

## · 中药农业 ·

# 人参锈腐菌 *Cylindrocarpon destructans* 侵染早期 人参根尖显微及超微结构变化<sup>△</sup>

高原, 丁万隆, 李勇\*

(中国医学科学院 北京协和医学院 药用植物研究所, 北京 100193)

**[摘要]** 目的: 研究人参锈腐菌 *Cylindrocarpon destructans* 接种后人参根尖显微及超微结构的变化情况。方法: 采用石蜡切片法研究人参根尖显微结构, 透射电镜研究人参根尖超微结构。结果: 与对照相比, 锈腐菌接种 7 d 后人参根尖表皮细胞细胞壁明显增厚, 表皮细胞内出现颗粒物沉积, 部分表皮细胞的细胞壁出现破裂, 细胞发生解体, 且根内髓部同样出现颗粒物。超微结构观察发现, 对照组人参根尖细胞形状规则, 内含物丰富, 细胞器清晰可辨; 接种人参锈腐菌后人参根尖细胞形态异常, 细胞内含物减少, 细胞器因解体消失而无法辨别。结论: 人参锈腐菌可能是先侵染人参表皮细胞, 再通过细胞间隙进入木质部, 阻碍水分和无机盐运输, 导致人参发病死亡。

**[关键词]** 人参; 人参锈腐菌; 侵染; 显微结构; 超微结构

## Microstructure and Ultrastructure Changes of *Panax ginseng* Roots Infected by *Cylindrocarpon destructans* at Early Stage

GAO Yuan, DING Wanlong, LI Yong\*

(Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences &  
Peking Union Medical College, Beijing 100193, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the microstructure and ultrastructure changes of *Panax ginseng* roots infected by *Cylindrocarpon destructans*. **Methods:** The paraffin section was used to observe the microstructure of root tips of *P. ginseng*. The superfine slice was used to observe the ultrastructure of root tips of *P. ginseng*. **Results:** Microstructure showed that the morphology and structure of epidermal cells of *P. ginseng* were regular in control. However, epidermal cell wall became thicker 7 days post inoculation of *C. destructans*, and particles deposition in cells as well as in pith parts was shown. The cell walls were broken, cells began to disintegrate. Ultrastructure showed that morphology of root cells of *P. ginseng* was regular in control. Cells had abundant contents, and organelles were easy to observe. On the contrary, morphology of cells was abnormal and contents in cells were decreased when infected by *C. destructans*. The organelles were break up, and some of them were disappeared. **Conclusion:** The hypha invaded the epidermal cells of *P. ginseng* maybe the first step of *C. destructans* infection. Then hypha entered into xylem of ginseng root through the intercellular space, which obstructed the transport of water and inorganic salt, and finally lead to the death of root cells.

**[Keywords]** *Panax ginseng*; *Cylindrocarpon destructans*; infection; microstructure; ultrastructure

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.2017.8.023

人参 *Panax ginseng* C. A. Meyer 为五加科人参属多年生草本植物, 主产于我国东北地区, 具有抗衰老、抗氧化、增强免疫力等功效, 市场需求量巨大。人参栽培周期较长, 土传病害发生较为普遍, 严重影响人参产量和品质<sup>[1-2]</sup>。由人参锈腐菌 *Cylindrocarpon destructans* 引起的人参锈腐病是人参产区发生最为普遍, 危害性最大的病害之一。Rah-

man 和 Punja<sup>[3]</sup> 在研究人参锈腐菌侵染寄主时发现, 病菌菌丝直接穿透人参表皮细胞并在皮层细胞内生长, 随后细胞分解并伴有酚类化合物大量积累。Kim 等<sup>[4]</sup> 发现接种人参锈腐菌后, 人参会出现细胞壁增厚, 以及接种部位周皮损伤的现象。这些研究表明锈腐菌侵染会导致人参内部结构的改变。人参锈腐菌和寄主互作研究主要集中在锈腐菌侵染后人

<sup>△</sup> [基金项目] 中医药行业科研专项(201407005); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程(2016-I2M-3-017)

\* [通信作者] 李勇, 研究员, 研究方向: 药用植物病害生物防治; E-mail: liyong@implad.ac.cn

参防御酶的变化<sup>[5]</sup>，但对于人参锈腐菌的侵染方式以及病菌侵染后人参内部组织、细胞器变化的研究鲜有报道。本研究使用盆栽接种实验，利用光学显微镜和透射电镜，观察人参锈腐菌侵染后人参根尖的显微结构和超微结构变化，旨在明确人参锈腐菌侵染对人参内部组织和细胞形态的影响，为研究人参锈腐菌与寄主植物人参的互作机制奠定理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

植物材料为三年生人参苗，取自中国医学科学院药用植物研究所实验田。致病菌人参锈腐菌 *Cylindrocarpon destructans* 由课题组分离、保存。

### 1.2 植物材料接种方法及样品采集

选取三年生健康人参苗，用 50% 多菌灵 800 倍稀释液浸泡 10 min 灭菌，再用蒸馏水冲洗 3 次。将人参苗移栽到装有无菌石英砂的塑料盒中，每盒 36 株，光周期为 16/8 h，25 ℃ 室温环境下培养，参考李勇等<sup>[6]</sup>采用 Hoagland 营养液提供人参苗生长所需养分。待人参苗叶片完全展开后，处理组接种浓度为  $3.9 \times 10^7 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$  的病原菌孢子悬浮液 250 mL，对照组喷施等量 Hoagland 营养液。接种

1 d, 4 d, 7 d 后分别收集对照组和处理组人参幼根，先用无菌水冲洗 3 次，再用无菌滤纸吸干水分备用，每个时间点取 10 份根尖样品。

### 1.3 石蜡切片制作

用手术刀片切取 5 mm 人参幼苗根尖，将材料置于福尔马林-醋酸-酒精(FAA)中固定 2 h 以上，放置备用。参考陈长宝<sup>[7]</sup>的方法制作石蜡切片，包埋材料分别纵切和横切，以厚度 10 μm 进行连续切片，依次用番红、固绿对不同部位染色，切片烘干后用 Leica DM2500 型光学显微镜观察处理组与对照组根尖细胞横切面、纵切面的显微结构，拍照留存。

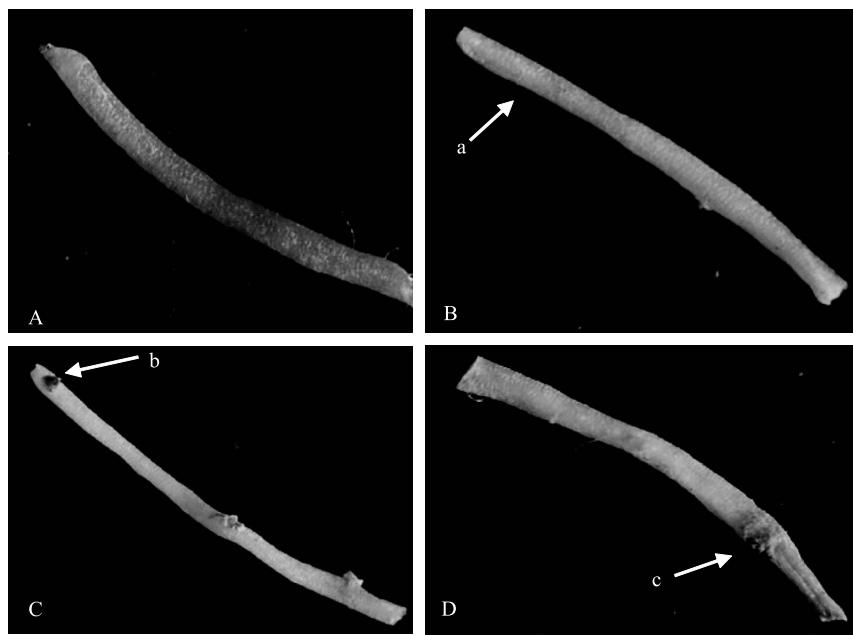
### 1.4 电镜观察

用手术刀片从对照组和处理组切取 1 mm<sup>3</sup> 人参幼苗根尖样品，用 2.5% 戊二醛固定 3 h，样品固定后送至中国农业大学电镜室制作超薄切片，利用 JEM-1400 透射电镜观察人参根尖细胞内部结构，拍照留存。

## 2 结果与分析

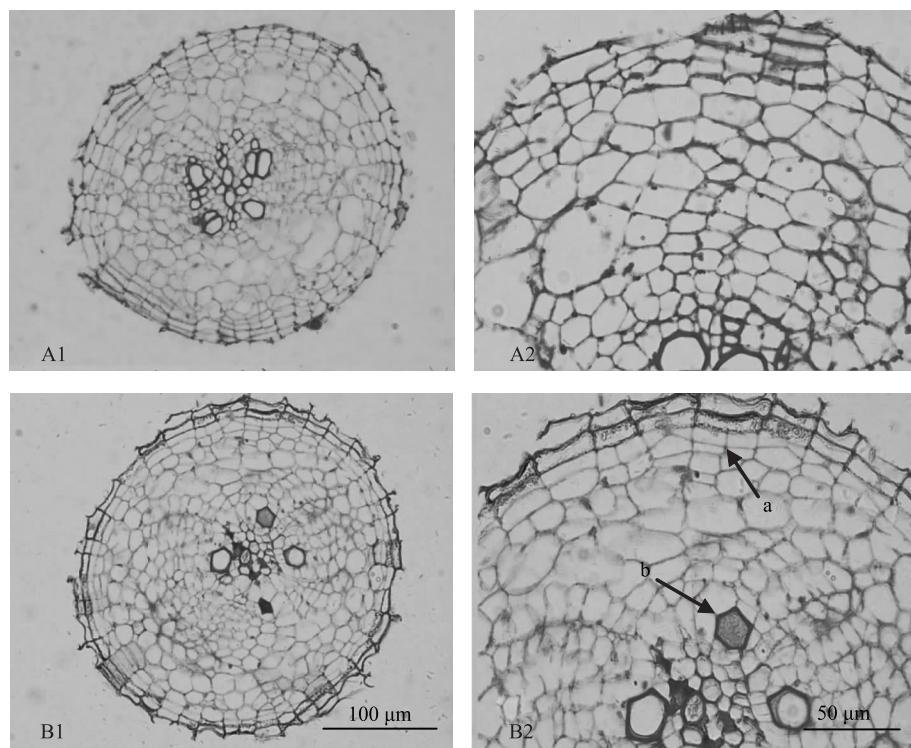
### 2.1 病菌接种后人参根部的症状

接种 1 d 后，人参根表出现微弱锈色斑点，表皮完好。接种 4 d 后，有机械损伤的根部出现锈斑，表皮仍完好。接种 7 d 后，锈斑扩大，易被观察到，表皮有失水现象出现(图 1)。



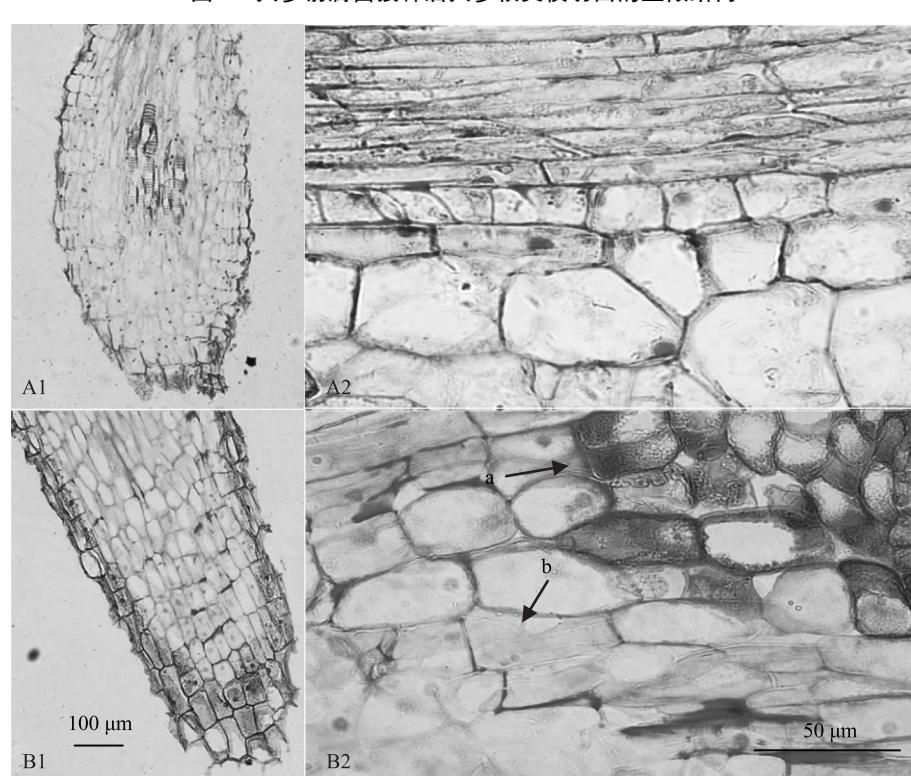
注：A. 对照组人参根表；B. 接菌 1 d 后的人参根表症状；C. 接菌 4 d 后人参根表症状；D. 接菌 7 d 后人参根表症状；  
a. 根表有微小锈斑出现；b. 根部有机械损伤或结点部位出现锈斑；c. 根表细胞失水

图 1 锈腐菌接种后人参幼根部位的症状



注: A1. 对照组人参根尖横切面( $10\times 10$ 倍放大); B1. 接菌7 d后人参根尖横切面( $10\times 10$ 倍放大);  
A2. 对照组人参根尖横切面( $10\times 40$ 倍放大); B2. 接菌7 d后人参根尖横切面( $10\times 40$ 倍放大);

图2 人参锈腐菌接种后人参根尖横切面的显微结构



注: A1. 对照组人参根尖纵切面( $10\times 10$ 倍放大); B1. 接菌7 d后人参根尖纵切面( $10\times 10$ 倍放大);  
A2. 对照组人参根尖纵切面( $10\times 40$ 倍放大); B2. 接菌7 d后人参根尖纵切面( $10\times 40$ 倍放大);  
a. 细胞内充满颗粒物; b. 细胞内有菌丝侵入

图3 人参锈腐菌接种后人参根尖纵切面的显微结构

## 2.2 人参锈腐菌接种对人参根尖细胞显微结构的影响

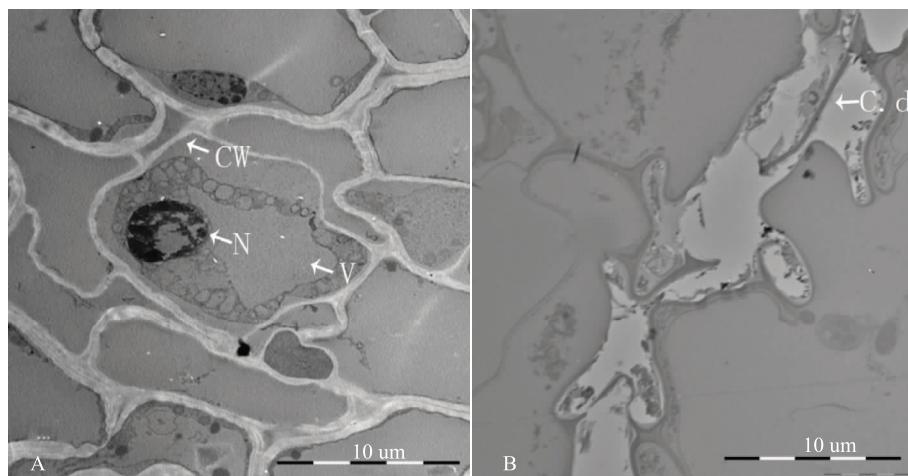
在光学显微镜下观察发现,对照组人参幼根表皮细胞形态结构正常,人参锈腐菌接种7 d后人参根尖表皮细胞壁出现明显增厚,细胞内出现颗粒物沉积,部分表皮细胞壁破裂以及发生细胞解体。且根内髓部同样有颗粒物出现,推测菌丝已侵入木质部,阻碍了根内水分和无机盐的运输,最终导致表皮失水(图2)。

如图3所示,由人参根尖纵切面显微结构可见,对照组人参根尖表皮细胞和韧皮部细胞结构正常,界限分明,表皮细胞排列紧密,且绝大部分细胞的

细胞核清晰可见。接种人参锈腐菌7 d后人参根尖表皮细胞排列混乱,且表皮细胞出现颗粒物沉积,部分根尖细胞的细胞核难以辨识。在10×40倍视野中,部分细胞内充满菌丝,病变细胞开始溶解。

## 2.3 人参锈腐菌接种对人参根尖细胞超微结构的影响

透射电镜观察发现,对照组人参根尖细胞形状规则,内含物丰富,细胞中心有1个大液泡,细胞核及其他细胞器在细胞边缘,贴近细胞壁分布。接种人参锈腐菌后,人参根尖细胞形态出现异常,细胞内含物减少,细胞器因解体消失而无法辨别(图4)。



注: A. 对照组人参根尖细胞; B. 处理组人参根尖细胞;

CW. 细胞壁; N. 细胞核; V. 液泡; C. d. 人参锈腐菌

图4 人参锈腐菌接种前后人参根尖超微结构

## 3 讨论

病原菌与植物间存在互作反应,植物感受到病菌侵染后,会在细胞壁与质膜间沉积形成胞壁沉积物以抵御病菌入侵<sup>[8]</sup>。病菌侵染早期,植物内部通过信号传递激活效应器,使抗病基因表达上调,做出防卫反应<sup>[9]</sup>。病原真菌侵染植物的方式较多,如分泌酶类消化细胞壁<sup>[10-11]</sup>、物理穿透或者二者兼有<sup>[12]</sup>。立枯丝核菌侵染水稻时产生胞壁降解酶,导致水稻叶鞘细胞膜透性改变,组织结构损伤,以及细胞壁破裂,从而易于病斑形成<sup>[13-14]</sup>。立枯丝核菌侵染马铃薯时,则先形成附着胞,再形成侵染垫紧贴在寄主表面,通过表皮细胞或细胞间隙进入寄主组织内,侵染顺序为:芽-茎-根-匍匐茎-块茎<sup>[15]</sup>。疫霉菌侵染大豆幼苗时,先形成附着胞,然后产生入侵结构,从表皮细胞间隙侵入寄主组织,通过细

胞间隙向皮层组织扩展。有些病菌在菌丝突破表皮蜡质层后未继续入侵,而是在蜡质层和表皮细胞壁之间扩展<sup>[8]</sup>。

本研究发现,接种锈腐菌4 d后人参根尖开始出现锈斑,表明锈腐菌侵染迅速,人参对锈腐菌的侵染应答可能发生在病菌侵染后1~4 d内。锈腐菌接种7 d后人参根尖出现明显的锈斑症状,表皮细胞明显增厚并出现颗粒物,表明菌丝主要由表皮细胞侵入。韧皮部细胞基本完好,细胞间隙偶见菌丝,木质部髓腔内出现大量颗粒物,推测菌丝通过细胞间隙侵入木质部阻塞导管,阻碍了人参根部对水分和无机盐的运输,最终导致人参失水腐烂,死亡。本研究未观察到附着胞与侵染垫,推测侵染结构可能在接菌后2~3 d内形成,有关人参锈腐菌致病机理以及菌丝侵入途径,有待进一步研究。

## 参考文献

- [1] 袁忠久,李恩友,王远征,等.人参病害综合防治技术[J].农业与技术,2015,35(2):124-125.
- [2] Punja Z K. Fungal pathogens of American ginseng (*Panax quinquefolium*) in British Columbia[J]. Canadian Journal of Plant Pathology,1997(19):301-306.
- [3] Rahman M, Punja Z K. Factors influencing development of root rot on ginseng caused by *Cylindrocarpon destructans*[J]. Phytopathology,2005,95(12):1381-1390.
- [4] Kim J H, Kim M S, Jeon Y H, et al. Different structural modifications associated with development of ginseng root rot caused by *Cylindrocarpon destructans*[J]. Plant Pathology Journal,2009,25(1):1-5.
- [5] 刘延硕,郜玉钢,王南,等.人参锈腐菌侵染参根后防御酶变化的分析[J].特产研究,2011,33(1):50-54.
- [6] 黄小芳,李勇,易茜茜,等.五种化感物质对人参根系酶活性的影响[J].中草药,2010,41(1):117-121.
- [7] 陈长宝.人参与化感作用及其忌连作机制研究[D].长春:吉林农业大学,2006.
- [8] 左豫虎,康振生,黄丽丽,等.大豆疫霉菌对大豆下胚轴侵染过程的细胞学研究[J].植物病理学报,2005,35(3):235-241.
- [9] Gao Y, He X, Wu B, et al. Time-course transcriptome analysis reveals resistance genes of *Panax ginseng* induced by *Cylindrocarpon destructans* infection using RNA-Seq [J]. Plos One,2016,11(2):e0149408.
- [10] 陈晓波,王冬梅,刘娟,等.植物细胞微丝骨架对真菌侵染的反应[J].河北农业大学学报,2001,24(3):100-104.
- [11] Sathiyaraj G, Srinivasan S, Kim H B, et al. Screening and optimization of pectin lyase and polygalacturonase activity from ginseng pathogen *Cylindrocarpon destructans*[J]. Brazilian Journal of Microbiology,2011,42(2):794-806.
- [12] 贺闻.植物病原真菌与昆虫病原真菌侵染寄主表皮的分子机制研究[D].重庆:重庆大学,2012.
- [13] 陈夕军,张红,徐敬友,等.水稻纹枯病菌胞壁降解酶的产生及致病作用[J].江苏农业学报,2006,22(1):24-28.
- [14] 张红,陈夕军,童蕴慧,等.纹枯病菌胞壁降解酶对水稻组织和细胞的破坏作用[J].扬州大学学报(农业与生命科学版),2005,26(4):83-86.
- [15] 拓宁,张君,邱慧珍,等.立枯丝核菌对马铃薯侵染过程的显微结构观察与胞壁降解酶活性的测定[J].草业学报,2015,24(12):74-82.

(收稿日期 2016-11-30)

(上接第1164页)

## 4 小结与讨论

白条党参一般3月中下旬移栽,在土壤墒情正常情况下,35 d左右出苗,10月下旬收获,生长期共约210 d左右。地上部分鲜重于7月上旬进入快速生长期,9月下旬单株地上部分鲜重达最大值。

白条党参根粗的生长,于8月下旬加快,8月下旬至10月中旬占总增粗量的53.3%。8月下旬至10月中旬则是根持续快速增长期。此时要进一步加强追肥、保水、防虫治病等田间管理措施,对白条党参优质高产具有重要意义。

白条党参内在质量,从9月下旬开始测定,每10 d测定1次,浸出物含量为55.9%~65.2%,内在质量符合《中华人民共和国药典》标准,到10月20日浸出物含量达到最高,10月30日趋于稳定。

4月中下旬土壤水分状况,决定白条党参出苗期的迟早,即而影响生长速度及其生长量的大小。同时,白条党生长动态亦受移栽密度、气候条件、土壤肥力<sup>[9]</sup>、降水分配及田间管理水平等影响。各因子互作效应关系如何,则有待进一步研讨。

## 参考文献

- [1] 刘恩荔,秦雪梅.党参研究进展[J].山西医科大学学报,2002,33(6):567-569.
- [2] 陈向东,刘效瑞.甘肃白条党参丰产优质栽培技术体系.甘肃农业科技[J].2011(10):53-56.
- [3] 聂玲霞,张双定.陇西县党参栽培技术规程.甘肃农业科技[J].2016(10):85-87.
- [4] 张建清,苏雪,吴琼,等.药用植物党参的RAPD分析[J].中药材,2006,29(5):417-420.
- [5] 刘效瑞,王富胜,刘荣清,等.旱农区主要粮经作物规范化生产技术研究与应用[M].兰州:科学技术出版社,2014:189-217.
- [6] 王培田,孔凡瑞,冯启焕,等.植物遗传育种学[M].北京:科学出版社,1976:229-237.
- [7] 王峰涛,徐国钧.中药党参的药源调查[J].中草药,1992,23(3):143-147.
- [8] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].北京:中国医药科技出版社,2015:281-282.
- [9] 冯守疆,龚成文,赵欣楠,等.甘肃道地中药材党参需肥规律研究[J].甘肃农业科技,2010(10):11-12.

(收稿日期 2017-02-24)