

小麦矮腥黑粉菌侵染小麦子房的激光共聚焦显微观察方法

李超¹, 陈德来^{1,2}, 魏晓庆^{1,2}, 刘俭俭^{1,3},
刘太国¹, 刘博¹, 陈万权¹, 高利^{1*}

(1. 中国农业科学院植物保护研究所植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100193;
2. 甘肃农业大学植物保护学院, 兰州 730070; 3. 长江大学农学院, 荆州 434023)

摘要 本试验利用碘化丙啶(propidium iodide)和 Alexa Flour 488(AF 488)标记的麦胚凝集素(WGA)分别对小麦子房细胞和小麦矮腥黑粉菌进行染色,结合激光共聚焦显微镜成像系统获取小麦子房的三维立体图像。该技术可获得清晰的小麦子房细胞图像,并观察小麦矮腥黑粉菌在小麦子房中的侵染状况。该方法将为研究病原菌在寄主体内的分布提供可参考依据。

关键词 小麦矮腥黑粉菌; 碘化丙啶; 麦胚凝集素; 激光共聚焦显微镜

中图分类号: S 435.121 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2018059

Observation of the wheat ovaries infected by *Tilletia controversa* Kühn by confocal laser scanning microscopy

LI Chao¹, CHEN Delai^{1,2}, WEI Xiaoqing^{1,2}, LIU Jianjian^{1,3},
LIU Taiguo¹, LIU Bo¹, CHEN Wanquan¹, GAO Li¹

(1. State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China; 2. College of Plant Protection, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China; 3. College of Agriculture, Yangtze University, Jingzhou 434023, China)

Abstract In this study, we used WGA AF-488 to label the mycelia of *Tilletia controversa* Kühn (TCK), used propidium iodide to stain the wheat ovary, and then used confocal laser scanning microscopy (CLSM) to observe the infection of TCK throughout the growth of wheat ovary. The images successfully revealed the cells of wheat ovary and the mycelia of TCK in the ovary cells, which contribute a lot to the research of mycelial distribution in the host cells.

Key words *Tilletia controversa*; propidium iodide; WGA AF-488; CLSM

小麦矮腥黑粉菌 *Tilletia controversa* Kühn (TCK)引起的小麦矮腥黑穗病对小麦的安全生产危害巨大^[1]。被小麦矮腥黑粉菌侵染发病的小麦植株多分蘖和矮化,正常的籽粒被发育成熟的孢子团(菌瘿)完全取代形成病粒,通常发病率约等于产量损失率^[1-2]。除了导致小麦产量损失外,小麦矮腥黑粉菌冬孢子中含有的三甲胺会严重影响小麦面粉的品质和人体健康,而且该病菌在2007年被列入《中华人民共和国进境植物检疫性有害生物名录》^[3]。

我国的部分冬麦区也面临小麦矮腥黑粉菌传入和定殖的风险^[4-6]。当前大多数研究都集中在对小麦矮腥黑粉菌的风险分析和分子鉴定^[7-9]上,并取得了长足的进展和广泛的应用,使得小麦矮腥黑粉菌的检测灵敏度可以达到0.1 fg/ μL ^[10-11]。然而,小麦矮腥黑粉菌与寄主互作方面的研究却极少见,该方面的研究将加深我们对小麦矮腥黑粉菌侵染机制的理解,并为小麦矮腥黑穗病的有效防治提供理论依据。

收稿日期: 2018-01-31 修订日期: 2018-04-04

基金项目: 国家自然科学基金国际合作项目(31761143011);国家自然科学基金(31571965);北京市自然科学基金(6162022);中国农业科学院优秀引导项目(Y2017JC09);国家重点研发计划(2016YFC1201200)

* 通信作者 E-mail: lgao@ippcaas.cn

病原菌在寄主体内的显微观察是了解病原菌感染过程较为直观的方式。传统的观察方法是将寄主组织整体透明染色后借助显微镜观察,操作步骤十分耗时和繁琐,制片过程中还有可能破坏幼嫩的植物组织^[12]。而利用绿色荧光蛋白标记病原菌再借助荧光显微镜观察的方法是过去十几年发展比较成熟的另一种技术^[13-15],在许多病原菌的侵染观察上获得应用^[16-18]。但绿色荧光蛋白的转化对于某些真菌难度很大,被标记病原菌的荧光表达量差异也制约着该方法的准确性^[19]。当前,借助某些荧光染料对菌丝染色并在荧光显微镜下观察菌丝的方法取得了显著的效果,如 Solophenyl Flavine 7GFE^[12,20] 和 苯胺蓝^[21] 等,这种利用荧光染料与菌丝细胞质成分特异性结合的方法在操作上十分便捷,荧光成像质量高,有着广泛的前景。然而,小麦矮腥黑粉菌侵染小麦子房的细胞学研究一直以来都停留在组织切片技术上^[2,22]。因此,有必要开发一种更直观便捷的方法来观察小麦矮腥黑粉菌对寄主的侵染状况。本文借鉴当前菌丝染色的方法结合寄主组织染色,在激光共聚焦显微镜下可实现方便、快捷、准确地观察小麦矮腥黑粉菌侵染小麦子房的显微过程。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试样品

本试验所需的小麦矮腥黑穗病发病样品是参照姚卓等^[23]的人工培养和室内接种方法,在中国农业科学院植物保护研究所国家生物安全中心中高危病原菌实验室的超低温植物培养箱内培养获得。接种用的供试菌株由美国农业部农业研究院(United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service)提供。

1.1.2 主要试剂和仪器

本试验所需的主要试剂:无水乙醇、磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS, pH=7.4)和吐温 20(Tween 20)购自北京广达恒益生物科技有限公司,碘化丙啉(propidium iodide, PI)和 Alexa Flour 488(AF 488)标记的麦胚凝集素(wheat germ agglutinin, WGA)由北京冰达生物科技有限公司代购。

主要仪器:镊子(DUMONT 41005-Antimag-

netic-E, China)、体视显微镜(Laica S6D, Germany)、全自动倒置荧光显微镜(Olympus IX83, Japan)、激光共聚焦显微镜(Leica SP8, Germany)。

1.2 方法

1.2.1 采样

在小麦生长到孕穗期后开始采样,每隔 24 h 进行采样,每次采样只采集小穗上的一粒并迅速置于无水乙醇中保存。

1.2.2 子房和胚珠的分离

采集的小穗在体视显微镜下进行观察并使用镊子解剖。剥掉外稃、内稃和花药,将子房从小穗轴上剥离并将离体子房浸入无水乙醇中保存。利用镊子破坏膨大子房的子房壁组织获得离体胚珠。全自动倒置荧光显微成像系统测量离体子房和胚珠的直径大小。

1.2.3 染色

离体子房和胚珠先后置于 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PI 和 0.1% 吐温 20 分别染色 60 min,再置于 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ WGA-AF 488 中染色 60 min;染色完成后使用 10 $\times$ PBS 冲洗 4~6 次,每次冲洗时间不少于 2 min。将完成染色处理的离体子房和胚珠保存在 10 $\times$ PBS 溶液中准备观察。所有染色过程均在室温下进行。

1.2.4 样品的观察

将染色处理后的离体子房和胚珠放置玻片上,并倒置于激光共聚焦显微镜成像系统的载物台上,进行观察并层扫拍照。激光发射光波的设定参数为 WGA-AF 488 激发蓝光波长 488 nm,发射光波长为 510~570 nm;PI 激发绿光波长 561 nm,发射光波长为 590~820 nm。

2 结果和分析

在染色过程中,WGA 作为从谷物中分离的植物源凝集素蛋白,可特异性地与真菌细胞壁中的几丁质结合并诱导寄主和病原菌之间的特异性识别^[24]。Alexa Flour 488 偶联蛋白优于包括 Cy2 在内的其他荧光素,不仅亮度更高,而且光稳定性更好,在 pH 为 4~10 的范围内均可以保持稳定状态。Alexa Flour 488 与 WGA 共轭结合所制成的染料可以使小麦矮腥黑粉菌菌丝在激光共聚焦显微镜的特定光波下呈现绿色。PI 是一种常见的荧光染料,可以与寄主细胞内的核酸结合使细胞在激光共聚焦显微镜的特定光波下呈现红色。小麦矮腥黑

穗病发病样品的整个培养过程都处于无菌和消毒的环境中,所有的用具都经过灭菌,确保只接种小麦矮腥黑粉菌。因此,综合利用 WGA-AF 488 和

PI 染色可以在激光共聚焦显微镜下显示小麦矮腥黑粉菌菌丝在小麦子房或胚珠中的侵染状态和分布区域(图 1)。

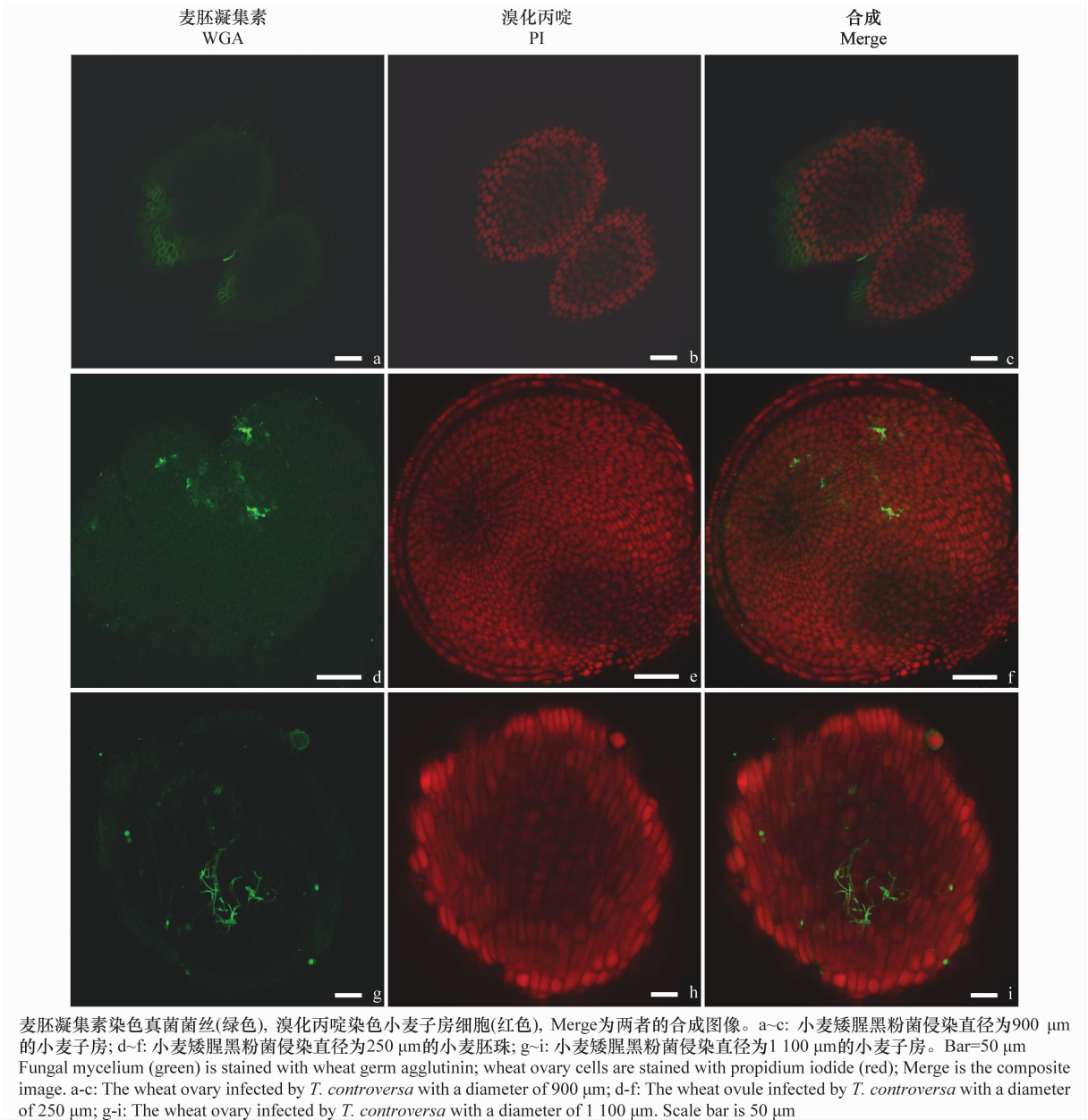


图 1 激光共聚焦扫描显微镜观察小麦矮腥黑粉菌侵染小麦子房和胚珠

Fig. 1 Observation of wheat ovary and ovule infected by *Tilletia controversa* by confocal microscopy

3 讨论

本试验为研究病原菌侵染植物组织提供了一种三维立体构象技术,采用本试验所述的方法,能够实现对小麦矮腥黑粉菌侵染小麦子房和胚珠的过程进行追踪和观察。结果显示,这种方法能够对离体子

房和胚珠内部细胞的结构进行准确成像,并识别小麦矮腥黑粉菌的菌丝。

当前,激光共聚焦显微镜被广泛应用于分子细胞生物学的研究,并在病原菌亚细胞定位、组织细胞生理代谢观察和侵染循环研究等方面发挥着重要作用,相比于其他显微镜技术,CLSM 大大提高了荧光

图像的分辨率和准确率^[25-26]。利用激光共聚焦显微镜追踪和观察植物体内的病原菌已有先例,Kelliher等^[27]利用激光共聚焦显微镜揭示了玉米花药中5种细胞的发育历程和分裂模式;Gao等^[28]在此基础上利用激光共聚焦显微镜并结合数据统计分析发现玉米瘤黑粉菌 *Ustilago maydis* 能够影响并延迟玉米花药细胞的发育;蔚慧欣等^[29]也利用 WGA-AF 488 和 PI 染色,观察了小麦矮腥黑粉菌在小麦叶片中的初步侵染。在激光共聚焦显微镜的操作上,我们适当提高了发射光波的长度范围以更好地识别染料的荧光。在我们的研究中还发现,当离体子房直径比较大的时候,激光共聚焦显微镜对子房内部结构尤其是胚珠的成像相较于外部子房壁细胞是比较模糊的,因此我们对子房进一步解剖并分离出胚珠,获得了胚珠细胞的清晰图像(图 1d~f)。

与传统的植物石蜡切片技术相比,本试验的方法避免了制片过程中对子房和胚珠内部结构的破坏,尤其是对组织细胞的变形和损伤。传统技术方法所呈现的二维平面图像无法对整个小麦子房和胚珠的立体结构进行扫描,而本试验的方法在精准获取植物组织细胞图像的基础上,还能够对病原菌进行标记和示踪。从结果上来看,本试验的方法为研究病原菌侵染寄主组织提供了一种有意义的解决方案。

参考文献

- [1] HOFFMAN J A. Bunt of wheat [J]. Plant Disease, 1982; 979 - 986.
- [2] TRIONE E J, HESS W M, STOCKWELL V O. Growth and sporulation of the dikaryons of the dwarf bunt fungus in wheat plants and in culture [J]. Canadian Journal of Botany, 1989, 67(6): 1671 - 1680.
- [3] 郭予元. 中国农作物病虫害[M]. 北京: 中国农业出版社, 2014; 615 - 618.
- [4] 魏淑秋, 章正, 郑耀水. 应用生物气候相似距对小麦矮化腥黑穗病在我国定殖可能性的研究[J]. 北京农业大学学报, 1995, 21(2): 127 - 132.
- [5] 陈克, 章正. 小麦矮腥黑穗病在中国定殖风险分析及区划研究[J]. 植物病理学报, 2002, 32(4): 312 - 318.
- [6] 周益林, 段霞瑜, 贾文明, 等. 小麦矮腥黑穗病(TCK)传入中国及其定殖的风险分析研究进展[J]. 植物保护, 2007, 33(2): 6 - 10.
- [7] KOCHANOVÁ M, ZOUHAR M, PROKINOVÁ E, et al. Detection of *Tilletia controversa* and *Tilletia caries* in wheat by PCR method [J]. Plant Soil and Environment, 2004, 50(2): 75 - 77.
- [8] MCDONALD J G, WONG E, KLASSEN G R. Differentiation of *Tilletia* species by rep-PCR genomic fingerprinting [J]. Plant Disease, 2000, 84: 1121 - 1125.
- [9] YUAN Qing, NIAN Siji, YIN Youping, et al. Development of a PCR-based diagnostic tool specific to wheat dwarf bunt, caused by *Tilletia controversa* [J]. European Journal of Plant Pathology, 2009, 124(4): 585 - 594.
- [10] GAO Li, CHEN Wanquan, LIU Taiguo. Development of a SCAR marker by inter-simple sequence repeat for diagnosis of dwarf bunt of wheat and detection of *Tilletia controversa* Kühn [J]. Folia Microbiologica, 2010, 55(3): 258 - 264.
- [11] GAO Li, CHEN Wanquan, LIU Taiguo. An ISSR-based approach for the molecular detection and diagnosis of dwarf bunt of wheat, caused by *Tilletia controversa* Kühn [J]. Journal of Phytopathology, 2011, 159: 155 - 158.
- [12] KNIGHT N L, SUTHERLAND M W. A rapid differential staining technique for *Fusarium pseudograminearum* in cereal tissues during crown rot infections [J]. Plant Pathology, 2011, 60(6): 1140 - 1143.
- [13] CHIU Wanling, NIWA Y, ZENG Weike, et al. Engineered GFP as a vital reporter in plants [J]. Current Biology, 1996, 6(3): 325 - 330.
- [14] LORANG J M, TUORI R P, MARTINEZ J P, et al. Green fluorescent protein is lighting up fungal biology [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(5): 1987 - 1994.
- [15] OREN L, EZRATI S, COHEN D, et al. Early events in the *Fusarium verticillioides*-maize interaction characterized by using a green fluorescent protein-expressing transgenic isolate [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(3): 1695 - 1701.
- [16] RAJASEKARAN K, CARY J W, COTTY P J, et al. Development of a GFP-expressing *Aspergillus flavus* strain to study fungal invasion, colonization, and resistance in cottonseed [J]. Mycopathologia, 2008, 165(2): 89 - 97.
- [17] 徐莹, 刘太国, 何月秋, 等. 绿色荧光蛋白及其在丝状真菌研究中的应用[J]. 植物保护, 2008, 34(6): 1 - 6.
- [18] ANDARGIE M, LI Luoye, FENG Aiqing, et al. Development of a GFP-expressing *Ustilagoideae virens* strain to study fungal invasion and colonization in rice spikelets [J]. South African Journal of Botany, 2015, 97: 16 - 24.
- [19] 刘甜甜, 周倩, 吴秋云, 等. 马铃薯晚疫病病菌侵染的 Solophenyl Fluoride 荧光染色方法研究[J]. 植物科学学报, 2016, 34(2): 316 - 324.
- [20] HOCH H C, GALVANI C D, SZAROWSKI D H, et al. Two new fluorescent dyes applicable for visualization of fungal cell walls [J]. Mycologia, 2005, 97(3): 580 - 588.
- [21] 李惠霞, 刘永刚, 张俊莲, 等. 马铃薯对晚疫病水平抗性的组织细胞学观察[J]. 西北植物学报, 2015, 35(8): 1554 - 1559.

参考文献

- [1] 陈万权,康振生,马占鸿,等. 中国小麦条锈病综合治理理论与实践[J]. 中国农业科学,2013,46(20):4254-4262.
- [2] 吴立人,牛永春. 我国小麦条锈病持续控制的策略[J]. 中国农业科学,2000,33(5):46-54.
- [3] LIU Taiguo, PENG Yunliang, CHEN Wanquan, et al. First detection of virulence in *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* in China to resistance genes Yr24 (=Yr26) present in wheat cultivar Chuanmai 42 [J]. Plant Disease,2010,94(9):1163.
- [4] 刘太国,章振羽,刘博,等. 小麦抗条锈病基因 Yr26 毒性小种的发现及其对我国小麦主栽品种苗期致病性分析[J]. 植物病理学报,2015,45(1):41-47.
- [5] 李强,李高宝,岳维云,等. 2002—2014 年陕西省小麦条锈菌生理小种变化动态和小麦品种(系)的抗病性[J]. 植物病理学报,2016,46(3):374-383.
- [6] 刘太国,王保通,贾秋珍,等. 2010—2011 年度我国小麦条锈菌生理专化研究[J]. 麦类作物学报,2012,32(3):574-578.
- [7] 刘博,刘太国,章振羽,等. 中国小麦条锈菌条中 34 号的发现及其致病特性[J]. 植物病理学报,2017,47(5):1-8.
- [8] 董玉琛,曹永生,张学勇,等. 中国普通小麦初选核心种质的产生[J]. 植物遗传资源学报,2003,4(1):1-8.
- [9] 邱永春,李建军,戎振祥,等. 我国小麦微核心种质抗锈病及白粉病鉴定与分析[J]. 麦类作物学报,2015,35(2):268-273.
- [10] 周新力,詹刚明,黄丽丽,等. 80 份国外春小麦种质资源抗条锈性评价[J]. 中国农业科学,2015,48(8):1518-1526.
- [11] 韩德俊,张培禹,王琪琳,等. 1980 份小麦地方品种和国外种质抗条锈性鉴定与评价[J]. 中国农业科学,2012,45(24):5013-5023.
- [12] LINE R F, QAYOUM A. Virulence, aggressiveness, evolution and distribution of races of *Puccinia striiformis* (the cause of stripe rust of wheat) in North America, 1968-87 [R]. USDA Technical Bulletin No. 1788. National Technical Information Service, 1992.
- [13] WAN Anmin, CHEN Xianming, HE Zhonghu. Wheat stripe rust in China [J]. Australian Journal of Agricultural Research, 2007, 58(6): 605-619.
- [14] 蔺瑞明,鄧彦敏,冯晶,等. 中国小麦农家品种抗条锈病的鉴定与评价[J]. 沈阳农业大学学报,2010,41(5):535-539.
- [15] 牛永春,吴立人. 繁 6-绵阳系小麦抗条锈性变异及对策[J]. 植物病理学报,1997,27(1):6-9.
- [16] 康振生,李振岐,商鸿生,等. 绵阳系统小麦条锈菌新菌系的发现[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),1994,22(3):7-11.
- [17] MCLINTOSH R A, DUBCOVSKY J, ROGERS W J, et al. Catalogue of gene symbols for wheat: 2017 supplement [Z/OL]. <https://shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes/mac-gene/supplement2017.pdf>.
- [18] FENG Junyan, WANG Meinan, SEE D R, et al. Characterization of novel gene Yr79 and four additional QTL for all-stage and high-temperature adult-plant resistance to stripe rust in spring wheat PI 182103 [J/OL]. Phytopathology, 2018. <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-11-17-0375-R>.
- [19] 杨雪,牛永春,邓晖. 小麦农家品种红麦(苏 1661)中一个主效抗条锈病基因的微卫星标记定位[J]. 植物遗传资源学报,2008,9(2):131-137.
- [20] 代君丽,李洪连. 和尚麦中抗条锈基因的 SSR 标记定位研究[J]. 河南农业大学学报,2008,42(3):341-344.
- [21] 代君丽,刘珂,牛永春,等. 中国小麦地方品种抗条锈病基因推导[J]. 河南农业科学,2010,39(12):83-87.
- [22] 王亚娟,赵喜特,陈雪燕,等. 陕西省小麦农家种主要农艺性状及其白粉病抗性评价[J]. 中国农学通报,2005,21(7):182-184.
- [23] 邵慧,冉从福,余静,等. 小麦地方品种半截芒 Glu-B1 位点 HMW-GS 基因的克隆及序列分析[J]. 西北农业学报,2015,24(6):21-26.
- [24] 翟雯雯,段霞瑜,周益林,等. 我国小麦地方品种蚂蚱麦、小白冬麦、游白兰、红卷芒抗白粉病性遗传分析[J]. 植物保护,2008,34(1):37-40.
- [25] 孙建鲁,王吐虹,冯晶,等. 100 个小麦品种资源抗条锈性鉴定及重要抗条锈病基因的 SSR 检测[J]. 植物保护,2017,43(2):64-72.
- [26] 赵霞,王长彪,赵兴华,等. 小麦抗病相关基因聚合育种的研究进展[J]. 山西农业科学,2017,45(2):308-313.
- (责任编辑:杨明丽)
- (上接 124 页)
- [22] FERNANDEZ J A, DURAN R. Hypodermic inoculation, a rapid technique for producing dwarf bunt in wheat [J]. Plant Disease Reporter,1978, 62(4): 336-337.
- [23] 姚卓,陈万权,高利,等. 小麦矮腥黑粉菌冬孢子萌发和室内人工接种方法的探索[J]. 植物保护,2014,40(3):122-126.
- [24] MIDOUX P, GRIVET J P, DELMOTTE F, et al. The binding of monosaccharides to wheat germ agglutinin: Fluorescence and NMR investigations [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1984, 119(2): 603-611.
- [25] LAMPRECHT A, SCHÄFER U F, LEHR C. Characterization of microcapsules by confocal laser scanning microscopy: structure, capsule wall composition and encapsulation rate [J]. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2000, 49(1): 1-9.
- [26] HONG Ren, LIU Yong, SUN Jingsan. Observation of rice embryo sac development with confocal laser scanning microscopy [J]. Acta Botanica Sinica, 1998, 40(9): 786-789.
- [27] KELLIHER T, WALBOT V. Emergence and patterning of the five cell types of the *Zea mays* anther locule [J]. Developmental Biology, 2011, 350(1): 32-49.
- [28] GAO Li, KELLIHER T, NGUYEN L, et al. *Ustilago maydis* reprograms cell proliferation in maize anthers [J]. Plant Journal for Cell and Molecular Biology,2013,75(6):903-914.
- [29] 蔚慧欣,高利,沈慧敏,等. 小麦矮腥黑粉菌在小麦体内侵染过程的显微观察[J]. 中国科学:生命科学,2016,46(5):637-645.
- (责任编辑:田 喆)