

# 叶锈菌对不同杨树品种叶片木质素的影响

费昭雪,陈祖静\*,曹支敏,刘莉丽

(西北农林科技大学 林学院,陕西 杨陵 712100)

**摘要:**通过对不同抗性的杨树寄主在不同接种时间段的木质素的沉积进行了跟踪。染色后观察发现:在受到落叶松—杨栅锈菌侵染后 1~2 d 不亲和组合叶肉组织中木质素积累就很多,3 d 后积累比较明显。木质素积累的整个进程基本表现为木质素积累在近免疫、高抗品种较多,感病品种中很少,而免疫品种中无明显变化。

**关键词:**杨树;落叶松—杨栅锈菌;木质素

**中图分类号:**S763.1      **文献标志码:**A      **文章编号:**1001-7461(2012)01-0124-05

## Effects of *Melampsora larici-populina* Kleb. on Leaf Lignin of Poplar Varieties with Different Resistance

FEI Zhao-xue, CHEN Zu-jing\*, CAO Zhi-min, LIU Li-li

(College of Forestry, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

**Abstract:** The lignin deposition in the leaves of host poplars with different resistance in different inoculation durations was traced by dyeing methods. It was found that after the infected by *Melampsora larici-populina* Kleb., the lignin accumulation in the 1~2 d mesophyll tissue of incompatible combination was very little, while the accumulation after 3 d was relatively obvious; the whole processes of lignin accumulation basically appeared as more in nearly immune and high resistance varieties, very little in susceptible varieties and no obvious change in immune varieties.

**Key words:** Popular; *Melampsora larici-populina* Kleb.; lignin

杨树由于具有优质、速生、适应性强、易改良遗传等优点,被广泛用于木材、造纸、包装等多种行业,具有重要的经济、社会、生态效益<sup>[1-3]</sup>。木质素是植物细胞壁的重要组分,主要沉积在疏导组织(如导管和管胞)、机械组织(如纤维、厚壁组织等)和保护组织(如表皮)的细胞次生壁中<sup>[4]</sup>。杨树叶锈病(*Melampsora larici-populina* Kleb.)是杨树的一种重要病害,是危害最严重、分布最广的一种叶部病害之一。植物组织结构抗病性是植物细胞在受到病原菌或逆境伤害时所发生的一系列结构抗性反应,如木质素沉积,侵填体和胶质体等的形成等<sup>[4-5]</sup>。

寄主受到病菌侵染后组织结构的变化与抗病性有一定的关系。国内外许多学者在作物上对小麦与

叶锈病互作的组织学和超微结构有研究后发现,木质素的沉积表现一定差异,认为抗锈性与木质素的沉积有关<sup>[3,6-9]</sup>。对于杨栅锈菌与寄主互作中木质素与抗病性的研究较少,在国外 Rinaldi 等人认为不同抗性寄主受侵染后木质素的沉积有一定差异<sup>[3,10]</sup>。在国内,田呈明等人对叶锈病的组织病理学和细胞学研究开展了一些的工作,主要研究在二者互作时的生理代谢及相关酶的研究方面<sup>[11-17]</sup>。其他研究者的工作主要集中在对病原菌种类及其致病性分化、流行规律、杨树抗锈性的遗传与鉴定、抗病品种选育以及化学防治等方面<sup>[18-24]</sup>。本研究通过选择不同抗性的杨树品种,通过观察不同寄主杨树与叶锈菌互作过程中木质素沉积,揭示寄主受侵后组织结构的

收稿日期:2010-11-17    修回日期:2011-03-01  
基金项目:西北农林科技大学大型仪器新功能开发项目(dysb0901)  
作者简介:费昭雪,女,硕士,实验师,主要从事植物病理学及分子生物学方面的研究。  
\* 通讯作者:陈祖静。

物理变化,为生理代谢变化和化学结构的研究提供基础和抗病育种提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 供试菌种与杨树

供试菌种为落叶松—杨栅锈菌 (*Melampsora larici-populina* Kleb.) CMLP<sub>4</sub> (中国落叶松 4 号生理小种 (*Melampsora larici-populina* race 4 in China)) 和 CMLP<sub>2</sub> (中国落叶松 2 号生理小种 (*Melampsora larici-populina* race 2 in China)) 的甘肃临夏单孢菌系 Gl<sub>052</sub> 和四川宝兴单孢菌系 Sb<sub>052</sub>, 由西北农林科技大学林学院森林病理学实验室提供。2008 及 2009 年春秋季节用太白杨 (*Populus purdomii*) 作为寄主在窑洞温室人工扩繁, 菌种的活化、接种以及保存等参照曹支敏等 (1998) 的方法。

供木质素染色观察的杨树为落叶松—杨栅锈菌生理小种鉴别寄主和生产中常用杨树品种 (种): 美洲黑杨 (*Populus deltoides*)、中华常青杨 (*P. nigra* × *P. deltoides*)、川杨 (*P. szechuanica*)、波兰 15 号杨 (*Populus* × *euramericana* cv. ‘Polska 15 A’), 欧美 108 杨 (*Populus* × *euramericana* cv. ‘Guarieto’), 中绥 12 号杨 (*Populus deltcides* × *P. cothogaha*)、北抗杨 1 号 (*Populus deleoides*. CL. “Beikang-1”)、中林美荷杨 (*Populus deltoides* × *P. nigra*) 和 I-69 杨 (*Populus deltoides* cv. “I-69”)。

1.2 接种

2009 年 3 月采集各品种杨树 1 a 生的插条, 盆栽于西北农林科技大学植物保护学院温室。6 月初选取叶龄指数 (LPI) 为 5~8 片健康叶片作为接种叶片。

参照曹支敏等 (1998) 的方法分别接种 Gl<sub>052</sub>

(G)、Sb<sub>052</sub> (S) 夏孢子悬浮液 1~2 mg · mL<sup>-1</sup> 于杨树叶片上, 以涂抹自来水作为对照 (CK)。每个处理设 3 个重复。接种后置于保湿桶内保湿 24 h, 然后放在 22~26 °C 的温室培养<sup>[9]</sup>。

1.3 反应型的测定

接种后观察叶片变化并记载各处理的潜育期 (d) 和反应型。反应型分级标准按照曹支敏等 (1998) 的分级标准<sup>[9]</sup>。

1.4 木质素染色观察

木质素观察采用 Rinaldi 的方法: 间苯三酚—盐酸法<sup>[10]</sup>。在接种后 0.5、1、2、3、5、7 和 9 d 随机选取各处理叶片, 并打成小圆片 (直径 4 mm), 每个处理打 10 个小圆叶片, 迅速放入盛有 95% 的酒精和冰醋酸 (1 : 1) 混合液 20 mL 的青霉素瓶中, 黑暗下固定 24 h, 然后放入饱和水合氯醛中透明一周之后用无水乙醇冲洗 2 次, 再用无水乙醇中脱水 2 d 以上, 取出材料后用 1% (w/v) 间苯三酚溶液 (溶于 95% 酒精, 现用现配, 黑暗避光保存) 黑暗染色 10 min, 然后用 6 mol · L<sup>-1</sup> 的盐酸处理 10 min, 封片, 立即置于生物显微镜下观察, 拍照。

2 结果与分析

2.1 寄主反应型测定结果

接种叶锈菌不同生理小种的菌系 Gl<sub>052</sub> 与 Sb<sub>052</sub> 后, 除了北抗杨、I-69 杨和中林美荷分别对两个生理小种的反应型不同外, 其他各品种对落叶松—杨栅锈菌菌系反应基本表现一致 (表 1)。其中北抗杨与 I-69 杨对菌系 Sb<sub>052</sub> 表现为近免疫或免疫, 而对 Gl<sub>052</sub> 表现为中感, 说明同一杨树品种对落叶松杨栅锈菌的不同生理小种或菌系的抗病性可表现不同, 表现出非亲和反应和亲和反应两种基本形式。

表 1 供试杨树品种 (种) 的反应型、潜育期及其抗病性

杨树品种 (种)	落叶松杨栅锈菌 Gl <sub>052</sub>			落叶松杨栅锈菌 Sb <sub>052</sub>		
	反应型	潜育期/d	抗病性	反应型	潜育期/d	抗病性
美洲黑杨	0	/	免疫	0	/	免疫
北抗杨	2 <sup>+</sup>	10	中抗	0	22	近免疫
中绥 12 号杨	0	5	近免疫	0	5	近免疫
川杨	1	5	高抗	1	5	高抗
I-69 杨	3~3 <sup>+</sup>	6	中感	0	/	免疫
欧美 108 杨	1~1 <sup>+</sup>	5	高抗	1 <sup>+</sup> ~2	6	中抗
波兰 15 号杨	2 <sup>+</sup>	5	中抗	2 <sup>+</sup> ~3	5	中感
中华常青杨	2 <sup>+</sup> ~3	7	中感	2	5	中感
中林美荷	3	5	中感	4 <sup>+</sup>	5	高感

2.2 锈菌对不同品种木质素含量的影响

对不同杨树叶片接种不同时间段叶片制片后显微观察结果如表 2 所示。除免疫品种美洲黑杨叶片

中木质素无明显积累外, 其余品种都有不同程度的积累。感病品种中华常青杨接种后木质素积累比较少, 近免疫品种中绥 12 号杨、高抗品种川杨中积累

较多且开始时间较早。其余品种表现为在不亲和组合中木质素积累较多。

表 2 不同组合杨树叶片中木质素的沉积情况

Table 2 Deposition state of lignin in poplar leaves with different interactions				
杨树品种 (种)	落叶松杨栅锈菌 Gl <sub>052</sub>		落叶松杨栅锈菌 Sb <sub>052</sub>	
	起始时间/d	沉积情况	起始时间/d	沉积情况
美洲黑杨	/	无 (附图 I—G)	/	很少 (附图 I—S)
北抗杨	5	很少 (附图 II—G)	1	多 (附图 II—S)
中绥 12 号杨	1	非常多 (附图 III—G)	2	非常多 (附图 III—S)
川杨	5	比较多 (附图 IV—G)	5	非常多 (附图 IV—S)
I—69 杨	3	比较多 (附图 V—G)	5	比较多 (附图 V—S)
欧美 108 杨	1	比较多 (附图 VI—G)	1	比较多 (附图 VI—S)
波兰 15 号杨	5	很少 (附图 VII—G)	7	很少 (附图 VII—S)
中华常青杨	7	很少 (附图 VIII—G)	3	很少 (附图 VIII—S)
中林美荷	7	很少 (附图 IX—G)	0.5	非常多 (附图 IX—S)

3 结论与讨论

本试验结果表明杨树叶片受锈菌侵染后,1~2 d 时在不亲和组合叶片组织内就有很多木质素的积累,3 d 时积累比较明显,整个进程中近免疫和高抗品种木质素积累较多,感病品种中很少(表 2),这与 Rinaldi<sup>[10]</sup>的结果基本一致。

虽然木质素的积累与苯丙氨酸解氨酶(PAL)的

局部活性有关,但并不起决定作用,PAL 主要影响木质素前体的形成;过氧化物酶(POD)是一个大的同工酶组,具有复杂的功能,有研究表明它与木质素单体的聚合有关。杨树与叶锈菌互作的生物化学研究中发现美洲黑杨叶片接种这两个锈菌菌系后,PAL 和 POD 活性都有所提高<sup>[14]</sup>,但是未发现木质素积累,这可能跟木质素合成中其他有关酶类的调控有关,如羟化酶、对甲基转移酶(OMT)、4-香豆素辅酶 A 连接酶(4CL)、还原酶等<sup>[24-27]</sup>,具体原因有待进一步验证。此外,免疫品种中锈菌的侵染被限制在入侵前或入侵阶段,在锈菌形成附着孢后,其侵染丝就受到抑制,从而不会对寄主的叶肉组织造成影响;本研究还表明不同抗性组合之间的木质素积累进程与积累量不同,这可能与抗病品种诱导木质化作用的特异性由病原物中诱导木质化的潜在基因和植物中对此发生反应的基因所控制,并且受有关酶的调节有关。

有研究者提出,对基因遗传控制的木质化特异性更能控制诱导木质化的水平,可被非亲和小种诱导木质化的品种,也可被亲和小种做某种程度的诱导,而且不同感病品种被同一病原小种诱导后,木质化作用在同一水平变化<sup>[28]</sup>。因此可以设想,种或“科”水平上的特异性抗性与生物型水平上的抗性相反,主要有多基因抗性。本研究在中林美荷接种亲和小种 Sb<sub>052</sub>后发现有木质素的积累或许证明了这一点。可见,木质素的诱导表达比结构性表达更加复杂。此外,若将组织染色法与生化测定木质素含量相结合可能更能准确揭示该互作中木质素的抗病机制。

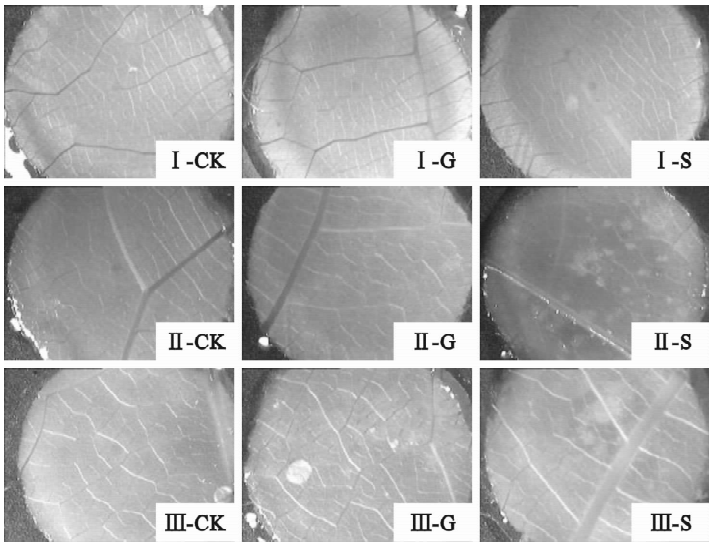


图 1 不同品种杨树叶片接种叶锈菌第 7 天的木质素的沉积情况

Fig. 1 Deposition state of lignin in poplar leaves varieties at 7 d after inoculation with *Melampsora larici-populina* Kleb.

注: I :美洲黑杨 II :北抗杨 III :中绥 12 号杨

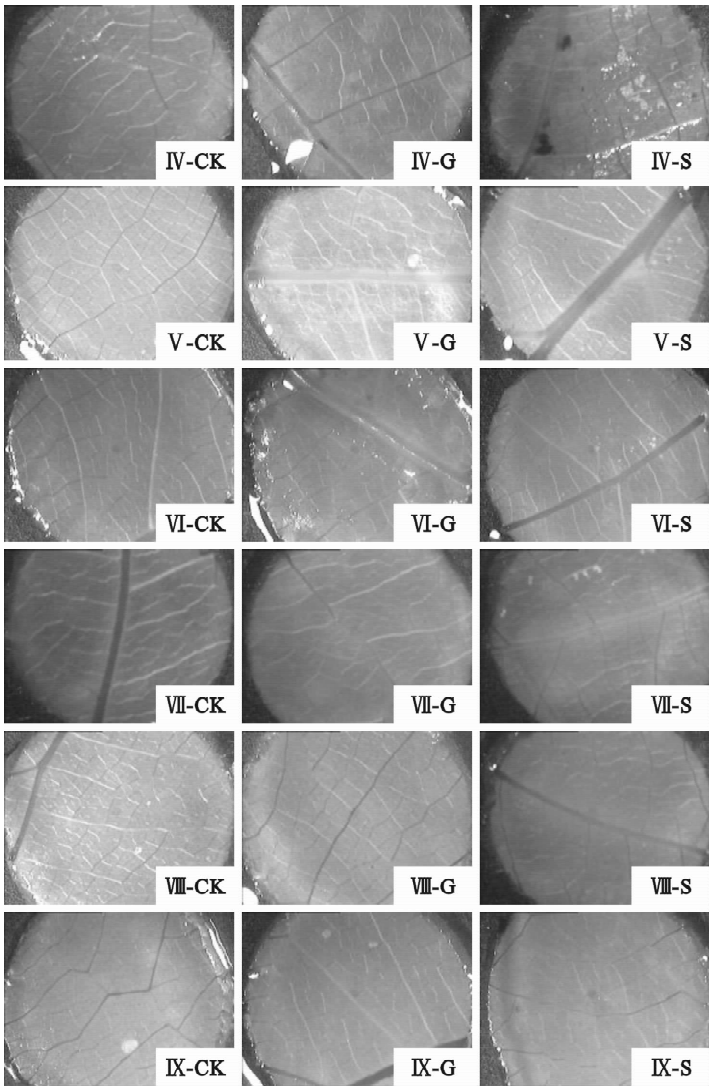


图 2 不同品种杨树叶片接种叶锈菌第 7 天时木质素的沉积情况

Fig. 2 Deposition state of lignin in poplar leaves of different varieties at 7d after inoculation with *Melampsora larici-populina* Kleb.  
注：Ⅳ：川杨 Ⅴ：I—69 杨 Ⅵ：欧美 108 杨 Ⅶ：波兰 15 号杨 Ⅷ：中华常青杨 Ⅸ：中林美荷 CK：对照 G：GL<sub>052</sub> S：SB<sub>052</sub>

参考文献：

[1] 孟繁荣,李国臣,石春玲,等. 抗青杨叶锈病杨树品种序列的筛选[J]. 林业科技,1996,21(2):39-40.

[2] 张山林. 青杨叶锈病损失量估计研究[J]. 甘肃林业科技,1990(2):29-33.

[3] LAURANS F, PILATE G. Histological aspects of a hypersensitive response in poplar to *Melampsora larici-populina* [J]. Phytopathology, 1999,89(3):233-238.

[4] 蓝海燕,陈正华. 植物与病原真菌互作的形态变化及其生理、生化机制和基因调控[J]. 植物学通报,1999,16(4):345-351.  
LAN H Y, CHEN Z H. Advances in studies on morphological changes and their physiological and biochemical mechanisms and gene regulation in the interaction between plant and pathogenic fungus[J]. Chinese Bulletin of Botany, 1999,16(4):345-351.

[5] 李堆淑. 植物诱导抗病性机制的研究进展[J]. 商洛学院学报, 2008,22(2):46-50  
LI D S. Advances in study of plant induced disease resistance mechanism[J]. Journal of Shangluo University,2008,22(2):46-50.

[6] 黄国红,王瑶,康振生,等. 小麦品种及单基因系与叶锈病互作的组织学和超微结构研究[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2003,31(2):45-49.  
HUANG G H,WANG Y,KANG Z S, *et al.* Histopathological and ultrastructural studies on interactions between wheat leaf rust and wheat cultivars Lovrin 10 and Jimai 3 as well as their corresponding resistance genes Lr26 and Lr3Bg[J]. Journal of Northwest A&F University: Natural Science Edition, 2003,31(2):45-49.

[7] TIBURY R, RESENER H J. Resistance of wheat to *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*: association of the hypersensitive reaction with the cellular accumulation of lignin-like material and callose[J]. Physiological and Molecular Plant pathology,1990,36(2):109-120.

[8] 康振生,黄丽丽,韩青梅,等. 禾谷镰刀菌侵染导致小麦穗组织细胞壁成分变化的细胞化学研究[J]. 植物病理学报,2007,37(6):623-628.  
KANG Z S,HUANG L L,HAN Q M, *et al.* ,Cytochemistry

of cell wall component alterations in wheat spikes infected by *Fusarium graminearum* [J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2007,37(6):623-628.

[9] KUMAR J,RATHI A S,PANWA R M. Biochemical changes in pearl millet leaves due to rust infection[J]. Forage Research, 2002,28(2):67-69.

[10] RINALDI C, KOHLER A. Transcript profiling of poplar leaves upon infection with compatible and incompatible strains of the foliar rust melampsora larici-populina [J]. Plant Physiology, 2007,144: 347-366.

[11] 田呈明,康振生,李振岐. 杨树叶锈病组织病理学和细胞学研究[J]. 西北林学院学报,2001,16(2):43-49.

TIAN C M,KANG Z S,LI Z Q, Researches on histology and cytology of poplar leaf rust[J]. Journal of Northwest Forestry University,2001,16(2):43-49.

[12] 赵鹏,田呈明,曹支敏. 杨树与栅锈菌互作中生理代谢变化[J]. 西北林学院学报,2007,22(4):124-127.

Z P,T C M,CAO Z M. Dynamic changes of physiological metabolism during the interaction of poplar and Melampsora larici-populina kleb[J]. Journal of Northwest Forestry University, 2007,22(4):124-127.

[13] 田呈明,梁英梅,康振生,等. 杨树与栅锈菌互作的组织病理学研究[J]. 林业科学, 2001,37(6): 52-58.

TIAN C M,LIANG Y M,KANG Z S,*et al.* Histopathology studies on interaction of poplars and leaf rust wirh different compatibilities[J]. Scientia Silvae Sinicae, 2001,37(6): 52-58.

[14] 陈祖静,曹支敏,苟兴庆,等. 杨树与松杨栅锈菌互作中寄主活性氧及抗性相关酶变化[J]. 林业科学, 2010,46(8):101-106.

CHEN Z J,CAO Z M,GOU X Q,*et al.* Dynamic changes of active oxygen and related enzymes of the host in interaction between the poplar and *Melampsora larici-populina* [J]. Scientia Silvae Sinicae, 2010,46(8):101-106.

[15] 李承森主. 植物科学进展(2卷)[M]. 北京:高等教育出版社, 1999:23-24.

[16] 魏建华,宋艳茹. 木质化生物合成途径及调控的研究进展[J]. 植物学报,2001,43(8):771-779.

WEI J H,SONG Y R. Recent advances in study of lignin biosynthesis and manipulation[J]. Acta Botanica Sinica, 2001, 43(8):771-779.

[17] 胡景江,朱玮,文建雷. 杨树细胞壁 HRGP 和木质素的诱导与其对溃疡病抗病的关系[J]. 植物病理学报,1999,29(2): 151-156.

HU J J ,ZU W, WEN J L . The relation between the accumulation of HRGP and lignin in cell wall of poplars and the resistance to poplar canker[J]. ACTC Phytopathologica Sinica,1999,29(2):151-156.

[18] 田呈明,李振岐,康振生. 青杨叶锈病进展[J]. 西北林学院学报,1999,14(2):81-88.

TIAN C M,LI Z Q,KANG Z S. Advances in researches of Cathay poplar leaf rust(*Melampsora larici-populina* Kleb.) [J] Journal of Northwest Forestry University, 1999,14(2): 81-88.

[19] 曹支敏,李振岐,胡锦涛. 落叶松-杨栅锈菌生理分化研究[J]. 西北林学院学报,1998, 13(1): 53-57.

CAO Z M,LI Z Q, HU J J. Physiological Specialization in *Melampsora larici-populina* Kleb. in the Qinling Mountains [J]. Journal Of Northwest Forestry University, 1998, 13(1): 53-57.

[20] 曹支敏,余仲东,潘彦平,等. 中国落叶松-杨栅锈菌(*Melampsoral larici-populina* Kleb.)生理小种分化[J]. 植物病理学报,2005,35(2): 184-186.

CAO Z M,YU Z D,PAN Y P,*et al.* Differentiation of physiological races in *Melampsora larici-populina* Kleb. in China [J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2005,35(2): 184-186.

[21] 姚燕,于惠敏,孙倩. 杨树基因工程的研究进展[J]. 山东林业科技,2006,164(3):82-84.

YAO Y ,YU H M, SUN Q. Research advances in poplar gene engineering[J]. Shangdong Forestry Science Technology[J]. 2006,164(3):82-84.

[22] 刘春梅,曹支敏,余仲东. 中国落叶松-杨栅锈菌生理小种鉴定[J]. 西北林学院学报,2008, 23(2): 105-108

LIU C M,CAO Z M,YU Z D. Physiological Race Identification of Chinese *Melampsora larici-populina* [J] Journal of Northwest Forestry University ,2008, 23(2): 105-108.

[23] 任本权,曹支敏,潘彦平,等. 落叶松-杨栅锈菌致病性分化研究[J]. 西北林学院学报,2003. 18(2): 51-54.

REN B Q,CAO Z M,PAN Y P,*et al.* Pathogenic specialization in *Melampsora larici-populina* [J]. Journal of Northwest Forestry University, 2003. 18(2): 51-54.

[24] 赵华燕,魏建华,宋艳茹. 木质素生物合成及其基因工程研究进展[J]. 植物生理与分子生物学学报,2004, 30(4):361-370.

ZHAO H Y,WEI J H,SONG Y R. Advances in research on lignin biosynthesis and its genetic engineering [J]. Journal of Plant Physiology and Biology, 2004,30(4):361-370.

[25] 余仲东,高爱琴,曹支敏. 杨树抗锈性研究现状[J]. 西北植物学报,2004,24(6):1160-1164.

YU Z D,GAO A Q,CAO Z M. Poplar rust resistance study [J]. Acta Botanica Boreali-occidentalia Sinica,2004,24(6): 1160-1164.

[26] 魏明,曹支敏,田呈明. 中国落叶松杨栅锈菌 4 个流行小种的 RAPD 标记[J]. 安徽农业科学,2007, 35( 18) : 5366- 5367, 5392.

WEI M ,CAO Z M,TIAN C M. RAPD Markers of 4 physiological races of *Melampsora larici-populina* in China [J], Journal of Anhui Agricultural Sciences , 2007, 35( 18) : 5366-5367, 5392.

[27] 高原,陈信波,张志扬. 木质素生物合成途径及其基因调控的研究进展[J]. 生物技术通报,2007(2):47-51.

GAO Y,CHEN X B,ZHANG Z Y. Advances in research on lignin biosynthesis and its molecular regulation[J]. Biotechnology Bulletin,2007(2):47-51.

[28] 王金生. 分子植物病理学[M]. 北京:中国农业出版社, 1999.