

杨 月,张潇雅,孙冬梅,等. 玉米圆斑病菌侵染体系的建立[J]. 江苏农业科学,2017,45(10):81-83.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.10.021

# 玉米圆斑病菌侵染体系的建立

杨 月<sup>1</sup>,张潇雅<sup>1</sup>,孙冬梅<sup>1</sup>,邓 馨<sup>2</sup>

(1. 黑龙江八一农垦大学,黑龙江大庆 163319; 2. 中国科学院植物研究所,北京 100093)

**摘要:**以玉米自交系 B73 作为研究对象,以玉米圆斑病菌为供试菌株,采取玉米离体叶片侵染与活体整株侵染相对比的方式,通过观察侵染早期不同时间的玉米叶片,测定相关 POD 酶活性及相关基因表达量变化等,对侵染早期玉米叶片的生理指标和分子指标进行研究,通过比较这 2 种接种方式对玉米早期生理生化表型的影响,来筛选一种较为便捷实用的试验方法。结果表明,离体叶片侵染体系与活体植株侵染在侵染初期所选取的各种生理生化指标方面变化无差异;离体叶片侵染体系具有操作简单、重复性高、节约时间的优点,可以作为整株侵染的替代体系,为研究早期调控提供试验手段。

**关键词:**玉米;圆斑病菌;侵染体系;早期调控

**中图分类号:** S435.131 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)10-0081-03

玉米是一种重要的粮食作物,其播种面积和产量仅次于水稻、小麦居世界第 3 位,平均单产则居第 1 位<sup>[1]</sup>。玉米真菌病害是影响其产量的重要因素,其中,玉米大斑病菌(*Exserohilum turcicum*)和玉米圆斑病菌(*Bipolaris zeicola*)引起的叶部病害尤为常见<sup>[2-3]</sup>。1959 年姜广正等首次报道我国发生玉米圆斑病<sup>[5-7]</sup>,该病可侵染玉米叶片、果穗、苞叶、叶鞘和茎秆等部位<sup>[8-9]</sup>。病原菌对植物的伤害大多与植物体内的活性氧代谢失调有关<sup>[4]</sup>,其中描述较多的为苯丙氨酸解氨酶(PAL)、过氧化物酶(POD)、超氧化物歧化酶(SOD)与过氧化氢酶(CAT)等<sup>[5]</sup>。

研究表明,病原菌侵染植物时病程相关蛋白(pathogenesis-related protein, PRs)会发生相应的变化,且植物碱性亮氨酸拉链(basic leucine zipper, bZIP)类转录因子参与了病菌防御以及对各种环境胁迫的响应等<sup>[6]</sup>。碱性亮氨酸拉链(basic leucine zipper, bZIP)蛋白是真核生物所特有的一类转录因子, bZIP 转录因子在人、动物、植物、微生物和昆虫中均有发现<sup>[7]</sup>。在植物中, bZIP 家族中的不同成员参与多种生物学过程<sup>[8-9]</sup>, bZIP 转录因子中的 B 亚族基因是驻膜转录因子(membrane-tethered transcription factors, MTTFs),参与内质网胁迫(ER)和其他逆境胁迫应答<sup>[10]</sup>。

由于整株侵染操作相对复杂,且条件控制较困难,重复性差。相比之下,离体叶片侵染反而可在短期内很好地模拟整株侵染的效果,但有关此方面研究未见报道。本试验以玉米圆斑病菌为研究材料,探讨了在离体和活体条件下,病害侵染初期植物体 POD 酶活性、防御过程中转录因子 bZIP 中 B 亚族的相关基因及病程相关蛋白的变化,为方便快捷地研究早期调控以及提供一种较好的试验手段打下基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

玉米自交系 B73 由中国农业大学巩志忠教授提供;玉米圆斑病菌由黑龙江八一农垦大学生命学院微生物实验室保存。

### 1.2 培养基

马铃薯培养基(PDA),玉米苗浸汁培养基(玉米苗 200 g、葡萄糖 20 g、琼脂粉 20 g,加蒸馏水定容至 1 000 mL)。

### 1.3 试验方法

1.3.1 病原菌纯化、扩繁 在无菌操作台中,用接种环挑取病原菌菌种菌丝于玉米苗浸汁培养基上活化,放入 28 ℃恒温培养箱倒置培养,待菌丝长至满皿。长好的病原菌用打孔器在培养基上竖直打成直径 0.5 cm 的菌碟,有菌一面朝下接种于 PDA 培养基上,28 ℃恒温倒置培养。待菌丝布满整个培养基即可从培养箱取出,室温放置黑暗处,促进孢子萌发。

1.3.2 玉米的种植 萌发:营养花卉土(灭菌)按 1:1 配蛭石混匀后称 100 g 置于直径 10 cm 小花盆中,小花盆放置于水盆中浸透水,玉米种子直接播种于浸透水的花盆中,深度约为 1~1.5 cm,置于人工气候箱(28 ℃、16 h 光照 8 h 黑暗)中培养,约 3 d 后即可萌发。

移苗:待幼苗生长至 3 叶 1 心期时移入直径 40 cm 的大花盆中,按“大田土:草炭=1:1”混匀,同时施加底肥(氮磷钾复合肥),用镊子小心将小苗整株挖出后轻轻抖落根部泥土,若残留太多可在水盆中轻轻涮洗后再移入土中(尽量不要伤根),随后浇足量的水。移苗后于温室中培养,保持室内温度为 30 ℃,相对湿度 60%,定期观察调节温度、湿度计和通风机及水帘,每周浇水 1 次,同时追肥,按照 5 g 复合肥溶于 10 L 自来水中的比例,每盆浇水 3 L。

1.3.3 玉米叶片侵染处理 离体:取生长发育及孢子萌发均匀病原菌平皿,用打孔器打下同样大小的菌碟备用。玉米生长到约 7 叶 1 心期时剪下第 3 张和第 4 张叶子,取发育状态相近的 3~5 cm 1 段放入铺有湿润滤纸的直径 90 mm 玻璃

收稿日期:2016-03-16

作者简介:杨 月,女,天津人,硕士研究生,研究方向微生物资源与利用。E-mail:751847926@qq.com。

通信作者:孙冬梅,博士,教授,研究方向为应用微生物。E-mail:7981004@qq.com。

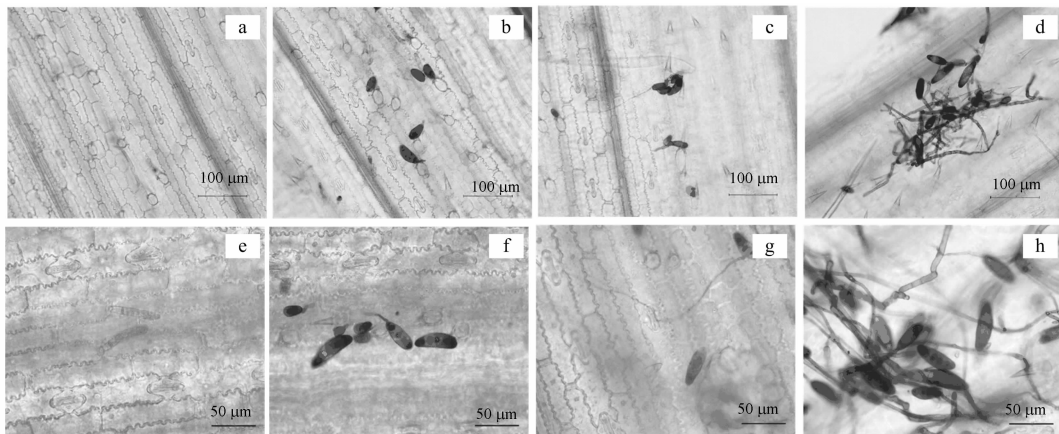
培养皿中,正面朝上,将打好的菌碟有菌一面朝下紧贴叶片放好,每段叶片上均匀放置 3 个菌碟,每皿 2 张叶片,盖好皿盖,放于 28 ℃ 培养箱保温,分别于接菌后 2、12、24 h 取样,以未接菌的叶片作为空白对照,每个处理 3 次重复。

活体:病原菌同样用打孔器打好菌碟备用。取相同生长阶段的玉米,连同小花盆一起放入大号透明塑料箱中,底部加湿润滤纸,用支架固定叶片,将病原菌菌碟接种于叶片上,盖好盖子,保持温度、湿度,取样方式同离体叶片。

1.3.4 叶片透明与显微观察 取大约 0.5 cm<sup>2</sup> 大小的叶片于“无水乙醇:冰醋酸=1:1”的固定液(现用现配)中固定 24 h,蒸馏水冲洗后放入饱和水合氯醛溶液中 1 h 即完成透明。取出叶片用蒸馏水冲洗干净残留液体,放在载玻片上,加 1 滴苯胺蓝染色 10 min,用蒸馏水冲洗掉染液滴加 1 滴 50% 甘油,盖上盖玻片,进行显微观察。

1.3.5 过氧化物酶(POD)酶活测定 愈创木酚法<sup>[11-12]</sup>进行 POD 的测定:在 pH 值 7.8 的 PBS 中加入 3 mL POD 反应液于比色皿中,以此作为调零组 300 μL,试验组粗酶液稀释 10 倍取 300 μL 加入 3 mL 反应液,在 470 nm 下每隔 1 min 读数 1 次,共读 5 次。以 1 min *D* 值变化(升高)0.01 为 1 个酶活性单位(U)来计算结果。

$$POD[U/(g \cdot \min)] = (\Delta D_{470 \text{ nm}} \times V_t) / (m \times V_s \times 0.01 \times t)。$$



a~d—整株侵染 0、2、12、24 h; e~h—离体叶片侵染 0、2、12、24 h

图1 接种玉米圆斑菌显微观察

## 2.2 圆斑病菌侵染后过氧化物酶(POD)酶活性变化

由图 2 可见,玉米圆斑病菌侵染后,离体叶片和活体整株叶片的 POD 酶活性呈现出先下降后升高再下降的相同趋势,但变化均并不明显,整体来看趋于稳定。

## 2.3 光合荧光参数测定

光合荧光参数  $F_v/F_m$  表示光合系统 II (PS II) 的最大光合潜能,是反映植物生长状态的一项重要生理指标。由图 3 可见,接种玉米圆斑病菌后叶片的光合荧光参数  $F_v/F_m$  变化不大,一直处于正常范围内,说明在侵染前期,植株并未受到明显影响。从图 3 中还可看出,离体叶片和活体叶片的光合荧光参数  $F_v/F_m$  都是处于正常范围内小幅波动。

## 2.4 圆斑病菌侵染后关键基因表达量分析

*pr3*、*pr5* 基因为病害诱导的重要标记基因。图 4 为接种玉米圆斑病菌后 *pr3*、*pr5* 基因的 Real-time PCR 结果。由图 4 可见,离体叶片接菌 24 h 引起 *pr3* 和 *pr5* 基因表达急剧上

式中: $\Delta D_{470 \text{ nm}}$  为反应时间内吸光度的变化; $m$  为样品鲜质量, g; $t$  为反应时间, min; $V_t$  为提取酶液总体积, mL; $V_s$  为测定时取用酶液体积, mL。

1.3.6 光合荧光参数测定和数据分析 将接菌后不同时间取样的玉米叶片暗处理 30 min,使用调制叶绿素荧光成像系统测定荧光参数  $F_v/F_m$ ,数据用 Imaging Win v2.41a 读出,导入 Excel 中进行分析。 $F_v/F_m$  表示 PS II 的最大光合潜能,计算公式为  $F_v/F_m = (F_m - F_o)/F_m$ 。

1.3.7 关键基因表达量分析 利用 TaKaRa 公司的 RNAiso Plus(Total RNA 提取试剂盒)进行提取玉米叶片 RNA。经 M-MLV 反转录成 cDNA,然后利用 Toyobo 公司的 SYBR® Green Realtime PCR Master Mix 进行 Real-time PCR。反应程序为:94 ℃ 30 s;94 ℃ 5 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 15 s,共 40 个循环。以 18S 作为内参,采用 2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup> 法分析基因相对表达量。

## 2 结果与分析

### 2.1 玉米圆斑病菌离体侵染及整株活体侵染及显微观察

由图 1 可见,离体叶片和活体叶片接菌后,玉米圆斑病菌均在接菌处理 2 h 开始萌发,12 h 菌丝伸长侵入组织,24 h 菌丝大量繁殖。表明离体叶片接菌和整株活体接菌对玉米圆斑病菌的侵染过程并未产生影响,试验中可以替代活体植株。

调,活体侵染 12~24 h 同样引起了上述 2 个基因的显著上调。说明无论是离体叶片还是活体叶片,病菌的侵入均调控了相关标记基因的表达,植物体启动了抵抗病菌侵入的程序来对抗病菌的入侵,即 *pr* 基因表达上调。

bZIP 转录因子是植物中普遍存在的一类转录因子,参与各种胁迫的早期调控,其中 B 亚族为驻膜转录因子,在正常条件下存在于内质网膜上,当受到侵害时会调控相关应答基因的表达,来抵抗外界胁迫。*bzip28*、*bzip17* 和 *bzip60* 都是驻膜转录因子,由图 5 可见,在玉米圆斑病菌侵染玉米后,无论是离体叶片还是活体叶片中的 *bzip28* 表达量均明显上调,二者表现一致。

## 3 结论与讨论

本试验通过 2 种病原菌对玉米进行短期侵染试验,分别采用离体叶片侵染和整株活体侵染 2 种方法的比较,期间对

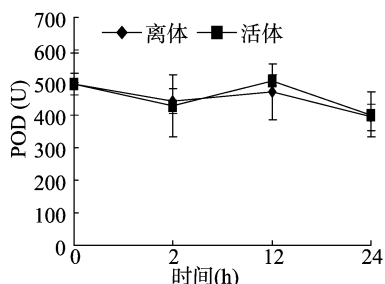


图2 接种玉米圆斑病后 POD 酶活性变化

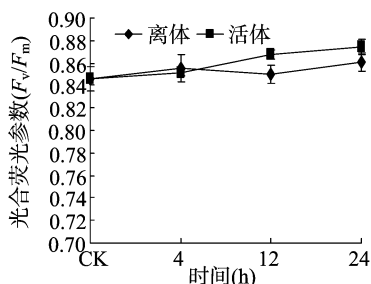


图3 接种玉米圆斑病菌后光合荧光参数变化

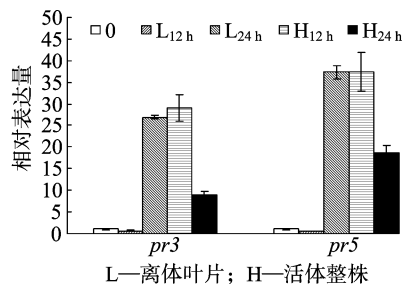


图4 病害相关pr基因表达量分析

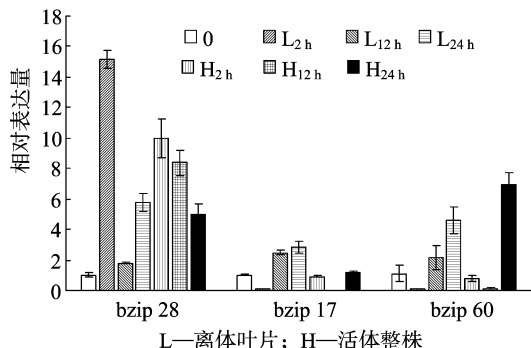


图5 相关 ZmbZIPs 转录因子表达量分析

2 种侵染方法的叶片进行显微观察、POD 酶活性测定、NBT 活性氧染色、光合荧光参数测定以及关键基因的表达量分析来对比 2 种侵染体系在侵染前期对植物的影响。结果表明,离体叶片侵染和整株活体侵染在侵染前期并无明显差别,而离体叶片侵染较活体整株侵染操作简单且重复性好。结果表明,在研究侵染前期病原菌诱导病害相关基因调控下游靶基因的信号途径时,可以采用较为方便快捷且节省试验材料的方法来进行取样,离体叶片侵染可以满足试验要求。

bZIP 类转录因子在总数上占较大比重,且不同的物种所含有 bZIP 转录因子基因家族成员不同。对于植物在逆境下的基因表达调控具有重要作用。转录因子也称反式作用因子,可以直接或间接地识别或结合在各类顺式作用元件核心序列上,从而参与调控靶基因转录效率的蛋白质,广泛参与植物低温、干旱、高盐、抗病等逆境应答以及植物生长发育的调控。以往的 bZIP 转录因子很多研究主要集中在非生物胁迫如干旱、高盐、激素等作用中的调节机制,但对生物胁迫下 bZIP 转录因子的功能研究报道较少,尤其在对病原菌侵染的应答方面研究还不是很完善。通过圆斑病菌侵染离体与活体植株的研究证实,bZIP 转录因子在信号传导途径前期发挥作用,在侵染 24 h 时叶片仍然维持正常的生理状态。在保温保湿的条件下,72 h 后叶片出现叶边缘发黄萎蔫的情况,白亚君等指出,在接菌的时候为了避免菌碟脱落需要用木片或线绳固定<sup>[16]</sup>,这就给试验造成了一定的困难,本试验采用的离体接菌方式在培养皿中接菌,不存在菌碟脱落的困扰,结合以上试验数据可初步判定,在病菌侵染早期,即 72 h 以内可以采用离体叶片接菌的方式作为一种方便快捷的试验方法。

#### 参考文献:

- [1] 刘 铭. 玉米圆斑病菌生物学特性研究[J]. 现代农业科技, 2014(20):110-112.
- [2] Renfro B L, Ullstrup A J. A comparison of maize diseases in temper-

ate and in tropical environments[J]. Pest Articles and News Summaries, 1976, 22:491-498.

- [3] 杨继良, 王 斌. 玉米大斑病抗性遗传的研究进展[J]. 遗传, 2002, 24(4):501-506.
- [4] 李兰真, 赵会杰, 杨会武. 小麦锈病与活性氧代谢的关系(简报)[J]. 植物生理学通讯, 1999, 35(2):115.
- [5] 宋瑞芳, 丁永乐, 宫长荣, 等. 烟草抗病性与防御酶活性间的关系研究进展[J]. 中国农学通报, 2007, 23(5):309-314.
- [6] Ullstrup, Arnold J. Two physiologic race of *Helminthosporium maydis* in the Corn Belt[J]. Phytopathology, 1944, 31:508-521.
- [7] 姜方正. 中国禾本科植物上的蠕形菌(*Helminthosporium*)[J]. 植物病理学报, 1959, 5(1):21-34.
- [8] Slabaugh E, Brandizzi F. Membrane-tethered transcription factors provide a connection between stress response and developmental pathways[J]. Plant Signaling & Behavior, 2011, 6(8):1210-1211.
- [9] Jakoby M, Weisshaar B, Drue-Laser W, et al. The family of bZIP transcription factors in *Arabidopsis thaliana* [J]. Trends in Plant Science, 2002, 7(3):106-111.
- [10] Hussain S S, Kauami M A, Amjad M. Transcription factors as tools to engineer enhanced drought stress tolerance in plants [J]. Biotechnology Progress, 2011, 27(2):297-306.
- [11] Xing H Y, Pidale R N, Guo G G, et al. Genome-wide identification and expression profiling of auxin response factor (ARF) gene family in maize[J]. BMC Genomics, 2011, 12:178.
- [12] Hirst H C. Transcription factors. 1: bZIP proteins [J]. Protein Profile, 1994, 1(2):123-168.
- [13] 邹芳斌, 司龙亭, 李 新, 等. 黄瓜枯萎病抗性与防御系统几种酶活性关系的研究[J]. 华北农学报, 2008, 23(3):181-184.
- [14] Kochba J, Lavee S, Spiegel-Roy P. Difference in peroxidase activity and isoenzymes in embryogenic and non-embryogenic 'Shamoufi' orange ovular callus lines[J]. Plant & Cell Physiology, 1977, 18(2):467.
- [15] 张天宇. 蠕形分生孢子真菌[M]. 北京:科学出版社, 2010.
- [16] Heinekamp T, Kuhlmann M, Lenk A, et al. The tobacco bZIP transcription factor BZI-1 binds to G-box elements in the promoters of phenylpropanoid pathway genes in vitro, but it is not involved in their regulation *in vivo* [J]. Molecular Genetics and Genomics, 2002, 267(1):16-26.
- [17] Steathmann A, Kuhlmann M, Heinekamp T, et al. BZI-1 specifically heterodimerises with the tobacco bZIP transcription factors BZI-2, BZI-3/TBZF and BZI-4, and is functionally involved in flower development[J]. Plant Journal, 2001, 28(4):397-408.
- [18] 白亚君, 刘海英, 范永山, 等. 玉米感染不同致病性玉米大斑病菌后 SOD 活性的动态变化[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(28):13821-13823.