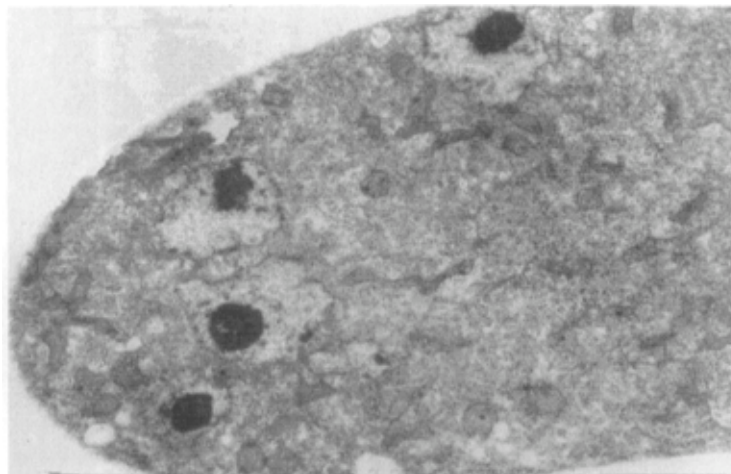
Figure 3-44 TEM photograph of mycelium during the infection



菌丝侵染 24h 时菌丝里存在 2 到多个明显的核结构 ($\times 5K$)

图 3-45 侵染时菌丝形态透射电镜照片

Figure 3-45 TEM photograph of mycelium during the infection



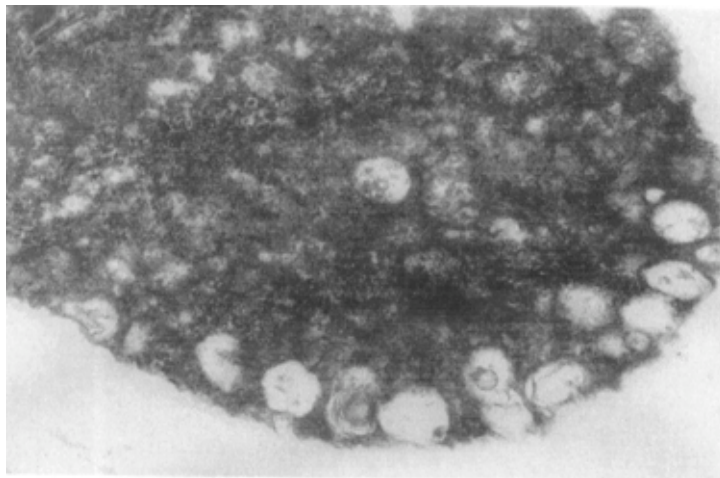
菌丝侵染 24h 时菌丝里存在 2 到多个明显的核结构 ($\times 8K$)

图 3-46 侵染时菌丝形态透射电镜照片

Figure 3-46 TEM photograph of mycelium during the infection

2. 菌丝体内还有很多呈圆状、椭圆状或不规则状泡状结构, 其中应是一些液状物质, 染色较浅; 具体什么物质还有待研究。从图 3-47 中看, 这些类似植物细胞中的液泡状的泡状结构在菌丝细胞边缘时, 可以逐渐变成凹陷, 从而释放出一些物质。由此分析, 可能是分泌一些酶类物质, 用于溶解寄主细胞壁。而没有成为凹陷前, 就应该存在这种机制。所以, 这类泡状结构的多寡与侵染能力有很大关系。事实证明, 确实如此。例如: 在菌丝侵染叶片过程中, 8h 时菌丝细胞边缘齐整, 内部致密, 颜色较深, 这种泡状结构数量较少也较小(图 3-48, 图 3-6); 而在 16h 时菌丝细胞边缘变得不再齐整, 特别是在侵染剧烈时, 内部结构也变得疏松, 泡状结构较多并较大, 颜色也较浅(图 3-49, 图 3-50)。而在 24h 时, 这种规律表现得不是特别显著; 有的菌丝细胞内部致密染色深, 有的则疏松染色浅(图 3-51, 图 3-52)。

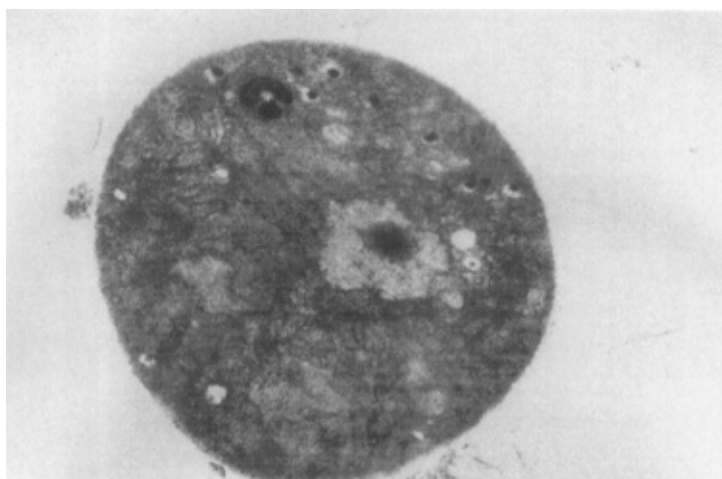
3. 子囊孢子侵染: 菌丝在侵染花瓣细胞时, 菌丝细胞内部大多数变得如图 3-53 所示, 呈细密小颗粒状, 既不形成小的泡状结构, 也不形成致密的染色较深结构。同时还有如图 3-54 那样, 菌丝细胞内出现较大且多的泡状物, 细胞内的稠密物质明显所占比例减少。



圆状、椭圆状或不规则状空白泡，染色较浅。(×20K)

图 3-47 侵染时菌丝形态透射电镜照片

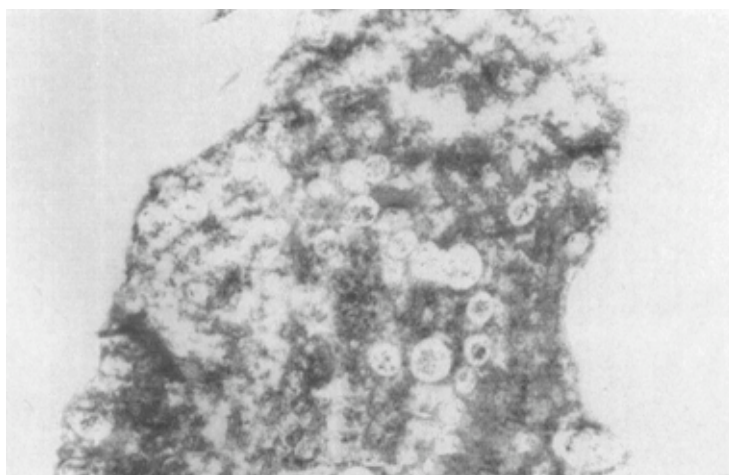
Figure 3-47 TEM photograph of mycelium during the infection



8h 时菌丝细胞边缘齐整，内部致密，颜色较深，泡状结构数量较少 (×10K)

图 3-48 侵染时菌丝形态透射电镜照片

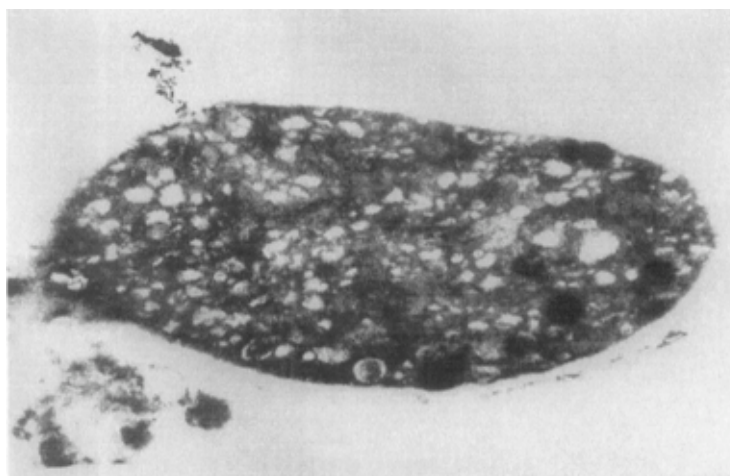
Figure 3-48 TEM photograph of mycelium during the infection



16h 时菌丝细胞边缘变得不再齐整，内部结构疏松，小泡较多($\times 13K$)

图 3-49 侵染时菌丝形态透射电镜照片

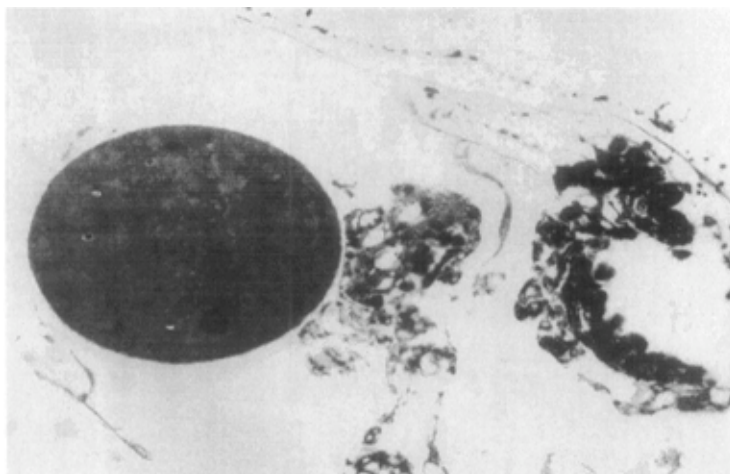
Figure 3-49 TEM photograph of mycelium during the infection



16h 时菌丝细胞内部结构疏松，泡状结构较多，颜色也较浅($\times 10K$)

图 3-50 侵染时菌丝形态透射电镜照片

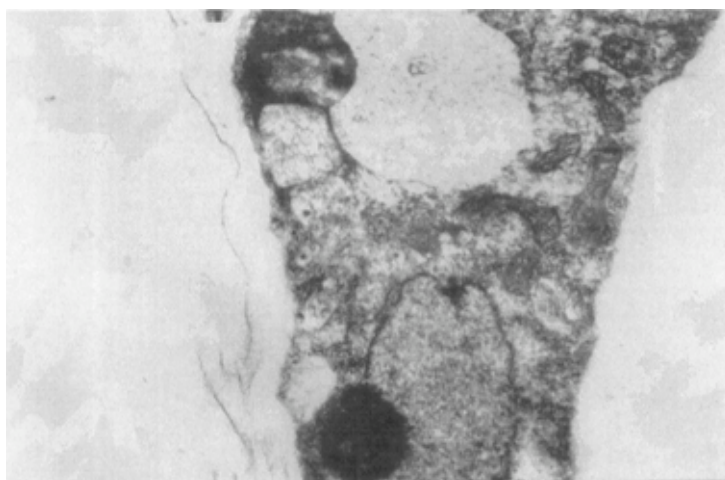
Figure 3-50 TEM photograph of mycelium during the infection



24h 时菌丝细胞内部致密、染色较深 (×6K)

图 3-51 侵染时菌丝形态透射电镜照片

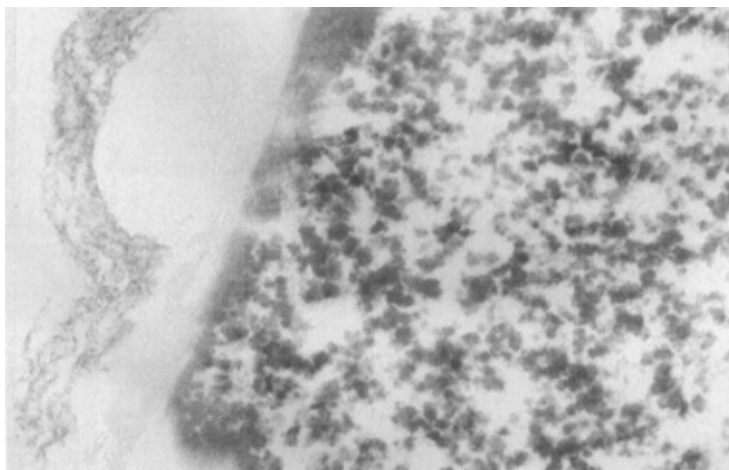
Figure 3-51 TEM photograph of mycelium during the infection



24h 时菌丝细胞内部疏松、染色较浅 (×16K)

图 3-52 侵染时菌丝形态透射电镜照片

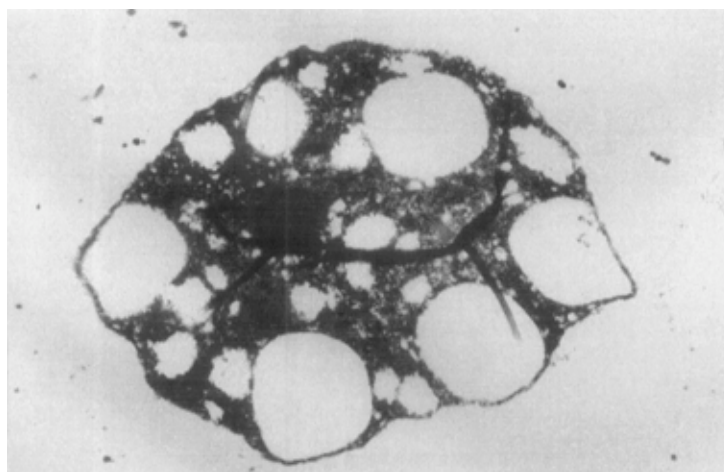
Figure 3-52 TEM photograph of mycelium during the infection



菌丝细胞内部呈细密小颗粒状($\times 25K$)

图 3-53 侵染时菌丝形态透射电镜照片

Figure 3-53 TEM photograph of mycelium during the infection



菌丝细胞内出现大且多的泡状物，稠密物质明显所占比例减少($\times 10K$)

图 3-54 侵染时菌丝形态透射电镜照片

Figure 3-54 TEM photograph of mycelium during the infection

3.3.2 菌丝直径大小的变化

从表 3-1 可以看出, 在侵染的不同阶段菌丝直径大小会发生一些变化: 在 8h 时平均为 $6.62\mu\text{m}$, 16h 时平均为 $4.26\mu\text{m}$, 24h 时平均为 $11.82\mu\text{m}$; 这说明菌丝直径大小与侵染时间有关。同时菌丝直径大小在子囊孢子侵染花瓣和菌丝侵染叶片之间也存在着差异。造成这种变化的原因, 还有待进一步观察研究。

表 3-1 菌丝直径
Table3-1 Diameter of hypha

					(μm)
侵染方式		菌丝侵染			子囊孢子侵染
侵染部位		叶片			花瓣
时间		8h	16h	24h	16h
测量值	1	7.00	5.00	11.38	6.25
	2	8.00	4.80	14.33	6.00
	3	6.89	5.00	8.38	7.00
	4	6.63	5.40	16.33	6.53
	5	4.60	1.10	10.50	6.88
	6			10.00	7.50
	平均值	6.62	4.26	11.82	6.69
	标准差	1.11	1.59	2.29	0.50
	方差	1.55	3.17	10.87	0.31

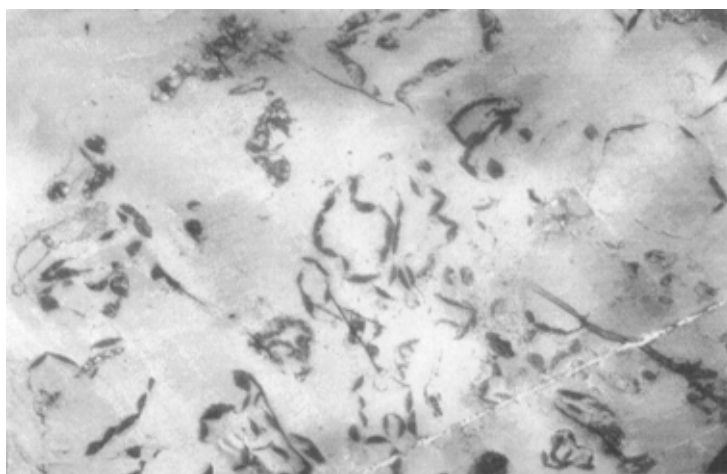
3.4 侵染过程中菌丝与寄主亚麻细胞之间的相互作用

在图 3-9 中, 可以看到, 一方面菌丝的生长对邻近的叶肉细胞产生一定的压力, 迫使亚麻叶肉细胞壁在菌丝生长的作用下呈现不同程度的凹陷。同时, 在图 3-24 中我们也看到, 菌丝在细胞间受到寄主细胞的挤压而呈现出个不同的形状。

1. 植物细胞本身变化: 亚麻细胞在菌丝没有侵染或侵染的初期或离细胞较远时 (图 3-34, 图 3-55), 细胞的形状完整, 形态规则, 其中的细胞器也完好无损, 并且位置功能都正常。而当受到菌丝的侵染后, 细胞本身发生变化。在侵染的初期, 植物细胞受到菌丝细胞生长的压力, 而出现一些凹陷或变形 (图 3-9); 而在侵染的中后期, 由于菌丝的进一步侵染, 分泌的一些酶类、草酸等物质, 破坏了寄主细胞壁的结构, 细胞壁变薄或消失, 与之紧密相连的细胞器分离开来 (图 3-12, 图 3-15), 细胞质浓缩或泄漏。这些均是菌丝作用于寄主细胞的结果。

2. 菌丝的变化: 菌丝在侵染的过程中, 除了自身的一些正常变化外, 由于受到寄主细胞的作用, 也会出现一些反应。如, 在侵染的初期, 植物细胞破坏的还不是很严重, 对于菌丝抵抗是很明显的。为了突破或避开这些障碍, 菌丝细胞往往能够在寄主细胞间生长, 这使得菌丝细胞为了适应寄主细胞间的生长而变得形态各异 (如图 3-56, 图 3-57, 图 3-58, 图 3-59)。在图 3-59, 图 3-60 中看, 菌丝在寄主细胞间受挤压而呈狭长形状。

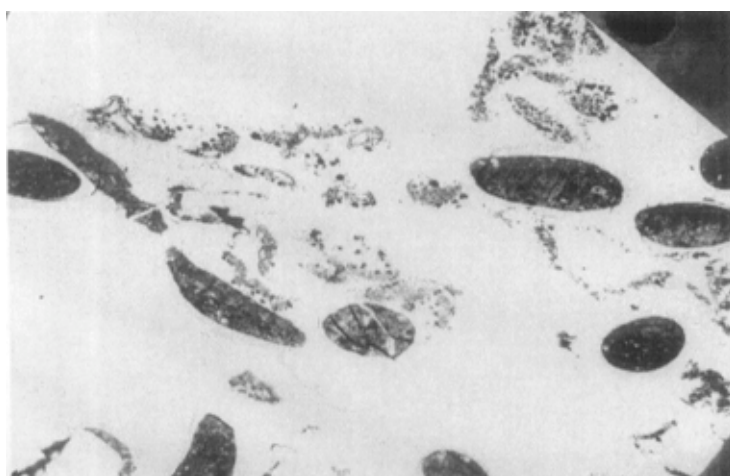
3. 菌丝与寄主细胞相互影响相互作用, 彼此间对抗相持, 直至寄主一方崩溃死亡。这在侵染的初期很明显。被侵染的寄主细胞即使被破坏, 破坏的细胞器和细胞质也形成致密的物质包裹在菌丝周围, 阻滞菌丝的下一步侵染 (图 3-5, 图 3-15, 图 3-19)。而菌丝对于直接接触的寄主细胞有很强的侵染作用, 同时对与其邻近的寄主细胞也有一定作用, 尚未接触, 就已经开始瓦解: 细胞壁部分地变薄、消失, 细胞内的叶绿体开始被破坏 (图 3-9)。菌丝与寄主细胞相接触, 两壁出现融合现象, 这可能是菌丝分泌酶类造成的。同时有些器官部位还出现凹陷和通道 (如图 3-24), 这其中可能还存在物质交换; 菌丝将寄主细胞内的物质或细胞壁物质分解转化成为菌丝可以利用的物质, 从而为菌丝生长或进行下一步侵染做好物质准备。



距离菌丝细胞较远的亚麻细胞形态完整($\times 700$)

图 3-55 菌丝与亚麻细胞相互作用透射电镜照片

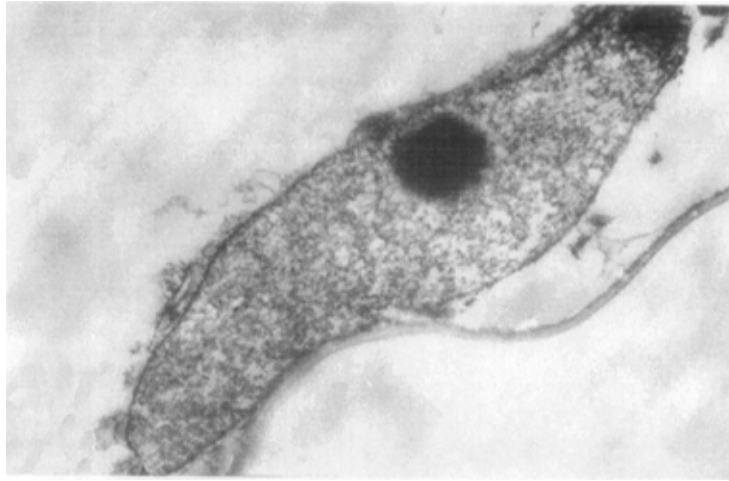
Figure 3-55 TEM photograph of interaction between mycelium and linseed



菌丝细胞在细胞间的生长形态各异($\times 1600$)

图 3-56 菌丝与亚麻细胞相互作用透射电镜照片

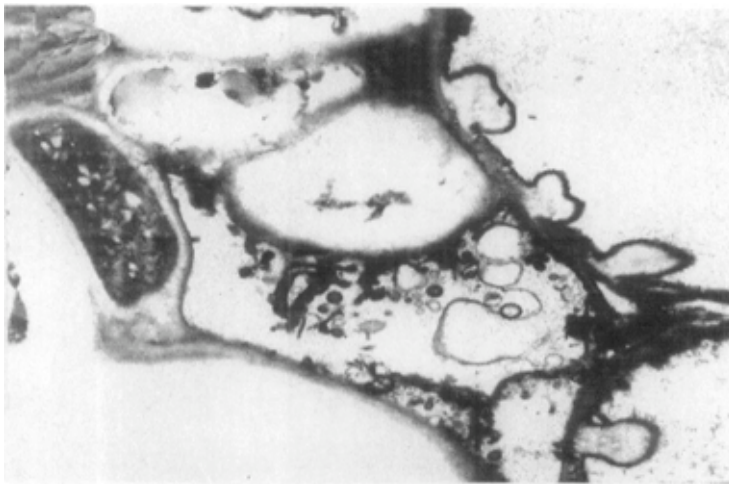
Figure 3-56 TEM photograph of interaction between mycelium and linseed



菌丝细胞呈不规则纺锤状($\times 13K$)

图 3-57 菌丝与亚麻细胞相互作用透射电镜照片

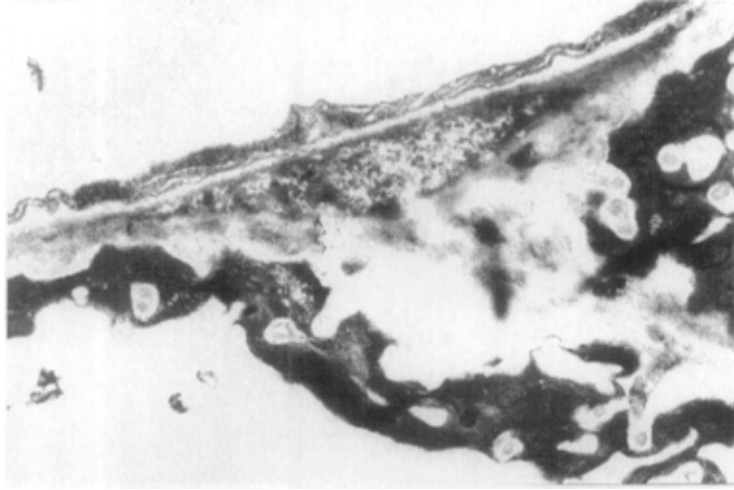
Figure 3-57 TEM photograph of interaction between mycelium and linseed



菌丝细胞在细胞间呈肾状($\times 7K$)

图 3-58 菌丝与亚麻细胞相互作用透射电镜照片

Figure 3-58 TEM photograph of interaction between mycelium and linseed



菌丝细胞受寄主细胞挤压呈狭长形状($\times 10K$)

图 3 - 59 菌丝与亚麻细胞相互作用透射电镜照片

Figure 3-59 TEM photograph of interaction between mycelium and linseed

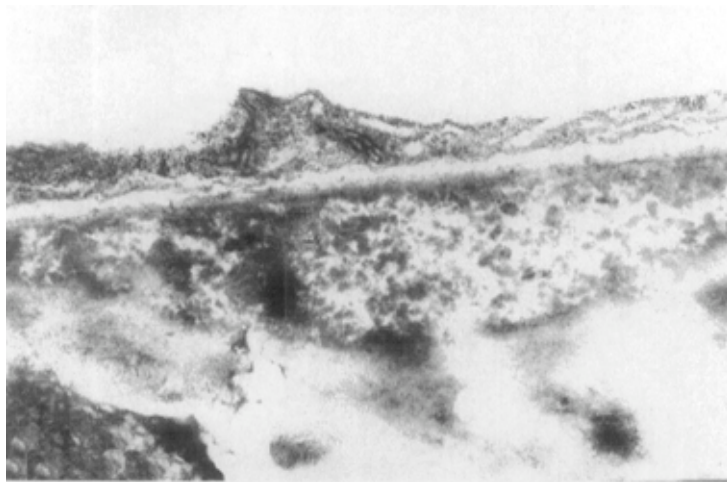


图 3 - 59 的放大图($\times 25K$)

图 3 - 60 菌丝与亚麻细胞相互作用透射电镜照片

Figure 3-60 TEM photograph of interaction between mycelium and linseed

结论与下一步研究打算

一、 结论

1. 核盘菌对亚麻进行侵染，菌丝既能在细胞内生长，又能在细胞间生长。这一点上在菌丝侵染叶片和子囊孢子侵染花瓣没有差异。
2. 核盘菌子囊孢子直接接种亚麻离体叶片，不能引起寄主发病，这与前人所论述的结果相同。
3. 在侵染过程中，侵染主要靠酶的帮助核盘菌来侵入寄主细胞。同时，菌丝生长所产生的生长压力对破坏细胞的结构也有一定影响。
4. 菌丝直径大小与侵染时期有关，在侵染初期菌丝直径较小，而在后期菌丝直径较大。
5. 菌丝侵染亚麻细胞过程中，菌丝和亚麻细胞之间相互作用，相互影响。从而导致亚麻细胞受到菌丝的生长压力而发生细胞壁产生凹陷的现象，而菌丝也由于受到寄主细胞的抵抗而形态发生变化。
6. 核盘菌侵染亚麻细胞时，无论是菌丝侵染叶片还是子囊孢子侵染花瓣，菌丝均出现凹陷现象；分析认为：这是菌丝侵染亚麻细胞而所具备的特殊侵染机制，与核盘菌侵染其他植物通常形成突起或形成分枝，靠机械压力和分泌酶类侵入寄主细胞不同；此种是形成凹陷，靠分泌酶类来达到破坏寄主细胞壁的目的。

二、 下一步研究打算

1. 继续对侵染亚麻的微观过程进行观察，同时对菌丝在侵染过程中的变化进行进一步观察，重点集中在核盘菌致病机理的细胞生物学及分子生物学解释。
2. 加强对核盘菌对不同寄主侵染机理的研究。如对豌豆的侵染微观过程的观察和机理分析。
3. 进一步研究核盘菌在侵染过程中菌丝形态、内部结构的变化规律，探索这一变化规律其侵染致病的关系。
4. 进一步探索核盘菌的生防菌的筛选，鉴定，并对核盘菌进行生物防

治的研究。

参考文献

- 1 谢影. 植物抗病的物质基础. 淮南师范学院学报. 2002, 2(4): 43 ~ 44
- 2 赵中秋, 郑海雷, 张春光. 生命科学. 2002, 2(4): 43 ~ 44
- 3 中国农科院植物保护研究所. 中国农作物病虫害. 中国农业出版社, 1979
- 4 乔春贵, 李树强等. 向日葵菌核病的研究和防治. 作物杂志, 1995, (6): 135 ~ 138.
- 5 Lumsden, R.D. , P.B.Adams, G.Abawi and Rsteadman 1975 Report on a *sclerotinia* work-shop conference. Bulletin Internationaol Society of Plant Pathology 5, Beltsville , Maryland, USA, 1974
- 6 钱允辉, 陈益新. 南通 2001 年油菜菌核病特大发生原因及治理对策探讨. 植保技术与推广. 2002, 22(4): 16 ~ 17
- 7 Framingham E.E. , D.M.Ann . Rungicidal control of *Sclerotinia sclertiorum* on cucumber Annals . Applied Biology. 1984, 104: 56 ~ 57
- 8 周乐聪, 周必文, 刘胜毅等. 菌核净系列新农药防治油菜菌核病的效果及机理. 农药. 1994, 33(3): 40 ~ 44
- 9 Adamus.P B et al. Phtopathol. 1979, 69: 896 ~ 899.
- 10 Dennis. C et al. Trans.Br.Mycol. 1971, 57: 25 ~ 59
- 11 Boland G J.Hall R. An index of plant hosts susceptible to *Sclerotinia sclerotiorum*. Can J plant Pathol.1994, 16: 93 ~ 108
- 12 李丽丽等. 油菜菌核病菌原生态条件的研究. 中国油料, 1986, (1): 75 ~ 78
- 13 王道本等译. 核盘菌论丛. 北京农业大学出版社, 1986
- 14 Watson-AK Miltimore-JE , Parasitism of the *scleraotia* of *Sclerotinia scleraotiorum* . Microsphaeropsis centaureae Canadian-Journal-of-Votany. 1975, 53(5), 2458 ~ 2461
- 15 李金秀, 陈文瑞, 秦芸. 油菜土壤中与核盘菌菌核存活有关的真菌. 四川农业大学学报. 1997, 15(1): 1 ~ 5
- 16 Huang-JC, kocco-EG. Penetration of hyphae of *Sclerotinia sclerao-tiorum* by *Conithyrium minitans* without the formation of apprèsoria. 1988, 12(2): 133 ~ 139
- 17 Jiang-DH, Li-GQ, Yi-XH and Wang-DB. Effects of some ecological

- factors on the scleraotial rot of *Conithyrium minitans* . Acta-Phytopathologica-Sinica. 1997, 27(1): 47 ~ 52
- 18 Thaning-C, Nelson-BD, Gulya-TJ. A method for assessing microbial effects on carpogenic germination of *Sclerotinia scleraotiorum* scleraotia . Proceedings of the 1998 Internatiional Sclerotinia Workshop, Fargo, ND, 1998, 9: 9 ~ 12
- 19 李世东, 刘杏忠. 食菌核基孢霉——一种有潜力的菌核病生防菌. 中国生物防治. 2000, 11(4): 177 ~ 182
- 20 杨谦, 张翼鹏. 核盘菌子囊盘形成的影响因子. 东北林业大学学报. 1995, 3, (23): 126 ~ 130
- 21 许卫东. 核盘菌一些生理性状的观察. 天津农学院学报. 1997, 12, (4): 43 ~ 46
- 22 DeBary A . In Comparative Morphology and Biology of the Fungi[M]. Mycetozoa and Bacteria Clarendon Press, Oxford, 1887: 380 ~ 382
- 23 Purdy LH . Some factors affecting penetration and infection by *S. sclerotiorum* [J] . Phytopathology. 1958, 48: 605 ~ 609
- 24 Abawi GS, Polach FJ, Molin WT. Infection of bean by ascospores of *whetzlinia sclerotiorum*[J]. Phytopathology. 1975, 65: 673 ~ 678
- 25 杨谦. 核盘菌侵入油菜超微结构及侵染机制的研究[J]. 植物病理学报. 1994, 24(3): 245 ~ 249
- 26 吴纯仁等. 油菜菌核病致病机理研究. 抗(耐)病性的组织病理学[J]. 中国油料. 1991, 1: 27 ~ 29
- 27 Lum sdem RD. Pectolytic enzymes of *Sclerotinia sclerotiorum* and their location in infected bean[J]. Can J Bot. 1976, 54: 2630 ~ 2641
- 28 RaiJN, Singh RP, Saxena VC. Phenolics and cell wall degrading enzymes in *Sclerotinia* infection of resistance and Susceptible plants of *Brassica juncea* [J] . Indian J Mycol and Plant Pathol. 1979, 9(2): 160 ~ 165
- 29 John PR. Common amino acid domain among endopoly galacturonases of ascomycete fungi[J]. Applied and Environmental Microbiology. 1990, 56(6): 2522 ~ 2528
- 30 Shashi Dhawan. Trans-eliminative (lytic) pectic enzymes in *S.sclerotiorum* infection of *B rassica juncea*[J] . Indian Journal of Mycology and Plant

- Pathology. 1981, 17(3): 325 ~ 327
- 31 罗宽, 周必文. 油菜病害及治理 [M]. 中国商业出版社, 北京, 1994
- 32 Maxwell DP, Lumsden RD. Oxalic acid production by *Sclerotinia sclerotiorum* in infected bean and in culture[J]. Phytopathology. 1970, 60: 1395 ~ 1398
- 33 吴纯仁等. 油菜菌核病的致病机理. 罹病组织内草酸毒素积累和分布的初步分析[J]. 植物病理学报. 1991, 21(2): 135 ~ 139
- 34 Godoy G, Steadman JR, Dicman MB, et al. DAN use of mutants to demonstrate the role of oxalic acid in pathogenicity of *Sclerotinia sclerotiorum* on *Phaseolus Vulgaris*[J]. Physiological and Molecular Plant Pathology. 1990, 37: 179 ~ 191
- 35 Singh R P, John P R. Phenolics and cell wall degrading enzymes in *Sclerotinia sclerotiorum* infection of resistance and susceptible parts of *Brassica juncea*[J]. India Journal of Mycol and Plant Pathology. 1979, 9(2): 160 ~ 165
- 36 薛应龙. 植物抗病的物质代谢基础[A]. 余叔文. 植物生理与分子生物学[C]. 科学出版社, 北京, 1992: 417 ~ 430
- 37 赵建伟, 陈爱武, 孟金陵. 甘蓝型油菜远缘杂交新品系某些酶的活性与抗菌核病的关系[J]. 中国油料作物学报. 1998, 20(1): 38 ~ 41
- 38 Dixon R A, Dickson M H, Grison R, et al. Molecular communication in interactions between plants and microbial pathogens[J]. Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol. 1990, 41: 339 ~ 367
- 39 Brokaert W F, Boland G J, Smith E A, et al. plant defensins: Novel antimicrobial peptides as components of the host defense system[J]. Plant Physiol. 1995, 108: 1353 ~ 1358
- 40 曾艳, 赵南明, 刘进元. 几丁质酶与植物防卫反应. 《生物工程进展》. 1997, 17(4): 236 ~ 248
- 41 Lawton K, Hughes W G. Acidic and basic class III chitinase mRNA accumulation in response to TMV infection of tobacco[J]. Plant Mol Biol. 1992, 19: 735
- 42 Chen Z, Adams P B, Morall R A, et al. Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid[J]. Science. 1993, 262: 1882 ~ 1886

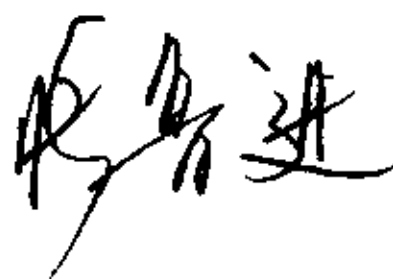
- 43 Neuenschwande U, Steel R G, Torrie J H, et al. Is hydrogen peroxide a second messenger of Salicylic acid in systemic acquired resistance[J]. Plant. 1995, 8: 227 ~ 233
- 44 刘澄清等. 甘蓝型油菜的抗病性及其遗传效应研究[J]. 中国农业科学. 1991, 24(3): 43 ~ 49
- 45 Dickson MH. Breeding for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in *Brassica oleracea*[J]. Acta Horticulture. 1996, 407: 103 ~ 108
- 46 Baswana KS, et al. Inheritance of stem rot in cauliflower [J]. Euphytica. 1991, 57: 93 ~ 96.
- 47 McClean DM. Role of dead flower parts in infection of certain Crucifers by *Sclerotium* (Lib) de Bary[J]. Plant Disease Report. 1958, 42: 663 ~ 666
- 48 李强生, McCartney HA, Heran A, 等. 油菜菌核病病原菌侵染条件的研究[J]. 安徽农业科学. 2000, 28(3): 314 ~ 315
- 49 Jamaux I, Gelie B, Lamarque C. Early stages of infection of rapeseed petals and leaves by *Sclerotinia sclerotiorum* revealed by scanning electron microscopy[J]. Plant Pathology. 1995, 44: 22 ~ 30
- 50 陈玉卿, 张洁夫, 吕忠进. 甘蓝型无花瓣油菜对菌核病抗(耐)性研究[J]. 江苏农业科学. 1991, 6: 10 ~ 13
- 51 张洁夫, 傅寿仲. 无花瓣油菜遗传与育种研究进展. 江苏农业学报. 2002, 18(3): 181 ~ 187
- 52 Buzza Gregory. 4th Australian rapeseed agronomists and breeders research workshop[C]. 1983: 15 ~ 16
- 53 刘后利. 油菜的遗传与育种[M]. 科技出版社, 北京, 1995
- 54 蔡明等. 甘蓝型油菜与埃塞俄比亚芥种间杂种的无花瓣性状表现[J]. 中国油料. 1991, 1: 86 ~ 87
- 55 傅寿仲. 油菜的形态与生理[M]. 江苏科技出版社, 南京, 1983
- 56 刘胜毅. 油菜抗菌核病草酸鉴定方法[J]. 中国油料. 1994, (增刊): 75 ~ 76
- 57 吴纯仁等. 草酸毒素在油菜抗病育种中的作用[J]. 中国农业科学. 1991, 24(4): 41 ~ 46
- 58 Wu CR. Selection of rape (*B. napus* L.) callus cultures resistant to oxalic acid[J]. Cruciferae Newsletter. 1991, 15: 80 ~ 81

- 59 吴力游, 高必达. 油菜抗菌核病突变体筛选及抗性鉴定[J]. 农业现代化研究. 1995, 18(5): 314 ~ 316
- 60 黄剑华. 利用小孢子 花药培养法筛选油菜抗菌核病品种[J]. 植物生理学通讯. 2001, 37(3): 226 ~ 227
- 61 赵云, 王茂林, 郑洪武. 油菜细胞诱变及抗草酸突变体的筛选[J]. 中国油料. 1996, 18(4): 10 ~ 14
- 62 郭学兰, 王汉中, 李均等. 玉米转座子 A c 转基因甘蓝型油菜的遗传变异[J]. 中国油料作物学报. 2001, 23(1): 7 ~ 11
- 63 BroglieKE. ChetI etal. Science. 1991, 254: 1194 ~ 1197
- 64 Grison GB, Lumsden R D, Christine R, etal. Field tolerance to fungal plant-pathogen of *Brassica napus* constittively expressing chimeric cjitinase gene[J]. Nature Biotechnology. 1996, 14(5): 643 ~ 646
- 65 Broglie K. Transgenic plants with enhanced resistance to the fungal pathogen *Rhizoctonia solani*[J]. Science. 1991, 254: 1194 ~ 1197
- 66 Oppenheim AB . Cloned chitinases infungal Plant-Pathogen control strategies[J]. Trend in Biotechnology. 1992, 57(2)
- 67 张丽华, 党本元等. 抗菌核病转基因油菜植株的获得. 高技术通讯. 1999 , 12: 41 ~ 46
- 68 李方球, 官春云. 油菜菌核病抗性鉴定、抗性机理及抗性遗传育种研究进展. 作物研究. 2001, 3: 85 ~ 92
- 69 实用生物电子显微术. 科学技术出版, 辽宁, 1989
- 70 张景强等. 生物电子显微技术. 中山大学出版社, 1987

哈尔滨工业大学硕士学位论文原创性声明

本人郑重声明：此处所提交的硕士学位论文《核盘菌侵染亚麻的微观过程观察及形态分析》，是本人在导师指导下，在哈尔滨工业大学攻读硕士学位期间独立进行研究工作所取得的成果。据本人所知，论文中除已注明部分外不包含他人已发表或撰写过的研究成果。对本文的研究工作做出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式注明。本声明的法律结果将完全由本人承担。

作者签字



日期：2003年7月2日

哈尔滨工业大学硕士学位论文使用授权书

《核盘菌侵染亚麻的微观过程观察及形态分析》系本人在哈尔滨工业大学攻读硕士学位期间在导师指导下完成的硕士学位论文。本论文的研究成果归哈尔滨工业大学所有，本论文的研究内容不得以其它单位的名义发表。本人完全了解哈尔滨工业大学关于保存、使用学位论文的规定，同意学校保留并向有关部门送交论文的复印件和电子版本，允许论文被查阅和借阅。本人授权哈尔滨工业大学，可以采用影印、缩印或其他复制手段保存论文，可以公布论文的全部或部分内容。

保密☐，在 年解密后适用本授权书。

本学位论文属于

不保密☐.

(请在以上相应方框内打“√”)

作者签名：



日期：2003年7月2日

导师签名：



日期：2003年7月2日

致谢

本研究在导师杨谦教授的严格要求和悉心指导下完成的。从论文的选题、设计、撰写、修改直至顺利完成，都倾注了恩师的心血。两年来，导师渊博的知识、高尚的品格、严谨的科学态度使我受益匪浅；对我的精心栽培和谆谆教诲，使我终身难忘。在此论文完成之际，我谨向恩师杨谦教授表示由衷的感谢。

论文完成过程中，得到了东北农业大学电镜实验室王学东、崔琳老师的耐心指导与无私帮助；顾挺等同学也给予我了大力支持和帮助。

值此论文完成之际，谨向所有给予我关心、指导和帮助的各位老师、同学和朋友们致以诚挚的谢意和深深的祝福，同时向参加论文评阅和答辩的专家、教授之一衷心的感谢和崇高的敬意。

作者：张鲁进
2003 年 6 月 20 日