

## 茭白筍組織之電子顯微鏡觀察

呂理森 張淳文

臺灣植物保護中心植物病理組

(接受日期：民國 71 年 11 月 13 日)

### 摘 要

孤受黑穗菌之刺激而莖部膨大成茭白筍。以電子顯微鏡觀察，可見菌絲於茭白筍生育早期在組織內增生，爾後寄主細胞被菌絲破壞及消化，成為菌腔，菌絲且於腔中聚成團狀。中期菌絲於腔中吸取養分，逐漸膨大，直徑由  $2.5\mu\text{m}$  增至  $4\mu\text{m}$  左右，且由前端開始分節，繼而膠化，形成串珠狀之前期冬孢子。至茭白筍生育後期，大部份菌絲轉變成冬孢子，菌腔繼續擴大，整個菌癭幾乎為冬孢子堆所佔據。超薄切片顯示冬孢子直徑約為  $5\sim 6\mu\text{m}$ ，內部充滿脂肪球之營養體，表面佈滿棘狀物，棘之長度約為  $0.3\mu\text{m}$ 。

此外，超薄切片亦顯示組織為菌絲侵入後，菌絲會使細胞發生原生質分離，且細胞被激發出纖維鞘及染色較深的小粒體。此兩種物質排列於細胞壁兩側，於破裂之細胞壁附近數目最多，且於原生質絲兩側排列的較整齊。此等破壞細胞壁之機制，即為造成菌腔之導因。

關鍵字 (茭白筍，組織解剖，冬孢子形成，*Zizania latifolia*, *Ustilago esculenta*)

### ABSTRACT

Leu, L. S. and C. W. Chang. 1982. **Electron Microscopy of Water Shoot, a Gall Induced by *Ustilago esculenta* in *Zizania latifolia*.** Plant Prot. Bull. (Taiwan, R. O. C.) 24: 247~252. (Plant Protection Center, Taiwan. Taichung, Taiwan 431, R. O. C.)

The swollen stem of *Zizania latifolia* was induced by *Ustilago esculenta*. Scanning electron microscopy and transmission electron microscopy revealed that hyphae invaded the tissues, broke the cell wall and digested it in the oral structure, massed up into cluster and occupied in the oral structure in the primary stage of gall development. The average diameter of hyphae would grow to  $4\mu\text{m}$  from  $2.5\mu\text{m}$ . Those hyphae dissociated into individual or small clumps of teliosporogenic hyphae, then developed into teliospores from the front part of the hyphae in the mid-stage of gall development. Proteliospores, without

spines, developed into teliospores and filled the oral structures in the latter stage of gall development. Teliospores had "T" shape spines of  $0.25-0.3 \mu\text{m}$  in length covered on the surface. Spores had thick cell walls and lipid globules. The average diameter of teliospores is  $5-6 \mu\text{m}$ .

Myelin figures and small dense bodies were induced in the tissue cells by invading hyphae. Those substances were considered to play the main roles on breaking the cell walls and cluster expanding in the oral structures.

(Key words: water shoot, *Zizania latifolia*, *Ustilago esculenta*, histology, teliospore formation)

## 緒 言

茭白筍又稱水筍，為禾本科之菰 (*Zizania latifolia* Turcz.)，受黑穗菌 (*Ustilago esculenta* P. Henn.) 寄生而產生之菌癭，為東南亞地區極受歡迎的蔬菜之一。Hennings 於1895年<sup>(5)</sup>首先報告菰產生之膨大幼莖係由黑穗菌 (*Ustilago esculenta* P. Hennings) 所產生。1916年 Sawada<sup>(11)</sup>於臺灣菌類調查報告中對黑穗菌作初步之描述。楊及呂 1978 年<sup>(13)</sup>以石臘切片法觀察黑穗菌促進菰產生菌癭之過程；並將茭白筍組織中黑穗菌菌體發展分為四期，菌絲呈白色時為初期，開始出現黑褐色斑點時為中期，佈滿斑點時為後期，密生大量孢子堆者為末期。林及張1981年<sup>(8)</sup>以塑膠包埋方法製成之組織切片觀察，發現菌腔周圍有許多成不規則排列的異常形成層被誘導生成，使細胞數目增多，體積增大。上述兩篇有關茭白筍的組織解剖學的報告均以光學顯微鏡觀察。本文以掃描式及穿透式電子顯微鏡，分別觀察菌絲進展及冬孢子形成過程，並對冬孢子標本製備方法作初步之探討，以觀察其形態及內部構造。

## 材料與方法

掃描式電子顯微鏡之標本製備：由埔里田間採得青殼種茭白筍之 M-T 型<sup>(13)</sup>，將菌癭剖開，依菌癭組織之感染狀態依楊及呂<sup>(13)</sup>之標準分為初、中、後、末四期。取前三期之組織，切下約  $5\text{mm} \times 5\text{mm} \times 1\text{mm}$  之組織塊，分別裝入指形瓶中，根據 Boyde 氏的方法予以處理<sup>(2)</sup>：先以 2% 戊二醛作前固定兩小時，後以

磷酸緩衝液洗 30 分，復以 2% 鉍酸作後固定兩小時，以磷酸緩衝液洗 30 分，作 50%~100% 的酒精系列脫水，置於 Amyl acetate 於  $4^\circ\text{C}$  過夜。次日取出樣品，置於臨界乾燥器中令其乾燥之後<sup>(6)</sup>，取出樣品黏於數有双面膠片之標本鋁臺上，於真空蒸著器內蒸著  $200-300 \text{ \AA}$  之金膜。再置於 Hitachi S-410 掃描式電子顯微鏡，在加速電壓 25KV 下觀察及照相。

穿透式電子顯微鏡之標本製備：將不同期感染部位之組織切成  $1\text{mm} \times 1\text{mm} \times 5\text{mm}$  之組織塊。分別裝入指形瓶中，以 6% 戊二醛於  $4^\circ\text{C}$  中固定 3 小時，以 0.1M 磷酸緩衝液洗 30 分，換入 2% 鉍酸溶液中於  $4^\circ\text{C}$  中過夜<sup>(4)</sup>，次日恢復室溫，以 0.1M 磷酸緩衝液洗 30 分，作酒精系列脫水，換入 propylene oxide 兩次，再換入斯博氏包埋劑 (Spurr) 滲透，最後將組織封埋於樹脂中，作成切塊<sup>(12)</sup>。所得之切塊標本以 Sorval MT-2B (Du Pont) 超薄切片機進行切片，所得之切片置於 6% 之 uranyl acetate 及 2% lead citrate (Renold's) 各染色 10~15 分，最後以 Hitachi H-300 穿透式電子顯微鏡於加速電壓 75 KV 下檢視切片及照相。

至於冬孢子之標本製備，則取末期充滿冬孢子之菌癭，切開取出冬孢子，置於含去離子水之試管中，於  $35^\circ\text{C}-38^\circ\text{C}$  之水浴槽中水化 (hydration) 36 小時之後，以 3,500 r.p.m. 離心 30 分，吸去上層液，加入 3% 戊二醛溶液作前固定 4 小時，再以 3,500 r.p.m. 離心 15 分，吸去戊二醛，加入 3.5% 洋菜水溶液，作成孢子懸浮液，速以 3,500 r.p.m. 離心 15 分，將含大量冬孢子之洋菜塊，切成  $1\text{mm} \times 1\text{mm} \times$

5mm之切塊，以磷酸緩衝液洗30分，置於2% 鐵酸溶液中過夜，次日取出，以磷酸緩衝液洗1小時，作酒精系列脫水後，再依照組織標本製備方法封埋及作切片。

## 結 果

未被 *U. esculenta* 侵害之菰植株組織內，未見有菌絲之存在，細胞整齊具規則性（圖1），被害株未形成菌癭處之組織亦如此。初期形成菌癭組織處有細胞增殖現象（圖2）。菌絲於茭白組織中多為內生，亦有間生者，但數量較少（圖3），內生菌絲發育時，會使寄主細胞之原生質分離，並激發細胞產生纖維鞘（Myelin figure）（圖4）。爾後組織細胞出現染色較深的小粒體（Small dense bodies），小粒體多排列於細胞壁上（圖5），但沿者原生質絲（plasmodesmata）處較多（圖6）。細胞壁由於纖維鞘及小粒體的出現開始破裂，導致茭白組織形成菌腔，多數細胞壁會繼續破裂，使菌腔擴大（圖7）。於菌腔中，菌絲消化部份組織細胞生育發展呈密生團狀（圖8）。菌絲之直徑約為 $2.5\mu\text{m}$ ，分枝處具有隔膜（septa）（圖9、10）。茭白生育中期，菌絲繁生，不斷消化養分，破壞細胞，並伸入菌腔中，菌腔因而逐漸擴大，準備冬孢子的形成（圖11、12、13），至後期菌腔充滿養分，菌絲繼續由細胞擴展進入菌腔（圖14），吸收養分，發育成冬孢子分生菌絲（teliosporogenic hyphae）（圖15、16），冬孢子分生菌絲比一般菌絲粗，約為 $4\sim 5\mu\text{m}$ 。分生菌絲會由前端膨大，分節成串珠狀。每一珠狀物會分離，形成前期冬孢子（proteliospore）（圖17、18、19）。分生菌絲形成前期冬孢子時，內部有許多營養體。營養體大都為脂肪球<sup>(1)</sup>，是冬孢子之主要成份，分生菌絲膨大分節時，且有類似隔膜的構造出現（Septum-like structure）（圖16、20）。前期冬孢子之直徑約為 $3\sim 6\mu\text{m}$ 和成熟冬孢子之直徑（ $5\sim 6\mu\text{m}$ ）相差不大。以切片觀察，前期冬孢子之細胞壁較薄，內部充滿營養體，細胞壁外層似乎有棘狀物（spine）出現的跡象（圖21、22）。串珠狀之前期冬孢子各個分離後，外壁

膠化（gelatinization），逐漸形成棘狀物（圖23）。茭白生育末期，分生菌絲已大部份變化成冬孢子，佈滿菌腔，菌腔周圍的菌絲養分極少，且乏內容物（圖25）。成熟之冬孢子外層佈滿“T”字型的棘狀物，長度約為 $0.3\mu\text{m}$ ，內部有許多脂肪球，具厚孢子壁，其厚度約為 $0.35\mu\text{m}$ （圖24、26）。

## 討 論

以健株作切片觀察，菰之莖部中空，外為維管束之基質所包圍<sup>(8)</sup>。被害株未形成菌癭處之組織細胞排列整齊。而形成茭白筍之部位，菌絲移入組織內，消化組織細胞，繼而擴展，繁殖而形成菌腔，末期菌腔中充滿冬孢子，茭白筍幾乎為菌腔及孢子堆所佔據<sup>(13)</sup>。黑穗菌刺激菰形成茭白筍之機制至今未明，但能使茭白筍發生異常形成層，使茭白筍細胞增大，數目增多<sup>(8)</sup>。茭白黑穗病菌形成冬孢子時，菌絲會聚成團狀，繼而膨大，表面膠化，最後形成具棘狀物的冬孢子，此過程和 *U. zeae* 相似<sup>(7)</sup>；而與 *U. pustulata* 及 *U. scabiosae* 的冬孢子形成過程不同<sup>(3)</sup>，並無扣狀結合（clamp connection）的發生。茭白黑穗菌冬孢子之形成和甘蔗黑穗菌相同均為向心性<sup>(9)</sup>。Makoto 於1980年調查日本所產35種黑穗菌之冬孢子，依棘狀物（spine）及外飾物（ornamentation）之形態，將黑穗菌分為7種類型。*U. esculenta* 和 *U. vaillantii* 同屬於“V（Verrucose）”型<sup>(10)</sup>。

Trione 於1980年報告甘蔗黑穗菌（*U. scitaminea*）所激生之鞭狀物莖部之孢子分生菌絲會分泌水解酶（hydrolytic enzymes）使寄主細胞壁崩解，這些水解酶對菌絲本身並無影響，可能為 glucanases, chitinase 及 proteinases 之類的物質<sup>(10)</sup>。本文曾述及茭白黑穗菌會激發茭白組織細胞發生纖維鞘及染色較深的小粒體，而且會使細胞發生原生質分離，最後導致細胞壁破裂，造成菌腔擴大，容納冬孢子的形成。此現象和 Trione 所述相類似，但茭白黑穗菌會造成寄主細胞膨大，細胞數目增加，成為莖部膨大的茭白筍。此現象和甘蔗鞭狀物的發生，玉米黑穗病菌癭的發生及其他黑

穗病害，在外形及病徵上雖有不同，在原則上則都是由於寄主和病原相互影響所造成的。

至於觀察到的纖維鞘及小粒體究竟為何物，茭白組織細胞受何種物質影響而發生變化，

則必須再作病理生理學方面的研究，才能對茭白筍的生成有更進一步的了解。

本研究為臺灣植物保護中心植物病理組研究報告第34號。

#### 圖版說明 圖版中使用簡稱如下：

(Abbreviations used in the plates)

CW (CELL WALL), 細胞壁; CWB (CELL WALL BROKEN), 破裂細胞壁; EH (EMPTY HYPHAE), 中空菌絲; G (GLYCOGEN), 肝糖; H (HYPHAE), 菌絲; HC (HOST CELL), 寄主細胞; HCL (HYPHAL CLUSTER), 菌絲團; HW (HYPHAL WALL), 菌絲壁; l (LIPID GLOBULES), 脂肪球; mf (MYELIN FIGURE), 纖維鞘; N (NUCLEUS), 細胞核; OS (ORAL STRUCTURE), 菌腔; Pa (PARENCHYMA), 柔組織細胞; Pd (PLASMODESMATA), 原生質絲; PH (PENETRATED HYPHAE), 入侵菌絲; PL (PLASMOLYSIS), 原生質分離; PS (PROTELIOSPORE), 前期冬孢子; Se (SEPTUM), 隔膜; Sp (SPINE), 棘狀物; SW (SPORE WALL), 孢子壁; TH (TELIOSPOROGENIC HYPHAE), 分生菌絲; VB (VASCULAR BUNDLE), 維管束。

圖 1：孤健株（未受黑穗菌侵害）之組織切片，顯示維管束組織細胞內未見菌絲。(SEM)

Fig. 1: No hypha was observed in the healthy tissue of *Z. latifolia*. (SEM)

圖 2：形成菌瘻組織處，有細胞增殖變化之現象。(TEM)

Fig. 2: Cell varied in mass and volume near gall forming tissue. (TEM)

圖 3：菌絲生長於茭白組織細胞中之情形。(TEM)

Fig. 3: Hyphae (arrows) in the vascular bundle of the invaded tissue. (TEM)

圖 4：菌絲於細胞中，激發細胞發生原生質分離。(TEM)

Fig. 4: Hyphae induced plasmolysis (PL) of host cell. (TEM)

圖 5：菌絲於細胞中，激發出染色較深的小粒體（箭頭處）及纖維鞘，小粒體且排列於細胞壁上。(TEM)

Fig. 5: Hyphae penetrated into host cell and induced myelin figure (mf) and small dense bodies (arrows) arranged along cell wall. (TEM)

圖 6：破裂細胞壁附近有許多纖維鞘及小粒體，小粒體多排列於 plasmodesmata 上。(TEM)

Fig. 6: Small dense bodies (arrows) and myelin figures (mf) appeared around the breakage of cell wall, especially numerous on the plasmodesmata (Pd). (TEM)

圖 7：菌絲侵入細胞中，激發出纖維鞘及小粒體，造成組織胞壁破裂。(TEM)

Fig. 7: Hyphae invaded the cell and induced myelin figures (mf) and small dense bodies (arrows) and triggered the breakage of cell wall. (TEM)

圖 8：菌絲消化部份組織細胞發展成密生團狀。(SEM)

Fig. 8: Hyphae digested part of the gall tissues and developed into cluster. (SEM)

圖 9：菌絲之直徑為  $2.5\mu\text{m}$ ，分枝處具隔膜。(TEM)

Fig. 9: The radius of hyphae was about  $2.5\mu\text{m}$ , septa could be seen on the branches. (TEM)

圖 10：於初期菌腔中所見之菌絲外形。(SEM)

Fig. 10: Morphology of hyphae observed in the primary stage of gall development. (SEM)

圖 11：菌絲破壞細胞進入菌腔形成菌絲團。(SEM)

Fig. 11: Hyphae invaded the cells and penetrated into the oral structure and formed hyphae cluster. (SEM)

圖 12、13：茭白發育中期，菌絲消化細胞，伸入菌腔中。(TEM)

Figs. 12, 13: Hyphae digested cell and expanded into the oral structure in the mid-stage of the gall development. (TEM)

圖 14：後期菌腔中充滿養分，菌絲由腔邊組織細胞擴展進入菌腔。(TEM)

Fig. 14: Hyphae invaded into oral structure which fulfilled with nutrients from the cells near the oral structure.

圖 15、16：後期菌腔擴大，菌絲於腔中形成分生菌絲，開始形成前期冬孢子。(黑色物質為養分及未消化物質)。(TEM)

Figs. 15, 16: Hyphae converting into teliosporogenic hyphae and became proteliospores in the oral structure of latter stage of gall development. (Dense substances were nutrients not yet digested.)

圖 17~19：茭白組織形成後期之菌腔中，菌絲膨大分節之情形。(SEM)

圖 17：菌絲由前端開始膨大收縮。

圖 18：菌絲膨大，分節之情形。

圖 19：菌絲分節之後形成串珠狀。

Figs. 17-19: Hyphae swelled and segmented in the latter stage of gall development. (SEM)

Fig. 17: Hyphae began to swell from the front part.

Fig. 18: Hyphae swelled and segmented.

Fig. 19: Hyphae became pearl-like after segmentation.

圖 20：前期冬孢子表面不平滑，尚無棘狀物出現。(SEM)

Fig. 20: Proteliospores had unsmooth surface without any spines. (SEM)

圖 21：菌絲膨大分節時，可見有類似隔膜(箭頭處)之構造及脂肪球。(TEM)

Fig. 21: Hyphae appeared septum-like structures (arrows) within globules (1) inside when they segmented. (TEM)

圖 22：前期冬孢子之內部有脂肪球及肝醣，細胞壁薄，外表似乎有棘狀突起。(TEM)

Fig. 22: Proteliospores had lipid globules (1) and glycogen (G) inside and thin cell walls showing up spines on the surface. (TEM)

圖 23：形成棘狀物之成熟前冬孢子。(SEM)

Fig. 23: Spines were forming on the surface of pre-mature teliospore. (SEM)

圖 24：成熟冬孢子表面具有棘狀突起。(SEM)

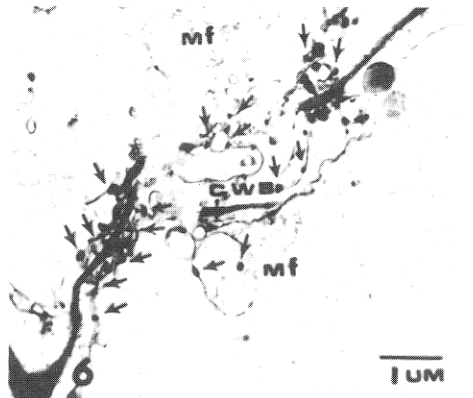
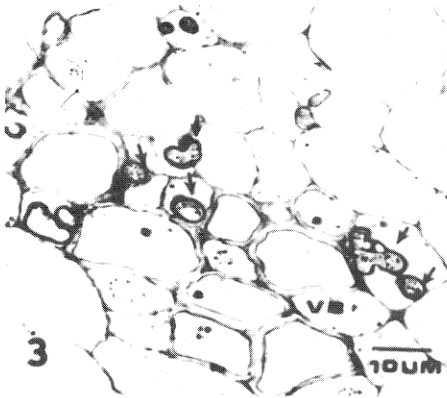
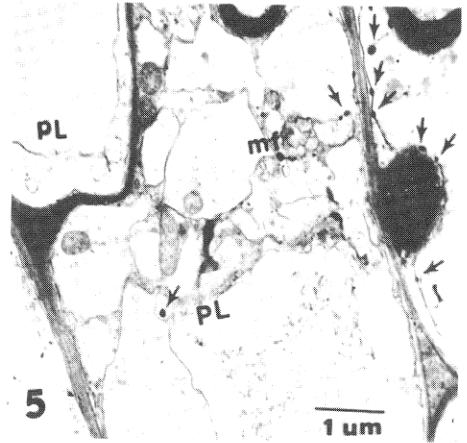
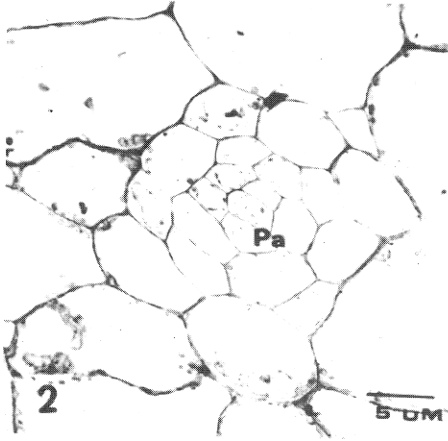
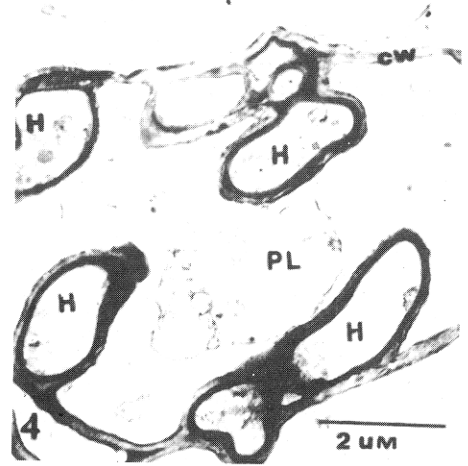
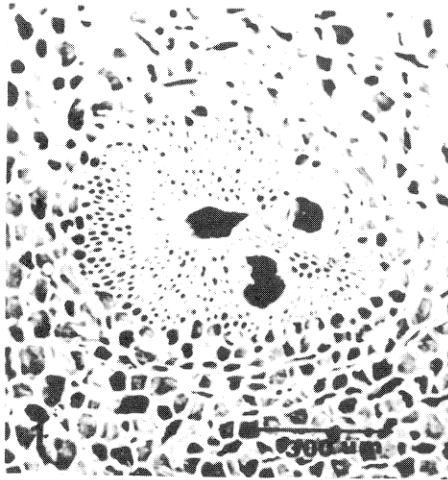
Fig. 24: Mature spores with spines on the surface. (SEM)

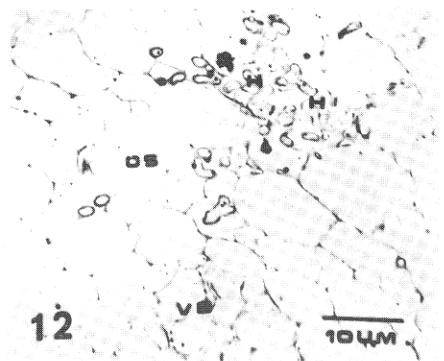
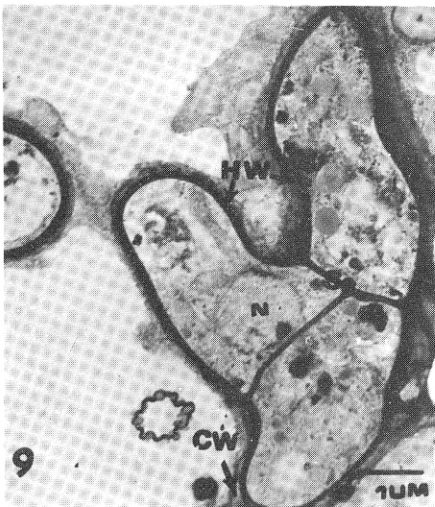
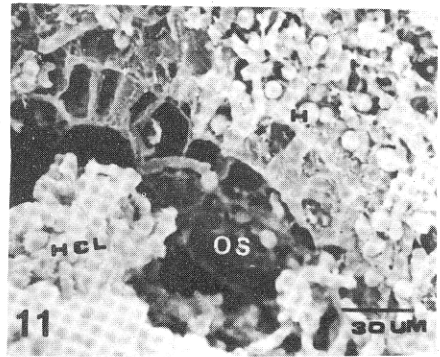
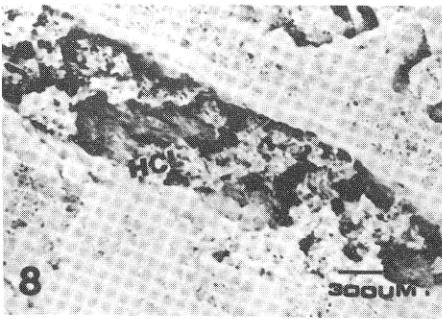
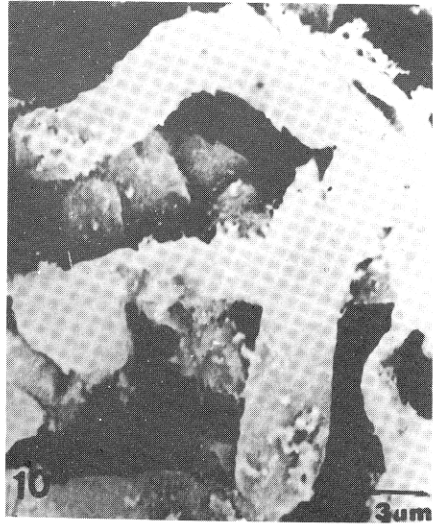
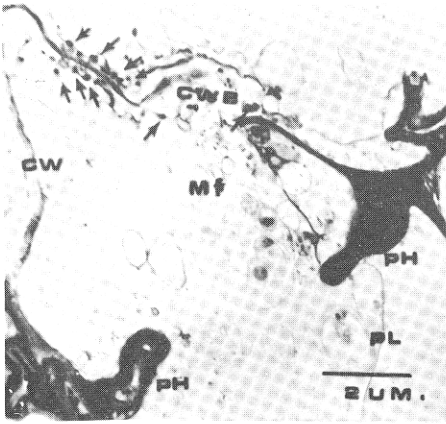
圖 25：成熟冬孢子之內部含脂肪球，具厚細胞壁；外有“T”字型棘狀物突起。(TEM)

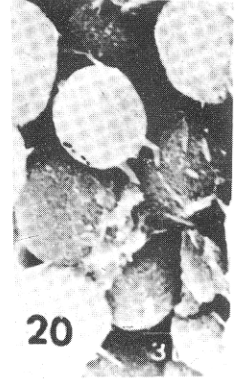
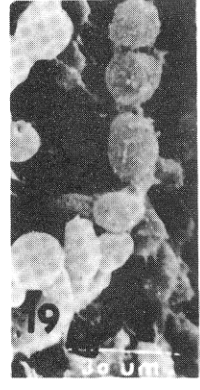
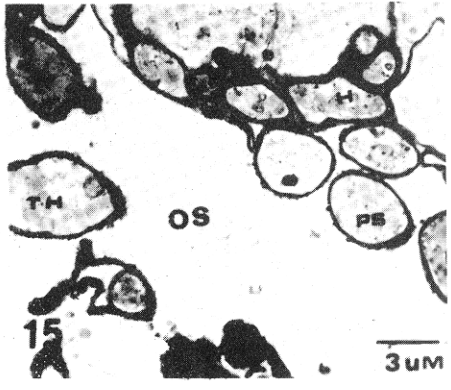
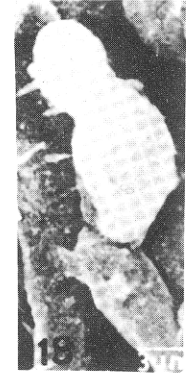
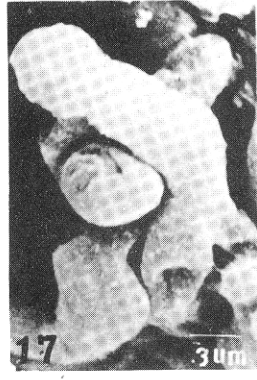
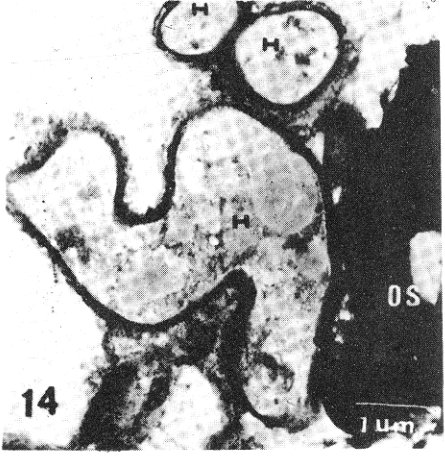
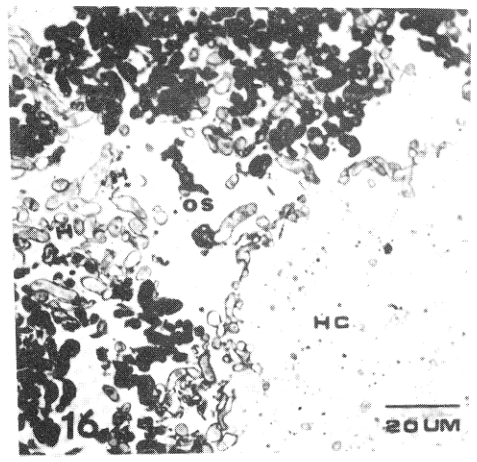
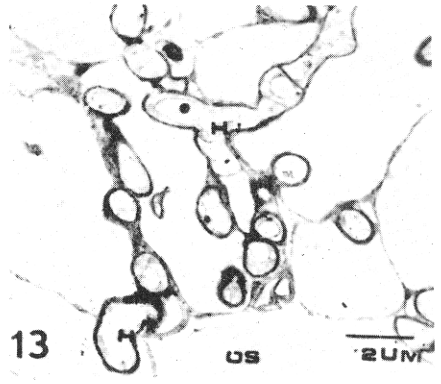
Fig. 25: Mature teliospores had lipid globules inside, thick spore wall and “T” shape spines outside. (TEM)

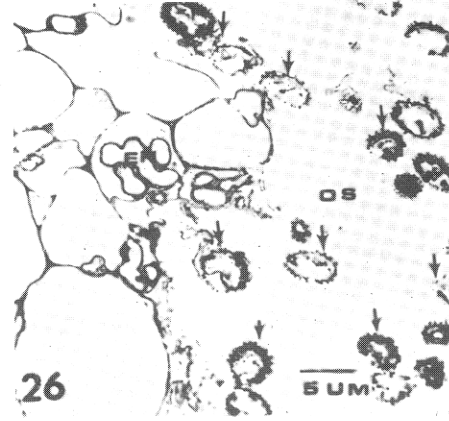
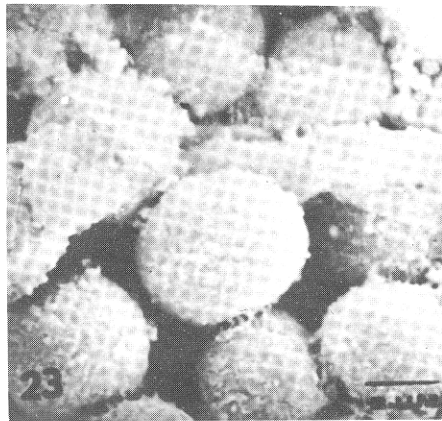
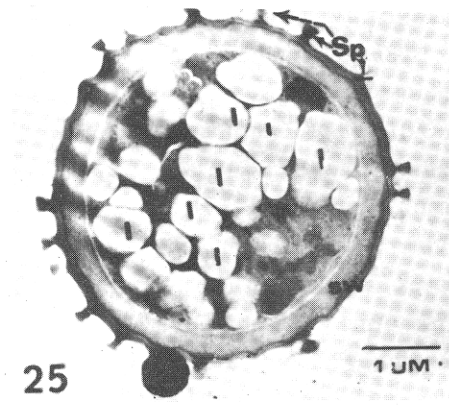
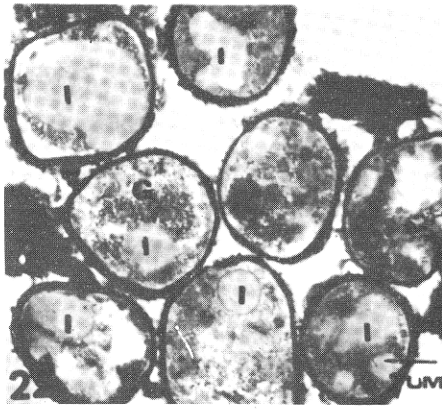
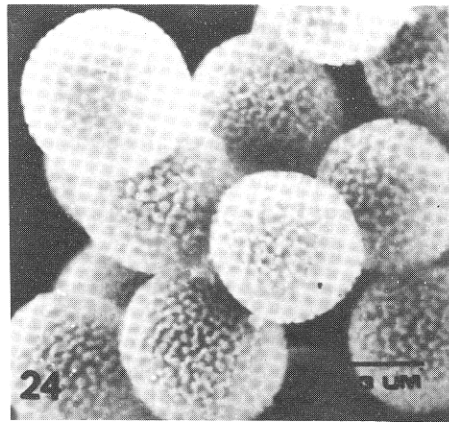
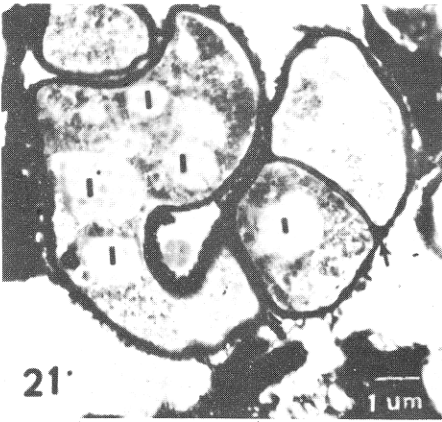
圖 26：末期菌腔中充滿冬孢子(箭頭處)，菌腔周圍之菌絲呈現缺乏內容物之情形。(多數冬孢子於固定過程中脫落)。(TEM)

Fig. 26: Oral structure fulfilled with teliospores (arrows) and hyphae around the border had no much components inside it (Most of the spores were lost during fixation.) in the last stage of gall development. (TEM)









## 引用文獻

1. Aist, J. R. and Williams, P. H. 1971. The cytology and kinetics of cabbage root hair penetration by *Plasmodiophora brassicae*. Can. J. Bot. 49: 2023-2034.
2. Boyde, A. 1972. Biological specimen preparation for the SEM—an overview. PP. 258-266. In O. Johari and I. Corvin (Eds.) Scanning electron microscopy. 1972. Part II. Proc. Workshop Biological Specimen for SEM. III Research Inst., Chicago, III. 447 pp.
3. Deml, G., M. Nebel and F. Oberwinkler. 1981. Light and scanning electron microscopy studies of spore formation in *Ustilago pustulata* and *U. scabiosae*. Can. J. Bot. 59: 122-128.
4. Esau, K. and L. L. Hoefert. 1978. Hyperplastic phloem in sugarbeet leaves infected with beet curly top virus. Amer. J. Bot. 65: 772-783.
5. Henning, P. 1895. Neue interessante Pilze aus dem Koniglich Botanische Museum in Berlin III. Hedwigia 34: 10.
6. Humphreys, J. W., B. O. Spurlosk and J. S. Johnson. 1974. Critical point drying of ethanol-infiltrated and cryofractured biological specimens for SEM. pp.275-282. In O. Johari and J. Corvin (Eds.) Scanning electron microscopy. 1974. Part. II. Proc. 7th. Ann. E. SEM Symp, IIT Research inst., Chicago, III. 1064 pp.
7. Hutchins, H. L. and B. F. Lutman. 1938. Spine development on the spores of *Ustilago zea*. Phytopathology 70:513-516.
8. Lin, C. H. and L. R. Chang. 1981. Studies on the gall formation of *Zizania latifolia* Turcz. I. Anatomical approach. Proc. Nati. Sci. Council. B. ROC 5:293-296.
9. Leu, L. S. 1971. Culmicolous smut of sugarcane in Taiwan. II. Pathological histology of diseased cane. Plant Prot. Bull. (Taiwan) 13:6~9.
10. Makoto, K. 1980. Smut spores of Ustilaginales classified by surface sturcture. Trans. Mycol. Soc. Japan 21:423-433.
11. Sawada, K. 1916. Descriptive catalogue of the Formosan fungi. (Japanese) Spec. Bull. No. 19. Gov. Agr. Exp. Stn., Formosa 1:319-326.
12. Spurr, A. R. 1969. A low viscosity embedding medium for electron microscopy. J. of Ultrastructure Res. 26:31-43.
13. Yang, H. C. and L. S. Leu. 1978. Formation and histology of galls induced dy *Ustilago esculenta* in *Zizania latifolia*. Phytopathology 68: 1572-1576.
14. Trion, E.J. 1980. Teliospore formation by *Ustilago scitaminea* in sugarcane. Phytopathology 70:513-516.