

柑桔叶点霉侵染琯溪蜜柚的超微结构观察及致病机理分析

牛先前¹, 罗金水¹, 卢松茂¹, 杜丽君², 郑国华³, 林秀香^{1*}

(1. 福建省热带作物科学研究所, 福建 漳州 363001; 2. 福建农林大学园艺学院, 福州 350002; 3. 漳州城市职业学院, 福建 漳州 363001)

摘要: 为探明黑斑病对琯溪蜜柚(*Citrus grandis* ‘Guanximiyou’)果皮细胞的侵染破坏特点及作用机理, 人工接种柑橘叶点霉亚洲种(*Phyllosticta citriasiana*)后, 在扫描电镜与透射电镜下观察蜜柚真皮细胞的变化。结果表明, 受到侵染后, 真皮细胞的液泡膜首先发生褶皱、断裂, 最终消失; 叶绿体的淀粉粒消失、膜出现褶皱; 质膜内陷、局部断裂; 类囊体发生膨胀并解体; 线粒体数量明显增加, 基粒清晰可见, 之后线粒体形态改变, 双层膜消失, 内部空胞化。未观察到细胞间隙及细胞内有菌丝分布, 且细胞壁结构始终稳定。*P. citriasiana* 危害蜜柚果皮细胞与毒素作用有关, 侵染位点可能是细胞膜, 信息通过胞间连丝穿过细胞壁, 进入细胞内部。

关键词: 琯溪蜜柚; 黑斑病; 侵染; 超微结构; 致病机理

doi: 10.11926/j.issn.1005-3395.2016.04.014

Destruction Characteristics of Hypodermal Cells in *Citrus grandis* ‘Guanximiyou’ Infected by *Phyllosticta citriasiana* and Pathogenic Mechanism

NIU Xian-qian¹, LUO Jin-shui¹, LU Song-mao¹, DU Li-jun³, ZHENG Guo-hua², LIN Xiu-xiang^{1*}

(1. *Fujian Institute of Tropical Crops*, Zhangzhou 363001, Fujian, China; 2. *College of Horticulture, Fujian Agriculture and Forestry University*, Fuzhou 350002, China; 3. *Zhangzhou City College*, Zhangzhou 363001, Fujian, China)

Abstract: In order to explore the characteristics of infection and damage of citrus black spot to *Citrus grandis* ‘Guanximiyou’, the changes in hypodermal cell structure were observed under scanning electron microscopy and transmission electron microscopy (TEM) after artificially inoculated with *Phyllosticta citriasiana*. After pomelo fruits were infected, the tonoplast in hypodermal cell wrinkled, fractured, and eventually vanished. The starch grains in chloroplast disappeared. The plasmolemma wrinkled, invaginated and partly ruptured. The number of mitochondria increased with clear visible grana. The thylakoid swelled and disintegrated. Afterwards, mitochondria underwent morphological changes, including disappearance of two layers of membrane and vacuolization. However, there were no intercellular or intracellular hyphae, and the cell wall remained structurally stable. *Phyllosticta citriasiana* infected hypodermal cells of ‘Guanximiyou’ through toxins, which probably attack cell membrane structure and cross over cell wall through plasmodesmata.

Key words: Guanxi pomelo; Citrus black spot; Infection; Ultrastructure; Pathogenic mechanism

收稿日期: 2015-10-23

接受日期: 2016-01-05

基金项目: 国家科技支撑计划项目(2014BAD15B00); 福建省公益类基本科研专项(2009R10010-1)资助

This work was supported by the National Science and Technology Support Project (Grant No. 2014BAD15B00), and the Special Project for Public Basic Scientific Research of Fujian Province (Grant No. 2009R10010-1).

作者简介: 牛先前(1981~), 男, 硕士, 研究方向为植物生理生态。E-mail: nxq828@126.com

* 通信作者 Corresponding author. E-mail: lxx92@126.com

中国是琯溪蜜柚的主要产区,但琯溪蜜柚易患黑斑病(*Citrus black spot*, CBS),使果面形成红褐色小斑,较大的病斑边缘呈红褐色中部凹陷呈灰色^[1],致使果实外观品质和市场价值严重受损。据福建省平和县2012年9–10月份普查,全县黑斑病害发生面积13 km²以上,一般果园果实发病率5%~10%,严重的15%~30%,直接经济损失上亿元;2013年已有10个乡镇发生面积约24 km²,并有不断蔓延和加重趋势。该病菌被欧盟列为A1类外来有害生物^[2],并被多个国家列为重要的检疫对象^[3]。

一直以来,琯溪蜜柚黑斑病的主要致病菌难以识别,琯溪蜜柚黑斑病具有潜伏期长、爆发突然的特点^[4–5],且引发琯溪蜜柚黑斑病的除主要致病菌外,其他伴生的杂菌及微生物也可引起果面产生褐色病斑^[6–7],如引起柑橘黑斑病的主要病原菌柑橘球座菌(*Guignardia citricarpa*),其无性世代为柑橘叶点霉(*Phyllosticta citricarpa*)。Wulandari等报道了*G. citricarpa*、*G. mangiferae*和*P. citriasiana*等3种致病菌的消长动态,并指出*P. citriasiana*可能是引起亚洲柑橘类黑斑病的主要致病菌^[8]。Wang等^[7]从中国柑橘属黑斑病病斑中分离出496个菌株,认为*P. citricarpa*和*P. citriasiana*具有一致的形态、习性和生物学特征。Stammler等^[9]对*P. citricarpa*引起的柑橘类水果黑斑病的检测方法进行了研究,有助于准确识别和探测致病菌的类型。目前已基本确定,引起琯溪蜜柚黑斑病的主要致病菌为*P. citriasiana*^[5],该菌最早于2009年由Wulandari等^[8]从亚洲出口荷兰的柚子黑斑病病斑上分离得到,不同于柑橘叶点霉^[10–11],被译为柑橘叶点霉亚洲种。柑橘叶点霉亚洲种是一种潜伏型致病菌,潜伏期高达数月,通常病斑直径2~3 mm,只在真皮层,但产生连续侵染后病斑可以深达白皮层但不侵染囊瓣。在实验室中很容易引发孢子萌发,而在田间只有在果实膨大后才会表现病症,其潜伏机理尚不明确。目前,有关柑橘叶点霉亚洲种的侵染特点、发病机制、作用机理等方面的研究较少。本研究以人工培养的柑橘叶点霉亚洲种,接种于琯溪蜜柚果实,采用扫描电镜和透射电镜系统观察柑橘叶点霉亚洲种侵染蜜柚果实真皮细胞的超微结构变化,获得了柑橘叶点霉亚洲种侵染寄主破坏寄主细胞的丰富信息,为从细胞水平阐述寄主的抗病机制及揭示柑橘叶点霉亚洲种的侵染特点提供研究基础。

1 材料和方法

1.1 材料

琯溪蜜柚黑斑病菌种,于2013年10月分离自福建省平和县琯溪蜜柚黑斑病果皮病斑,经鉴定为柑橘叶点霉亚洲种(*Phyllosticta citriasiana*)。OA培养基上培养5 d,沿菌落边缘挑取菌丝块转接PDA培养基,于28℃,200 r min⁻¹摇床培养5 d,收集菌丝体,-20℃保存备用。

1.2 接种

将保存菌丝体转接于OA培养基上14 d,刮取菌落的乳白色粘液获得分生孢子,用无菌水配制成浓度约为10⁴ CFU mL⁻¹的分生孢子悬浮液。在平和县选择黑斑病发生较少的蜜柚园为试点,选择长势健壮的5年生琯溪蜜柚(*Citrus grandis* ‘Guanximiyou’)果树作试材。2014年5月22日,对健康无病果实先用75%的酒精消毒,待酒精挥发后,果实的半侧用喷雾接种为处理(P),纱布保湿;以另一半果及邻果喷无菌水做对照(CK)。之后,统一套经高压灭菌的蜜柚专用袋隔离,果园按照当地常规管理。

2014年7月15日采摘处理果,从病斑重新分离病原菌,采用罗金水等^[5]的检测方法进行鉴定,以确定接种成功且无其他杂菌干扰发病后,取典型病果为试材制作切片和超薄切片。

1.3 显微切片的制备

取带有典型病斑的果皮真皮材料,用卡诺氏固定液固定,常规石蜡切片法切片。切片厚度10 μm。在Olympus显微下观察拍照,重复10次以上。

1.4 超薄切片的制备

选择不同发生时期的典型病斑,从病斑中心由近至远依次取材反映病菌侵染对宿主的破坏,参照牛先前等^[12]的方法制备超薄切片。依次切取大小为0.5 mm×1 mm的果皮真皮组织块,迅速投入用含2%焦锑酸钾的磷酸缓冲液(pH 7.6)配制的3%戊二醛固定液中,脱气后于4℃固定1 d以上;用2%焦锑酸钾-0.1 mol L⁻¹磷酸氢二钾(pH 7.6)洗涤4次,每次30 min,4℃过夜;将材料转移至用含2%焦锑酸钾的磷酸缓冲液(pH 7.6)配制的1%锇酸中,4℃冰箱内固定4 h;然后重蒸水洗涤4次,每次30 min,冷乙醇梯度脱水,丙酮过渡,环氧树脂618包埋,LKB-5

型超薄切片机切片(厚度50 nm),经醋酸双氧铀染色后,在JEM1010型透射电镜下观察照相。

2 结果和分析

2.1 接种和验证

从图1可见,对照琯溪蜜柚果实的表皮油绿、光滑未表现病症;接种果实(P)表现出典型黑斑病(*Phyllosticta citriasiana*)病症,出现浅黄色褪绿小斑点,果面上有半埋生的褐色菌丝体(前期);果皮病斑为褐色,直径约为2~3 mm,少量病斑有流胶现象(中期);病斑转红色小斑点,中央凹陷(后期);凹陷继续,并产生孢子囊(末期)。在显微镜下观察,末期病斑中心为黑褐色,周围感病细胞组织为红褐色,且距离病斑中心越远颜色越接近健康色(图2: A);从果皮纵切

面清晰地看到充满孢子的孢子囊,但未发现菌丝体(图2: B)。从病果表皮上取样鉴定,病斑中致病菌为接种菌种且无杂菌干扰,说明接种成功。

2.2 真皮细胞特点

柚皮包括表皮、真皮和白皮层三部分,真皮是由两层结构不同的细胞组成。靠近表皮的真皮细胞(以下称近表皮细胞)排列紧密、细胞间隙小,细胞呈长条形(图3: A);靠近白皮层的真皮细胞(以下称近白皮层细胞)呈椭圆形,细胞排列松散、细胞间隙大(图3: D)。近表皮细胞的叶绿体呈卵形,内部有2片清晰的片层结构(图3: B),线粒体呈条形,含有基粒(图3: C);近白皮层细胞的叶绿体呈椭圆形,内部基质类囊体、基粒类囊体分布有序,淀粉粒清晰可见(图3: E),线粒体呈短棒或圆球状,内含物丰富,

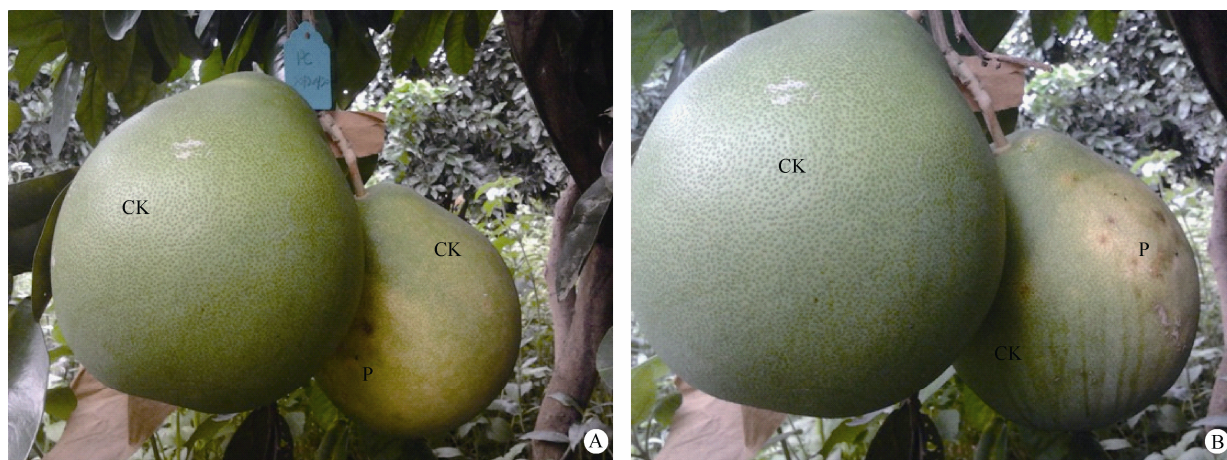


图1 接种黑斑病菌的果实和对照果。A: 对照果(CK); B: 接种果(P)。

Fig. 1 Fruits inoculated with *Phyllosticta citriasiana* and control fruits. A: Control fruit (CK); B: Inoculated fruit (P).

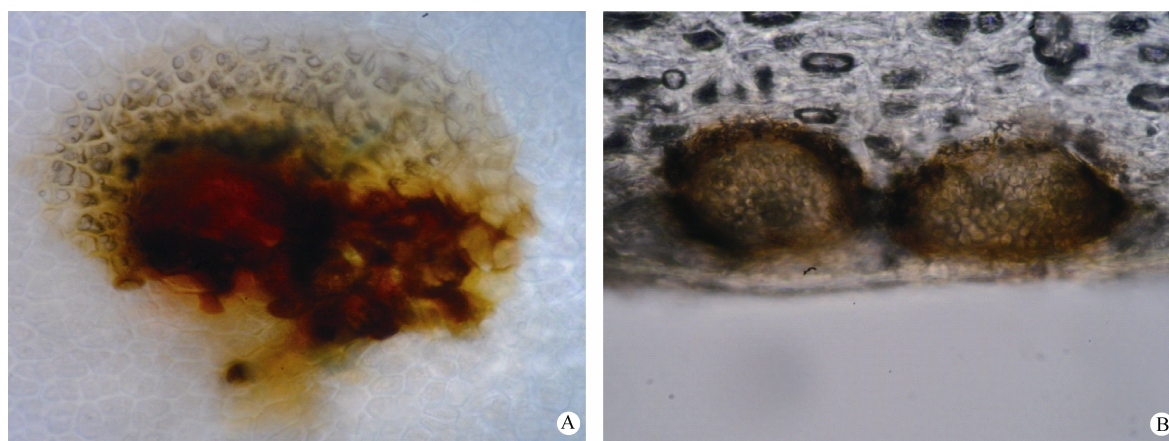


图2 感染 *Phyllosticta citriasiana* 的果皮表面。A: 正面; B: 纵切面。

Fig. 2 Pericarp surface inoculated with *Phyllosticta citriasiana*. A: Front; B: Longitudinal section.

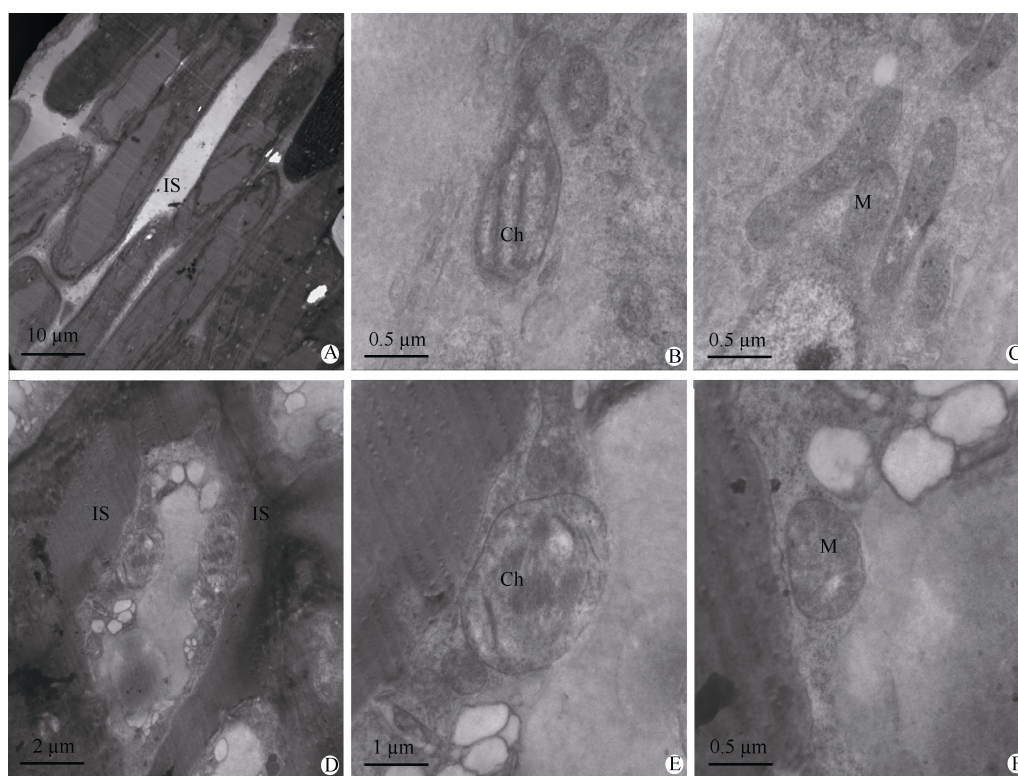


图3 蜜柚真皮细胞结构。IS: 细胞间隙; Ch: 叶绿体; M: 线粒体; A: 近表皮细胞; B: 近表皮细胞的叶绿体; C: 近表皮细胞的线粒体; D: 近白皮层细胞; E: 近白皮层细胞的叶绿体; F: 近白皮层细胞的线粒体。

Fig. 3 Hypodermal cell structure of honey pomelo. IS: Intercellular space; Ch: Chloroplast; M: Mitochondrion; A: Near epidermal cells; B: Chloroplast of near epidermal cell; C: Mitochondrions of near epidermal cell; D: Epidermal cell near albedo layer; E: Chloroplast in cell near albedo layer; F: Mitochondrion in cell near albedo layer.

含5~8个模糊基粒(图3: F)。可见, 近白皮层细胞结构更符合典型细胞结构, 因此本试验选择近白皮层细胞为研究对象, 观察黑斑病对真皮细胞的破坏特点。

2.3 对液泡的影响

在透射电镜下, 健康真皮细胞中央液泡很大, 占细胞体积的90%以上, 液泡膜清晰且内含物较少, 其他细胞器, 如叶绿体、线粒体等被挤到细胞边缘紧贴细胞壁分布(图4: A)。透射电镜下, 当病害侵染发生时液泡膜首先破裂, 细胞质及细胞器涌向细胞中间, 叶绿体片层结构未有明显破坏现象, 清晰可见(图4: B); 距离致病中心愈近, 破坏越严重, 最终液泡消失(图4: C, D)。整个侵染过程中未见细胞间隙及细胞内有菌丝的存在。

2.4 对叶绿体的影响

在超薄切片中健康细胞叶绿体呈椭圆形, 被膜清晰, 内部淀粉粒清晰, 基质片层叠垛整齐, 基质

类囊体与基粒类囊体紧密相连, 是一个完整的膜系统结构(图3: E)。透射电镜下, 受病害侵染后, 叶绿体形状趋于圆形, 被膜出现褶皱叶绿体表面变的凹凸不平, 基粒类囊体逐渐向两端拉伸导致体积增大, 基质类囊体与基粒类囊体之间链接松散, 淀粉粒消失(图5: A)。距离致病中心愈近, 叶绿体被膜破裂越严重, 基质出现外泄, 基质片层与基粒之间出现间隙, 甚至出现分离(图5: B)。随着病害加重, 叶绿体结构完全混乱难以识别, 基粒类囊体和基质类囊体开始断裂并出现明显分离, 叶绿体内部出现较大空隙(图5: C), 叶绿体膜系统被完全破坏, 叶绿体内部出现多个囊泡, 叶绿体片层结构严重分解(图5: D); 到病害末期, 致病中心叶绿体解体为絮状物溶解于细胞质中(图5: E)。

2.5 对线粒体的影响

透射电镜下, 正常细胞线粒体呈短棒或圆球状, 双层膜结构完整, 基质粘稠且嵴数目少(图3: F)。

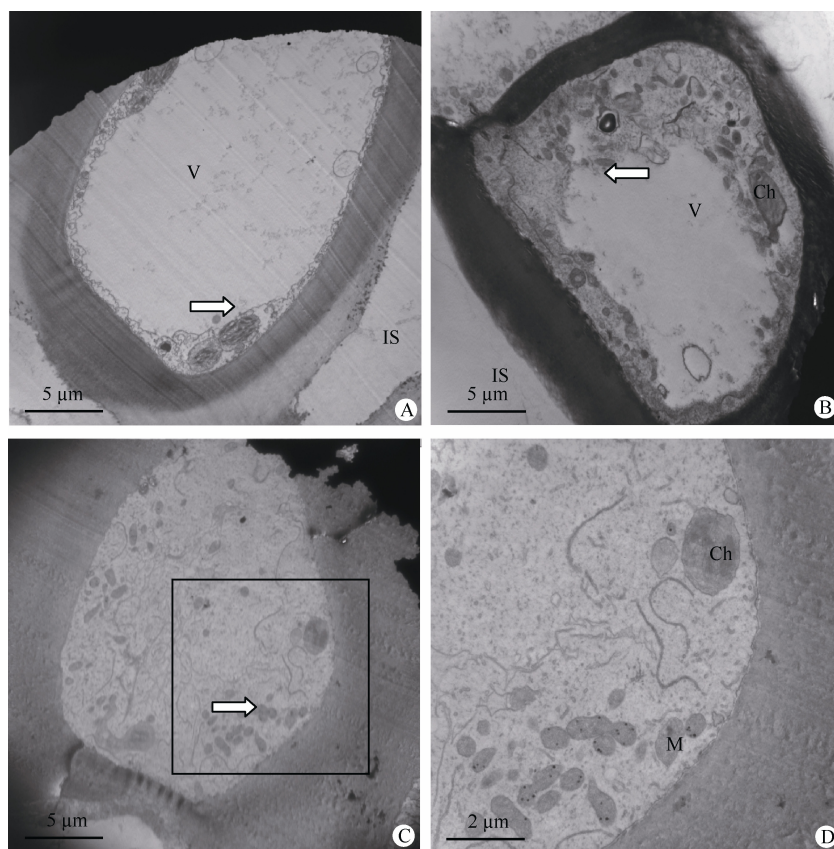


图 4 侵染过程中蜜柚真皮细胞的液泡变化(箭头)。V: 液泡; A: 健康的液泡; B: 破裂的液泡; C: 破坏严重的液泡; D: C 方框的放大。

Fig. 4 Changes in vacuole of hypodermal cells during infection. V: Vacuole; A: Healthy vacuole; B: Ruptured vacuole; C: Severely damaged vacuole; D: Enlargement of box in Figure C.

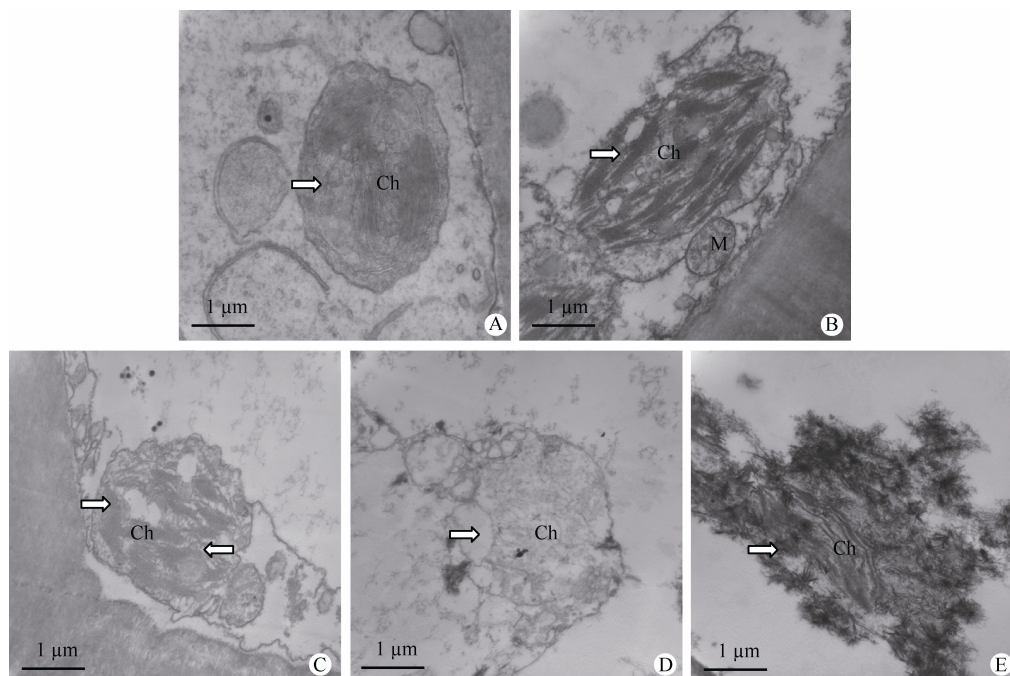


图 5 侵染过程中蜜柚真皮叶绿体超微结构变化(箭头)。A: 出现褶皱; B: 被膜破裂; C: 类囊断裂; D: 囊泡化; E: 解体。

Fig. 5 Changes in chloroplast ultrastructure of in hypodermis of honey pomelo during infection. A: Folded chloroplast; B: Ruptured membrane; C: Capsular ruptured; D: Vesiculated; E: Disintegrate.

病害侵染后, 线粒体数量增多, 1 个视野内 7 个(图 4: A)增加到 36 个(图 4: D), 但双层膜结构完整, 基质基粒清晰可见, 基粒数量也增多(图 6: A)。随侵染程度加剧, 线粒体形态发生扭曲变形愈严重, 并导致膜断裂, 嵴结构被破坏, 基粒开始模糊(图 6: B); 线粒体形态继续恶化, 嵴几乎消失, 内部出现空胞化(图 6: C); 之后, 线粒体膜消失, 内部解体(图 6: D); 发病末期, 线粒体完全解体为絮状物, 线粒体消失(图 6: E)。

2.6 对细胞壁的影响

正常真皮细胞壁层次清晰, 初生壁和次生壁结

构致密, 中胶层紧密, 均匀而连续。受到病害侵染叶绿体膨胀, 细胞壁结构无明显变化(图 6: A, F); 当叶绿体开始解体, 线粒体扭曲变形, 线粒体膜消失, 内部解体时, 细胞壁结构依然完好(图 6: B, D, G); 当线粒体严重解体时, 细胞壁仍没有明显破坏现象(图 6: E); 直至发病末期, 细胞器完全解体, 发病中心的细胞壁内部纤维才开始出现空隙、中胶层出现解体(图 6: H)。王志坤等观察植物细胞衰老死亡过程, 在细胞器解体的同时, 细胞壁有一个中胶层致密度降低及消失的过程^[13], 本文观察结果与其相似, 说明蜜柚细胞壁的变化是在细胞死亡之后发生的自然解体, 与黑斑病菌的作用无关。

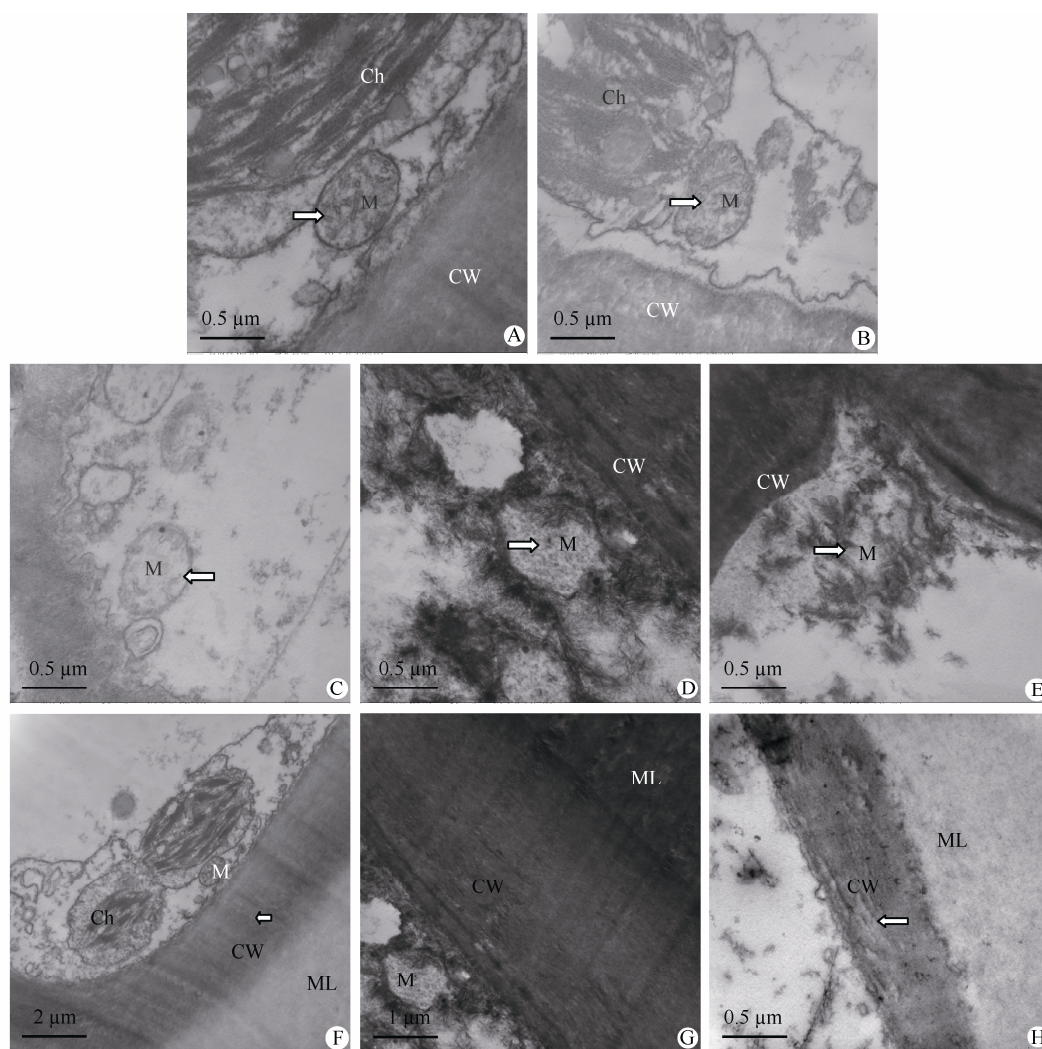


图 6 侵染过程中蜜柚真皮细胞的线粒体和细胞壁的变化(箭头)。CW: 细胞壁; ML: 胞间层; A: 基粒增多的线粒体; B: 形态扭曲的线粒体; C: 空胞化的线粒体; D: 膜消失的线粒体; E: 线粒体解体; F: 叶绿体膨胀时的细胞壁; G: 线粒体变形时的细胞壁; H: 细胞壁解体。

Fig. 6 Changes (arrows) in mitochondrion and cell wall in hypodermis of honey pomelo during infection. CW: Cell wall; ML: Intercellular layer; A: Increased granum in mitochondria; B: Distorted mitochondria; C: Vacuolated mitochondria; D: Membrane disappeared mitochondria; E: Disintegrated mitochondria; F: Chloroplast expanded cell walls; G: Mitochondrial deformed cell walls; H: Disintegrated cell walls.

3 讨论

当植物受到致病菌侵染时, 寄主细胞会发生一系列生理、病理变化, 从而导致细胞超微结构的变化。甜瓜(*Cucumis melo*)感染单囊壳白粉菌(*Podosphaera xanthii*)后叶绿体膜不清晰, 类囊体结构模糊, 线粒体空泡化, 随着侵染加剧叶绿体逐渐解体^[14]。向日葵(*Helianthus annuus*)感染向日葵锈病(*Puccinia helianthi*)后, 出现细胞器变形、空泡化, 最终寄主细胞解体^[15]。柑橘叶点霉亚洲种侵染蜜柚真皮细胞后, 有较长的潜伏期, 此时寄主无明显病症, 通过分子检疫手段可以检测到致病菌的存在。侵染初期, 病症为针状失绿小点, 此时液泡断裂, 叶绿体出现破坏, 宿主表皮失绿; 随侵染加剧, 病斑逐渐扩大, 失绿小点由黄转褐, 叶绿体解体严重; 之后病斑扩展到2~3 mm, 病斑中心出现凹陷, 液泡、叶绿体消失, 线粒体解体, 细胞死亡, 细胞内含物大量流失, 此时果实外观品质产生严重影响, 商品性急剧下降, 经济效益明显降低。距离致病中心愈远, 细胞破坏愈小; 愈近, 细胞器破坏愈严重。本文的观察结果表明, 致病菌首先破坏液泡膜, 使液泡膜发生褶皱、断裂并最终消失; 液泡消失的同时叶绿体膜出现褶皱、破裂, 类囊体膨胀并断裂; 最后是最不敏感细胞器——线粒体发生解体, 即标志着细胞的凋亡。

有研究表明, 白粉病病原菌(*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*)侵染大麦(*Hordeum vulgare*)后, 能够诱导侵染点附近叶肉细胞的叶绿体增加, 从而为病原菌的生长发育提供持续的养分来源^[16]。本研究未观察到叶绿体增加现象, 但距离致病中心较远的真皮细胞中有淀粉粒消失和线粒体增加现象。线粒体作为细胞能量的供应体, 参与细胞的主动防御, 以提高能量代谢来抵御病原菌的入侵。淀粉粒可以转化为糖, 为线粒体提供能量。这暗示了淀粉粒的消失可能不是被致病菌吸收利用, 也可能是线粒体能量代谢消耗了。

Dehpour等^[17]研究了柑橘病害发生过程, 认为致病菌菌丝是通过气孔或附着胞穿透细胞表皮进入真皮组织, 并分泌毒素(HST和NHST)造成细胞壁的损害。本研究观察到, 致病菌侵染宿主真皮细胞, 使液泡、叶绿体、线粒体的膜结构发生解体, 细胞壁结构依然完好。这暗示柑橘叶点霉亚洲种破坏细胞器的最初位点是细胞的膜结构。已有研究^[18-22]

证实, 毒素的作用位点是细胞膜结构, 会导致膜透性发生变化。本研究也支持这一观点, 当寄主细胞受到毒素作用后, 伤害信息可能通过胞间连丝在胞内及胞间传递, 从而诱发超敏反应(Hypersensitive response, HR), 使寄主细胞的质膜发生一系列变化, 如质膜内陷, 局部断裂, 膜周围出现电子密集的沉积物等^[23]。

本试验采用扫描和透射电镜观察琯溪蜜柚黑斑病侵染后, 寄主细胞结构的变化, 为进一步研究琯溪蜜柚对黑斑病的抗性机理提供依据。但仍有很多问题无法解释, 如孢子落到寄主上有一个潜伏期, 要到果实膨大期才发病, 是环境因素还是寄主分泌的次生物质起了关键作用, 还需要进一步深入研究。

参考文献

- [1] LIN S M, LIAO F R, FANG Z P, et al. Molecular identification of the pathogen of black spots on fruit of *Citrus grandis* (L.) Osbeck cv. guanxi-miyu in Zhangzhou, China [J]. Plant Quar, 2010, 24(5): 13–17. 林石明, 廖富荣, 方志鹏, 等. 漳州琯溪蜜柚果实黑斑病菌的分子鉴定 [J]. 植物检疫, 2010, 24(5): 13–17.
- [2] SMITH I M, MCNAMARA D G, SCOTT P R, et al. Quarantine Pests for Europe: Data Sheets on Quarantine Pests for the European Union and for the European and Mediterranean Plant Protection Organization [M]. 2nd ed. New York: CAB International, 1997: 46–54.
- [3] BAAYEN R P, BONANTS P J M, VERKLEY G, et al. Nonpathogenic isolates of the citrus black spot fungus, *Guignardia citricarpa*, identified as a cosmopolitan endophyte of woody plants, *G. mangiferae* (*Phyllosticta capitalensis*) [J]. Phytopathology, 2002, 92(5): 464–477. doi: 10.1094/PHYTO.2002.92.5.464.
- [4] BALDASSARI R B, BRANDIMARTE I, de ANDRADE A G, et al. Induction of the precocious expression of *Guignardia citricarpa* symptoms in fruits of pera-rio sweet orange [J]. Rev Bras Frut, 2007, 29(2): 269–275. doi: 10.1590/S0100-29452007000200016.
- [5] LUO J S, ZHANG H R, LU S M, et al. *Phyllosticta citriasiana* sp. nov., identification and pathogenicity test with *Citrus maxima* in Asia [J]. Fujian Sci Techn Trop Crops, 2012, 36(4): 1–5. doi: 10.3969/j.issn.1006-2327.2011.04.001. 罗金水, 张汉荣, 卢松茂, 等. 琯溪蜜柚黑斑病菌分离鉴定及其致病性测定 [J]. 福建热作科技, 2012, 36(4): 1–5. doi: 10.3969/j.issn.1006-2327.2011.04.001.
- [6] GLIENKE C, PEREIRA O L, STRINGARI D, et al. Endophytic and pathogenic *Phyllosticta* species, with reference to those associated with *Citrus* black spot [J]. Persoonia: Mol Phylog Evol Fungi, 2011, 26(1):

- 47–56. doi: 10.3767/003158511X569169.
- [7] WANG X H, CHEN G Q, HUANG F, et al. *Phyllosticta* species associated with citrus diseases in China [J]. Fung Div, 2012, 52(1): 209–224. doi: 10.1007/s13225-011-0140-y.
- [8] WULANDARI N F, TO-ANUN C, HYDE K D, et al. *Phyllosticta citriasiana* sp. nov., the cause of *Citrus* tan spot of *Citrus maxima* in Asia [J]. Fung Div, 2009, 34(2): 23–39.
- [9] STAMMLER G, SCHUTTE G C, SPEAKMAN J, et al. *Phyllosticta* species on citrus: Risk estimation of resistance to QoI fungicides and identification of species with cytochrome b gene sequences [J]. Crop Prot, 2013, 48: 6–12. doi: 10.1016/j.cropro.2013.02.001.
- [10] KIELY T B. *Guignardia citricarpa* n. sp. and its relationship to the black spot disease of *Citrus* in coastal orchards of New South Wales [J]. J Austr Inst Agri Sci, 1948, 14(2): 81–83.
- [11] KIELY T B. Preliminary studies on *Guignardia citricarpa* n. sp.: The ascigerous stage of *Phoma citricarpa* McAlp. and its relation to black spot of *Citrus* [J]. Proc Linn Soc NSW, 1949, 73: 249–292.
- [12] NIU X Q, ZHENG G H, LIN X X, et al. Effect of INA bacteria on pulp cell ultrastructure of young loquat fruit [J]. Chin J Eco-Agri, 2010, 19(2): 388–393. doi: 10.3724/SP.J.1011.2011.00388.
- 牛先前, 郑国华, 林秀香, 等. 冰核细菌对低温胁迫下枇杷幼果中果肉超微结构的影响 [J]. 中国生态农业学报, 2011, 19(2): 388–393. doi: 10.3724/SP.J.1011.2011.00388.
- [13] WANG Z K, QIN Z W, LI Y Q, et al. Ultrastructural changes of pericarp of cucumber *in vivo* during senescence [J]. Acta Hort Sin, 2007, 34(4): 889–894. doi: 10.3321/j.issn:0513-353x.2007.04.014.
- 王志坤, 秦智伟, 李艳秋, 等. 黄瓜果实衰老过程中果皮超微结构的变化 [J]. 园艺学报, 2007, 34(4): 889–894. doi: 10.3321/j.issn:0513-353x.2007.04.014.
- [14] MA H Y, GAO P X, ZU Y G, et al. Histopathology and ultrastructure of infection of *Podosphaera xanthii* on melon leaves [J]. J Jilin Agri Univ, 2011, 33(3): 272–277.
- 马鸿艳, 高鹏, 祖元刚, 等. 甜瓜与单囊壳白粉菌亲和互作组织病理学及超微结构研究 [J]. 吉林农业大学学报, 2011, 33(3): 272–277.
- [15] JING L, KANG J, WANG L F, et al. Ultrastructure of sunflower resistance to rust induced by oligosaccharide [J]. Sci Agri Sin, 2009, 42(2): 719–724. doi: 10.3864/j.issn.0578-1752.2009.02.043.
- 景岚, 康俊, 王丽芳, 等. 寡糖诱导向日葵抗锈病超微结构 [J]. 中国农业科学, 2009, 42(2): 719–724. doi: 10.3864/j.issn.0578-1752.2009.02.043.
- [16] ZHAO S F, HU D W. Ultrastructure and cytochemistry of barley mesophyll attacked by *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* [J]. Acta Phytopath Sin, 2003, 33(5): 444–448. doi: 10.3321/j.issn:0412-0914.2003.05.013.
- 赵淑芳, 胡东维. 白粉病菌侵染诱导的大麦叶肉细胞变化的超微结构与细胞化学 [J]. 植物病理学报, 2003, 33(5): 444–448. doi: 10.3321/j.issn:0412-0914.2003.05.013.
- [17] DEHPOUR J, MAJD A, ALAVI S. Study on germination, penetration and development of *Alternaria alternata*, causal agent of brown spot and black rot diseases, on citrus leaves and fruits in north of Iran [J]. Iran J Biol, 2009, 22(1): 161–169.
- [18] GARDNER J M, SCHEFFER R P. Effects of cycloheximide and sulfhydryl-binding compounds on sensitivity of oat tissues to *Helminthosporium victoriae* toxin [J]. Physiol Plant Pathol, 1973, 3(1): 147–157. doi: 10.1016/0048-4059(73)90031-3.
- [19] HOLDEN M J, SZE H. *Helminthosporium maydis* T toxin increased membrane permeability to Ca^{2+} in susceptible corn mitochondria [J]. Plant Physiol, 1984, 75(1): 235–237. doi: 10.1104/pp.75.1.235.
- [20] XU L, ZHANG S G. The effect of tabtoxin to the ultra-structure of tobaccos' leaves [J]. J Yunnan Agri Univ, 2006, 21(1): 57–60. doi: 10.3969/j.issn.1004-390X.2006.01.011.
- 徐玲, 张世琰. 烟草野火病毒毒素对烟草叶片组织超微结构的影响 [J]. 云南农业大学学报, 2006, 21(1): 57–60. doi: 10.3969/j.issn.1004-390X.2006.01.011.
- [21] KANG Z S, HUANG L L, BUCHENAUER H. Immunocytochemical localization of deoxynivalenol in infected wheat spikes by *Fusarium graminearum* [J]. Acta Phytopath Sin, 2004, 34(5): 419–424. doi: 10.3321/j.issn:0412-0914.2004.05.006.
- 康振生, 黄丽丽, BUCHENAUER H. 小麦穗组织中脱氧镰刀菌烯醇毒素的免疫细胞化学定位 [J]. 植物病理学报, 2004, 34(5): 419–424. doi: 10.3321/j.issn:0412-0914.2004.05.006.
- [22] WAN Z X, ZHU J J, QIANG S. The pathogenic mechanism of toxin of *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler to *Eupatorium adenophorum* Spreng. [J]. J Plant Resour Environ, 2002, 10(3): 47–50. doi: 10.3969/j.issn.1674-7895.2001.03.010.
- 万佐玺, 朱晶晶, 强胜. 链格孢菌毒素对紫茎泽兰的致病机理 [J]. 植物资源与环境学报, 2001, 10(3): 47–50. doi: 10.3969/j.issn.1674-7895.2001.03.010.
- [23] QI G F, YANG B, YE J R. Research advances on the toxin of the plant pathogenic fungus [J]. J Nanjing For Univ, 2000, 24(2): 66–70. doi: 10.3969/j.issn.1000-2006.2000.02.016.
- 祁高富, 杨斌, 叶建仁. 植物病原真菌毒素研究进展 [J]. 南京林业大学学报, 2000, 24(2): 66–70. doi: 10.3969/j.issn.1000-2006.2000.02.016.