

细胞微丝骨架在玉米抗纹枯病菌 *Rhizoctonia solani* 侵染中的作用

王伟, 裴艳刚, 王宇霜, 孙霞, 戴浩, 龚国淑, 常小丽*

(四川农业大学农学院, 成都 611130)

摘要 为探究细胞微丝骨架在玉米抗纹枯病侵染过程中的作用, 采用微丝骨架解聚剂 LatB 预处理玉米离体叶片后接种立枯丝核菌 *Rhizoctonia solani* AG1-1A, 显微观察病原菌的侵染过程, 并检测活性氧(ROS)、细胞坏死及抗病基因(*PR1*、*ZmDREB2A*)表达等抗病反应情况。结果显示, 与未经 LatB 预处理相比, LatB 预处理加快了 *R. solani* 侵染后玉米病斑的形成, 并影响了侵染结构的发育; 在侵染后期, LatB 促进了 *R. solani* 诱导的玉米叶片中 ROS 积累、细胞坏死反应和 *PR1* 基因表达; 溶剂 DMSO 预处理与未经 LatB 预处理的结果类似, 表明 DMSO 对本试验的影响较小。研究表明, 细胞微丝骨架不仅参与玉米抗 *R. solani* 的侵入, 而且通过调控 ROS、*PR1* 基因表达, 细胞死亡等抗病信号提高玉米抗病防御能力。本研究为进一步研究细胞微丝骨架在玉米对纹枯病的抗病机理中的作用提供了重要参考。

关键词 玉米; 立枯丝核菌; 细胞微丝骨架; 活性氧; 抗病基因

中图分类号: S 435.4 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2016252

Roles of actin filaments in defense against *Rhizoctonia solani* causing banded leaf and sheath blight of maize

WANG Wei, PEI Yangang, WANG Yushuang, SUN Xia, DAI Hao, GONG Guoshu, CHANG Xiaoli

(College of Agriculture, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China)

Abstract In order to find out the role of cellular actin filaments in maize resistance to *Rhizoctonia solani* causing banded leaf and sheath blight, detached maize leaves were pretreated with the actin filament depolarization, latrunculin B (LatB), before inoculation with *R. solani* AG1-1A, and then collected at different time points in this study. Disease development and pathogen infectious structures were observed through the microscope, and meanwhile, defense responses including ROS accumulation, cell death and defense gene expression (*PR1* and *ZmDREB2A*) were also examined. The results showed that, compared to inoculation with *R. solani* alone, pretreatment with LatB led to an earlier disease lesions and development of infectious structures. Additionally, ROS accumulation, cell death and defense gene expression were much higher than that without LatB pretreatment. In addition, pretreatment with the solvent DMSO showed similar results to the control without LatB treatment, indicating that DMSO had little effect on the LatB treatment. These data demonstrated that cellular cytoskeletal actin filaments not only functioned on pathogen invasion, but also regulated ROS accumulation, *PR1* expression and cell death, all of which worked together to suppress pathogen spread on maize leaves and enhance maize resistance. This study provides important information for further studies on the role of actin filaments in maize resistance.

Key words maize; *Rhizoctonia solani*; cellular actin filaments; ROS; defense-related gene

玉米 *Zea mays* L. 是世界三大谷类作物之一, 既作为主要的食、饲兼用作物, 也是重要的工业及能源原料, 对国家的粮食安全起着举足轻重的作用^[1]。

玉米纹枯病(banded leaf and sheath blight, BLSB) 是国内外玉米产区广泛发生、且危害严重的土传病害之一^[2]。在我国, 玉米纹枯病菌以立枯丝核菌

收稿日期: 2016-12-25 修订日期: 2018-06-19

基金项目: 四川省科技支撑计划(2015NZ0-040)

* 通信作者 E-mail: xl_changkit@126.com

Rhizoctonia solani Kühn 融合菌群 AG1-IA 为优势病原菌,其具有土传性、寄主范围广、适应性强和高致病性等特点^[3-4]。近年来,由于我国高投入、单一化大面积的玉米种植模式,导致玉米纹枯病发生日趋严重,成为我国各玉米产区的主要病害之一^[1],严重影响玉米产量。选育和利用抗病玉米品种是防治玉米纹枯病最经济、有效的途径^[2],然而,国内外关于玉米抗纹枯病机制有待深入研究。细胞微丝骨架(actin filaments)是植物细胞骨架的重要组成部分,其在生物体内行使多种生理功能,同时也参与植物抗病防御过程^[5-6]。研究表明,细胞微丝骨架的动态变化参与了病原菌侵染点细胞壁乳突形成相关物质的运输^[6]、保卫细胞中 K^+ 离子通道的开闭^[7]、NO 诱导的气孔关闭^[8]、活性氧积累(ROS)、细胞坏死反应及抗病相关基因的表达等抗病防御相关反应^[6]。目前,关于细胞微丝骨架在玉米抗纹枯病侵染过程中的作用机制研究较少。

本研究通过细胞微丝骨架解聚剂 LatB 预处理后接种玉米纹枯病致病菌立枯丝核菌 *R. solani* AG1-IA,观察玉米叶片病斑扩展及 *R. solani* 侵染结构发育情况,检测叶片中活性氧(ROS)积累、细胞坏死及抗病基因(*PR1*、*ZmDREB2A*)表达等抗病防御反应情况,旨在初步探明细胞微丝骨架在玉米对纹枯病抗病过程中的作用,为玉米抗病育种及纹枯病防治提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试品种及菌株

供试玉米品种为“登海 605”,购自山东登海种业股份有限公司,为常规品种,经抗性鉴定对纹枯病表现为中抗;立枯丝核菌 *Rhizoctonia solani* Kühn 融合菌株 AG1-IA 由四川农业大学植物病理系实验室提供。

1.2 试剂及仪器

主要试剂:微丝骨架解聚剂 latrunculin B (LatB),购自 Sigma-Aldrich 公司;反转录试剂盒 Prime-Script™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser 购自宝生物工程(大连)有限公司;TRIzol 总 RNA 提取试剂盒、Taq PCR Master Mix、DNA Marker、核酸染料等均购自天根生化科技有限公司;二氨基联苯胺 DAB (3, 3-diaminobenzidine)、台盼蓝 (Trypan Blue)、DMSO(二甲基亚砜)、琼脂糖、考马斯亮蓝、

甲醇、三氯乙醇、甘油及其余常规试剂购自成都博大泰克生物公司。引物合成由上海生工生物工程技术服务有限公司完成。

主要仪器:5424R 型台式高速冷冻离心机、Universal Hood II 凝胶成像仪、C1000 PCR 扩增仪,购自美国 Bio-Rad 公司;Nanodrop 2 000 超微量分光光度计,购自美国 Thermo Scientific 公司;DYY-6C 型凝胶电泳仪,购自北京六一仪器厂;Nikon Eclipse 80i 显微镜购自日本 Nikon 公司;GXM 型智能光照培养箱,购自宁波江南仪器厂,以上仪器均由四川农业大学植物病理实验室提供。

1.3 试验方法

1.3.1 玉米盆栽苗培育

将玉米种子用 75% 乙醇处理 1 min,然后用 0.1% 的次氯酸钠处理 20 s,蒸馏水冲洗 3~5 次,将消毒好的玉米种子置于培养皿中经无菌水浸润灭菌滤纸上,于生长温度 22~28℃、相对湿度 75% 的恒温箱中培养催芽,1 d 后取出移栽于装有灭菌基质土的直径 10 cm 的花盆中,当玉米长至 5~6 片叶时进行接种处理。

1.3.2 病原菌活化及接种

将 AG1-IA 菌株接入马铃薯葡萄糖琼脂平板培养基(PDA,马铃薯 200 g,葡萄糖 10 g,琼脂 10 g,水 1 000 mL),置于 25~28℃ 恒温下扩大培养 3 d,至长满整个培养皿待用。

将玉米叶片剪成长 4 cm、宽 2 cm 的叶段,置于垫有灭菌滤纸的培养皿中保湿。参照 Henty-Ridilla 等^[9]的使用浓度,将微丝骨架解聚剂 latrunculin B (LatB)先用 DMSO(二甲基亚砜)配制成 2 mol/L 的母液,再用蒸馏水稀释至 2 mmol/L 作为工作浓度,以确保 DMSO 浓度小于 0.1%,不影响 LatB 的作用效果。采用无针头注射器将 20 μ L LatB (2 mmol/L)注入玉米叶肉细胞中,30 min 后接种 AG1-IA 菌饼于注射部位作为处理样品,以注射等体积 DMSO 和灭菌蒸馏水后接种 AG1-IA 的叶片为对照,每个处理重复 3 次,试验进行 3 次。接种后置于 25℃ 保湿培养过夜,并于接种后不同时间点(0、6、12、24、48 h 和 72 h)收集材料,用于病原菌侵染结构观察及抗病相关反应检测。

1.3.3 玉米纹枯病菌侵染结构的观察

于接种后不同时间点(0、6、12、24、48 h 和 72 h)取接种叶段材料,用脱色液(无水乙醇:甘油:无菌水,

体积比为 15:1:4)沸水浴脱色 1 h 至透明,然后用考马斯亮蓝染色液(0.15%三氯乙酸水溶液:0.6%考马斯亮蓝 R-250 甲醇溶液,体积比 1:1)染色 10 min,最后用自来水漂洗 3~5 次至染液洗净。制片,并在显微镜(Nikon Eclipse 80i)下观察病原菌侵染结构发育。

1.3.4 活性氧测定

活性氧(ROS)的检测采用二氨基联苯胺 DAB (3,3-diaminobenzidine) 染色法^[10]。取接种后不同时间段的玉米叶片,蒸馏水洗净后置于 15 mL 离心管中,加入适量 DAB 染液(1 mg/mL, pH 5.8)至完全浸没叶片,用真空抽滤泵抽滤 5 min 后置于 28℃ 避光保存 8 h,随后取出离心管光照 1 h 至红棕色斑点显现。弃掉各管染液,用无菌水漂洗 3 次洗去浮色,加入脱色液(无水乙醇:甘油:水,体积比 15:1:4),沸水浴直至叶片绿色完全褪去,重复 1 次,重新加入脱色液,置于 4℃ 冰箱内保存。拍照后,采用 Image J 软件统计染色面积占总叶片面积的百分比,并在显微镜下观察细胞 ROS 产生情况。

1.3.5 细胞坏死观察

叶片细胞坏死采用台盼蓝染色法^[10]进行检测。取接种后不同时间段的玉米叶片,蒸馏水洗净后置于培养皿中,加入适量台盼蓝染液(乳酸:水饱和酚:甘油:1 mg/mL 台盼蓝,体积比 1:1:1:1)至完全浸没叶片,28℃ 下放置 4 h。随后取出叶片,用无菌水漂洗 3 次,洗去浮色后放入 15 mL 离心管中,加入脱色液(无水乙醇:甘油:水,体积比 15:1:4),并沸水浴直至叶片绿色完全褪去,弃掉各管液体重新加入脱色液,置于 4℃ 冰箱内保存并拍照记录,计算染色面积占叶片总面积的百分比,用以评价细胞坏死情况。

1.3.6 抗病相关基因表达检测

在接种后 0、6、12、24、48 和 72 h 后分别取处理叶片 200 mg,无菌水洗净,灭菌纸擦干后加入液氮进行研磨,参照 TRIzol 试剂盒操作手册提取总 RNA。用 NanoDrop 2 000 超微量分光光度计检测 RNA 的质量。采用反转录试剂盒获得 cDNA,反应体系包括:1 μ L Oligo dT18 Primer、10 μ L 2 $\times$ TS Reaction Mix、1 μ L Fracs Script RT/RI Enzyme Mix、gRNA Remover,用 RNase-free Water 补足至 20 μ L,反应条件为:42℃,30 min;85℃,5 min;4℃,保存。反转录获得的 cDNA 用 ddH₂O 按 1:20(V/V)稀释后待用。PCR 扩增体系为:12.5 μ L 2 $\times$ Taq PCR Master Mix、9.5 μ L 灭菌 ddH₂O、1 μ L Primer F、1 μ L Primer R、1 μ L cDNA。引物序列分别为:18S rRNA (F: 5'-TCCTGAGTAACGAACGAGACC-3'和

R: 5'-CACGATGAAATTTCCCAAGAT-3')^[8], PR1 (F: 5'-AGGCTCGCGTGCCTCCTAGCTCTGG-3'和 R: 5'-GGAGTCGCGCCACACACCTGCGTG-3')^[8], ZmDREB2A (F: 5'-GTATCTTGATGAGCTGGGAT-TCGAG-3'和 R: 5'-GTGAAGCAAACCCAGTTCCC-3')^[11]。扩增条件为:94℃ 变性 5 min;94℃ 变性 30 s,58℃ 退火 20 s,72℃ 延伸 20 s,循环 40 次,72℃ 延伸 5 min,4℃ 保持。PCR 扩增产物通过 2% 琼脂糖凝胶进行电泳检测,并采用凝胶成像仪进行拍照。

1.3.7 统计分析

用 SPSS 22.0 进行数据分析,采用 *t* 测验对经两种不同接种处理的玉米叶片中 ROS、细胞坏死反应、菌丝体量进行差异显著性分析,显著水平为 5%,并使用 Excel 2010 软件制图。

2 结果与分析

2.1 LatB 预处理对玉米叶片发病情况的影响

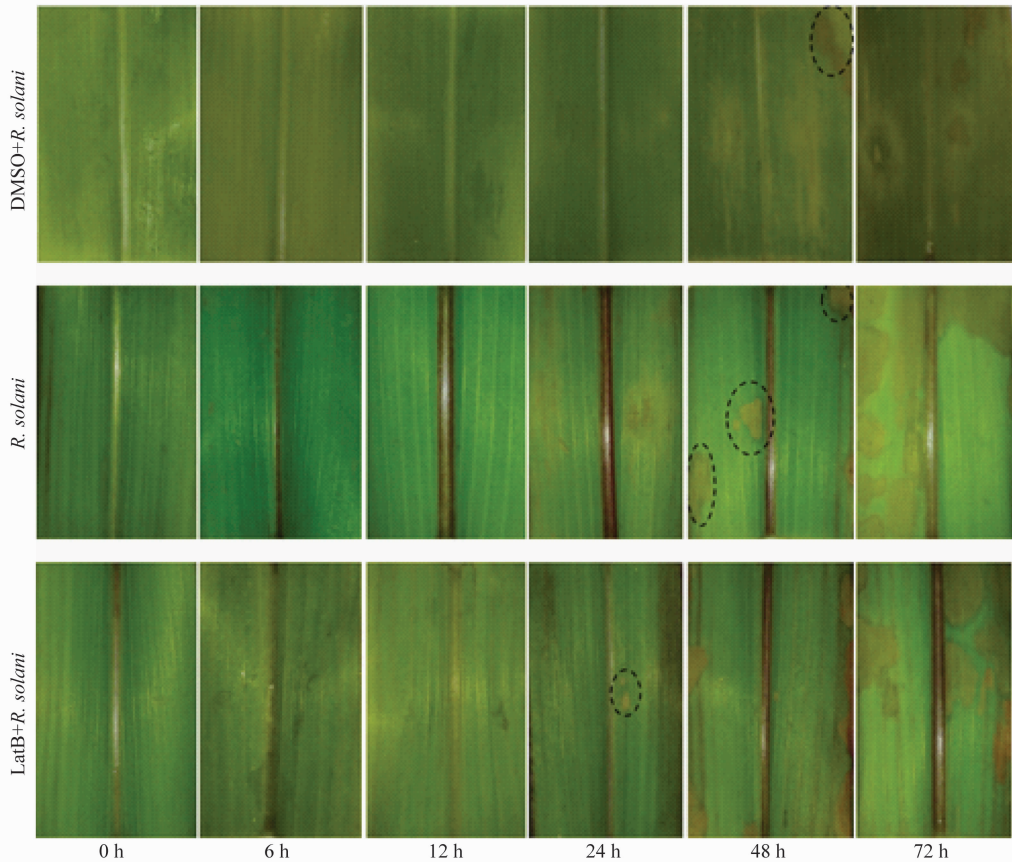
采用 *R. solani* AG1-1A 接种玉米离体叶片后观察病斑扩展情况。结果如图 1 所示,在接种后 0~6 h, LatB 预处理、DMSO 溶剂处理以及未经预处理的玉米叶片均未出现病斑。LatB 预处理 30 min 后接种的玉米叶片在接种菌后 12 h 开始出现水渍状小病斑,且病斑处褪绿变黄;24~48 h 时,病斑扩大且出现明显坏死;72 h 时,叶片上出现典型的纹枯病危害后的云纹状坏死病斑。未预处理的玉米叶片在接种后 24 h 开始出现水渍状小病斑;接菌后 48 h 时,出现不同程度的、较多的病斑;随着病斑的扩展,72 h 时玉米叶片均出现较为明显的纹枯病水渍状云纹病斑。与未预处理叶片相似,DMSO 预处理后接种的玉米叶片在 24 h 开始出现零星水渍状褪绿变黄斑,到 48 h 后病斑面积开始快速扩散,到 72 h 时叶片表面均匀出现云纹状纹枯病典型症状。结果表明 LatB 预处理加快了玉米离体叶片上病斑的出现,加速了玉米对 *R. solani* 的抗性反应。

2.2 LatB 预处理对纹枯病菌侵染结构的影响

采用考马斯亮蓝对接种后不同时间点病原菌侵染结构进行染色,结果如图 2 所示。未经 LatB 预处理的叶片(图 2,1a~1f),在接种后 6 h 时,菌丝伸长,并出现初级分枝(图 2,1a);接种 12 h 时,在初级分枝上出现许多短粗状的侧枝(图 2,1b);随后的 24~48 h,侧枝顶端膨大形成裂瓣状的附着胞(图 2,1c),且附着胞下形成侵染钉可直接侵入寄主表皮细胞(图 2,1d),也可通过气孔侵入(图 2,1e);接种 72 h 时,大量侧枝及附着胞相互聚集在一起(图 2,1f)。溶剂 DMSO 预处

理后接种病菌结果显示,菌丝在接种后 6 h 不断伸长(图 2,2a);12 h 时菌丝产生初级分枝,并且从气孔侵入玉米叶片(图 2,2b);接种 24 h 时,菌丝侧枝顶端开始形成瓣状附着胞(图 2,2c);接种 48 h 时,附着胞下产生侵入钉(图 2,2e),菌丝变粗变短,分枝间距缩短(图 2,2d);接种 72 h 时,大量附着胞开始串生或簇生在一起,形成巨大的瓣状复合体(图 2,2f)。经 LatB 预处理 30 min 后接种病原菌 6 h 时,菌丝顶端开始膨大(图 2,3a);12 h 时,出现初级

分枝,且初级分枝顶端膨大呈球形(图 2,3b);接种 24 h 时,初级分枝上出现马蹄型侵染垫,且能观察到侵入钉侵染玉米表皮细胞(图 2,3c);接种 48 h,菌丝体继续分枝,大量马蹄形侵染垫形成(图 2,3d),且在气孔处聚集大量菌丝体(图 2,3e);72 h 时,垫状侵染结构及病原菌菌丝体均大量增加且聚集在一起(图 2,3f)。结果表明 LatB 预处理对 *R. solani* AG1-IA 侵染结构在玉米叶片上的发育有影响,有利于病原菌的迅速入侵。



DMSO+*R. solani*: DMSO 溶剂预处理 30 min 后接种 *R. solani*; *R. solani*: 未预处理直接接种 *R. solani*; LatB+*R. solani*: 微丝骨架解聚剂 latrunculin B 预处理 30 min 后接种 *R. solani*
DMSO+*R. solani*: inoculation with *R. solani* after pretreatment with the solvent DMSO for 30 min; *R. solani*: inoculation with *R. solani* without pretreatment; LatB+*R. solani*: inoculation with *R. solani* after pretreatment with latrunculin B for 30 min

图 1 不同接种处理后玉米叶片病斑扩展情况

Fig. 1 Disease lesion development after inoculated by *Rhizoctonia solani* AG1-IA with or without LatB pre-treatment on maize leaves

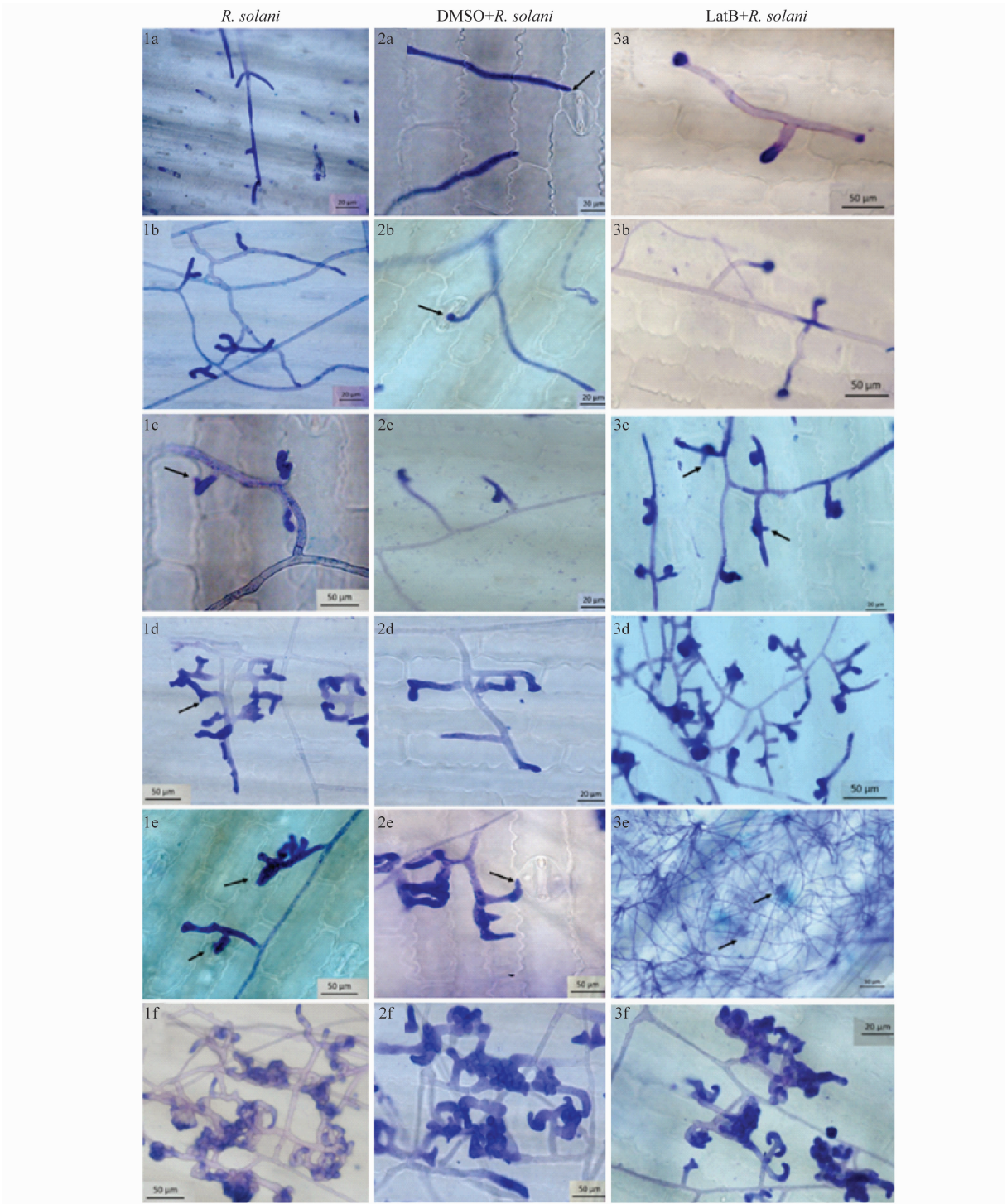
2.3 LatB 预处理对接种后玉米叶片细胞内活性氧积累的影响

经 LatB 预处理,接种 *R. solani* 后不同时间点取玉米叶片用 DAB 染色,以 DMSO 预处理及未预处理作为对照,对 ROS 积累面积百分比进行统计,如图 3 所示,接种后 6~12 h ROS 开始积累,LatB 预处理与未处理的叶片 ROS 积累量相当;接种后 24 h,ROS 积累量开始逐渐增加,经 LatB 预处理的叶片中 ROS 积累

量显著高于未处理的叶片;接种后 48 h,ROS 积累量达到峰值,且经 LatB 预处理的叶片中的 ROS 积累量是未经 LatB 处理的 2 倍,随后接种 72 h 后 ROS 积累量有所降低。随着病原菌侵入,在 24~72 h,在相同时间点经 LatB 预处理的叶片中 ROS 积累量始终显著高于未经 LatB 处理的叶片;其中,在使用溶剂 DMSO 处理后,在 0~24 h 时,活性氧的积累量都很低,当处理 48 h 后,活性氧的积累量显著快速增加,基本与

未用 LatB 预处理的活性氧的积累量相同,但远低于经过 LatB 预处理组(图 3)。结果表明细胞微丝骨架解聚

剂 LatB 预处理可提高 *R. solani* AG1-IA 诱导的玉米叶片中 ROS 的积累量。

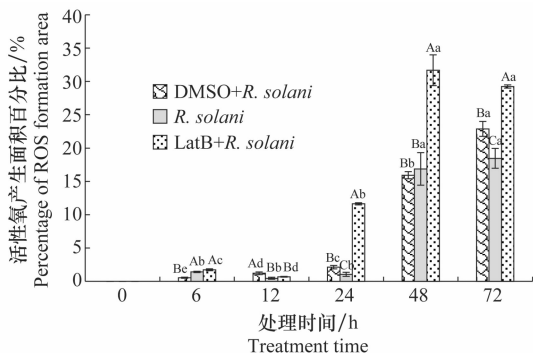


a~f表示*R. solani*侵染结构在玉米叶片上的发育过程,其中,a:接种后6 h菌丝发育情况;b:接种后12 h;c:接种后24 h,箭头处表示侵入钉;d~e:接种后48 h,箭头表示病原菌从气孔侵入;f:接种后72 h。1e~1f:未经预处理直接接种*R. solani*;2e~2f:DMSO溶剂预处理30 min后接种*R. solani*;3e~3f:微丝骨架解聚剂latrunculin B预处理30 min后接种*R. solani*

a~f indicate the developmental process of *Rhizoctonia solani* infectious structure on maize leaves. a: Mycelium branches at 6 h after inoculation; b: 12 h after inoculation; c: 24 h after inoculation, and arrows represent penetration pegs; d~e: 48 h after inoculation; f: 72 h after inoculation. 1e~1f: Inoculation with *R. solani* without pretreatment; 2e~2f: Inoculation with *R. solani* after pretreatment with the solvent DMSO for 30 min; 3e~3f: Inoculation with *R. solani* after pretreatment with latrunculin B for 30 min

图 2 不同预处理后 *Rhizoctonia solani* AG1-IA 侵染结构显微观察

Fig. 2 Microscopy observation of *Rhizoctonia solani* AG1-IA infectious structure after different pretreatments on maize leaves



不同小写字母代表同一处理接种后不同时间的玉米叶片活性氧产生面积差异显著($P < 0.05$)。不同大写字母表示不同处理同一时间的玉米叶片活性氧产生面积差异显著($P < 0.05$)

Different lowercases indicate significant difference in ROS accumulation area at different time after inoculation under the same pretreatment at the level of 0.05, and different uppercases indicate significant difference in ROS accumulation area at the same time after inoculation under different pretreatments at the level of 0.05

图3 不同接种处理后玉米叶片活性氧产生面积百分比

Fig. 3 ROS production in maize leaves after different inoculation with *Rhizoctonia solani* AG1-IA

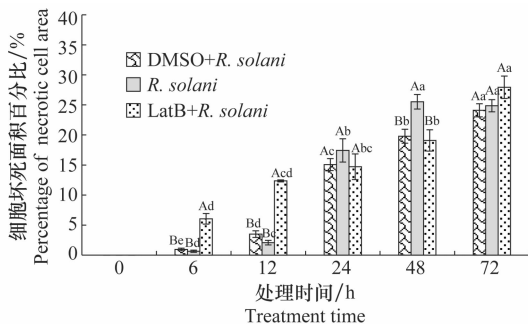
2.4 LatB 预处理对接种后玉米叶片细胞坏死情况的影响

经 LatB 预处理,接种 *R. solani* 后不同时间点玉米叶片的细胞死亡情况采用台盼蓝染色法进行检测,以 DMSO 预处理及未预处理作为对照,统计叶片坏死斑面积百分比,结果如图 4 所示。在接种 0 h 时,各处理均无明显细胞死亡出现;接种后 6~12 h,三种处理均有细胞死亡产生,未处理与 DMSO 预处理细胞死亡差异不显著,但 LatB 预处理的叶片细胞死亡面积显著增加;接种后 24~48 h,未处理和 DMSO 预处理玉米叶片蓝色坏死斑开始大量出现,但在相同时间内其坏死斑面积较经 LatB 预处理略高;接种后 72 h,各处理叶片经 LatB 预处理的叶片和未处理的叶片中细胞坏死面积相当。结果表明细胞微丝骨架解聚剂 LatB 处理后导致玉米叶片细胞微丝骨架解聚,在 *R. solani* AG1-IA 侵染前期,玉米叶片细胞大量死亡,以提高寄主的防御功能,减少自身受到损害。

2.5 LatB 预处理对接种后玉米叶片抗病相关基因表达的影响

为了检测 LatB 预处理对病原菌 *R. solani* AG1-IA 接种后玉米叶片抗病相关基因的表达情况,本试验选择了病程相关蛋白 PR1 和玉米转录因子 *ZmDREB2A* 两个基因,以 18S rRNA 作为内参持家基因,采用半定量 RT-PCR,在接种后不同时间点检测其表达水平,结果如图 5 所示: DMSO 预处理、LatB

预处理以及未经 LatB 预处理的玉米叶片中持家基因 18S rRNA 在接种后不同时间点的表达量基本相同,说明提取获得的玉米叶片总 RNA 稳定。在 LatB 预处理 30 min 后接种 *R. solani* 的玉米叶片中,PR1 在接种 12 h 被诱导表达,24 h 被抑制,随后 48 h 表达量最大,72 h 表达量明显降低;而在未经 LatB 预处理的玉米叶片中,PR1 在接种后 48 h 表达量显著增加,其他时间与 0 h 相比,变化不明显。*ZmDREB2A* 基因在两种处理中的表达量在 LatB 预处理的玉米叶片中于接种后 12 h 有所升高,其他时间点变化不明显,而在未经 LatB 预处理的玉米叶片以及使用溶剂 DMSO 预处理的玉米叶片中各时间点均无特别显著变化。结果表明,细胞骨架解聚剂 LatB 预处理对转录因子 *ZmDREB2A* 的影响较小,但可强烈诱导水杨酸(SA)途径相关的 PR1 基因表达,可能与 SA 参与到玉米抗纹枯病防御机制有关。



不同小写字母代表同一处理不同接种时间后的玉米叶片细胞死亡面积百分比差异显著($P < 0.05$)。不同大写字母表示不同处理同一时间点的玉米叶片细胞死亡面积百分比差异显著($P < 0.05$)

Different lowercase letters indicate significant difference in necrotic cell area at different time after inoculation under the same pretreatment at the level of 0.05, and different uppercase letters indicate significant difference in necrotic cell area at the same time after inoculation under different pretreatments at the level of 0.05

图4 不同接种处理后玉米叶片细胞坏死情况

Fig. 4 Necrotic cell areas of maize leaves after different inoculation with *Rhizoctonia solani* AG1-IA

3 讨论

植物在与病原菌长期共进化互作过程中形成了一套十分复杂、精密的防御机制,细胞微丝骨架作为细胞骨架的重要组成结构,在植物抵御病原菌侵染过程时常发生解聚与聚合,在病原菌侵入及扩展过程中均发挥了重要作用^[6,12]。本试验通过微丝骨架解聚剂预处理玉米叶片后接种纹枯病菌 *R. solani* AG1-IA,对病原菌侵染结构发育情况及玉米抗病相关反应检测,初步明确了细胞微丝骨架在玉米抗纹枯病菌侵染中的作用。

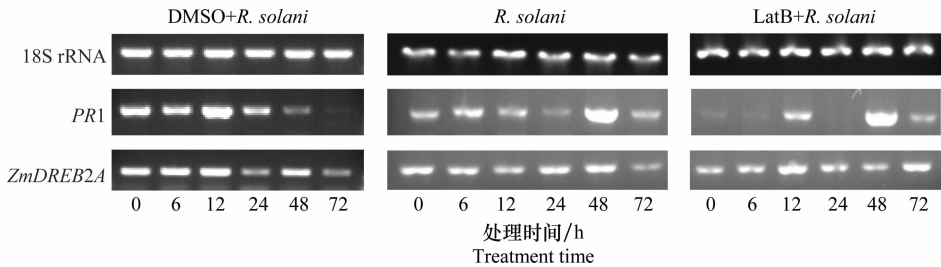


图 5 抗病基因的半定量 RT-PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳检测

Fig. 5 Representative agarose gels for semi-quantitative RT-PCR of defense gene expression

大量研究表明,细胞微丝骨架是植物抵御病原菌侵入的重要方式^[12]。病原菌侵染后微丝骨架可在侵染点附近聚集,呈放射状排列,参与寄主细胞质内抗病相关物质及蛋白运输到病原菌侵染位点的过程^[6]。Henty-Ridilla 及其团队研究表明,受丁香假单胞杆菌 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000、农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* 和稻瘟病菌 *Magnaporthe grisea* 侵染 1 h 后均能观察到细胞微丝骨架聚集。采用细胞松弛素或者微丝骨架解聚剂 LatB 处理则病原菌成功侵染^[9,14-15]。最近研究发现,细胞微丝骨架参与了大豆对病毒病的抗性,微丝骨架解聚有利于大豆花叶病毒病的发生^[16]。本试验中,立枯丝核菌 *R. solani* 为兼性寄生菌,该菌常以侵染垫或裂片状附着胞侵染寄主,或者不产生专门的侵染结构,而由菌丝顶端直接穿透植物表面或从自然孔口(主要是气孔)及伤口侵入。本试验采用细胞微丝骨架解聚剂 LatB 处理离体玉米叶片 30 min 后接种 *R. solani*,观察到病原菌菌丝分枝后迅速形成马蹄状侵染垫,并发育成侵入钉直接穿透表皮细胞完成侵入(图 2,3c),在接种后 6~12 h 迅速出现病斑;而在未经 LatB 预处理的玉米叶片上,*R. solani* 菌丝则出现较多侧枝后才形成短粗花瓣状的附着胞及侵入钉,或者延伸至气孔处进行侵入(图 2,1c),在接种后 24 h 出现病斑(图 4),表明细胞微丝骨架参与了寄主抵抗病原菌侵入的过程,LatB 预处理导致微丝骨架解聚,破坏了依赖于微丝骨架的玉米叶片抗侵入结构,而有利于病原菌的菌丝快速发育成马蹄状侵染垫,其与多分支的裂瓣状附着胞相比能更迅速侵入寄主,并建立寄生关系。这一结果从 Marshall 等^[17]的试验也得到证实,即纹枯病菌在水稻感病品种叶鞘表面形成大量的侵染垫,而抗病品种上则不形成侵染垫,只形成裂瓣状的附着胞。

已有研究发现,细胞微丝骨架不仅对侵染点附

近原生质凝集和乳突积累有影响,还参与调控植物的抗病防御反应,如活性氧(ROS)积累、细胞死亡及抗病基因的表达^[18-20]。采用微丝骨架解聚剂 cyclochalasin A 处理后发现,白粉菌诱导的黄瓜叶片中过敏性细胞坏死、H₂O₂ 的产生及乳突的形成均明显受抑,表明微丝骨架解聚可促进小麦白粉菌的侵染^[14,21]。采用细胞松弛素 D 处理,能够显著降低小麦-白粉菌互作^[22]、小麦-叶锈病菌互作^[23]、马铃薯-晚疫病菌互作^[24]中寄主叶片细胞坏死的产生。与前人研究结果不同,本试验中,LatB 预处理后接种病原菌,ROS 在接种后 24 h 大量积累,推测可能与微丝骨架解聚能够诱导寄主抗病信号有关,从而抑制病原菌的扩展。此外,本试验还发现,LatB 预处理提高 *R. solani* 诱导的水杨酸抗病信号相关的 PR1 基因大量表达,表明在玉米纹枯病抗病反应中,细胞微丝骨架的作用与水杨酸途径有关,这一结果与 Matoušková 等^[25]的研究结果相似。

此外,本试验为排除溶剂 DMSO 对细胞微丝骨架解聚剂 LatB 效果的影响,补充设置了溶剂 DMSO 预处理对照,结果表明,DMSO 预处理后接种 *R. solani* 的玉米叶片上菌丝及其他侵染结构发育、叶片活性氧的积累量、细胞坏死以及抗病相关基因与未经 LatB 预处理组结果相似,表明溶剂 DMSO 在本次试验中对试验结果的影响可以忽略。

综上,本试验通过组织细胞染色法及抗病基因表达检测,初步明确了细胞微丝骨架可影响病原菌在玉米叶片上的发育及侵入过程,也参与了玉米抗病防御相关的 ROS、细胞死亡及抗病基因表达水平,这为深入研究玉米对纹枯病抗病机理奠定了一定基础。然而,玉米纹枯病作为一种世界性的玉米病害难题,由于 *R. solani* 在室内人工培养条件下很难产孢,因此试验采用菌饼接种法,可能导致对病原菌侵染结构发育的观察较实际情况晚。此外,本研究采用细胞微丝骨

架解聚剂间接研究了其在玉米纹枯病抗病机制中的作用。为了更清楚直观地观察 *R. solani* 接种后玉米叶片微丝骨架结构的动态变化,目前本课题组正尝试通过免疫荧光蛋白标记纹枯病菌和细胞微丝骨架,从而实现激光共聚焦显微镜实时观察纹枯病菌与玉米互作过程中微丝骨架的动态变化。

参考文献

- [1] 邹军顺, 李新果, 马文峰. 中国玉米种植产业发展现状分析及政策建议[J]. 粮食科技与经济, 2014, 39 (1): 13 - 15.
- [2] 唐海涛, 荣廷昭, 杨俊品, 等. 玉米纹枯病研究进展[J]. 玉米科学, 2004, 12(1): 93 - 96.
- [3] 陈文生. 玉米纹枯病抗性资源筛选及抗性 QTL 元分析[D]. 成都: 四川农业大学, 2013.
- [4] 肖炎农, 李建生, 郑用连, 等. 湖北省玉米纹枯病原丝核菌的种类和致病性[J]. 菌物系统, 2002, 21(3): 419 - 424.
- [5] SCHMIDT S M, PANSTRUGA R. Cytoskeleton functions in plant-microbe interactions [J]. Physiological and Molecular Plant Pathology, 2007, 71: 135 - 148.
- [6] PORTER K, DAY B. From filaments to function: the role of the plant actin cytoskeleton in pathogen perception, signalling and immunity [J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2016, 58(4): 299 - 311.
- [7] 张永梅, 吴忠义, 王学臣, 等. 拟南芥保卫细胞微管骨架的重排参与 NO 诱导的气孔关闭[J]. 科学通报, 2008, 53(3): 293 - 298.
- [8] CHIMTAMANANI S, HULBERT S H, JOHAL G S, et al. Identification of a maize locus that modulates the hypersensitive defense response, using mutant-assisted gene identification and characterization [J]. Genetics, 2010, 184: 813 - 825.
- [9] HENTY-RIDILLA J L, LI J, DAY B, et al. The plant actin cytoskeleton responds to signals from microbe-associated molecular patterns [J/OL]. PLoS Pathogens, 2013, 9(4): e1003290.
- [10] 龙书生, 曹远林, 李亚玲, 等. 小麦抗条锈病过敏性坏死反应中的活性氧代谢[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2009, 37(11): 125 - 130.
- [11] NGUYEN H T, LEIPNER J, STAMP P, et al. Low temperature stress in maize (*Zea mays* L.) induces genes involved in photosynthesis and signal transduction as studied by suppression subtractive hybridization [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2009, 47: 116 - 122.
- [12] SCHMELZER E. Cell polarization, a crucial process in fungal defence [J]. Trends in Plant Science, 2002, 7(9): 411 - 415.
- [13] HENTY-RIDILLA J L, LI J, DAY B, et al. ACTIN DEPOLYMERIZING FACTOR4 regulates actin dynamics during innate immune signaling in *Arabidopsis* [J]. Plant Cell, 2014, 26: 340 - 352.
- [14] 郝心愿, 李红莉, 禹珂, 等. 微丝骨架解聚剂在小麦-黄瓜白粉菌非寄主互作中的作用[J]. 中国农业科学, 2011, 44(2): 291 - 298.
- [15] JAROSCH B, COLLINS N C, ZELLERHOFF N, et al. RAR1, ROR1, and the actin cytoskeleton contribute to basal resistance to *Magnaporthe grisea* in barley [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2005, 18 (5): 397 - 404.
- [16] LU Lu, WU Guanwei, XU Xiaoming, et al. Soybean actin-depolymerizing factor 2 interacts with soybean mosaic virus encoded P3 protein [J]. Virus Genes, 2015, 50(2): 333 - 339.
- [17] MARSHALL D S, RUSHM C. Infection cushion formation on rice sheaths by *Rhizoctonia solani* [J]. Phytopathology, 1980, 70: 947 - 950.
- [18] KOBAYASHI Y, KOBAYASHI I. Depolymerization of the actin cytoskeleton induces defense responses in tobacco plants [J]. Journal of General Plant Pathology, 2007, 73(5): 360 - 364.
- [19] CHANG Xiaoli, RIEMANN M, LIU Qiong, et al. Actin as deathly switch? How auxin can suppress cell-death related defence [J/OL]. PLoS ONE, 2015, 10(5): e0125498.
- [20] THORDAL-CHRISTENSEN H, ZHANG Ziguo, WEI Yangdou, et al. Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction [J]. The Plant Journal, 1997, 11(6): 1187 - 1194.
- [21] 郝重朝. 微丝骨架在黄瓜对小麦白粉菌非寄主抗性中作用的组织化学研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2013.
- [22] KOBAYASHI I, KOBAYASHI Y, YAMAOKA N, et al. Recognition of a pathogen and a nonpathogen by barley coleoptile cells. III. Responses of microtubules and actin filaments in barley coleoptile cells to penetration attempts [J]. Canadian Journal of Botany, 1992, 70(9): 1815 - 1823.
- [23] 侯春燕, 王冬梅, 李小娟, 等. 细胞骨架解聚药物对小麦与叶锈菌互作诱发的细胞过敏性反应的影响[J]. 植物病理学报, 2002, 32 (2): 147 - 152.
- [24] TOMIYAMA K, SATO K, DOKE N, et al. Effect of cytochalasin B and colchicine on hypersensitive death of potato cells infected by incompatible race of *Phytophthora infestans* [J]. Annals of the Phytopathological Society of Japan, 1982, 48 (2): 228 - 230.
- [25] MATOUŠKOVÁ J, JANDA M, FIŠER R, et al. Changes in actin dynamics are involved in salicylic acid signaling pathway [J]. Plant Disease, 2014, 223: 36 - 44.

(责任编辑: 杨明丽)