

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2011.00793

利用红色荧光蛋白标记的轮枝镰孢研究病原菌对玉米根系的系统侵染和定殖

吴磊^{1,2} 王晓鸣^{2,*} 徐荣旗³ 李洪杰^{2,*}

¹河北科技师范学院生命科技学院, 河北昌黎 066600; ²中国农业科学院作物科学研究所 / 农作物基因资源与基因改良国家重大科学工程, 北京 100081; ³中国农业科学院生物技术研究所, 北京 100081

摘要: 采用农杆菌介导法将红色荧光蛋白基因 *DsRed* 转入轮枝镰孢 Fv-1 菌株, 利用荧光显微镜观察轮枝镰孢在玉米自交系 B73 根部定殖和生长的规律。土壤中的轮枝镰孢首先侵染玉米的须根等组织, 并在其中大量增殖, 随后沿主根向上侵染, 以菌丝的形式扩展到地上组织。有些孢子附着在根表面的纹理中, 萌发形成菌丝而扩展; 有的则向内侵染附着的细胞, 然后再继续向周边侵染。由根内部向上侵染的菌丝多沿着细胞间隙上行, 有些也会穿行在不同细胞之间。分析接种不同时间轮枝镰孢在玉米根和茎基部组织形成的单菌落数量(CFU)发现, 轮枝镰孢在根部的 CFU 值随时间逐渐减小, 而茎基部的 CFU 值则呈逐渐增大的趋势。这说明土壤中的轮枝镰孢能够通过根系侵染途径危害地上部组织。本研究的结果为进一步探明轮枝镰孢和玉米之间的互作关系, 以及其他土传真菌与植物之间的互作提供了有益的参考。

关键词: 玉米; 轮枝镰孢; *DsRed*; 互作; 系统定殖; 单菌落数量(CFU)

Root Infection and Systematic Colonization of *DsRed*-labelled *Fusarium verticillioides* in Maize

WU Lei^{1,2}, WANG Xiao-Ming^{2,*}, XU Rong-Qi³, and LI Hong-Jie^{2,*}

¹ College of Life Science and Technology, Hebei Normal University of Science & Technology, Changli 066600, China; ² Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences / National Key Facility for Crop Gene Resources and Genetic Improvement, Beijing 100081, China; ³ Biotechnology Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China

Abstract: *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg [syn. *F. moniliforme* J. Sheld., teleomorph: *Gibberella fujikuroi* (Sawada) Ito in Ito & K. Kimura] is an important causal agent of diseases in maize (*Zea mays* L.) worldwide, which invades maize plants at all growth stages. This filamentous fungus not only incites obvious symptoms on maize ear, stem, root, and seedling, but also is able to infect plants without any visible symptom (endophytic infection). This makes difficult to detect interaction between this fungus and its hosts. Fluorescent reporter gene-labelled filamentous fungus permits *in vitro* and *in planta* monitoring growth and development of the fungus. In this study, gene *DsRed* encoding red fluorescent protein was delivered into *F. verticillioides* strain Fv-1 via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. Using the *DsRed*-tagged *F. verticillioides*, systemic colonization of the fungus in roots and stems of the susceptible maize inbred line B73 was investigated. The aim of this study was to understand the interaction between *F. verticillioides* and maize. The fungus invaded and multiplied inside the lateral root tissues. Some conidia tended to colonize on the veins of the maize root surface and grew along the veins after their germination. Others penetrated the plant cells where they attached and formed hyphae for attacking other cells nearby. Usually, the mycelia migrated from root to stem through intercellular parts of tissues, while some mycelia run across different host cells. Analysis of colony forming unit (CFU) from diseased plants demonstrated that following inoculation the CFU values from roots tended to decrease, but those from stems inclined to increase. This indicates that *F. verticillioides* is able to attack the aboveground parts of plant via systemic colonization on roots. The results from the present study are useful in disclosing the interaction between *F. verticillioides* and maize, and can be extended to studying interactions between other soil-borne fungi and plants.

本研究由国家“十一五”科技支撑计划项目(2006BAD02A16-3)资助。

* 通讯作者(Corresponding authors): 李洪杰, E-mail: hongjie@caas.net.cn; 王晓鸣, E-mail: wangxm@mail.caas.net.cn

第一作者联系方式: E-mail: 1985wulei@163.com

Received(收稿日期): 2010-10-20; Accepted(接受日期): 2011-03-08.

Keywords: Maize; *Fusarium verticillioides*; DsRed; Interaction; Systemic colonization; CFU (colony forming unit)

玉米茎腐病在中国乃至全世界玉米生产区都有普遍发生^[1]。近年来,受耕作制度(如保护性耕作、秸秆还田等)的改变和气候变化的影响,我国玉米茎腐病的发生正逐渐加重^[2]。玉米茎腐病的主要致病菌之一轮枝镰孢(*Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg)不仅能侵染玉米的根、茎和穗,引起苗枯病、茎腐病和穗腐病,还能像内生菌那样既能定殖于植株体内又不引起病症^[3-5]。

轮枝镰孢侵染玉米的途径之一是通过种子带菌引起植株的系统侵染,它首先通过种子进入初生根,然后根向上进入植株的茎髓^[6-8]。另一种侵染途径是其分生孢子通过气流落到花丝上,进而侵染籽粒,或落到叶鞘缝隙处侵染茎节或叶鞘组织^[9-12]。第 3 种是土壤中的病菌通过菌丝的生长直接侵染玉米植株根系,然后继续向上侵染植株地上组织。关于土传的轮枝镰孢对玉米根部的定殖和系统侵染的结论不尽相同^[5,13-14]。

常规研究植物与病原菌互作的方法无法实现实时、活体观察病原菌的行为及其寄主的响应。荧光蛋白标记系统为寄主与微生物的互作研究提供了一种直观、非破坏性的技术,可以揭示病原菌(特别是观察比较困难的土传病原菌)系统侵染植物的动态过程^[15-17]。

绿色荧光蛋白(GFP)是一种广为利用的报告基因编码的蛋白,能够在特定的激发光下发出绿色荧光^[18]。来源于海葵(*Discosoma striata*)的红色荧光蛋白(DsRed)是 GFP 的一种同源蛋白,能够发出明亮的红色荧光,可以作为另一种颜色的荧光蛋白标记,单独或与绿色荧光蛋白一起,研究不同真菌或同一真菌的不同菌株与植物的互作。与 GFP 相比,DsRed 蛋白的成熟时间和荧光寿命更长^[19]。在高激发光(558 nm/583 nm)下,DsRed 蛋白具有较高的信噪比和抗淬灭特性^[20]。DsRed 已经被用于织片草螺菌(*Herbaspirillum seropedicae*)^[21]和尖孢镰孢(*Fusarium oxysporum*)^[22]等细菌和真菌与植物的互作研究。本研究的目的是利用红色荧光蛋白基因 *DsRed* 转化轮枝镰孢,并用于研究致病菌对玉米的系统侵染和定殖过程。

1 材料与方 法

1.1 植物材料

玉米自交系为 B73,该自交系对轮枝镰孢引起

的茎腐病表现高度感病。

1.2 菌株和质粒

轮枝镰孢 Fv-1 菌株是本实验室从玉米植株上分离并保存的,经过形态鉴定及 ITS 序列分析,确证为轮枝镰孢。携带 *DsRed* 基因的质粒 pCAMDsRed 由 Marina Franceschetti (John Inner Center, UK)惠赠。*DsRed* 基因受构巢曲霉 3-磷酸甘油醛脱氢酶基因 *gpdA* 的启动子 *PgpdA* 调控,以潮霉素 B 抗性基因 *hyg* 作为选择标记基因^[23]。

1.3 转化方法和转化子检测

利用农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)介导法^[24],将红色荧光蛋白基因 *DsRed* 转移到野生型轮枝镰孢 Fv-1 菌株中,在含潮霉素 B ($100 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$)的 Potato Dextrose Agar (PDA)培养基上获得阳性克隆,经纯化后在 Potato Dextrose Broth (PDB)中培养 5 d,采用尿素法提取真菌基因组 DNA,用 *DsRed* 基因 (*DsRed*-A: 5'-ACTCCTCCGAGGACGTCATCAA-3' 和 *DsRed*-B: 5'-ACGTAGTAGTAGCCGGGCAGCT-3') 和潮霉素 B 抗性基因 *hyg* (*Hyg*-8F: 5'-GCAGACAG GAACGAGGACAT-3'和 *Hyg*-8R: 5'-GCTCCATACA AGCCAACCAC-3')的特异性引物扩增,检测 *DsRed* 基因和 *hyg* 基因是否插入到转化子基因组中。PCR 循环参数为 95 预变性 5 min; 95 30 s, 58 或 56 (*DsRed* 或 *hyg*) 30 s, 72 8 min, 30 个循环; 最后 72 延伸 10 min,用 1.2%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。利用荧光显微镜(Olympus BX60, 日本东京)观察转化子的荧光表达。表达荧光的转化子(命名为 Fv-DsRed)在不含潮霉素 B 的 PDA 培养基上继代 5 次,然后再转接至含潮霉素 B ($100 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$)的 PDA 培养基上,以确定插入基因 *DsRed* 在转化子中的遗传稳定性。利用 Southern 杂交确定 T-DNA 在转化子中的拷贝数,探针为地高辛标记的 *DsRed* 基因 PCR 扩增产物,采用 Digoxigenin Labeling Kit (Roche, 德国 Mannheim)进行探针标记和信号检测。

1.4 转化子生长特性分析

红色荧光标记菌株 Fv-DsRed 和野生型菌株 Fv-1 在 Capzek 液体培养基中培养 3 d,调节孢子悬浮液浓度至 $1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$,各取 5 μL 孢子悬浮液接种到 PDA 平板培养基中央(直径 9 cm),25 培养,每天测定 1 次菌落直径,直到第 7 天菌落长满培养皿。制备含有脱脂奶粉(1.0%, W/V)、纤维素(0.5%, W/V)、

淀粉(0.1%, W/V)和果胶(1.0%, W/V)的 Capzek 盐培养基, 比较转化子与野生型轮枝镰孢在蛋白酶、纤维素酶、淀粉酶和果胶酶等胞外酶的代谢。将 5 μ L 孢子悬浮液接种到上述含不同碳源的 Capzek 盐培养基中央, 25 $^{\circ}$ C 培养 2 d 后, 分别测定菌落直径(Dr)和产生透明环的直径(Dp)。以 Dp/Dr 的比值大小来评价轮枝镰孢胞外酶的代谢能力^[25]。

1.5 轮枝镰孢对玉米侵染的观察

将玉米自交系 B73 的种子用 75%酒精和 5%次氯酸钠溶液分别处理 10 min 和 30 min, 进行表面消毒。用无菌水冲洗 4 次, 无菌滤纸上干燥 1 h, 然后在无菌水中浸泡过夜。将种子播种于直径为 15 cm 的花盆中, 每盆播种 4 粒种子, 每盆装有 250 g 与 50 mL Fv-DsRed 孢子悬浮液(含 0.2% Tween-20)混匀的灭菌蛭石, 孢子浓度为 2×10^9 mL⁻¹, 以无菌水为空白对照。分别在接种后 1、3、8、12、16 和 21 d 取根(1 株对照根, 3 株接种根), 用无菌水冲洗, 观察样本的横切面和纵切面的徒手切片, 或将整体根在无菌水中铺展于载玻片上, 用 0.25%琼脂糖封片。利用荧光显微镜和激光共聚焦荧光显微装置 Leica TCS SP2 (Leica Microsystems GmbH, 德国 Wetzlar)观察, 激发光波长为 558 nm/583 nm。

1.6 病菌在组织中定殖相对量检测

CFU(colony forming unit)即定殖于寄主中的真菌在固体培养基上形成的单菌落数量。采用与上述轮枝镰孢侵染玉米相同的方法分别接种荧光标记(Fv-DsRed)和野生型(Fv-1)轮枝镰孢菌株测定 CFU。种子发芽后 7、14 和 21 d 取玉米根和茎基部组织, 称重后用搅拌器打碎, 再用 10 mL (含 0.2% Tween-20)无菌水进行稀释, 然后取 5 μ L 混合液均匀涂布在

PCNB、SFA、DCPA 和 MPDA 培养基上^[26-28]。培养 2 d 后记录培养基上的菌落数。以每克根(茎)所形成的 CFU 来定量分析轮枝镰孢在玉米根/茎基部的定殖。

1.7 实验设计和数据统计分析

对转化子特性分析设 3 次重复, CFU 测定设 5 次重复。这些分析均进行 2 次独立实验。计算每个测定指标的平均数和标准差, 进行方差分析, 利用最小显著差数法(LSD)比较平均数的差异显著性。CFU 测定值在方差分析之前进行对数转换。统计分析在 SAS 统计软件(Version 9.1, SAS Institute, 美国 Cary)上进行。

2 结果与分析

2.1 轮枝镰孢的遗传转化与特性鉴定

2.1.1 遗传转化和分子检测 利用农杆菌介导法将 *DsRed* 基因整合到轮枝镰孢 Fv-1 菌株基因组中, 获得红色荧光蛋白基因标记的菌株 Fv-DsRed。利用 *DsRed* 和 *hyg* 基因特异性引物从 Fv-DsRed 基因组 DNA 中能扩增到 579 bp 和 800 bp 的目的片段, 质粒 pCAMDsRed 中也能扩增出相同的片段, 而野生型 Fv-1 菌株中无扩增片段(图 1-A, B), 表明 *DsRed* 基因已经转入轮枝镰孢 Fv-1 菌株的基因组中。Southern 杂交结果显示, *DsRed* 基因在轮枝镰孢基因组中是单一拷贝(图 1-C)。

2.1.2 转化子的荧光表达和 *DsRed* 基因的遗传稳定性 *DsRed* 基因转化的 Fv-DsRed 菌丝和分生孢子子在形态上与野生型菌株 Fv-1 相似(图 2-A, B)。在荧光显微镜下观察, Fv-DsRed 的菌丝和分生孢子都能激发出明亮的红色荧光(图 2-C), 而 Fv-1 的菌丝

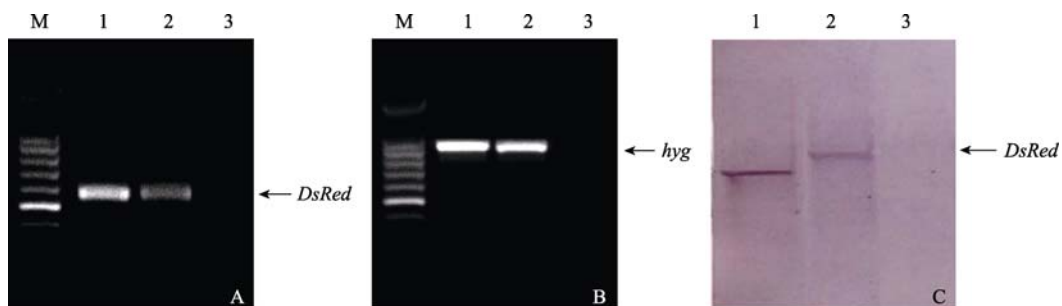


图 1 *DsRed* 标记的 Fv-DsRed 菌株中 *DsRed* 基因(A)和 *hyg* 基因(B)的 PCR 检测与 Southern 杂交分析(C)

Fig. 1 DNA amplification with the primers specific for genes *DsRed* and *hyg* and Southern blotting analysis of the *DsRed*-tagged *Fusarium verticillioides* strain Fv-DsRed

M: 100 bp DNA 分子量标记; 1: pCAMDsRed 质粒; 2: 转化子 Fv-DsRed; 3: 野生型 Fv-1。

箭头示特异扩增片段或 *DsRed* 基因特异杂交片段。

M: 100 bp DNA ladder; 1: Plasmid CAMDsRed; 2: Transformant Fv-DsRed; 3: Wild-type Fv-1. Arrows indicate the diagnostic amplification fragments or *DsRed* gene-specific hybridization fragment.

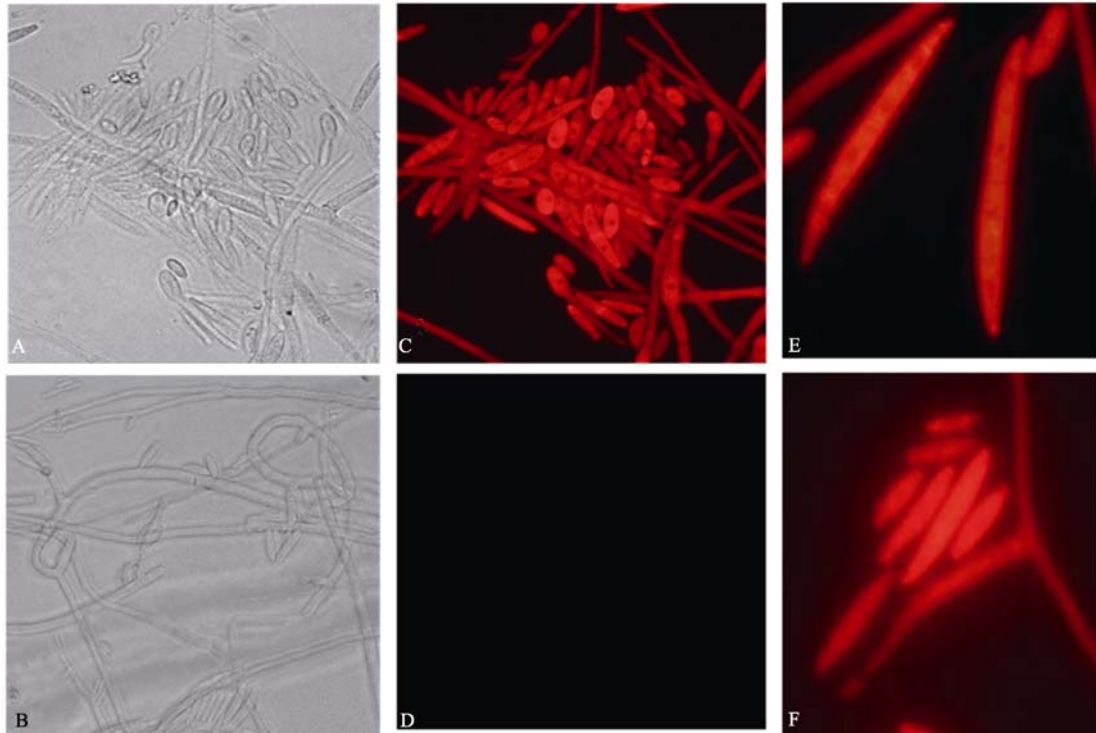


图 2 DsRed 标记的轮枝镰孢菌株 Fv-DsRed 菌丝和分生孢子中红色荧光蛋白的表达

Fig. 2 Mycelia and conidia of DsRed-tagged *Fusarium verticillioides* strain Fv-DsRed

A 和 C: Fv-DsRed 的分生孢子和菌丝在明场(A)和荧光(C)显微镜下的表现; B 和 D: Fv-1 的分生孢子和菌丝在明场(B)和荧光(D)显微镜下的表现; E 和 F: Fv-DsRed 的大孢子(E)和小孢子(F)。

A and C: Hypha and conidia of Fv-DsRed under bright field (A) and epifluorescent (C) microscopy. B and D: Hypha and conidia of Fv-1 under bright field and (B) epifluorescent (D) microscopy. E and F: Macrospores (E) and microspores (F) of Fv-DsRed.

和分生孢子无荧光表达(图 2-D)。DsRed 在 Fv-DsRed 的细胞核、细胞质和细胞壁等各种细胞结构中都能表达,但液泡中少有荧光表达(图 2-A, E, F)。

将 Fv-DsRed 在不含潮霉素 B 的 PDA 培养基上继代 5 次后,重新转接至含有潮霉素 B 的培养基上, Fv-DsRed 仍然能正常生长,表明插入基因 *DsRed* 在轮枝镰孢中是能够稳定遗传和表达的。

2.1.3 转化子的生长特性与胞外酶代谢检测 在相同培养条件下, Fv-DsRed 和 Fv-1 在 PDA 平板上生长速度均匀,除第 7 天外, Fv-DsRed 的菌落直径都略大于 Fv-1,但差异不显著($P > 0.05$)(图 3)。

在含有脱脂牛奶、纤维素、淀粉和果胶的查比克盐培养基上 Fv-DsRed 均能生长,其 Dp/Dr 值在 1.05~2.08 之间,与相应 Fv-1 的 Dp/Dr(1.02~2.02)没有显著差异($P > 0.05$)(图 4),表明 Fv-DsRed 菌株中外源基因 *DsRed* 的插入对轮枝镰孢胞外酶的代谢无明显影响。另外, Fv-DsRed 和 Fv-1 在含果胶培养基上的 Dp/Dr 值最大,与其他 3 种酶(蛋白酶、纤维素酶和淀粉酶)相比差异显著($P < 0.05$)。说明轮枝镰孢 Fv-DsRed 和 Fv-1 菌株产生和利用果胶酶的能力明

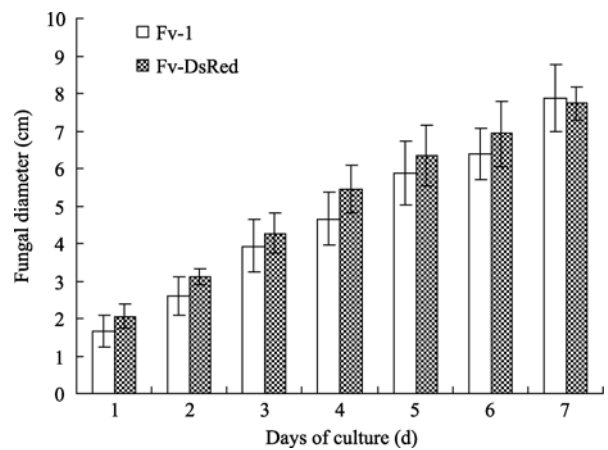


图 3 DsRed 标记的 Fv-DsRed 菌株与野生型 Fv-1 菌株在 PDA 上的菌落直径比较

Fig. 3 Comparison of colony diameters on PDA between DsRed-tagged strain Fv-DsRed and the wild type strain Fv-1 图中的误差线示标准误。

Error bars in the figure indicate the standard errors.

显高于其他 3 种酶。

2.2 轮枝镰孢在玉米根系的系统侵染与定殖

2.2.1 轮枝镰孢引起玉米根系组织病变与菌丝的定

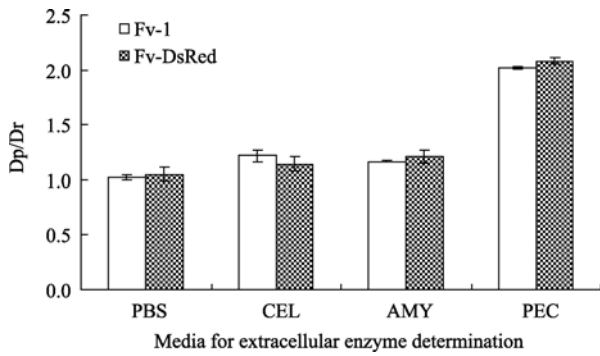


图 4 DsRed 标记的 Fv-DsRed 菌株与野生型 Fv-1 菌株的胞外酶代谢比较

Fig. 4 Comparison of metabolism of extracellular enzymes for the DsRed-tagged strain Fv-DsRed and the wild strain Fv-1. PBS: 测定蛋白酶代谢的 Capzek 盐+脱脂牛奶培养基; CEL: 测定纤维素酶代谢的 Capzek 盐+纤维素培养基; AMY: 测定淀粉酶代谢的 Capzek 盐+淀粉培养基; PEC: 测定果胶酶的 Capzek 盐+果胶培养基。图中的数据为产生的透明环直径(Dp)与菌落直径(Dr)的比值(Dp/Dr)。误差线示标准误。

PBS: Capzek salt + nonfat-dried milk medium for determining proteinase metabolism; CEL: Capzek + cellulose medium for determining cellulase; AMY: Capzek + starch for determining amylase; PEC: Capzek + pectin for determining pectase. The data presented in the figure represent the ratios of transparency (Dp) to radius (Dr) of colony. Error bars in the figure indicate the standard errors.

殖 以土壤带菌的方法接种轮枝镰孢菌株 Fv-DsRed 和 Fv-1。播种 28 d 后, 接种的玉米植株根系发育较未接种对照的根系发育差, Fv-DsRed 与 Fv-1 接种的玉米根系上出现相似的症状, 未接种对照则无症状(图 5-A)。侵染早期, 轮枝镰孢主要侵染玉米的伸长区(图 5-B, C), 较少侵染代谢旺盛的根尖和分生区(图 5-D)。受侵染的部位形成褐色病斑, 随着侵染时间的延长和程度的加深, 病斑由浅褐色转变成褐色, 甚至黑色, 病斑逐渐扩展, 最终覆盖整个玉米根系。

取病斑程度不同的根组织在荧光显微镜下观察发现, 根部形成的小的浅色病斑及其周围有大量菌丝生长, 菌丝生长的范围往往超过其形成的病斑大小(图 5-E, F), 在颜色较深的大的病斑中也有菌丝定殖, 但是菌丝的扩展范围局限于病斑中(图 5-G, H)。有些玉米根部形成的病斑是围绕着主根上须根着生部位开始扩展的, 病斑形成初期也会像根表面一样在病斑周围可见大量的菌丝定殖生长(图 5-I, J)。随着病斑的扩展, 病斑颜色由浅变深, 从褐色(图 5-K)、深褐色(图 5-M), 最终表现为黑色(图 5-O)。病斑内菌丝的生长则随着病斑颜色的加深而减少, 褐色病斑中表现红色荧光的菌丝局限在病斑周围(图 5-L), 深褐色的病斑只在局部有菌丝定殖(图 5-N),

黑色的病斑中很少观察到病原菌的定殖(图 5-P)。

2.2.2 轮枝镰孢在玉米根组织中的系统扩展

荧光显微观察发现, 红色荧光蛋白标记的轮枝镰孢菌株 Fv-DsRed 首先侵染玉米的须根等组织, 并在其中大量增殖, 随后沿主根向上侵染, 菌丝在根组织内部向上扩展(图 6-A), 但并不在主根内大量增殖。孢子萌发后会形成类似“附着胞”样的结构侵染周围的细胞(图 6-B, C)。有些孢子附着在根表皮的纹理中, 萌发形成菌丝, 向上扩展(图 6-D, E)。菌丝沿着细胞间隙扩展(图 6-F), 或侵入细胞内部, 穿行于多个细胞之间(图 6-G)。有些菌丝则集中定殖在一个细胞中(图 6-H, I)。玉米茎基部定殖的轮枝镰孢多位于细胞间隙中(图 6-J, K)。在玉米根表面的菌丝会交织成网状, 还会形成一些圈状结构(图 6-L, M)。在根部形成的浅褐色病斑中, 能够观察到大量菌丝(图 6-N, O)。

2.3 轮枝镰孢在玉米上定殖的定量分析

利用 4 种选择性培养基 PCNB、SFA、DCPA 和 MPDA 测定轮枝镰孢在玉米根系和茎基部组织的 CFU 值。其中, MPDA 上长出的菌落多, 而且由于没有添加任何抗生素或抑制物质, 因而被其他真菌和细菌污染的情况严重, 导致统计的结果重复性差。而 PCNB、SFA 和 DCPA 培养基的结果基本一致(数据未列出), 但在 PCNB 和 DCPA 培养基上长出的菌落数较多, 尤其是在 PCNB 上形成的菌落非常小, 容易增加人为误差, 而且 PCNB 和 DCPA 培养基中含有胰蛋白胨(Peptone)会导致轮枝镰孢积累产生的毒素。在 SFA 培养基上长出的菌落数适当, 菌落较大, 易于观察, 而且细菌污染较少, 适合于轮枝镰孢的 CFU 测定。

利用 SFA 选择培养基定量测定 Fv-DsRed 和 Fv-1 菌株接种后不同时间在玉米根和茎基部组织的定殖。在玉米种子萌发生长的早期, 轮枝镰孢在根部组织的定殖最多, 播种后 7 d 和 14 d 的 CFU 值没有显著差异($P > 0.05$), 但显著高于播种 21 d 的 CFU 值($P < 0.05$)(图 7)。与此不同, 轮枝镰孢在茎基部组织的定殖数量与根部结果相反, 在播种后 21 d 的 CFU 值显著高于播种后 7 d 的 CFU 值。说明轮枝镰孢在侵染根部后, 并没有在玉米根部大量繁殖, 而是沿着根系向上侵染。Fv-DsRed 和 Fv-1 的结果一致, 在各时间点上两者的 CFU 值差异均不显著($P > 0.05$)(图 7), 两者的相关系数在根和茎中分别为 $r=0.93^*$ ($P < 0.05$)和 $r=0.99^*$ ($P < 0.05$)。



图 5 DsRed 标记和野生型轮枝镰孢在玉米根系组织上的病症与菌丝的定殖

Fig. 5 Symptoms on maize roots incited by DsRed-tagged and the wild-type strains of *Fusarium verticillioides* and colonization of mycelia
 A: 接种轮枝镰孢玉米的根部症状比较。1: 未接种对照; 2: 接种 Fv-DsRed 的玉米; 3: 接种野生型 Fv-1 的玉米。B: 玉米接种后苗期发病症状。C: 玉米根部出现症状的伸长区部分。D: 玉米根尖和分生区, 不表现症状。E~P: Fv-DsRed 在玉米根部组织的侵染与定殖。E 和 F: 玉米根部形成的浅褐色病斑(E)和定殖的菌丝(F); G 和 H: 玉米根部形成的褐色病斑(G)和定殖的菌丝(H); I 和 J: 玉米须根着生部位形成的浅褐色病斑(I)和定殖的菌丝(J); K 和 L: 玉米须根着生部位形成的褐色病斑(K)和定殖的菌丝(L); M 和 N: 玉米须根着生部位形成的深褐色病斑(M)和定殖的菌丝(N); O 和 P: 玉米须根着生部位形成的黑色病斑(O)和定殖的菌丝(P)。
 A: Symptoms on the root systems of maize following inoculation with DsRed-tagged and the wild-type strains of *Fusarium verticillioides*.
 1: Uninoculated control; 2: Inoculated with Fv-DsRed; 3: Inoculated with Fv-1. B: Symptoms on the seedlings of maize. C: Lesions on the elongation region of maize roots. D: Symptomless root tips. E to P: Colonization of Fv-DsRed and lesions on maize roots observed under bright field microscopy (E, G, I, K, M, and O) and epifluorescent microscopy (F, H, J, L, N, and P). E and F: Sandy beige lesion formed on the root (E) and the fungi located across the lesions (F). G and H: Brown lesion formed on root (G) and the fungi located around the lesion (H). I and J: Sandy beige lesion formed on the region of main root where the fibrous root resides (I) and the fungi located across the lesion (J). K and L: Brown lesion formed on the adjacent region between main root and the fibrous root (K) and the fungi located within the lesion (L). M and N: Dark brown lesion formed on the region of main root where the fibrous root resides (M) and the fungi located on the lesion (N). O and P: Black lesion formed on the region of main root where the fibrous root resides (O) and the fungi located on the lesion (P).

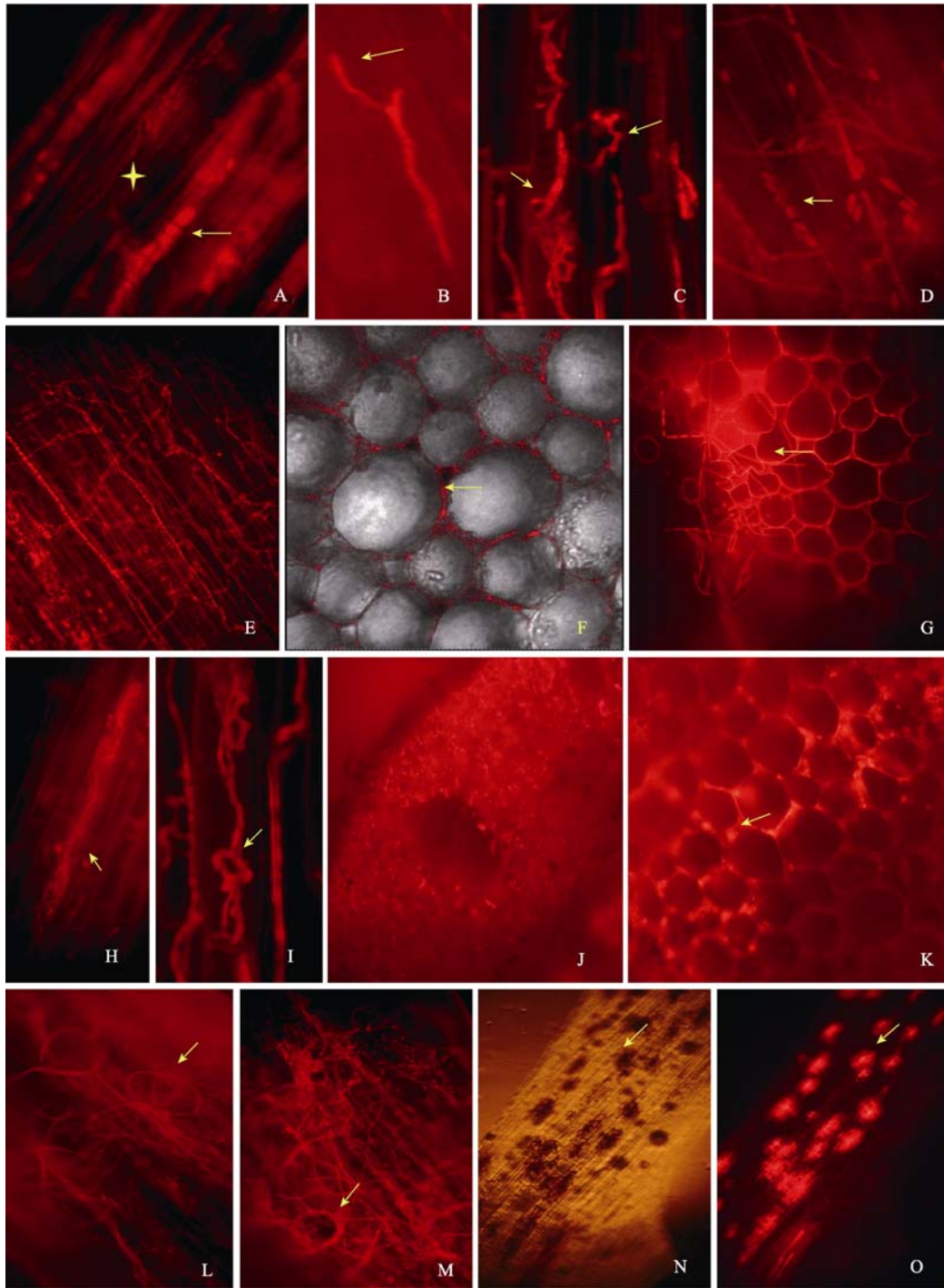


图 6 DsRed 标记的轮枝镰孢菌株 Fv-DsRed 在玉米根部的系统侵染与定殖

Fig. 6 Systemic infection and colonization of DsRed-tagged *Fusarium verticillioides* strain Fv-DsRed on maize root

A: 在玉米根内形成的正常菌丝(星号)与膨大菌丝(箭头); B: 轮枝镰孢在玉米根部形成的“附着胞”状结构(箭头); C: 在根内部萌发的分生孢子形成的“附着胞”样结构(箭头); D: 孢子附着在根表皮的纹理中(箭头), 菌丝则沿着纹理走行; E: 菌丝在玉米根表面形成网状结构; F: 激光共聚焦显微镜下观察定殖在细胞间隙的菌丝(箭头); G: 在细胞之间生长的菌丝(箭头); H: 定殖在一个细胞中的菌丝(箭头); I: 在玉米根组织细胞中菌丝形成的类似菌丝圈样的结构(箭头); J 和 K: 扩展到玉米茎基部的菌丝(箭头); L: 在玉米根细胞内菌丝形成的网状结构(箭头); M: 菌丝在根表面形成菌丝圈(箭头); N: 玉米根部形成的可见病斑(箭头); O: 荧光显微镜下病斑的形态(箭头)。

A: Normal (asterisk) and swelled (arrow) hypha grown in the root. B: Appressorium-like structure of *F. verticillioides* produced in the root tissue (arrow). C: Germinated conidia in the root tissue (arrow). D: Conidia and hypha on the root surface (arrow). E: Net structure of hypha formed on the surface of root. F: Hypha grown in the intercellular parts of root tissue (arrow). G: Hypha grown across different root cells (arrow). H: Hypha located in a single root cell (arrow). I: Hyphal ring-like structure formed in the root cells (arrow). J and K: Hypha grown in the basal internode of stem (arrow). L: Net structure of hypha formed in the maize root cells (arrow). M: Hyphal ring-like structure produced on the surface of the root (arrow). N and O: Lesions formed on the root surface (arrow).

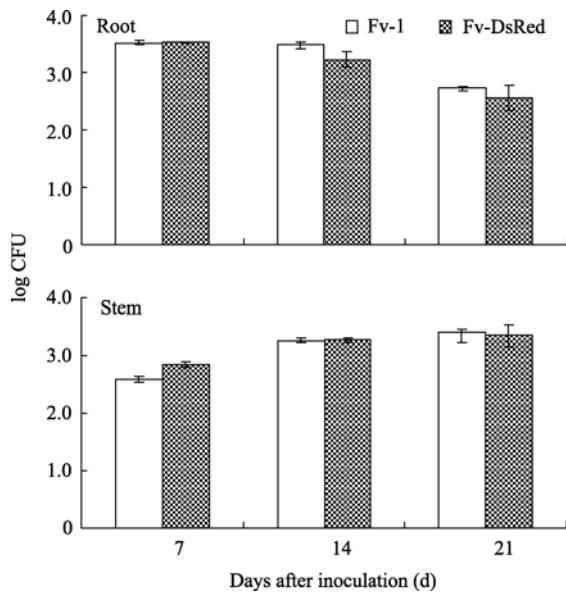


图 7 玉米接种红色荧光蛋白标记(Fv-DsRed)和野生型(Fv-1)轮枝镰孢菌株后不同时间根和茎基部组织的 CFU 值

Fig. 7 Comparison of CFU values produced by root and basal stem at different days after inoculation with DsRed-tagged (Fv-DsRed) and the wild-type (Fv-1) strains of *Fusarium verticillioides*

图中数据为对数转换数据, 误差线示标准误。

Data presented in the figures are subjected to the logarithmic transformation. Error bars in the figure indicate the standard errors.

3 讨论

轮枝镰孢能够引起根、茎、穗等部位组织的腐烂、坏死等症状。土壤中的轮枝镰孢能否侵染寄主, 主要取决于早期真菌是否能够在寄主根部成功定殖。本研究发现轮枝镰孢首先侵染玉米的须根等组织, 并在其中大量增殖, 然后沿主根向上侵染。这与先前轮枝镰孢侵染玉米根系的结果一致^[5,29]。轮枝镰孢的菌丝在玉米根内沿细胞间隙向上扩展并侵染地上部的茎髓组织, 有些会在细胞间横向扩展。轮枝镰孢在侵染玉米根部时, 侵染点主要发生在根的伸长区, 而在根冠和分生区较少发生。

观察发现, 受侵染的玉米首先在须根的伸长区形成浅褐色的病斑, 显示病菌是从须根开始侵染并逐渐进入主根的。病斑出现与菌丝扩展的时空分析表明, 病斑的形成滞后于真菌的扩展, 带菌组织并不一定出现细胞的大量坏死, 而细胞逐渐坏死并形成可见的病斑需要一段时间, 这个过程可能和定殖其中的病菌次生代谢有关。病斑颜色的进一步加深, 表明发病组织中细胞的坏死程度加重, 此时定殖在病斑内的轮枝镰孢量逐渐减少, 在黑色的坏死斑处

几乎观察不到 Fv-DsRed 的荧光, 表明坏死的细胞内可能没有菌丝的定殖。通过测定轮枝镰孢在玉米根部形成的 CFU 定量分析发现, 真菌在玉米根部的定殖随时间而减少, 而在茎基部定殖逐渐增加。进一步说明轮枝镰孢能够通过系统侵染玉米的根系而危害玉米的地上部组织。

真菌侵染寄主时, 一般会产生附着胞等特异结构^[30-31]。本研究发现轮枝镰孢的孢子附着在根表面的纹理中, 萌发形成菌丝, 向上扩展。有的则形成“附着胞”样结构向内侵染附着的细胞, 然后继续向周边侵染。在根表皮定殖的菌丝交织成网, 并形成圈状结构。这种特异结构称为菌丝圈。菌丝圈结构在禾谷丝核菌(*Rhizoctonia cerealis*)^[32]、丛枝菌根(*Arbuscular mycorrhiza*)^[33]等真菌侵染寄主时也会形成。这种圈状结构可能对病原菌的生存具有重要意义, 同时也有利于侵染寄主, 以及随后在寄主中的定殖。

在利用荧光蛋白标记的轮枝镰孢研究病菌侵染玉米的过程中, 除了保证目的基因稳定整合和遗传之外, 转化子与野生型病菌应尽可能保持相近的生长和代谢特性。胞外酶的代谢是真菌侵染植物的一种重要机制。因此, 本研究除了比较红色荧光蛋白标记菌株 Fv-DsRed 和野生型菌株 Fv-1 的生长特性之外, 还对转化子的蛋白酶、纤维素酶、淀粉酶和果胶酶等胞外酶代谢进行了比较。通过对转化子的菌落形态、生长量和胞外酶代谢等特性的研究证明, 相对于野生型轮枝镰孢菌株 Fv-1, 转化子 Fv-DsRed 没有发生显著变异。因此, 用表达红色荧光的菌株 Fv-DsRed 能够真实地反映轮枝镰孢在寄主中的侵染和定殖。

4 结论

通过农杆菌介导方法用红色荧光蛋白基因 *DsRed* 标记了轮枝镰孢 Fv-1 菌株, 转化子 Fv-DsRed 在菌落形态上与野生菌相同, 且孢子和菌丝都能产生明亮的红色荧光。*DsRed* 基因被整合到轮枝镰孢的基因组中, 插入片段为单拷贝。Fv-DsRed 和野生型菌株 Fv-1 在菌落生长量和胞外酶的代谢上基本一致。Fv-DsRed 首先侵染玉米的须根组织, 然后沿主根的细胞间隙向上扩展。附着在根表面的孢子萌发后沿着根表面的纹路生长, 有的形成“附着胞”样或菌丝圈状的特异结构。土传轮枝镰孢可以通过系统侵染根系造成对玉米地上组织的危害。

References

- [1] Ledencan T, Šimić D, Brkić I, Jambrović A, Zdunić Z. Resistance of maize inbreds and their hybrids to fusarium stalk rot. *Czech J Genet Plant Breed*, 2003, 39: 15–20
- [2] Wang X-M(王晓鸣), Jin Q-M(晋齐鸣), Shi J(石洁), Wang Z-Y(王作英), Li X(李晓). The status of maize diseases and the possible effect of variety resistance on disease occurrence in the future. *Acta Phytopathol Sin* (植物病理学报), 2006, 36(1): 1–11 (in Chinese with English abstract)
- [3] Kommedahl T, Windels C E. Root-, stalk-, and ear-infecting *Fusarium* species on corn in the USA. In: Nelson P E, Toussoun T A, Cook R J, eds. *Fusarium: Diseases, Biology and Taxonomy*. Pennsylvania State University Press, University Park, Pennsylvania, USA, 1981. pp 94–103
- [4] Bacon C W, Hinton D M. Symptomless endophytic colonization of maize by *Fusarium moniliforme*. *Can J Bot*, 1996, 74: 1195–1202
- [5] Oren L, Ezrati S, Cohen D, Sharon A. Early events in the *Fusarium verticillioides*-maize interaction characterized by using a green fluorescent protein-expressing transgenic isolate. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 81: 556–565
- [6] Foley D C. Systemic infection of corn by *Fusarium moniliforme*. *Phytopathology*, 1962, 52: 870–872
- [7] Kedera C J, Leslie J F, Clafin L E. Systemic infection of corn by *Fusarium moniliforme*. *Phytopathology*, 1992, 82: 1138
- [8] Munkvold G P, McGee D C, Carlton W M. Importance of different pathways for maize kernel infection by *Fusarium verticillioides*. *Phytopathology*, 1997, 97: 209–217
- [9] Headrick J, Pataky J. Maternal influence on the resistance of sweet corn lines to kernel infection by *Fusarium moniliforme*. *Phytopathology*, 1991, 81: 268–274
- [10] Munkvold G P, Carlton W M. Influence of inoculation method on systemic *Fusarium moniliforme* infection of maize plants grown from infected seeds. *Plant Dis*, 1997, 81: 211–216
- [11] Munkvold G P, Helmich R L, Showers W B. Reduced *Fusarium* ear rot and symptomless infection in kernels of maize genetically engineered for European corn borer resistance. *Phytopathology*, 1997, 87: 1071–1077
- [12] Duncan K E, Howard R J. Biology of maize kernel infection by *Fusarium verticillioides*. *Mol Plant-Microbe Interact*, 2010, 23: 6–16
- [13] Leslie J F, Pearson C, Nelson P, Toussoun T. *Fusarium* spp. from corn, sorghum, and soybean fields in the central and eastern United States. *Phytopathology*, 1990, 80: 343–350
- [14] Rheeder J P, Marasas W F O. *Fusarium* species from plant debris associated with soils from maize production areas in the Transkei region of South Africa. *Mycopathologia*, 1998, 143: 113–119
- [15] Lübeck M, Knudsen I M B, Jensen B, Thrane U, Janvier C, Jensen D F. GUS and GFP transformation of the biocontrol strain *Clonostachysosea* IK726 and the use of these marker genes in ecological studies. *Mycol Res*, 2002, 106: 815–826
- [16] von der Weid I, Artursson V, Seldin L, Jansson J K. Antifungal and root surface colonization properties of GFP-tagged *Paenibacillus brasilensis* PB177. *World J Microbiol Biotechnol*, 2005, 21: 8–9
- [17] Mansouri S, Fakhoury A M. Developing molecular tools to study the *Fusarium virguliforme* soybean interaction. *Phytopathology*, 2006, 96: S72–S73
- [18] Mark R S, Jason O, William P H. Green fluorescent protein is a quantitative reporter of gene expression in individual eukaryotic cells. *FASEB J*, 2005, 19: 440–442
- [19] Jakobs S, Subramaniam V, Schonle A, Jovin T M, Hell S W. EGFP and DsRed expressing cultures of *Escherichia coli* imaged by confocal, two-photon and fluorescence lifetime microscopy. *FEBS Lett*, 2000, 479: 131–135
- [20] Baird G S, Zacharias D A, Tsien R Y. Biochemistry, mutagenesis, and oligomerization of dsRED, a red fluorescent protein from coral. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 11984–11989
- [21] Rose A M, Maria A S, Valter A de B, Eduardo B, Roseli W, Marshall G Y, Marco A F R, Fábio O P, de Emanuel M S. Early colonization pattern of maize (*Zea mays* L. Poales, Poaceae) roots by *Herbaspirillum seropedicae* (Burkholderiales, Oxalobacteraceae). *Genet Mol Biol*, 2008, 31: 932–937
- [22] Sarrocco S, Falaschi N, Vergara M, Nicoletti F, Vannacci G. Use of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* transformed with marker genes to follow colonization of carnation roots. *J Plant Pathol*, 2007, 89: 47–54
- [23] Eckert M, Maguire K, Urban M, Foster S, Fitt B, Lucas J, Hammond-Kosack K. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Leptosphaeria* spp. and *Oculimacula* spp. with the reef coral gene *DsRed* and the jellyfish gene *gfp*. *FEMS Microbiol Lett*, 2005, 252: 67–74
- [24] Mullins E D, Chen X, Romaine P, Raina R, Geiser D M, Kang S. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Fusarium oxysporum*: an efficient tool for insertional mutagenesis and gene transfer. *Phytopathology*, 2000, 91: 173–180
- [25] Xu R-Q(徐荣旗), Wang J-N(汪佳妮), Chen J-Y(陈捷胤), Dai X-F(戴小枫). Analysis of T-DNA insertional flanking sequence and mutant phenotypic characteristics in *Verticillium dahliae*. *Sci Agric Sin* (中国农业科学), 2010, 43(3): 489–496 (in Chinese with English abstract)
- [26] Nash S M, Snyder W C. Quantitative estimations by plate counts of propagules of the bean root rot fusarium in field soils. *Phytopathology*, 1962, 52: 567–572
- [27] Burgess L W, Liddell C M. Laboratory Manual for *Fusarium* Research. University of Sydney, Australia. 1983. p 162

- [28] Andrews S, Pitt J I. Selective medium for isolation of *Fusarium* species and dematiaceous hyphomycetes from cereals. *Appl Environ Microbiol*, 1986, 51: 1235–1238
- [29] Murillo I, Cavalarin L, Segundo S S. Cytology of infection of maize seedlings by *Fusarium moniliforme* and immunolocalization of the pathogenesis-related PRms protein. *Phytopathology*, 1999, 89: 737–747
- [30] Howard R J. Breaching the outer barriers-cuticle and cell wall penetration. In: Carroll G, Tudzynski P, eds. *Plant Relationships*, Vol. 5A. New York: Springer-Verlag, 1997. pp 43–60
- [31] Money N P, Caesar-TonThat T C, Frederik B A, Henson J M. Melanin synthesis is associated with changes in hyphopodial turgor, permeability, and wall rigidity in *Gaeumannomyces graminis* var. *graminis*. *Fungal Genet Biol*, 1998, 24: 240–251
- [32] Liu X-M(刘雪梅), Xiao J-G(肖建国). Histopathological study on infection process of wheat sheath blight *Rhizoctonia cerealis*. *Mycosystema* (菌物学报), 1999, 18(3): 288–293 (in Chinese with English abstract)
- [33] Cai B-P(蔡邦平), Chen J-Y(陈俊愉), Zhang Q-X(张启翔), Guo L-D(郭良栋). A survey of *Arbuscular mycorrhiza* colonization in roots of *Prunus mume* in China. *Acta Horti Sin* (园艺学报), 2008, 35(4): 599–602 (in Chinese with English abstract)