

RESEARCH ON FREEZE-DRYING OF THE NUCLEATED CELL OF HUMAN CORD BLOOD*

XIAO Hong Hai** LI Jun** HUA Ze Zhao** ,**** WANG Xin** GU Xue Lian** ZHENG Xiao Dong***

(* ** Institute of Refrigeration and Cryogenic Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093 China; *** Tofflon Ltd., Shanghai 201109 China)

ABSTRACT The research on hematogenic stem cells of cord blood has become more popular. How to preserve the cord blood stem cells have been researched by many researchers. At present, cord blood is preserved in ultra-low temperatures. In this research, it was preserved it by freeze-drying. Firstly, the samples with different concentrations of PVP, HES and saccharides were frozen to -40°C on the lyophilizer's shelf. Afterwards, they were vacuum-dried at selected shelf temperature at -30°C for main drying stage, and then at 15°C for second drying, the entire time of the freeze drying is 52.5hs. The dried samples were resuspended in an isotonic phosphate-buffered saline solution for rehydration and tested by microscope and flow cytometer. The protocol of 40% PVP + 20% sucrose had the best result. Flow Cytometer (FCM) measured the livability of the nucleated cells, and it was 55.67%. The ratio of the number of CD34^{+} to lymphocytes was 3.61%.

Key words: Human cord blood Freeze-drying Lyoprotectant CD34^{+} cell

* This work was supported by National Natural Science Foundation of China grant 59836240

**** Corresponding author. E-mail: tchua@sh163.net

小麦叶锈菌侵染过程的显微和超微结构*

王志英** 王冬梅***,**** 侯春燕** 刘娜*** 韩胜芬*** 马利华***

(河北农业大学** 园林与旅游学院*** 生命科学学院 保定 071001)

摘要 采用光学显微技术和电子显微技术对小麦叶锈菌的侵染过程进行了研究。发现叶锈菌从气孔侵入后在气孔腔内形成气孔下泡囊,然后分化出圆形的膨大体,由膨大体产生1-2初生菌丝,初生菌丝在寄主细胞间隙延伸扩展,与叶肉细胞壁接触后分化形成吸器母细胞,吸器母细胞进入寄主细胞后形成吸器。初生菌丝在吸器母细胞处产生分枝,形成次生菌丝在叶肉细胞间蔓延。在病原菌侵染早期(接种后8-24h),寄主细胞的超微结构变化并不明显。侵染中、后期(接种48-72h),被侵染叶肉细胞发生严重质壁分离,叶绿体膨胀变形,基粒片层排列疏松。线粒体嵴突退化。

关键词: 小麦叶锈菌 侵入过程 显微和超微结构

由小麦叶锈菌(*Puccinia recondita* f. sp. *tritici*)引起的小麦叶锈病是世界上最为严重的病害之一,也是我国麦区的一种主要病害。因此,了解病原菌的侵染过程对于探讨寄主植物与病原菌的互作机制尤为重要。我们课题组长期从事小麦抗叶锈生理机制的研究,对小麦抗叶锈防卫反应的信号及其转导机制以及过敏反应的诱发进行了大量的工

作^[1-3],但对该病的致病机理仍缺乏深入系统的研究。我们早期的研究表明,小麦叶锈菌的侵入方式

本文2003年4月21日收到,5月28日接受。

* 基金项目:河北省自然科学基金(编号:399172,301124)及河北省教委博士基金资助(编号:B2001211)。

**** 联系人。E-mail: Dongmeiwang63@hotmail.com

同其他锈菌一样,是通过气孔侵入的^[3,4]。但对于病原菌侵入表皮后的扩展过程,只是从组织病理学方面加以探讨^[4],而对于叶锈菌侵染过程中细胞学方面的研究则报道很少。本文利用光学显微技术和电子显微技术对小麦叶锈菌的侵染过程进行了较系统的研究,旨在探讨病原菌的致病机制及寄主的抗病机制的细胞学研究提供依据。

材料和方法

1. 供试品种与叶锈菌菌种

供试材料为小麦(*Triticum aestivum*)品种洛夫林 10。供试菌种为小麦叶锈菌(*Puccinia recondita* f. sp. *tritici*)小种 165,小麦品种洛夫林 10 与叶锈菌小种 165 组成亲和组合,菌种由河北农业大学小麦锈病研究室提供。

2. 幼苗培育与接种

选用正常健康、饱满的种子播于直径 9cm 的花盆中,生长于人工气候培养室内。昼夜温度为 20-27℃,光照周期 14h/d,镝灯照射,光照强度 400W/m²。当幼苗第一片真叶展开时,采用涂抹法进行接种,然后将幼苗置于保湿箱中保湿 16h,再移入培养室内继续培育。

3. 显微样品及电镜样品的制备

分别于接种后 8、12、24、48、72h 随机切取接种叶片,两端各弃去 1cm,将剩余叶片切成 1-2mm² 的小块,2.5% 戊二醛前固定 24h,1% 锇酸后固定 3h。丙酮等级系列脱水,Epon812 包埋。为对叶锈菌侵入处进行初步定位,包埋块先进行半薄切片(1-2μm),天青 II-亚甲蓝染色,光学显微镜下观察。然后在 LKB 超薄切片机上进行切片,醋酸双氧铀-柠檬酸铅染色,JEM-100CX 透射电镜下观察、摄影。

结 果

1. 叶锈菌侵染过程的显微观察

在光学显微镜下观察发现,接种后 8h,小麦叶肉细胞在气孔下腔出现了椭圆形的气孔下泡囊(图版图 1),气孔下泡囊的形成是叶锈菌侵染成功的标志。接种后 12h,气孔下泡囊分化形成较短的初生侵染菌丝(图版图 2)。由图 3 可以看出,接种后 24h,细胞间隙中的初生侵染菌丝紧贴寄主细胞壁继续延伸,而且菌丝着色较深,表现其原生质组分丰满稠密。同时,在气孔下方仍可见气孔下泡囊出现。到接种后 48h,胞间菌丝不断向各个方向扩展,菌丝顶端与叶肉细胞壁接触后分化产生圆球形的吸器母细胞,并且在胞间隙中可见许多分枝的次生菌丝(图版图 4)。此时仍有气孔下泡囊产生,说明叶锈菌夏孢子萌发侵入的时间并不一致。接种后 72h,胞间

菌丝仍继续分枝蔓延,许多吸器母细胞清晰可见(图版图 5)。由于菌丝在胞间隙中穿插伸长的方向不一致,使得在多数切片中只能观察到菌丝某一段的纵切、斜切或横切面。

2. 叶锈菌侵染过程的超微观察

(1) 胞间菌丝 透射电镜观察表明,叶锈菌侵入寄主组织后,在寄主细胞间隙内产生大量的胞间菌丝,多数菌丝紧贴寄主细胞壁延伸。菌丝多数为长条状,并具有分枝,而且细胞核数目不一,具有多核(图版图 12)、双核(图版图 6)、单核(图版图 7,9)几种类型。胞间菌丝的原生质与细胞器因其发育时期不同而有所变化。幼龄菌丝中原生质丰满稠密,细胞核明显,原生质中充满核糖体、线粒体、内质网等细胞器,液泡较少(图版图 6,7);而老龄菌丝中原生质稠密度减弱,液泡化程度增加,但细胞器的形状和分布仍很正常(图版图 8,9)。从图 10 可看出胞间菌丝的横切面结构,其原生质亦丰满稠密,线粒体非常发达,内质网比较丰富。

(2) 吸器母细胞和吸器 锈菌胞间菌丝在寄主细胞间扩展时,菌丝顶端和寄主细胞壁接触后产生隔膜,分化形成吸器母细胞(图版图 11),吸器母细胞的原生质成分同菌丝细胞相同,细胞核数目为双核(图版图 12),并未发现多核现象。随后初生菌丝在吸器母细胞处产生分枝,形成次生菌丝在叶肉细胞间蔓延(图版图 12)。随着吸器母细胞的不断发育,在入侵栓形成之前,线粒体开始有规律的沿其边缘排列(图版图 13)。当吸器母细胞与寄主细胞壁接触后,接触部位的吸器母细胞壁和寄主细胞壁表现不同程度的增厚,增厚部分的染色程度加深。在入侵栓侵入处,寄主细胞质膜内陷(图版图 14,箭头),随后入侵栓穿越寄主细胞壁继续在寄主细胞内延伸,这一延伸的管状结构最终转化为吸器的颈部(图版图 15)。吸器的颈部伸长到一定程度后,其顶端部分开始膨大形成圆形的幼小吸器体。吸器母细胞中的原生质成分和细胞器逐渐转入吸器中。吸器体进一步扩大形成成熟吸器。吸器一般呈球形、卵球形。在吸器的发育过程中,经常伴随寄主质膜的内陷,从而将吸器体与原生质分隔开来,这部分质膜被称为吸器外膜,常呈波浪状结构。吸器体内原生质成分与吸器母细胞基本一致,内含丰富的线粒体、内质网及大量电子密度颗粒,吸器体中的细胞核一般为单核(图版图 16,17)。吸器是锈菌在寄主细胞内发育形成的最终结构。侵染菌丝在寄主细胞间隙内不断分枝扩展,形成次生菌丝构成菌落,并不断产

生吸器母细胞和吸器,以便从寄主细胞内吸收营养。

(3) 寄主细胞的结构变化 在小麦叶锈菌侵染早期(接种后8-24h),寄主细胞的超微结构变化并不明显,只看到被侵染细胞质膜轻微下陷,同时叶绿体稍显膨胀(图版图7)。到侵染中、后期(接种48-72h),被侵染细胞发生严重质壁分离(图版图13),部分叶绿体膨胀变形,片层结构散乱,淀粉粒数目增多(图版图11,18)。线粒体嵴突开始发生退化,内部略显空虚,只有双层膜仍保持形态结构的完整性(图版图13、16)。

讨 论

1. 萌发与侵入

研究表明,不同锈菌的侵入方式并不一致。小麦叶锈菌夏孢子萌发后产生芽管,芽管沿与叶脉垂直方向伸长,趋向气孔,在气孔上方形成附着胞。附着胞产生侵入丝穿过保卫细胞间隙,侵入气孔下腔并形成气孔下泡囊^[3,5]。小麦叶锈菌的萌发与侵入途径与小麦条锈菌^[5]、青杨叶锈菌^[6]相类似,而与菜豆锈菌^[7]、杨树栅锈菌^[8]不尽相同。菜豆锈菌多从气孔侵入寄主细胞,少数可从寄主表皮直接侵入,并且侵入前不一定形成明显的附着胞。栅锈菌侵染感病杨树叶片时亦可由气孔侵入,亦可直接穿透寄主表皮入侵。

2. 胞间菌丝与吸器

在小麦条锈病等作物病害中,菌丝和吸器母细胞以及吸器中常出现多核现象^[5]。小麦叶锈菌的吸器体、吸器母细胞中的细胞器、原生质组分与菌丝细胞中相同,但细胞核数目并不一致。小麦叶锈菌的菌丝有多核、双核、单核几种类型。吸器母细胞中的细胞核数目多为双核,个别为单核,并未发现诸如小麦条锈菌中的多核现象,这与有其他锈菌如菜豆锈菌^[7]、青杨叶锈菌^[6]很相似。另外,除小麦条锈菌吸器的多核现象较为普遍外,多数锈菌的菌丝及吸器含有双核,而小麦叶锈菌成熟吸器内仅可观察到单核。Hu^[9]对小麦叶锈菌的研究发现,成熟前的吸器含有双核,成熟后的吸器却具有单核,而细胞核中却含有两个核仁,这表明小麦叶锈菌成熟吸器的单核可能是由两个细胞核融合而成。此外,燕麦冠锈菌成熟吸器内同样也含有单核^[10]。研究不同锈菌中菌丝与吸器中细胞核的差异对于了解吸器的结

构和功能以及锈菌的致病机理具有重要意义。

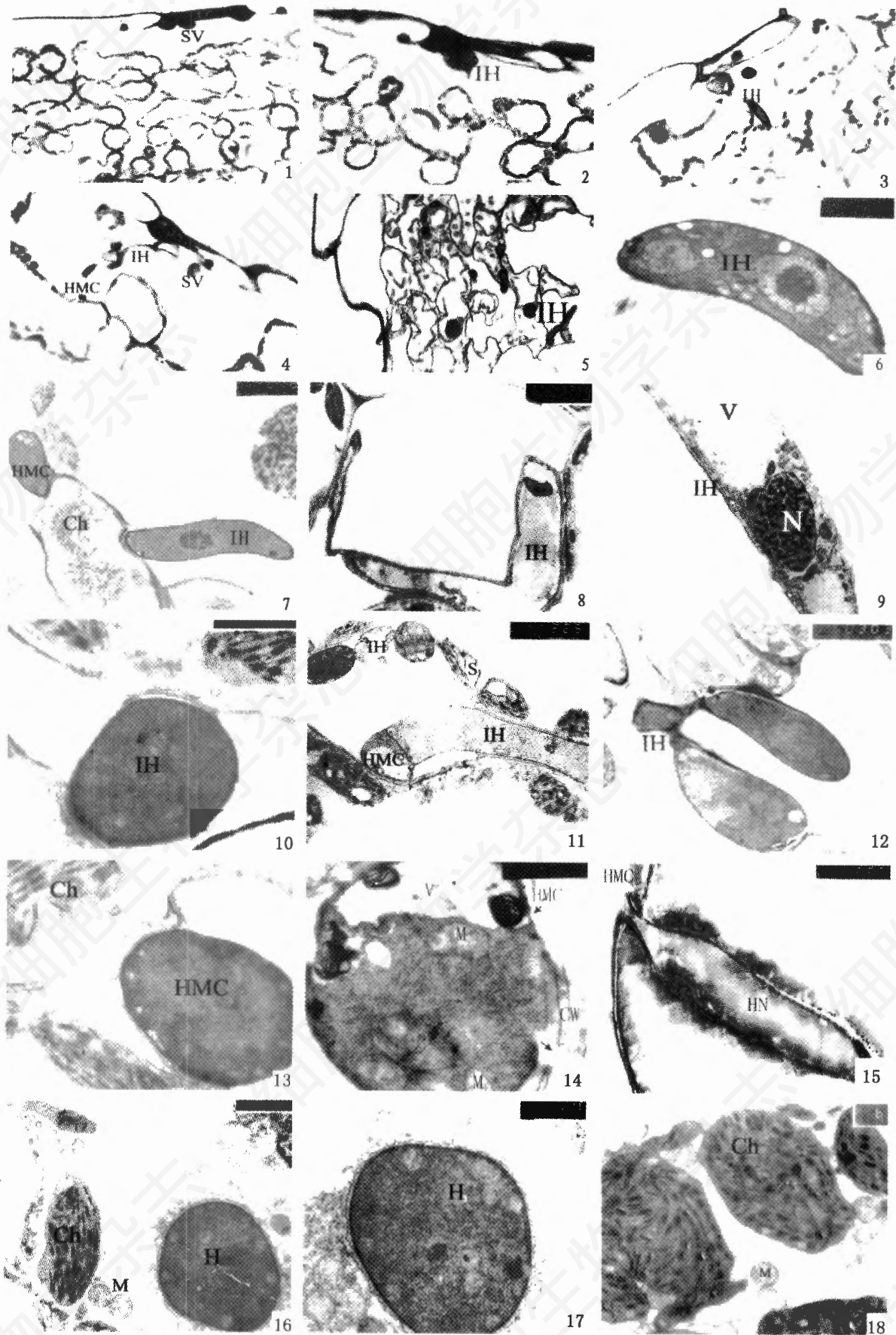
3. 寄主细胞的反应

在小麦与叶锈菌的亲组合中,当病原菌在互作中占主导势力时,植物的防卫体系不被激活或反应很弱,不足以对病原菌形成威胁。因此在寄主被病原菌侵染早期,病原菌的存在并未对寄主细胞的结构产生明显的影响,从而使病原菌不断地在细胞间隙中扩展。因此,本实验在光学显微镜下可观察到大量菌丝在胞间隙中蔓延,在透射电镜下亦可看到许多菌丝存在,在多数切片上均可看到菌丝、吸器母细胞和吸器的不同切面结构。

从本实验结果可以看出,小麦叶锈菌侵染后期,寄主细胞中叶绿体膨胀变形,基粒片层排列疏松,线粒体嵴突出现退化,这些现象与冯东昕^[11]、杨若林^[12]、兰景华^[13]的报道结果基本一致。这些结构变化可能会降低受侵染细胞的光合强度,影响能量的代谢,最终使细胞的正常生理活动受到干扰,从而有利于锈菌进一步扩大侵染范围。虽然病原菌与寄主建立了专性寄生关系,但最终会因叶锈菌侵染造成大面积叶片坏死,从而导致整株死亡。但田呈明^[6]对青杨叶锈病菌侵染过程的研究发现,病原菌在寄主细胞间隙延伸时,寄主细胞仍保持正常状态。这一现象反映出不同种类病原菌的侵入对寄主细胞的伤害程度并不相同。

参 考 文 献

- [1] 毛爱军、王智焯,1995,河北医学院学报,16(4):23.
- [2] 王冬梅等,1997,植物病理学报,27(4):376.
- [3] 侯春燕等,2002,植物病理学报,32(2):147-152.
- [4] 张凤国等,1991,植物病理学报,21(4):271-275.
- [5] 李振歧、曾士迈,2000,中国小麦锈病[M].北京:中国农业出版社.
- [6] 田呈明等,2002,植物病理学报,32(1):71-78.
- [7] 冯东昕等,2000,植物病理学报,30(1):53-59.
- [8] LAURANSL, PILATE G., 1999, *Phytopathology*, 89(3): 233-238.
- [9] Hu G. G. et al., 1998, *Journal of Phytopathology*, 146(1): 39-50.
- [10] 康振生,1995,植物病原真菌的超微结构[M].北京:中国科学技术出版社.
- [11] 冯东昕等,2001,植物病理学报,31(3):246-250.
- [12] 杨若林等,2001,西北植物学报,21(2):293-296.
- [13] 兰景华,1992,西南农业大学学报,14(4):289-291.



图版说明

小麦叶锈菌侵染过程的显微及超微结构

1. 接种后 8h, 气孔下泡囊(SV)形成(200×); 2. 接种后 12h, 初生侵染菌丝结构(400×); 3. 接种后 24h, 胞间菌丝(IH)结构(400×); 4. 接种后 48h, 菌丝与吸器母细胞(HMC)结构(400×); 5. 接种后 72h, 吸器母细胞与分枝菌丝(400×); 6. 双核的胞间菌丝(8 000×); 7. 胞间菌丝、吸器母细胞及寄主细胞结构(4 000×); 8. 胞间菌丝结构(4 000×); 9. 胞间菌丝及液泡(V, 4 000×); 10. 胞间菌丝横切面(8 000×); 11. 胞间菌丝、吸器母细胞与寄主细胞结构(4 000×); 12. 双核的吸器母细胞与多核次生菌丝结构(5 000×); 13. 侵染寄主前的吸器母细胞, 线粒体(M)沿其边缘排列(8 000×); 14. 吸器母细胞形成入侵栓处, 寄主细胞细胞膜内陷(箭头处, 15 000×); 15. 吸器颈部(HN)结构(8 000×); 16. 寄主细胞及成熟的单核吸器(H, 6 000×); 17. 16图放大(10 000×); 18. 侵染中后期, 寄主细胞中的叶绿体(Ch)结构(8 000×)。

CW. 细胞壁; M. 细胞膜; S. 淀粉粒。

MICROSTRUCTURE AND ULTRASTRUCTURE INFECTED BY WHEAT RUST FUNGUS*

BAI Zhi Ying** WANG Dong Mei**·**** HOU Chun Yan*** LIU Na*** HAN Sheng Fang*** MA Li Hua***

(* College of Landscape Architecture and Tourism, *** College of Life Science,

Agricultural University of Hebei, Baoding 071001 China)

ABSTRACT The infection process of *Puccinia recondita* f. sp. *tritici*, on leaves of wheat was examined under microscope and transmission electron microscope. The results showed that the fungus formed a sub-stomatal vesicle when it penetrated through stomata and further formed a round inflated body usually with one or two primary hypha. Intracellular hypha extended at first between host cell and a haustorium mother cell formed at a hyphal tip in contact with a host cell. Then penetrated host cell and produced haustoria. The secondary hypha formed, which a haustorium mother cell has developed and spread intracellularly. Ultra structure of the host cell in compatible combination didn't show visible change at the early stage of infection (8-24h after inoculation). At the middle and late stage of 48-72h after inoculation, the host cell became plasmolyzed, and some of the cytoplasmic membrane showed slightly sunken. The chloroplasts were swollen or malformed. The thylakoid array inside chloroplasts became loosen or disordered, the crista of most mitochondria appeared indistinctly, and the cells started to decline.

Key words: *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* Infection process Microstructure and ultrastructure

* Supported by the Hebei Provincial Natural Science Foundation (399172, 301124) and the Hebei Provincial Ph. D foundation of education bureau(B2001211).

**** Author for correspondence. E-mail: Dongmeiwang63@hotmail.com