

DOI:10.12171/j.1000-1522.20230298

## 山田胶锈菌与苹果叶互作的组织学及生理病理特征

邵晨曦<sup>1,2</sup> 梁英梅<sup>3</sup> 劳文浩<sup>1,4</sup> 李云帆<sup>1</sup>

(1. 北京林业大学林学院, 省部共建森林培育与保护教育部重点实验室, 北京 100083; 2. 广州海关技术中心, 广东 广州 510623; 3. 北京林业大学博物馆, 北京 100083; 4. 内蒙古通辽市生态环境局技术服务中心, 内蒙古 通辽 028001)

**摘要:**【目的】明确山田胶锈菌专性侵染苹果叶片的病理学过程, 探究寄主受侵染后的生理代谢响应机制, 为今后开展山田胶锈菌致病分子机理的研究奠定基础。【方法】利用显微技术观察山田胶锈菌担孢子侵入感病苹果叶片的连续发育过程和寄主叶片细胞的结构变化; 使用 TU-1810 型紫外可见分光光度计检测苹果叶片上产生褪绿花斑时以及在性孢子阶段和锈孢子阶段的过氧化氢、过氧化物酶(POD)及总酚含量。【结果】山田胶锈菌的担孢子在苹果叶片上 6 h 后萌发产生芽管, 12 h 后由芽管直接侵入表皮细胞; 24 h 后在寄主细胞间隙产生初生胞间菌丝, 72 h 后观察到有隔膜的次生菌丝, 7 d 后由胞间菌丝或吸器母细胞形成的单核吸器进入寄主细胞; 10 d 后在叶片正面观察到性孢子器和性孢子形成, 60 d 时在叶片背面形成锈孢子器和锈孢子。在叶片表面出现褪绿花斑之前, 寄主细胞的形态结构未发生明显变化; 叶表出现明显花斑时, 初生吸器大量形成, 寄主细胞质染色变浅, 细胞器形态发生扭曲。在性孢子发育阶段, 寄主细胞的细胞膜及细胞器开始消融; 在锈孢子形成阶段, 寄主细胞出现坏死。随着锈菌侵染过程的推进, 苹果叶片中过氧化氢含量先下降后略有上升, POD 活性和总酚含量呈现不同幅度的上升趋势。【结论】山田胶锈菌担孢子萌发后, 产生芽管和附着胞, 直接侵入叶表皮细胞(0~5 dpi), 由胞间菌丝或吸器母细胞形成大量单核吸器与寄主建立活体营养寄生关系(5~10 dpi), 最后发育产孢(10 dpi 以后)生成性孢子和锈孢子。寄主细胞的感病反应从吸器进入叶肉细胞时开始出现, 细胞坏死发生于锈孢子形成时期。山田胶锈菌的侵染诱导苹果叶片中酚类物质的积累, 可能在维持感病寄主体内低含量活性氧中发挥重要作用。

**关键词:** 胶锈菌; 亲和性互作; 超微结构; 组织病理学; 生理反应

中图分类号: S763.1 文献标志码: A 文章编号: 1000-1522(2024)11-0034-09

引文格式: 邵晨曦, 梁英梅, 劳文浩, 等. 山田胶锈菌与苹果叶互作的组织学及生理病理特征 [J]. 北京林业大学学报, 2024, 46(11): 34-42. Shao Chenxi, Liang Yingmei, Lao Wenhao, et al. Histological and physiopathology characteristics in the interaction of *Gymnosporangium yamadae* and *Malus domestica* leaves [J]. Journal of Beijing Forestry University, 2024, 46(11): 34-42.

### Histological and physiopathology characteristics in the interaction of *Gymnosporangium yamadae* and *Malus domestica* leaves

Shao Chenxi<sup>1,2</sup> Liang Yingmei<sup>3</sup> Lao Wenhao<sup>1,4</sup> Li Yunfan<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory for Silviculture and Conservation of Ministry of Education, School of Forestry,

Beijing Forestry University, Beijing 100083, China;

2. Guangzhou Customs Technology Center, Guangzhou 510623, Guangdong, China;

3. Museum of Beijing Forestry University, Beijing 100083, China;

4. Technical Service Center of Inner Mongolia Tongliao Ecological Environment Bureau, Tongliao 028001, Inner Mongolia, China)

**Abstract:** [Objective] The study aimed to determine the histopathological process of pathogen and

收稿日期: 2023-10-31 修回日期: 2023-12-18

基金项目: 国家自然科学基金项目(31870628)。

第一作者: 邵晨曦. 主要研究方向: 林木病理学. Email: shaochenxi@bjfu.edu.cn 地址: 100083 北京市海淀区清华东路 35 号北京林业大学林学院。

责任作者: 梁英梅, 教授, 博士生导师. 主要研究方向: 林木病害致病机制及病原真菌分子系统研究. Email: liangym@bjfu.edu.cn 地址: 100083 北京市清华东路 35 号北京林业大学 94 号信箱。

本刊网址: <http://j.bjfu.edu.cn>; <http://journal.bjfu.edu.cn>

investigate the physiological and metabolic response mechanisms of the host during specific infection of *Gymnosporangium yamadae* on apple (*Malus domestica*) leaves, and investigate the pathological mechanisms underlying the host-specific selection of the rust, so as to lay the groundwork for further research on pathogenetic molecular mechanisms of *G. yamadae*. [Method] After artificially inoculating apple leaves with *G. yamadae* basidiospores, the infection structures of pathogen and cytology changes of the host were observed continuously using microtechnic; the contents of hydrogen peroxide, peroxidase (POD) and total phenol of infected apple leaves showed chlorotic flecks and at the pycnium and aecium stages were determined using TU-1810 UV-visible spectrophotometer. [Result] *G. yamadae* basidiospores germinated and produced germ tubes after 6 hpi (hours past inoculation) and directly entered into apple leaf epidermal cells at 12 hpi, intercellular mycelia formed at 24 hpi and secondary mycelia with diaphragm were observed at 72 hpi. After 7 dpi (days past inoculation), intercellular mycelia or haustorial mother cells entered into host cells, resulting in the formation of monokaryotic haustoria. After 10 dpi, the pycnium and pycniosporophores were observed on the surface of apple leaves and the aecium and aeciospores were formed on the undersides of apple leaves at 60 d. The morphological structure of host cells did not visually change before infected leaves showing chlorotic flecks. However, the cytoplasmic staining of host cells lightened, and the morphology of organelles distorted when the host leaves showed chlorotic flecks (numbers of haustorium were formed and developed). In the spermatogonial stage, host cell membranes and organelles became ablation. During the formation of aeciospores, host cells began to necrotic. The content of hydrogen peroxide decreased first and then increased slightly, while the activity of POD and the content of total phenol showed an increasing trend of different amplitude in infected apple leaves. [Conclusion] The basidiospores of *G. yamadae* germinate to produce germ tubes and appressorium directly enters the host epidermal cells (0–5 dpi). The number of monokaryotic haustoria is formed by intercellular mycelia or haustorial mother cells to establish the biotrophic parasitic relationship with the host (5–10 dpi). Finally, the rust further develops to produce the spermatia and aeciospores (after 10 dpi). Susceptible reactions of host cells begin with haustorium entering mesophyll cells, and necrosis of host cells occurs in the aecial stage. Furthermore, the infection of *G. yamadae* results in the considerable accumulation of phenols in apple leaves, which might play a crucial role in maintaining low reactive oxygen species in the host.

**Key words:** *Gymnosporangium* spp.; compatible interaction; ultrastructure; histopathology; physiological reaction

山田胶锈菌 (*Gymnosporangium yamadae*) 引起的苹果 (*Malus domestica*) 叶锈病正严重威胁我国苹果产业的发展<sup>[1]</sup>。多年来, 研究工作主要集中在对病原锈菌的系统发育学<sup>[2-3]</sup>、转录组学<sup>[4-7]</sup>和防治<sup>[8]</sup>等方面。在 20 世纪的 60—90 年代, 国内外学者对胶锈菌各生活史阶段中孢子的萌发特征<sup>[9]</sup>及超微结构<sup>[10-12]</sup>进行了观察, 明确了胶锈菌的冬、担、性和锈孢子的萌发条件及形态结构特征<sup>[10,13]</sup>。特别是发现亚洲胶锈菌 (*G. asiaticum*) 在侵染梨 (*Pyrus* sp.) 叶片后, 性孢子和锈孢子阶段的吸器由胞间菌丝直接形成, 或由胞间菌丝首先形成吸器母细胞, 再由吸器母细胞发育成吸器<sup>[11]</sup>; 而在侵染贴梗海棠 (*Chaenomeles speciosa*) 叶片时, 吸器由单核菌丝直接形成, 成熟的吸器呈菌丝状, 或由细长的颈部和顶端膨大的吸器体形成<sup>[12]</sup>。在本课题组前期研究中也发现, 山田胶锈菌在侵染苹果后形成的吸器形态与亚洲胶锈菌相

似, 呈菌丝状、肾形或不规则形状<sup>[14]</sup>。然而, 现有研究仅对局部病斑中胶锈菌的部分器官形态进行了观察, 缺乏对其侵染过程中超微结构发育特征及感病寄主细胞学变化的系统性研究。

在锈菌与寄主植物的亲和性互动中, 寄主植物的生理代谢在氧化系统、次生代谢产物等方面发生显著变化, 这些变化从生理代谢层面反映了锈菌的专化性侵染特点<sup>[15-17]</sup>。近期研究发现, 胶锈菌的亲亲和性侵染会诱导寄主产生大量酚类等次生代谢产物, 这一现象不同于大多数锈菌与寄主的互作表现<sup>[18-19]</sup>, 从生理层面反映了胶锈菌的寄主特异性和专化性。研究表明, 酚类物质不仅是优质的抗氧化物<sup>[20-21]</sup>, 还能在植物与病原菌的互作中发挥抗菌作用<sup>[22]</sup>, 因此, 探究山田胶锈菌亲和性侵染苹果叶片后寄主体内活性氧和酚类物质的动态变化特征具有重要意义。

本研究通过山田胶锈菌的人工接种试验, 连续

取样以观察侵染时间内山田胶锈菌的超微侵染结构,以及寄主苹果叶片受侵染后的细胞学变化和生理代谢反应,为揭示山田胶锈菌与寄主亲和性互作的病理学机制奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料及接种处理

供试苹果苗为3年生嘎啦(*M. domestica* 'Royal Gala')品种,苗高80 cm,主干直径为1.0~1.5 cm。接种体冬孢子堆采自北京海淀公园的圆柏(*Juniperus chinensis*),采集后保存于-20℃冰箱中备用。山田胶锈菌的人工接种方法参考文献[14]。

### 1.2 光学显微样品和扫描电镜样品的制备

取20 μL冬孢子悬浮液置于Gelbond膜的疏水面上,在24~26℃条件下培养12~24 h,通过光学显微镜观察冬孢子体外萌发情况,以及人工接种苹果叶片后孢子的萌发及侵入方式。

在接种后6 h、8 h、10 h、12 h、24 h、36 h、48 h、3 d、5 d、7 d、10 d、30 d、45 d、60 d分别进行采样,直至寄主叶片出现锈孢子器。将叶片样品切成约0.5 cm×0.5 cm的小块,分为两份:一份用于光学显微镜下直接观察孢子的侵入方式;另一份用于制备扫描电镜样品,于2.5%戊二醛缓冲液(pH=6.8)中4℃下过夜固定,经不同浓度梯度的乙醇脱水处理后,使用叔丁醇进行置换,并使用冷冻抽干机干燥,叶片样品喷金后,用场发射扫描电镜(SU8010,日立)进行观察。

### 1.3 透射电镜样品的制备

采集接种后3、5、7、10 d及性孢子器和锈孢子器阶段的苹果叶片,修剪成0.5 cm×0.5 cm的小块,按照常规方法<sup>[23]</sup>处理。使用透射电子显微镜(HT7700,日立)观察侵染过程中病原菌的侵染结构和寄主的细胞学变化。

### 1.4 生理生化指标测定

分别取健康、接种后7 d(花斑期)、14 d(性孢子阶段)和45 d(锈孢子阶段)的苹果叶各3~8片,每个样品均取3份作为重复。将样品在研钵中加入少量液氮研磨成粉末,备用。过氧化氢含量测定参照Sergiev等<sup>[24]</sup>的方法,使用TU-1810型紫外可见分光光度计在390 nm波长下测定吸光度。过氧化物酶(POD)活性测定参照李江华等<sup>[25]</sup>的方法,将预冷的10 mL磷酸缓冲液(0.2 mol/L, pH=6.4)加入待测样品中,取上清液用于TU-1810型紫外可见分光光度计检测,每分钟OD<sub>470</sub>增加0.01为1个酶活性单位(U)。总酚含量测定参照高俊凤<sup>[26]</sup>的方法,使用TU-1810型紫外可见分光光度计在500 nm波长下测定

吸光度。

## 2 结果与分析

### 2.1 冬孢子的萌发及孢子的侵入

在Gelbond膜上,山田胶锈菌的冬孢子萌发后形成外生担子。外生担子由隔膜分隔为4个细胞,进一步发育形成担孢子小梗。担子小梗逐渐透明,顶端产生椭圆形的担孢子(图1a)。担孢子在6~12 h内大量萌发,产生芽管,内含物从担孢子流入芽管(图1b)。担孢子萌发后,顶端形成膨大透明的附着体结构(图1c)。同样,在接种苹果叶片12 h时,也观察到担孢子萌发后形成芽管和附着胞,随后直接侵入叶片表皮细胞(图1d)。

### 2.2 胞间菌丝在寄主细胞间的扩展过程

接种24 h后,寄主细胞间隙出现胞间菌丝(图2a)。72 h时,胞间菌丝紧贴寄主细胞壁延伸,并在细胞间隙蔓延(图2b)。120 h后,寄主细胞间隙形成了大量长条状、有隔膜的次生菌丝(图2c,黑色箭头指示隔膜)。隔膜由3层组成,2个外层的电子致密度较高,中间层较低(图2d)。与植物细胞壁相邻的胞间菌丝顶端呈现凸透镜状增厚,内含物质常聚集在菌丝顶端(图2c,白色箭头)。随着菌丝的发育,原生质稠密度减弱,液泡数量增加,体积增大,内部细胞器的形状和分布正常。

### 2.3 吸器母细胞和吸器的形成及发育

接种7 d后,次生菌丝的顶端与寄主细胞接触并产生隔膜,随后转化为圆形或不规则形的吸器母细胞。吸器母细胞与寄主细胞接触后,形成侵入钉,穿透寄主细胞壁,使寄主细胞膜内陷,形成吸器(图3a~c),吸器壁与寄主细胞壁接触部位稍有缢缩(图3b~e,白色箭头),未观察到细长的吸器颈结构。吸器母细胞中的原生质和细胞器逐渐流入吸器(图3b~c)。胞间菌丝也可以直接产生吸器(图3d)。吸器体中存在横隔膜将其与吸器母细胞或胞间菌丝分隔开(图3b~c,黑色箭头)。侵入叶肉细胞内的吸器并未与寄主细胞的原生质直接接触,而是被外围呈现波浪状的吸器外质膜和吸器外间质所隔开(图3e)。山田胶锈菌的吸器呈肾形或长条形等形状,一般为单核,未发现双核或多核(图3f)。

### 2.4 性、锈孢子阶段的发育过程

接种10 d后,叶片正面出现点状凸起的性孢子器(图4a,白色箭头)。当性孢子器成熟时,聚集的丝状细胞刺穿寄主表皮细胞并从表皮中伸出成为授精丝(图4b)。性孢子器为烧瓶状(图4c)。成熟的性孢子为单胞,呈纺锤形,细胞壁双层(图4d)。

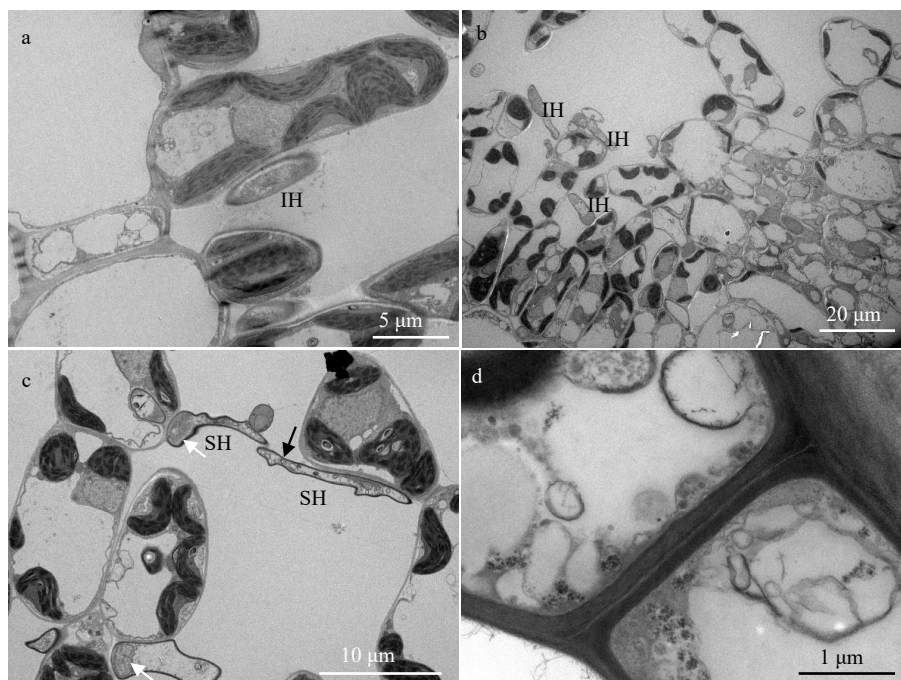
接种苹果叶片60 d后,在叶背面与性孢子器相



a. 冬孢子萌发产生担子及担孢子; b. 担孢子萌发产生芽管; c. 担孢子芽管顶端产生透明附着胞结构; d. 芽管从叶表面直接侵入。B. 担子; BS. 担孢子; GT. 芽管; HA. 透明的附着胞; T. 冬孢子。a, teliospores germinate to produce basidia and basidiospores; b, basidiospores germinate to produce germ tubes; c, hyaline appressoria occur at the end of germ tubes; d, the germ tube penetrates directly from the leaf surface. B, basidia; BS, basidiospore; GT, germ tube; HA, hyaline appressoria; T, teliospore.

图 1 山田胶锈菌冬孢子的萌发及担孢子的侵入

Fig. 1 Germination of teliospores and invasion of basidiospores of *Gymnosporangium yamadae*



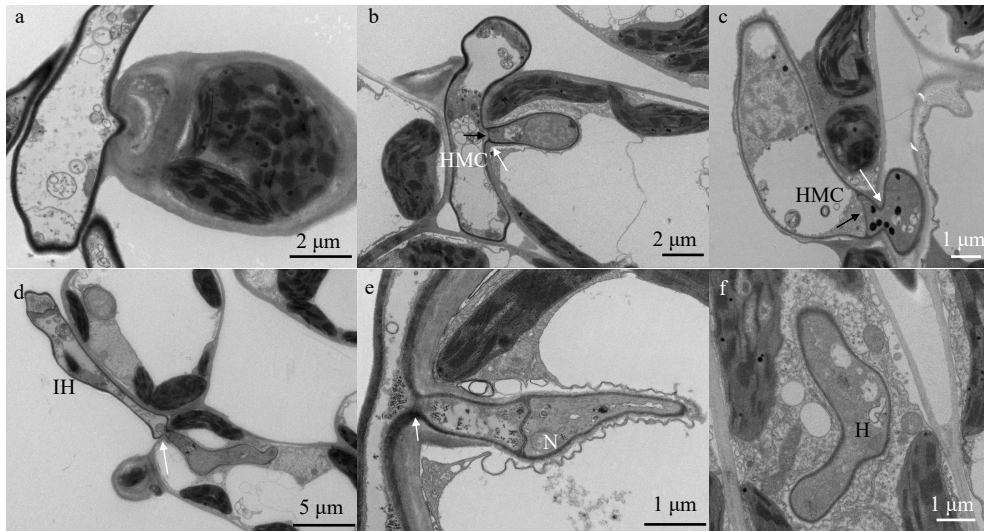
a. 出现胞间菌丝; b. 胞间菌丝蔓延; c. 次生菌丝产生分支和隔膜; d. 胞间菌丝隔膜分为 3 层。IH. 胞间菌丝; SH. 次生菌丝; 黑色箭头. 菌丝隔膜; 白色箭头. 菌丝顶端增厚处。a, intercellular mycelium appear; b, intercellular hyphae spread in the intercellular space; c, secondary hyphae produce branches and septa; d, intercellular hyphal septum is divided into three layers; IH, intercellular hyphae; SH, second hyphae; black arrow, mycelial septum; white arrow, tip of thickened intercellular hypha.

图 2 胞间菌丝在寄主细胞间的发育及扩展过程

Fig. 2 Development and expansion process of intercellular hyphae between host cells

对的位置出现毛状的锈孢子器。扫描电镜观察发现, 锈孢子器由包被细胞围成管状或杯状(图 5a ~ b)。

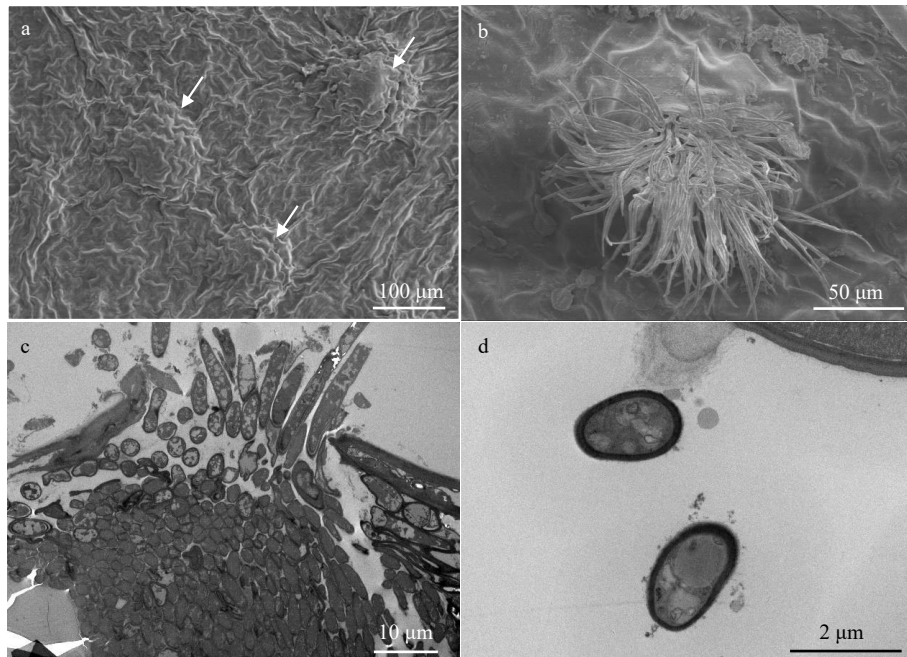
锈孢子器内部产生大量球形或近球形的、表面具疣状突起的锈孢子(图 5b ~ c), 内部充满大量脂肪颗粒



a. 侵入钉穿透寄主细胞; b~c. 吸器母细胞产生吸器; d. 胞间菌丝形成吸器; e. 吸器外质膜与吸器外间质将吸器与寄主细胞原生质分隔开; f. 寄主细胞内的吸器。H. 吸器; HMC. 吸器母细胞; IH. 胞间菌丝; N. 吸器细胞核; 白色箭头. 缢缩; 黑色箭头. 隔膜。a, invasive nails penetrate host cells; b~c, haustorial mother cells produce haustoria; d, haustorium formed at the top of intercellular hyphae; e, haustorial ectoplasm membrane and haustorial ectoplasm separate the haustorium from the host cell protoplasm; f, haustorium in host cell. H, haustorium; HMC, haustorial mother cells; IH, intercellular hyphae; N, nucleus of haustorium; white arrows constriction; black arrow, septum.

图3 吸器母细胞及吸器在寄主叶肉细胞内的扩展

Fig. 3 Expansion of haustorial mother cells and haustoria in host mesophyll cells



a. 寄主叶片表面凸起的性孢子器; b. 突破寄主表皮细胞的授精丝; c. 性孢子器为烧瓶状; d. 性孢子单胞、呈纺锤型; 白色箭头. 性孢子器。a, bulging pycnium formed on the surface of host leaves; b, paraphyses break through pycnium; c, pycnium is flask shaped; d, pycniosporophore cell is single with spindle type; white arrow, pycnium.

图4 性孢子器及性孢子的形成

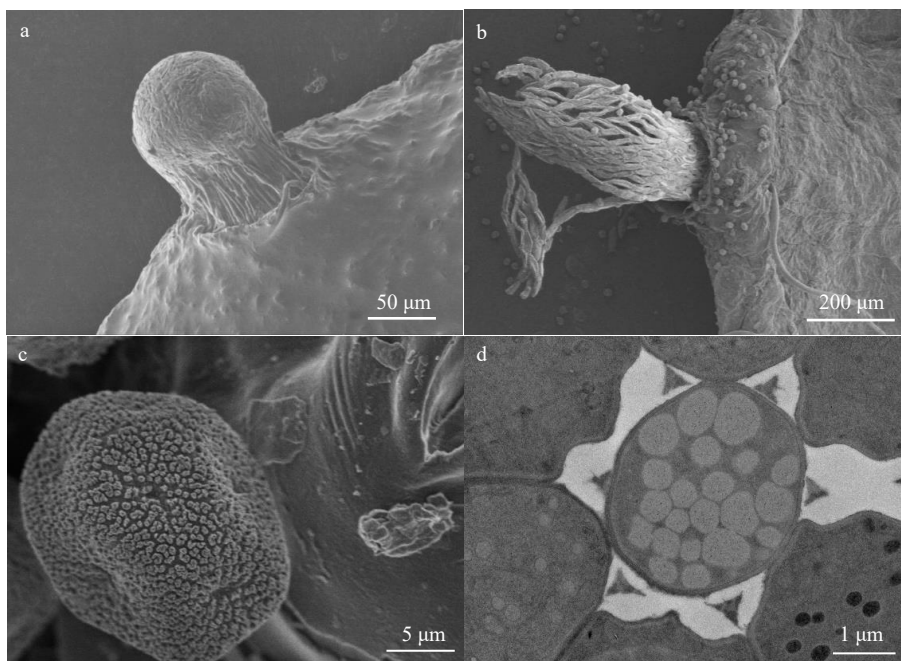
Fig. 4 Formation of pycnium and spermatia

等物质, 原生质电子密度高, 细胞壁着色深(图 5d)。

## 2.5 寄主受锈菌侵染后的细胞学及生理代谢变化

在接种山田胶锈菌 120 h 后, 苹果叶片正面出现褪绿斑(图 6a1)。透射电镜观察发现, 与锈菌胞间菌丝相邻的寄主细胞的形态结构正常, 未出现质壁分离现象; 细胞内含物丰富, 细胞质染色较均匀, 细

胞器排列分布均匀结构完整(图 6a2、a3)。被吸器入侵的寄主细胞中, 细胞器向吸器周围靠拢, 叶绿体开始发生扭曲; 随着吸器等侵染结构的不断扩展, 寄主细胞质逐渐消融, 染色变浅(图 6a4)。在苹果叶片正面形成性孢子的阶段(图 6b1), 寄主细胞中细胞器结构发生退化, 细胞器等质膜发生瓦解, 原生质出现



a. 锈孢子器; b. 锈孢子器呈管状或杯状; c. 锈孢子椭圆形, 表面具疣; d. 锈孢子横截面。a, aecium; b, aecia are tubular or cup-shaped; c, aeciospores are spherical or subspherical, numerous warts on aeciospore surface; d, cross section of aeciospore.

图 5 锈孢子器及锈孢子的形成

Fig. 5 Formation of aecium and aeciospore

弥散(图 6b2)。寄主细胞内的线粒体失去内膜(嵴), 肿胀并变圆; 叶绿体层出现松散, 基粒结构紊乱, 外叶绿体膜变成囊泡状而最终破裂(图 6b3)。同时, 寄主细胞发生质壁分离, 原生质开始消融(图 6b4)。在苹果叶片背面形成锈孢子时期(图 6c1), 寄主细胞的细胞膜完全消融(图 6c2), 细胞壁处产生高电子密度的细胞壁沉积物(图 6c3)。锈孢子形成时, 寄主细胞内部分细胞器发生瓦解, 受感染的寄主细胞的细胞壁断裂, 内部细胞器消融, 细胞变得空泡化并严重坏死(图 6c4)。

与健康苹果叶片相比, 过氧化氢含量在花斑期(吸器大量形成时期)显著降低, 在性孢子阶段和锈孢子阶段上升(图 6d1); POD 活性和总酚含量均在苹果叶片感病后持续上升, 总酚含量在性孢子到锈孢子阶段呈现较大的上升幅度(图 6d2、d3)。

### 3 讨 论

#### 3.1 山田胶锈菌的侵染过程及侵染结构

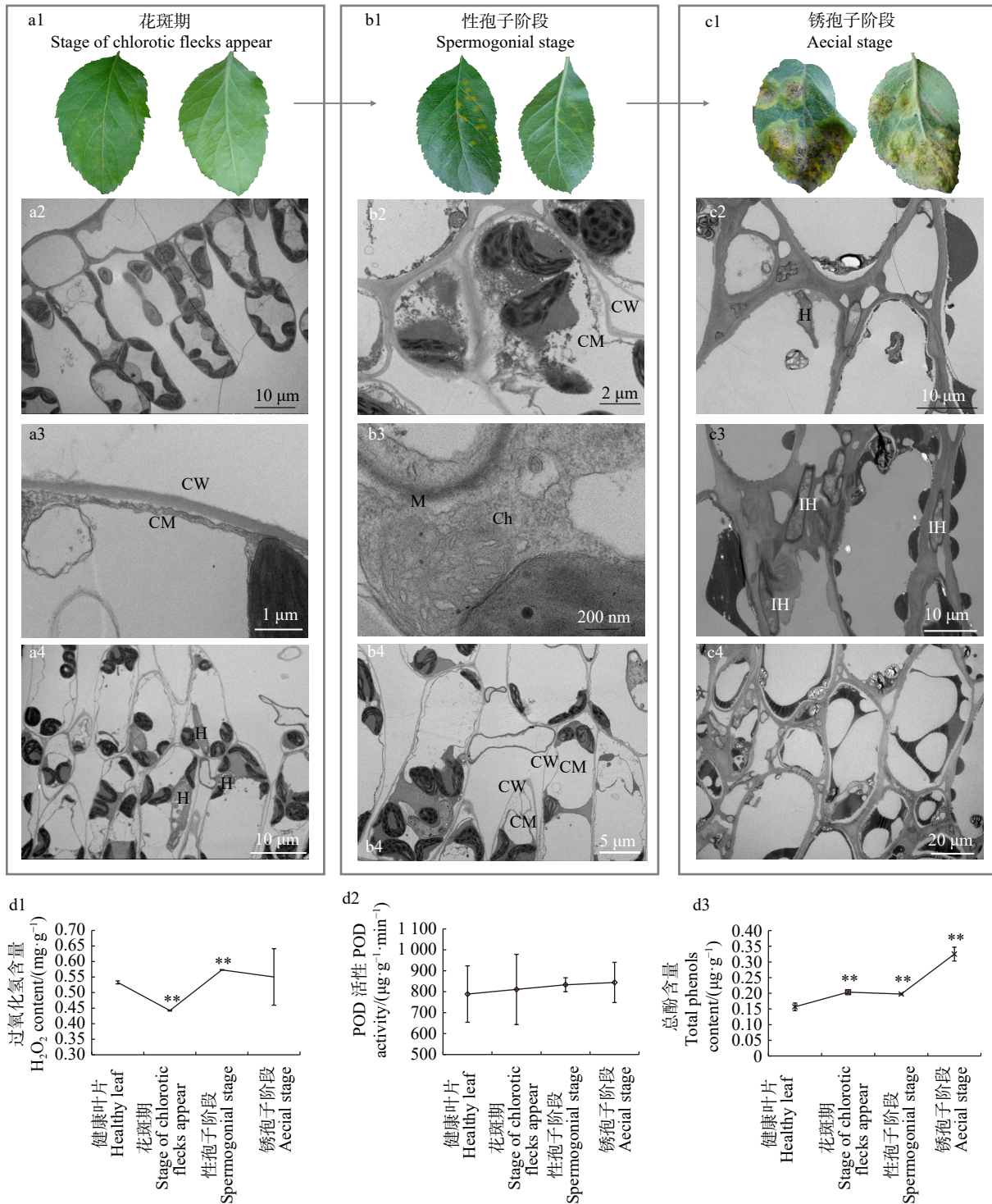
本研究利用光学显微镜和电子显微镜技术, 在组织学水平上对山田胶锈菌亲和性侵染苹果叶片的过程进行了系统研究, 将山田胶锈菌在苹果叶片上的侵染过程大致分为以下 3 个阶段: 第一个阶段为担孢子萌发及侵入阶段(0~5 dpi), 担孢子萌发后产生芽管和附着胞, 直接侵入叶表皮细胞, 进而产生胞间菌丝; 第二个阶段为定殖和营养生长阶段(5~10 dpi), 胞间菌丝或吸器母细胞形成大量吸器, 与寄

主建立活体营养寄生关系, 随后菌丝在叶片细胞间隙扩展和生长; 第三个阶段为性、锈孢子器及孢子发育阶段(10 dpi 以后), 10 d 时叶正表皮下已形成性孢子器, 之后产生性孢子, 60 d 时叶背面出现锈孢子器和锈孢子。研究表明, 山田胶锈菌担孢子的侵入方式及发育过程与雪松-苹果锈病菌(*G. juniper-virginianae*)<sup>[27]</sup>、小麦条锈病菌(*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*)<sup>[28]</sup>和豇豆单胞锈菌(*Uromyces vignae*)<sup>[29]</sup>等相似, 但性、锈孢子阶段的发育周期较长<sup>[30]</sup>。

锈菌担孢子形成的吸器在形态和结构上不具有寄主专化性<sup>[14,31-32]</sup>。山田胶锈菌的担孢子侵入苹果叶片细胞后形成的单核吸器具有隔膜结构, 无明显的颈部与吸器体, 而是在吸器壁与寄主细胞壁接触部位出现缢缩, 这与其他胶锈菌及燕麦冠锈菌(*P. coronata avenae*)单核吸器的形成方式基本一致<sup>[11,33]</sup>。锈菌不同生活史阶段中的孢子发育完全依赖于吸器与寄主建立的营养寄生关系, 但由不同孢子形成的吸器在细胞核数量上存在差异。目前尚不清楚, 在苹果叶片上由山田胶锈菌担孢子、性孢子和锈孢子形成的不同细胞核数量的吸器之间存在哪些生物学特性及功能上的差异, 这些差异是否与特定孢子的发育有关。

#### 3.2 寄主感病后的细胞学及活性氧代谢变化

锈菌亲和性侵染寄主的初期阶段不会损伤寄主细胞<sup>[34]</sup>。在本研究中, 山田胶锈菌吸器形成时期, 受



a1. 苹果叶片正面出现褪绿花斑; a2~a4. 花斑期寄主的细胞学反应; b1. 苹果叶片正面产生性孢子器及性孢子; b2~b4. 性孢子阶段寄主的细胞学反应; c1. 苹果叶片背面产生锈孢子器及锈孢子; c2~c4. 锈孢子阶段寄主的细胞学反应; d1~d3. 苹果叶片在山田胶锈菌侵染后不同时期的过氧化氢含量、过氧化物酶(POD)活性及总酚含量。CM. 细胞膜; Ch. 叶绿体; CW. 细胞壁; H. 吸器; IH. 胞间菌丝; M. 线粒体。小写字母表示显著差异(ANOVA 检测和 Tukey 比较,  $P < 0.01$ )。a1, the chlorotic flecks appear on the surface of apple leaves; a2~a4, cytological changes of host leaves at chlorotic flecks formation stage; b1, pycnium and spermatia formed on the surface of apple leaves; b2~b4, cytological changes of host leaves at spermatogonial stage; c1, aecium and aeciospore formed on underside of apple leaves; c2~c4, cytological changes of host leaves at the aecial stage; d1~d3, hydrogen peroxide content, peroxidase (POD) activity and total phenol content of apple leaves at different stages after *G. yamadae* infection; CM, cell membrane; Ch, chloroplast; CW, cell wall; H, haustorium; IH, intercellular hyphae; M, mitochondria. Different letters indicate statistically significant differences (ANOVA with Tukey's comparisons,  $P < 0.01$ ).

图6 苹果叶片受山田胶锈菌侵染后不同时期的症状、细胞学变化及生理代谢反应

Fig. 6 Symptoms, cytological changes and physiological metabolic reactions of apple leaves after *Gymnosporangium yamadae* infection

侵寄主细胞与健康细胞形态结构相似; 到性孢子形成时期, 寄主细胞内的叶绿体、线粒体等细胞器结构

开始受损, 但寄主细胞形态依然完整; 到锈孢子形成时期, 寄主细胞才出现发生瓦解直至死亡现象。成

熟的锈孢子中含有大量脂质物质, 满足后续孢子发育的营养需求, 这一时期寄主细胞死亡不会影响到锈菌生存。寄主细胞学形态的变化暗示了山田胶锈菌对寄主植物免疫反应的抑制调控, 反映出与小麦条锈菌等其他锈菌担孢子相似的侵染调控机制<sup>[28,35-36]</sup>。此外, 这一过程不同于锈菌夏孢子在侵染寄主后期导致寄主细胞死亡的情况, 说明锈菌在有性生殖阶段和无性繁殖阶段采取了不同的侵染策略<sup>[34,37]</sup>。

活性氧是病原菌侵染诱导寄主植物过敏性坏死和启动防御反应的重要信号<sup>[38]</sup>。已有研究表明, 在易感的杨树和豇豆叶片中, POD、SOD 和 CAT 等抗氧化酶活性升高, 有助于清除活性氧, 从而促进锈菌的侵染<sup>[39-40]</sup>; 在具有抗性的杨树和小麦中, 低含量的抗氧化酶导致寄主体内自由基大量积累, 从而诱导了抗性反应<sup>[16-17]</sup>。本研究关注了山田胶锈菌侵染苹果叶片后, 吸器、性孢子和锈孢子产孢阶段 3 个关键发育阶段中与活性氧代谢相关的指标变化。山田胶锈菌的亲性和性侵染没有引起苹果叶片中过氧化氢的过量积累, 但 POD 活性及总酚含量却在侵染后持续上升, 这两类物质可能是寄主体内活性氧维持在低含量的主要原因<sup>[41]</sup>。山田胶锈菌亲和性侵染苹果的互作体系中, 以酚类物质为主要抗氧化物, 与其他锈菌侵染感病寄主以抗氧化酶为主的感病表现明显不同。尚不明确的是, 感病苹果叶片中酚类等抗氧化物的大量积累是否由锈菌特异性调控而诱导生成的。

## 4 结 论

山田胶锈菌侵染苹果叶片的病理学过程大致分为 3 个阶段: 孢子萌发及侵入阶段(0 ~ 5 dpi)、定殖和发育阶段(5 ~ 10 dpi)和产孢阶段(10 dpi 以后)。苹果叶片细胞的感病反应始于吸器定殖, 细胞坏死发生在产孢阶段的锈孢子形成时期。在山田胶锈菌与苹果叶片互作过程中, 病原菌的超微结构发育特征及寄主的细胞学变化未显示出胶锈菌侵染苹果时存在专化性的结构特点。苹果叶片受山田胶锈菌侵染后产生的大量酚类物质, 可能有助于清除活性氧, 从而促进锈菌侵染。这一特殊的生理代谢变化可能与山田胶锈菌的专化性侵染机制相关, 需要从分子水平进一步研究。

### 参 考 文 献

- [1] 李保华, 王彩霞, 董向丽. 我国苹果主要病害研究进展与病害防治中的问题[J]. 植物保护, 2013, 39(5): 46-54.  
Li B H, Wang C X, Dong X L. Research progress in apple diseases and problems in the disease management in China[J]. Plant Protection, 2013, 39(5): 46-54.
- [2] Zhao P, Qi X H, Crous P W, et al. *Gymnosporangium* species on *Malus*: species delineation, diversity and host alternation[J]. *Persoonia*, 2020, 45(1): 68-100.
- [3] Tao S Q, Cao B, Kakishima M, et al. Species diversity, taxonomy, and phylogeny of *Gymnosporangium* in China[J]. *Mycologia*, 2020, 112(5): 941-973.
- [4] Tao S Q, Cao B, Tian C M, et al. Comparative transcriptome analysis and identification of candidate effectors in two related rust species (*Gymnosporangium yamadae* and *Gymnosporangium asiaticum*)[J]. *BMC Genomics*, 2017, 18(1): 651.
- [5] Tao S Q, Cao B, Morin E, et al. Comparative transcriptomics of *Gymnosporangium* spp. teliospores reveals a conserved genetic program at this specific stage of the rust fungal life cycle[J]. *BMC Genomics*, 2019, 20(1): 723.
- [6] Tao S Q, Auer L, Morin E, et al. Transcriptome analysis of apple leaves infected by the rust fungus *Gymnosporangium yamadae* at two sporulation stages[J]. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 2020, 33(3): 444-461.
- [7] 翁涵, 刘霞, 陶思齐, 等. 山田胶锈菌和亚洲胶锈菌吸器的比较转录组分析[J]. 生物工程学报, 2022, 38(10): 3825-3843.  
Weng H, Liu X, Tao S Q, et al. Comparative transcriptomic analysis of the haustoria of *Gymnosporangium yamadae* and *G. asiaticum*[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2022, 38(10): 3825-3843.
- [8] 董向丽, 李海燕, 孙丽娟, 等. 苹果锈病防治药剂筛选及施药适期研究[J]. 植物保护, 2013, 39(2): 174-179.  
Dong X L, Li H Y, Sun L J, et al. Control effects and optimal spraying time of fungicides to apple rust caused by *Gymnosporangium yamadae*[J]. *Plant Protection*, 2013, 39(2): 174-179.
- [9] Mims C W. Fine structure of basidiospores of the cedar-apple rust fungus *Gymnosporangium juniperi-virginianae*[J]. *Botany*, 1977, 55(9): 1057-1063.
- [10] Mims C W, Richardson E A. Ultrastructure of secondary spore formation in the rust *Gymnosporangium juniperi-virginianae*[J]. *Mycologia*, 1990, 82(2): 236-244.
- [11] 周世国. 梨胶锈菌性孢子和锈孢子阶段吸器的超微结构研究[J]. 真菌学报, 1992, 11(4): 289-293.  
Zhou S G. Ultrastructural studies on the haustorium of *Gymnosporangium haraeaeum* in the pycnio-and aecio stage[J]. *Mycologia*, 1992, 11(4): 289-293.
- [12] 黄丽丽, 康振生, 马远利. 胶锈菌在贴梗海棠上发育过程的电镜观察[J]. 西北农业学报, 1994, 3(4): 37-40.  
Huang L L, Kang Z S, Ma L Y. Electron microscopy observation of development of *Gymnosporangium haraeaeum* on *Chaenomeles speciose*[J]. *Acta agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 1994, 3(4): 37-40.
- [13] Lee S K, Kakishima M. Surface structures of peridial cells of *Gymnosporangium* and *Roestelia* (Uredinales)[J]. *Mycoscience*, 1999, 40(2): 121-131.
- [14] 刘霞, 陶思齐, 翁涵, 等. 山田胶锈菌和亚洲胶锈菌吸器提取体系建立[J]. 菌物学报, 2019, 38(9): 1430-1439.  
Liu X, Tao S Q, Weng H, et al. Construction of haustorial isolation systems of *Gymnosporangium yamadae* and *G. asiaticum*[J]. *Mycosystema*, 2019, 38(9): 1430-1439.
- [15] 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.

- Zhao P, Tian 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.
- [16] 王晨芳, 黄丽丽, 张宏昌, 等. 小麦-条锈菌互作过程中活性氧及保护酶系的变化研究[J]. 植物病理学报, 2009, 39(1): 52–60.
- Wang C F, Huang L L, Zhang H C, et al. Changes of reactive oxygen species and protective enzymes in the interaction of wheat and *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2009, 39(1): 52–60.
- [17] Mishra R K, Mishra K K, Jaiswal R K, et al. Biochemical changes in pea (*Pisum sativum* L.) infected by *Uromyces fabae*[J]. Indian Phytopathology, 2010, 63(2): 222–224.
- [18] Kalisz S, Oszmianski J, Wojdyo A. Increased content of phenolic compounds in pear leaves after infection by the pear rust pathogen[J]. Physiological and Molecular Plant Pathology, 2015, 91: 113–119.
- [19] Lu Y, Chen Q, Bu Y, et al. Flavonoid accumulation plays an important role in the rust resistance of *Malus* plant leaves[J]. Frontiers in Plant Science, 2017, 8: 1286.
- [20] Tang J, Dunshea F R, Suleria H A R. LC-ESI-QTOF/MS characterization of phenolic compounds from medicinal plants (hops and juniper berries) and their antioxidant activity[J]. Foods, 2019, 9(1): 7.
- [21] Shen N, Wang T F, Gan Q, et al. Plant flavonoids: classification, distribution, biosynthesis, and antioxidant activity[J]. Food Chemistry, 2022, 383(30): 132531.
- [22] Sarkar D, Shetty K. Metabolic stimulation of plant phenolics for food preservation and health[J]. Annual Review of Food Science and Technology, 2014, 5: 395–413.
- [23] 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, 1996: 1–92.
- Kang Z S. Ultrastructure of plant pathogenic fungi[M]. Beijing: China Science and Technology Press, 1996: 1–92.
- [24] Sergiev I, Alexieva V, Karanov E. Effect of spermine, atrazine and combination between them on some endogenous protective systems and stress markers in plants[J]. Comptes Rendus de l'Academie Bulgare des Sciences, 1997, 51: 121–124.
- [25] 李江华, 王贵禧, 梁丽松, 等. 桐柏大枣气调贮藏期间几种酶活性变化[J]. 食品科学, 2006, 27(6): 234–237.
- Li J H, Wang G X, Liang L S, et al. Changes of some enzyme activity of 'Tongbai jujube' fruit during controlled atmosphere storage[J]. Food Science, 2006, 27(6): 234–237.
- [26] 高俊凤. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 高等教育出版社, 2006: 211–222.
- Gao J F. Plant physiology experiment techniques[M]. Beijing: Higher Education Press, 2006: 211–222.
- [27] Mims C W, Richardson E A. Ultrastructure of appressorium development by basidiospore germlings of the rust fungus *Gymnosporangium juniperi-virginianae*[J]. Protoplasma, 1989, 148(2): 111–119.
- [28] 赵杰, 赵元元, 李巧, 等. 小麦条锈菌转主寄生小檗 (*Berberis germanensis*) 的人工接种鉴定[J]. 植物病理学报, 2017, 47(2): 274–277.
- Zhao J, Zhao Y Y, Li Q, et al. Identification of *Berberis germanensis* as an alternate host of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* under artificial conditions[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2017, 47(2): 274–277.
- [29] Heath M C. Signaling between pathogenic rust fungi and resistant or susceptible host plants[J]. Annals of Botany, 1997, 80(6): 713–720.
- [30] Shao C X, Lao W H, Liang Y M. Reference genes selection of *Gymnosporangium yamadae* during the interaction with apple leaves[J]. Journal of Fungi, 2022, 8(8): 830.
- [31] Gold R E, Littlefield L J, Statler G D. Ultrastructure of the pycnial and aecial stages of *Puccinia recondite*[J]. Canadian Journal of Botany, 1979, 57(1): 74–86.
- [32] Chethana K, Jayawardena R S, Chen Y J, et al. Appressorial interactions with host and their evolution[J]. Fungal Diversity, 2021, 110(1): 75–107.
- [33] Harder D E, Chong J. Ultrastructure of spermatium ontogeny in *Puccinia coronata avenae*[J]. Canadian Journal of Botany, 1978, 56(4): 395–403.
- [34] 田呈明, 梁英梅, 康振生, 等. 杨树与栅锈菌互作的细胞学研究[J]. 林业科学, 2002, 38(3): 87–93.
- Tian C M, Liang Y M, Kang Z S, et al. Cytological studies on the host-pathogen relationship in the course of poplar leaf infection by *Melampsora larici-populina*[J]. Scientia Silvae Sinicae, 2002, 38(3): 87–93.
- [35] Figueroa M, Dodds P N, Henningsen E C. Evolution of virulence in rust fungi-multiple solutions to one problem[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2020, 56: 20–27.
- [36] 庄华, 段婉露, 杨婷, 等. 小檗 *NPR1* 在小麦条锈菌侵染过程中的表达特征[J]. 植物病理学报, 2019, (49)6: 773–781.
- Zhuang H, Duan W L, Yang T, et al. Expression pattern of barberry *NPR1* during the infection of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2019, (49)6: 773–781.
- [37] Duplessis S, Lorrain C, Petre B, et al. Host adaptation and virulence in heterocercous rust fungi[J]. Annual Review of Phytopathology, 2021, 59(1): 403–422.
- [38] Waszczak C, Carmody M, Kangasjarvi J. Reactive oxygen species in plant signaling[J]. Annual Review of Plant Biology, 2018, 69: 209–236.
- [39] 曾永三, 王振中. 豇豆与锈菌互作中的活性氧代谢研究[J]. 植物病理学报, 2004, 34(2): 142–153.
- Zeng Y S, Wang Z Z. Studies on the metabolism of active oxygen species during the interactions of cowpea and rust pathogen[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2004, 34(2): 142–153.
- [40] 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 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.
- [41] 金莹, 孙爱东, 胡晓丹, 等. 苹果多酚的超声波提取及抗氧化作用研究[J]. 北京林业大学学报, 2007, 29(5): 137–141.
- Jin Y, Sun A D, Hu X D, et al. Ultrasonic extraction and antioxidant activities of apple polyphenols[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2007, 29(5): 137–141.

(责任编辑 范娟  
责任编辑 张星耀)