

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2012.00231

利用表达分析和基因沉默方法研究硫代硫酸硫转移酶基因 *TaTST* 与小麦抗白粉病反应的关系

贺 洋 岳洁瑜 王华忠*

天津师范大学生命科学学院 / 细胞遗传与分子调控天津市重点实验室, 天津 300387

摘 要: 硫代硫酸硫转移酶参与植物体内的硫代谢、氰化物的清除以及活性氧的生成与清除, 与植物抗病反应密切相关。小麦抗、感白粉病近等基因系材料在接种白粉菌后均诱导表达硫代硫酸硫转移酶基因 *TaTST*, 并在接种后 0~48 h 内呈现 2 次诱导峰值, 分别与白粉菌初次接触识别和附着胞侵入、吸器形成时间相对应, 也与 2 次氧突发时间对应。*TaTST* 在感病材料上的诱导表达水平明显高于在抗病材料上, 由此导致的活性氧过度清除可能是导致感病反应的原因之一。*TaTST* 也参与抗病反应过程。利用病毒诱导的基因沉默技术(virus-induced gene silencing, VIGS)创造了 *TaTST* 基因沉默的抗病植株。尽管充分发病时间后沉默植株叶片上并未观察到肉眼可见的病斑, 但侵染早期白粉菌成功侵入频率的增加和次级菌丝的有限伸长说明 *TaTST* 沉默植株抗病水平下降。*TaTST* 沉默导致乳突致密度下降和 H₂O₂ 在细胞内的扩散时间延迟。因此, *TaTST* 可能通过调节活性氧的积累和扩散、乳突的形成等小麦-白粉菌互作早期的寄主细胞反应而参与小麦对白粉菌的抗侵入过程。

关键词: 小麦; 白粉菌; 硫代硫酸硫转移酶; VIGS

Gene Expression Profiling and Silencing Reveal the Relationship between *TaTST*, a Wheat Thiosulfate Sulfurtransferase Gene, and the Resistance Response of Wheat to Powdery Mildew

HE Yang, YUE Jie-Yu, and WANG Hua-Zhong*

School of Life Sciences / Tianjin Key Laboratory of Cyto-Genetical & Molecular Regulation, Tianjin Normal University, Tianjin 300387, China

Abstract: Plant thiosulfate sulfurtransferase (TST), which participates in sulfur metabolism, removal of cyanide, generation and removal of reactive oxygen species (ROS), is closely related to plant disease resistance. The wheat TST-encoding gene *TaTST* was induced by the powdery mildew pathogen fungus *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* (*Bgt*) in both the resistant and the susceptible wheat near-isogenic lines. Two expression peaks of *TaTST* were found from 0 to 48 h after inoculation of *Bgt*, corresponding to the initial contact and recognition between the host cell and *Bgt* and the invasion attempt of appressoria and haustoria formation. The two expression peaks were also in agreement with the two oxygen burst reactions. The induced expression level of *TaTST* was significantly higher in the susceptible line than in the resistant line, which may result in excessive removal of ROS as a response to *Bgt* infection and so contribute to the process of disease susceptibility. *TaTST* also involved in the process of disease resistance. The method of virus-induced gene silencing (VIGS) was used to silence the *TaTST* gene of the resistant line. Although *TaTST*-silencing plants did not produce visible mildew spots or lesions, they showed reduction of resistance to powdery mildew with the increased successful penetration rate and limited elongation of secondary hypha. Decreased density of papilla and delayed H₂O₂ spreading in the *Bgt*-challenged host cells of the VIGS plants suggest that *TaTST* possibly affects the *Bgt* penetration process in resistance response through participating in the ROS accumulation and spread and the papilla formation at early stage of wheat-*Bgt* interaction.

Keywords: Wheat; *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* (*Bgt*); Thiosulfate sulfurtransferase (TST); VIGS

本研究由天津市自然科学基金(08JCYBJC05000)和天津市高等学校科技发展基金(200100606)资助。

* 通讯作者(Corresponding author): 王华忠, E-mail: skywhz@mail.tjnu.edu.cn

第一作者联系方式: E-mail: skywhz@mail.tjnu.edu.cn

Received(收稿日期): 2011-08-08; Accepted(接受日期): 2011-10-13; Published online(网络出版日期): 2011-12-01.

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20111201.0924.019.html>

硫代硫酸硫转移酶(thiosulfate sulfurtransferase, TST, EC 2.8.1.1)又称硫氰酸酶(rhodanese), 体外催化硫代硫酸盐和氰化物之间的硫原子转移, 形成产物亚硫酸盐和硫氰酸。细胞内的 3-巯基丙酮酸(3-mercaptopyruvate, 3-MP)、硫代磺酸盐(thiosulfonates)、过硫化物(persulfides)等也可作为 TST 催化反应的硫供体, 而细胞内的硫受体可能也不只氰化物一种^[1-3]。TST 广泛存在于各种生物中, 拟南芥 TST 家族的 20 个成员根据序列相似性被分成了 6 个亚家族^[3-4]。TST 与植物衰老^[5]、胚和种子的发育^[6]以及生物/非生物胁迫响应^[3]等密切相关。番茄^[3]、小麦^[7]、笋瓜^[8]等植物上均发现了病原诱导后的 TST 上调表达。硫缺陷导致油菜硫元素依赖性的植物抗毒素减少, 并表现出对多种真菌、细菌病害感病性的增强^[9]。导入拟南芥 TST 基因 *AtStr1* 的烟草提高了对细菌病原 *Pseudomonas syringae* pv *tabaci* 的抗性^[10]。TST 参与植物抗病反应的可能机制是: (1)TST 参与细胞内氰化物的解毒^[11]。乙烯是植物胁迫条件诱导产生的重要信号分子, 而氰化物的一个主要来源是乙烯合成的副产物^[12]。氰化物是细胞的高毒性物质, 能够抑制线粒体呼吸链中细胞色素 c 氧化酶的活性, 因此一方面氰化物可直接对病原起抑制作用^[13], 另一方面, 寄主自身细胞内氰化物也需要在 TST 及 CAS (β -cyanoalanine synthase)参与下及时清除。(2)TST 参与硫酸盐的同化和体内硫的代谢和转移^[14]。细胞预存的或诱导产生的元素硫、 H_2S 、谷胱甘肽、硫代葡萄糖苷、富含半胱氨酸蛋白(硫堇 thionins 和防御素 defensins 等)及植保素(phytoalexin)等含硫防卫化合物(sulfur-containing defence compounds, SDCs)在植物抗病反应中发挥着重要作用^[15]。(3)TST 具有硫氧环蛋白过氧化物酶活性, 参与活性氧的清除以保护健康组织, 维持细胞内氧化还原(redox)稳态^[16-17]。

尽管 TST 在植物抗病反应中可能发挥重要作用, 但相关的实验证据还很少, 特别是在重要农作物病害系统上。2002 年, 牛吉山等^[7]克隆了第 1 个小麦 TST 基因 *TaTST*, 该基因产物与拟南芥 *AtStr1* 具有 62%一致性和 78%相似性。*TaTST* 经白粉病诱导后上调表达, 可能参与小麦抗白粉病反应。本研究对 *TaTST* 在抗、感白粉病小麦近等基因系材料上的白粉菌(*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*, *Bgt*)诱导表达特性进行系统分析, 利用 VIGS 技术创造了抗白粉病小麦材料 *TaTST* 基因的沉默植株, 该基因沉默降低了小麦对白粉病的抗性。本研究的结果为

进一步探索 TST 与小麦抗白粉病反应的关系奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 小麦近等基因系与白粉菌

携带广谱抗白粉病基因 *Pm21* 的小麦材料 92R137/扬麦 158⁷ 及其感病近等基因系扬麦 158 用于 *TaTST* 基因的白粉菌诱导表达分析。92R137/扬麦 158⁷ 用于 *TaTST* 基因沉默。将小麦种子播种于盆钵中, 罩以卷成筒状的透明投影胶片, 上覆 3 层滤纸, 防止空气中白粉菌孢子及其他杂菌落入, 然后置 25℃ 人工培养箱培养(光照 16 h/黑暗 8 h)。小麦白粉菌为北方地区流行的 15 号生理小种 E09 (由中国农业大学农学与生物技术学院小麦遗传改良与基因组学研究室提供), 92R137/扬麦 158⁷ 苗期对该小种表现免疫(反应型 0; 级), 扬麦 158 苗期则表现严重感病(反应型 3~4 级)。白粉菌在密植盆栽的感病品种苏麦 3 号上繁殖, 接种前 24 h 抖去老孢子。

1.2 VIGS 载体构建

大麦条纹花叶病毒(*Barley stripe mosaic virus*, BSMV)是一种正链 RNA 病毒, 具有 α 、 β 和 γ 3 个基因组^[18], 其 cDNA 分别克隆于 3 个重组载体(BSMV $_{\alpha}$ 、BSMV $_{\beta}$ 和 BSMV $_{\gamma}$) T7 启动子下游, 可通过体外转录技术获得感染性病毒 RNA 分子。BSMV $_{\gamma}$ 上的 γ b 开放阅读框下游终止密码子处引入了 *Nhe* I 切点, 用于目标基因片段的插入。根据 *TaTST* 基因(GenBank 登录号为 AY036608.1)保守区序列设计两端添加了 *Nhe* I 识别序列的上下游引物 VIGSTST-F (5'-TATGCTAGCAATGTGTTCCGTTCCCTGAG-3')和 VIGSTST-R (5'-ATGCTAGCGTAAACCGGAACGTCATGCT-3'), 经 RT-PCR 扩增获得该基因片段。扩增产物经 *Nhe* I 酶切、连接等过程替换 BSMV $_{\gamma}$:*TaPDS* 载体上相应切点处的 *TaPDS* 基因片段, 再经 VIGSTST-F 和 VIGSTST-R 及载体序列插入位点两侧特异引物 YINKU2 (5'-GTTAACGCAATACGTAAGTCCG-3')和 M13 (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3')进行巢式扩增鉴定插入 *TaTST* 基因片段的重组克隆 BSMV $_{\gamma}$:*TaTST*。由于酶切、连接过程为单切点不定向克隆, 进一步利用 VIGSTST-F 和 VIGSTST-R 分别与 M13 搭配成引物对的扩增方法鉴定反向插入基因片段的载体 BSMV $_{\gamma}$:*TaTST*。经测序进一步确认重组克隆。

1.3 体外转录与病毒接种

重组载体经 *Mlu* I (BSMV $_{\alpha}$ 、BSMV $_{\gamma}$:*TaTST*、BSMV $_{\gamma}$:GFP 和 BSMV $_{\gamma}$:*TaPDS*)或 *Spe* I (BSMV $_{\beta}$)酶切线

性化后作为体外转录模板, 采用 RiboMAX large Scale RNA Production-T7(Promega)试剂盒经体外转录获得病毒 RNA 组分。将病毒的 3 个 RNA 组分 RNA_α、RNA_β和 RNA_{γ:TaTSTas} 等量混合(BSMV:TaTST), 加等体积的 2× GKP (50 mmol L⁻¹ glycine, 30 mmol L⁻¹ K₂HPO₄, pH 9.2, 1% bentonite, 1% celite)缓冲液, 混匀后于小麦二叶期在第 2 叶上摩擦接种。设置接种 1×GKP 缓冲液和接种 RNA_α+RNA_β+RNA_{γ:GFP} (BSMV:GFP)分别作为空白对照和病毒对白粉菌侵染的影响对照; 接种 RNA_α+RNA_β+RNA_{γ:TaPDS} (BSMV:TaPDS)并以叶片漂白症状跟踪基因沉默情况。接种后保湿 24 h, 然后在光照培养箱中于 20 左右、16 h 光照/8 h 黑暗条件下培养, 定期观察病毒症状和接种 BSMV TaPDS 植株叶片漂白情况。

1.4 RNA 提取和定量 PCR

当 92R137/扬麦 158⁷ 和扬麦 158 幼苗长至 1 叶 1 心期时采用抖落法高密度接种新鲜白粉菌孢子, 分别于接种后 0、6、16、24、36 和 48 h 取叶片用于 RNA 提取和基因的诱导表达分析。

提取接种 BSMV TaTST 且有病毒症状的植株第 3、4 叶 RNA 用于 *TaTST* 基因的 mRNA 水平即沉默效果分析。使用 TRIZOL 提取总 RNA 后以 QuantScript RT cDNA 试剂盒(天根)逆转录合成 cDNA 第 1 链作为定量 PCR 模板。将 *TaTST* 全长 cDNA 序列与小麦基因组序列比对(<http://www.cerealsdb.uk.net>), 将获得的 contigs 拼接得到该基因对应的基因组序列。基因组序列与 cDNA 序列比对获得 *TaTST* 基因的外显子—内含子结构信息。设计跨内含子的定量 PCR 引物为 TSTqPF: 5'-CAAGGGAAGGAGTTAGAAGTGG-3'和 TSTqPR: 5'-ACAATCGGGCCATCAAGG-3', 扩增片段为 146 bp, 该片段在该基因序列上的位置与 BSMV_{γ:TaTSTas} 上的插入片段位置不重叠, 避免病毒序列的扩增。使用 Real-Master Mix (SYBR Green)试剂盒(天根)在 Rotor-Gene 6000 (Corbett Life Science)上进行定量 PCR 扩增、信号检测和溶解曲线分析。内参基因为小麦微管蛋白基因, 该基因扩增引物为 TubulinF (5'-GTGGA AACTGGCTCTGGC-3')和 TubulinR (5'-CGCTCAATGTCAAGGGA-3'), 扩增片段为 234 bp。实验过程均参照试剂盒手册。采用 2^{-ΔΔCt} 法分析数据^[19]。

1.5 白粉菌接种和侵染叶片的组织学观察

1.5.1 基因沉默对白粉菌成功侵染的影响 取病毒症状明显的植株 3~4 cm 长的第 3、4 叶叶段, 背

面朝上固定于含 20 mg L⁻¹ 6-BA 的 0.5%琼脂平板上。在 18 ℃、光照 16 h/黑暗 8 h 条件下, 高密度接种新鲜白粉菌孢子, 接种白粉菌后 48 h 将叶片在含 0.15%三氯乙酸的乙醇-三氯甲烷(75:25, V/V)脱色液中脱色 48 h, 其间更换 2 次脱色液, 使叶段透明, 再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=1:1, V/V)染色 4 h。将染色后的叶段用自来水漂洗后, 在冰醋酸:甘油:水(1:4:15, V/V/V)混合液中保存并在显微镜下观察, 记录 150~200 个互作位点白粉菌侵染情况。

1.5.2 基因沉默对重要抗病反应形式——乳突形成的影响 接种白粉菌后 24 h 和 7 d, 离体叶片经考马斯亮蓝染色液染色 10 min 后, 使用荧光显微镜(Nikon i80, excitation filter 330~380 nm, dichoric mirror 400 nm, barrier filter 420 nm)观察表皮细胞和乳突的自发荧光。

1.5.3 基因沉默对白粉菌诱导的 H₂O₂ 积累的影响 对病毒症状明显的植株活体接种白粉菌, 在取样时间点前 8 h 剪取叶片并切口朝下插入 1 mg mL⁻¹ DAB (pH 3.8)的溶液中 8 h, 然后在脱色液中脱色, 叶片透明后经考马斯亮蓝染色液染色 10 min, 在显微镜下观察。

1.6 呼吸速率测定

使用 Li-6400 光合作用测定系统(Li-Cor, 美国)测定接种白粉菌前和接种后 24 h 的叶片呼吸速率(样品室和参比室 CO₂ 浓度差)。测定前叶片经 30 min 黑暗处理避免光合作用干扰。使用 SHAM 抑制抗氧呼吸, 用 2 张经 0.05 mol L⁻¹ SHAM 溶液充分润湿的滤纸上下紧贴待测叶片处理 20 min。每个处理重复测定 3 次, 取平均值比较。

2 结果与分析

2.1 小麦 *TaTST* 基因能够被白粉菌诱导表达

抗病材料 92R137/扬麦 158⁷ 和感病材料扬麦 158 上的 *TaTST* 基因本底表达水平很低, 分别只有内参基因的 26%和 16%, 抗病材料高于感病材料。在接种白粉菌后 0~48 h 范围内, 抗、感材料上 *TaTST* 基因的白粉菌诱导表达水平均呈现双峰曲线特征, 但抗病材料的诱导表达水平始终较低。抗、感材料第一次表达峰值均出现在接种后 6 h, 诱导表达水平不高, 之后表达水平开始下降, 至接种后 16 h 又开始上升, 并分别在接种后 24 h (抗病材料)和接种后 36 h (感病材料)处达到第 2 次峰值, 即抗病材料早于感病材料。感病材料第 2 次峰值处的诱导表达水平非常

高, 分别是诱导前的 11.24 倍和第 1 次峰值的 5.08 倍, 但第 2 次峰值过后诱导表达的维持水平(接种后 48 h)感病材料仍然低于抗病材料(图 1)。TaTST 能够被白粉菌诱导表达以及在抗感材料上的不同诱导表达特征表明, 该基因可能参与小麦对白粉菌的抗病反应过程。

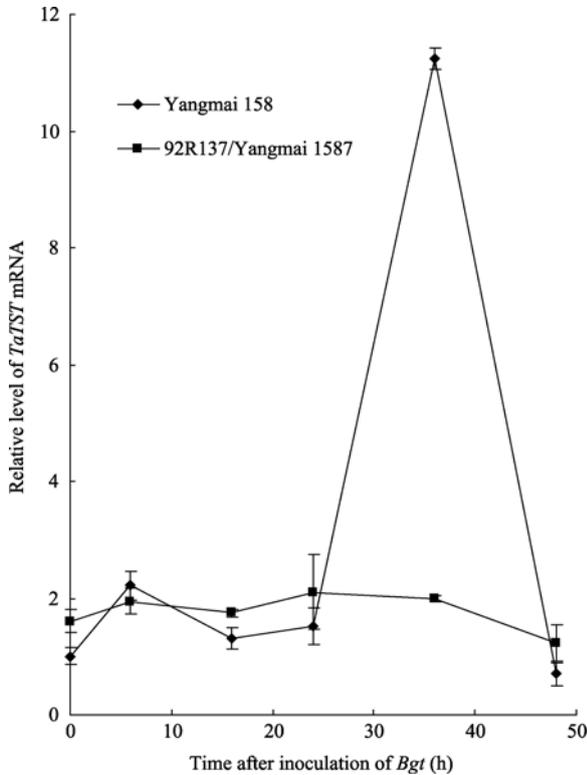


图 1 小麦 TaTST 基因的白粉菌诱导表达模式
Fig. 1 Induced expression pattern of wheat TaTST after inoculation of Bgt

取样时间点为接种后 0、6、16、24、36 和 48 h。

Samples were collected at 0, 6, 16, 24, 36, and 48 h after inoculation.

2.2 TaTST 基因沉默小麦植株的获得

TaTST 基因产物与拟南芥 AtStr1 相似, 含有 1 个 N 端无活性的 RHOD (rhodanese) 结构域(9-129)和 1 个 C 端有活性的 RHOD 结构域(177-294)。C 端 RHOD 结构域活性位点含有一个保守的 Cys 残基 (Cys²⁶⁰)。BSMV_{γ-TaTSTas} 上反向克隆了 TaTST 基因保守区 191 bp 大小的片段(图 2)。接种病毒后, 为了确定内源基因沉默效果, 提取有病毒症状植株的第 3、4 叶 RNA 进行荧光定量 PCR 分析。如图 3 所示, 基于 BSMV 病毒的 VIGS 技术可以有效地沉默小麦 TaTST 内源基因的表达, 该基因的 mRNA 水平均呈现不同程度的下降, 最低只有对照的 2%。除病毒渍水斑症状外, TaTST 基因沉默植株在本研究生长条件下的生长、形态与对照无明显差异。

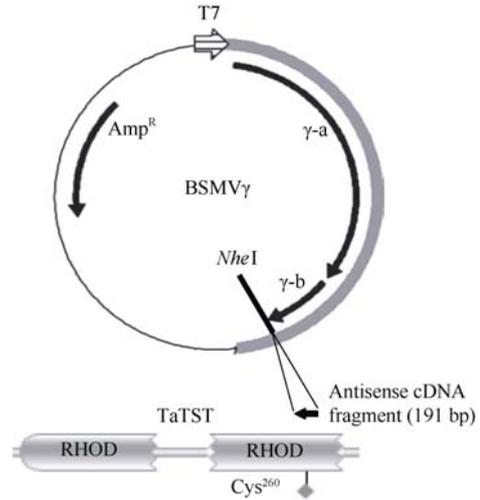


图 2 TaTST 编码蛋白质的保守结构域预测及 VIGS 载体构建
Fig. 2 Prediction of conserved domains of TaTST encoding protein and construction of VIGS vector

使用 ScanProsite (<http://prosite.expasy.org/scanprosite/>) 预测编码蛋白质的保守结构域, 选取 TaTST 保守区片段用于构建 VIGS 载体。

Conserved domains of TaTST-encoding protein were predicted using ScanProsite at <http://prosite.expasy.org/scanprosite/>; conserved TaTST fragment was used to construct VIGS vector.

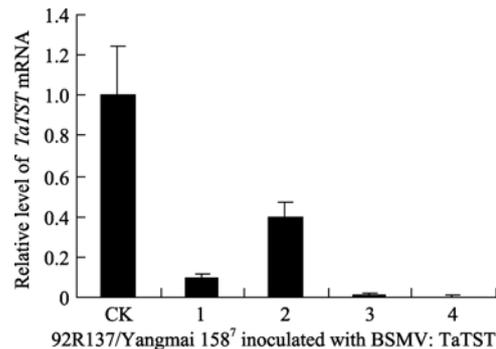


图 3 接种 BSMV:TaTST 的 92R137/扬麦 158⁷ 第 3、第 4 叶 TaTST 基因转录水平

Fig. 3 Transcript level of TaTST in the 3rd or 4th leaves of 92R137/Yangmai 158⁷ inoculated with BSMV:TaTST

CK: 接种 BSMV:GFP 的对照叶片; 1~4: 接种 BSMV: TaTST 的不同单株叶片。

CK: control leaf inoculated with BSMV:GFP; 1~4: leaves of individual plants inoculated with BSMV:TaTST.

2.3 TaTST 沉默对白粉菌侵染的影响

接种白粉菌 48 h 后, 与对照相比, 接种 BSMV: TaTST 的抗病材料 92R137/扬麦 158⁷ 上的白粉菌孢子侵入频率显著提高(图 4), 成功侵染的白粉菌在接种后 48 h 单个分生孢子发育出的菌丝以 1~2 根居多, 最多可达 7 根, 平均 2.4 根(图 5)。因此, TaTST 基因的沉默在一定程度上降低了沉默植株的抗病水平。不同沉默植株、同一植株的不同叶片甚至叶片的不同部位白粉菌的侵入频率和成功侵染白粉菌的生长

速度变化较大,其原因可能是不同植株内源基因的沉默程度不同(图 3),或病毒在叶片内的未充分扩展及不均匀分布导致的不同叶段基因沉默水平不同。接种 BSMV:TaPDS 植株的叶片漂白症状也证实这一点,不同植株叶片出现漂白症状的时间、漂白部位和程度均不同。

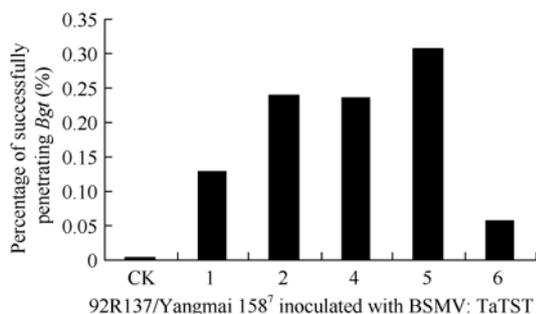


图 4 *TaTST* 沉默后 92R137/扬麦 158⁷ 上白粉菌的侵入频率
Fig. 4 Silencing of *TaTST* increased the percentage of successfully penetrating *Bgt* on 92R137/Yangmai 158⁷

观察时间为接种白粉菌后 48 h。CK: 接种 BSMV:GFP 的小麦材料 92R137/扬麦 158⁷ 的对照叶片; 1~5: 接种 BSMV:TaTST 且具有病毒症状的 92R137/扬麦 158⁷ 植株叶片。

Samples were observed at 48 h after inoculation of *Bgt*. CK: BSMV:GFP-inoculated 92R137/Yangmai 158⁷ as control; 1-5: individuals of BSMV:TaTST-inoculated 92R137/Yangmai 158⁷.

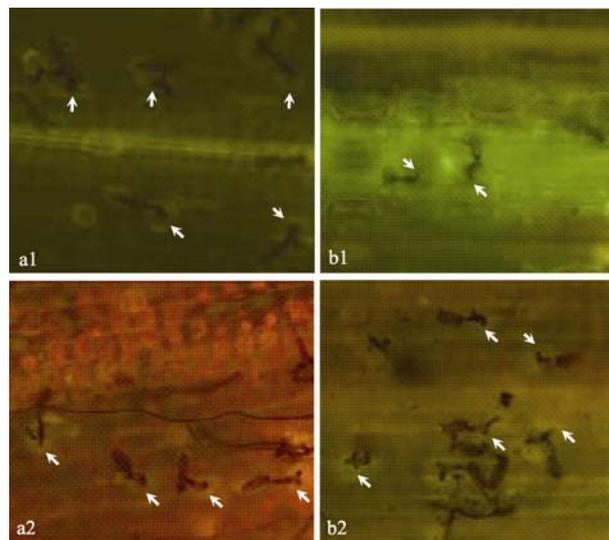
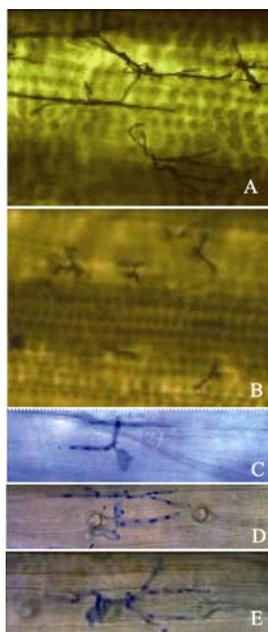


图 6 乳突自发荧光的显微观察($\times 100$)

Fig. 6 Microscopic observation of papilla autofluorescence ($\times 100$)
a 和 b 分别表示接种 BSMV:GFP 和 BSMV:TaTST 的 92R137/扬麦 158⁷; 1 和 2 分别表示接种白粉菌后 24 h 和 7 d 取样。
a and b indicate BSMV:GFP and BSMV:TaTST inoculated 92R137/Yangmai 158⁷, respectively; 1 and 2 indicate sampling at 24 h and 7 d after inoculation of *Bgt*, respectively.

图 5 接种后 48 h 小麦第 3 或 4 叶片的白粉菌侵染情况
Fig. 5 *Bgt* structures on the 3rd or 4th leaves from *TaTST*-silenced and control plants 48 h after inoculation
A: 苏麦 3 号感病对照($\times 200$); B: 接种 BSMV:GFP 的 92R137/扬麦 158⁷($\times 200$); C-E: 接种 BSMV:TaTST 的 92R137/扬麦 158⁷($\times 400$).
A: Sumai 3 as susceptible control ($\times 200$); B: 92R137/Yangmai 158⁷ inoculated with BSMV:GFP ($\times 200$); C-E: 92R137/Yangmai 158⁷ inoculated with BSMV:TaTST ($\times 400$).

TST 与活性氧的积累和清除有关,而活性氧参与乳突内的物质交联和过敏性坏死(hypersensitive reaction, HR)等重要抗病反应形式。接种后 24 h, *TaTST* 沉默植株乳突荧光亮度和大小显著低于对照,至接种后 7 d 差异不明显(图 6)。此外, *TaTST* 沉默植株叶片活性不高,表现为蓝光激发下,叶绿素红色荧光不明显,甚至出现成片黄色荧光(图 6)。

H_2O_2 的积累情况较为复杂,但仍反映出 *TaTST* 沉默产生的影响(图 7)。接种白粉菌 16 h 后,部分白粉菌分生孢子初生芽管与表皮细胞接触点出现 H_2O_2 积累。接种 24 h 后开始观察到附着胞侵入诱导产生的 H_2O_2 在乳突处的积累。在所有观察时间点 *TaTST* 沉默植株乳突处的 H_2O_2 染色均强于对照,但向乳突外围、沿两细胞之间以及向整个被侵染细胞扩散的时间延缓。对照整个被侵染细胞积累 H_2O_2 现象的开始时间和大量发生时间分别为接种后 24 h 和 36 h,而 *TaTST* 沉默植株分别延迟至接种后 36 h 和 48 h。大量发生后的整个被侵染细胞积累 H_2O_2 现象(接种后 48 h) *TaTST* 沉默植株要显著多于对照,这与接种后 7 d 荧光观察发现的基因沉默植株叶片活性不高(图 6)可能相关,但后者也可能是由基因沉默植株未能及时清除的氰化物毒性所导致。

TST 通过激活细胞色素途径电子传递链和清除氰化物解除抗氰呼吸参与细胞呼吸速率的调节。接

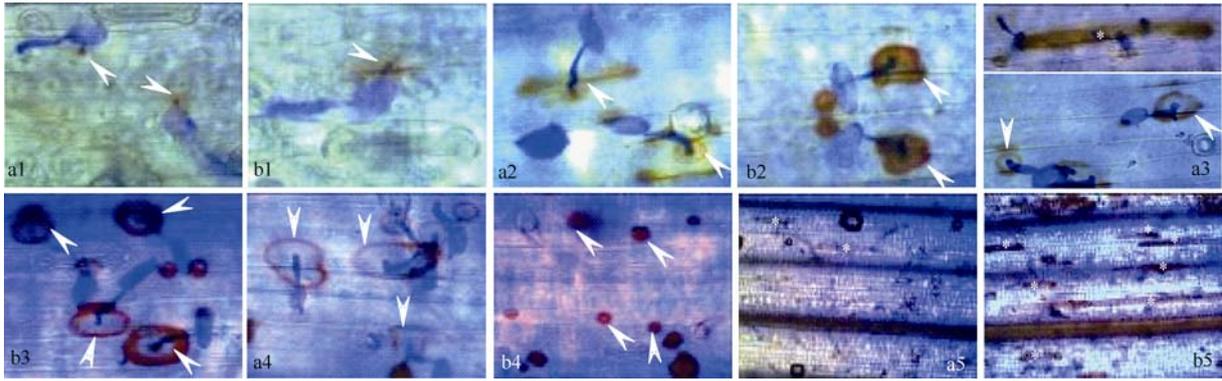


图 7 H_2O_2 诱导积累的 DAB 染色观察

Fig. 7 DAB staining for *Bgt*-induced hydrogen peroxide accumulation

箭头示乳突附近 H_2O_2 的积累。“*”号示整个被侵染细胞内积累 H_2O_2 。a 和 b 分别表示接种 BSMV:GFP 和 BSMV:TaTST 的 92R137/扬麦 158⁷; 1~5 依次表示接种后 16、24、36、48 和 48 h 取样。除 a5 和 b5 为放大 100 倍外, 其他照片均为放大 400 倍。

Arrowheads indicate the accumulation of H_2O_2 in the vicinity of the papillae. Asterisks show *Bgt*-infected cells wholly filled with H_2O_2 . a and b indicate BSMV:GFP and BSMV:TaTST inoculated 92R137/Yangmai 158⁷, respectively; 1–5 in order indicate sampling at 16, 24, 36, 48, and 48 h after inoculation of *Bgt*. All pictures were taken at a magnification of $\times 400$ except for a5 and b5 which were taken at a magnification of $\times 100$.

种白粉菌前, 对照和 *TaTST* 沉默植株总呼吸速率相当, 经抗氰呼吸途径抑制剂 SHAM 处理后变化也不大。接种白粉菌 24 h 后, 对照总呼吸速率变化不大, 但 *TaTST* 沉默植株则明显下降。此时病原侵染细胞对 SHAM 很敏感, 经 SHAM 处理, 对照和 *TaTST* 沉默植株呼吸速率均显著增加, 且对照增加幅度更大 (图 8)。

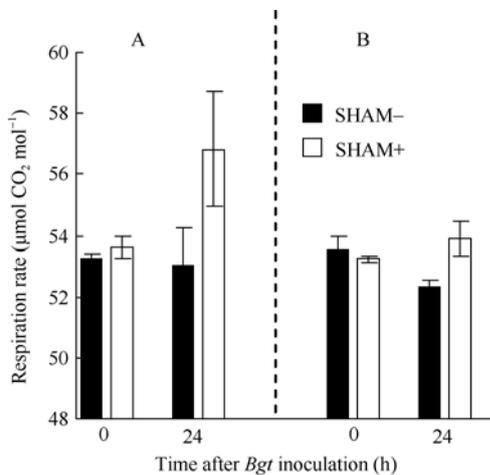


图 8 白粉菌侵染对接种 BSMV:GFP (A) 和 BSMV:TaTST (B) 的 92R137/扬麦 158⁷ 呼吸速率的影响

Fig. 8 Effect of *Bgt* infection on wheat respiration rate of BSMV:GFP (A) and BSMV:TaTST (B) inoculated 92R137/Yangmai 158⁷

3 讨论

接种白粉菌 0~48 h 后的时间范围是小麦针对病原侵染作出反应的关键时期, 这一时期内寄主细胞依次通过调控乳突的形成、HR 的发生及防卫反应基

因的激活等细胞、分子和生化水平的反应抑制白粉菌侵入或抑制功能吸器的成熟, 因此这一时期也是研究相关基因诱导表达模式的重要时期^[20-21]。活性氧在直接抑制病原生长、介导细胞壁物质交联、参与 HR 的发生、以及作为信号分子诱导其他防卫反应形式中发挥了重要作用, 而活性氧的合理清除对避免自身健康组织的伤害也非常重要^[20,22]。白粉菌侵染早期, 大麦、小麦通常具有 2 次活性氧水平的升高—氧突发(oxygen burst)过程, 分别发生在接种后 6 h 和接种后 24~36 h。第 1 次氧突发在抗、感品种上均发生且水平低, 对应于附着胞芽管的接触识别及基础抗性; 第 2 次氧突发在抗病材料上持续时间长、水平高, 在增强其他防卫反应形式中起关键作用^[22]。TST 对活性氧的产生具有双重作用, 一方面具有硫氧还蛋白过氧化物酶活性, 能够与其他抗氧化酶一起清除活性氧; 另一方面可激活线粒体呼吸链(活性氧的主要来源)活性, 或清除其抑制物氰化物的积累、解除抗氰呼吸, 增强活性氧的产生^[3], 这与前述活性氧的双重角色类似。氰化物的角色同样如此, 一方面氰化物对抗病反应有贡献, 即直接抑制病原^[13]或作为毒性物质参与寄主细胞 HR 的发生; 另一方面, 氰化物对主要呼吸链的抑制又负调控活性氧的产生, 其水平对植物健康组织的伤害也是个问题。由此可见, 病原侵染后细胞内氰化物的积累和清除、活性氧的积累和相关清除系统水平的调节非常复杂(图 9)。

本研究中, *TaTST* 本底表达水平较低。经白粉菌诱导 0~48 h 内出现 2 次 mRNA 的积累(开始于接种

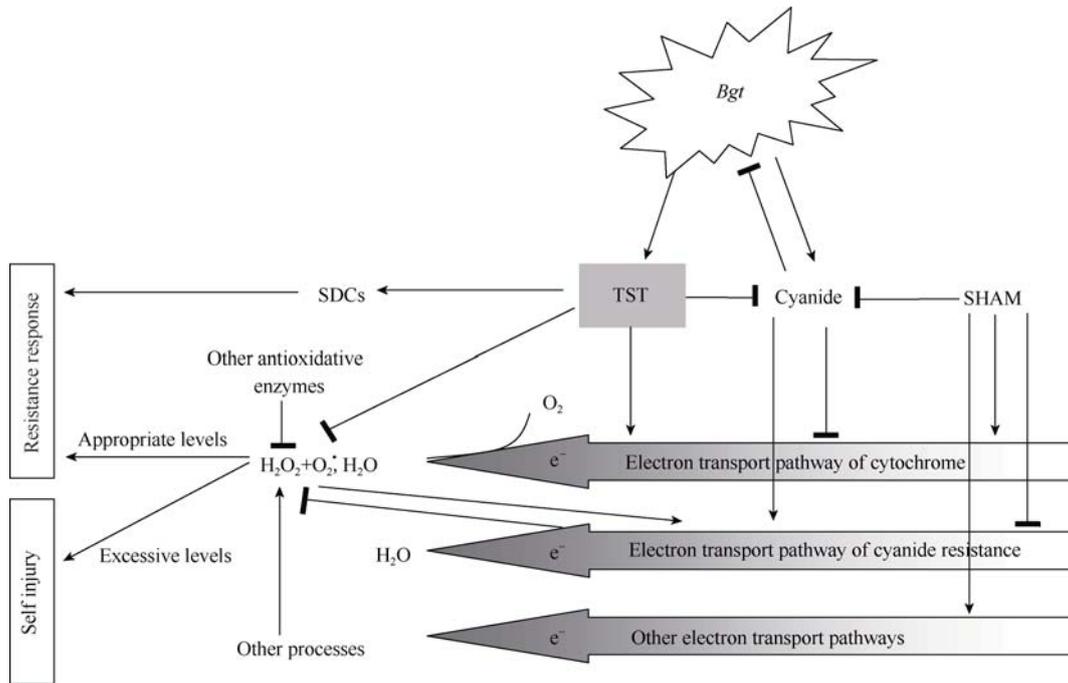


图 9 硫代硫酸硫转移酶在小麦抗白粉病反应中的作用

Fig. 9 The role of thiosulfate sulfurtransferase in the wheat-*Bgt* interaction

Bgt: 小麦白粉病菌; TST: 硫代硫酸硫转移酶; SDCs: 含硫防卫化合物。

Bgt: *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*; TST: Thiosulfate sulfurtransferase; SDCs: Sulfur-containing defence compounds.

后 6 h 和 16 h), 分别与白粉菌附着胞芽管的初次接触识别时间和附着胞侵入、吸器形成时间相对应, 也与两次氧突发时间^[23]对应。接种后 16~36 h 是第二次氧突发和决定病原能否成功寄生的关键时间, 因此抗、感材料第 2 次峰值出现时间和表达水平的差异可能反映了 *TaTST* 基因在抗、感反应中的角色有所不同。此时感病材料高水平的 TST 活性对活性氧的清除可能导致活性氧不足, 即在感病互作中 *TaTST* 部分地扮演了感病因子的角色。与此类似的是, Harrach 等^[24]发现大麦-白粉菌感病互作中抗氧化酶系的高水平诱导表达, 可能是 H_2O_2 积累水平显著低于抗病互作的重要原因之一。TST 增强感病反应的另外一种可能的解释是, 高水平的 TST 对氰化物的及时清除。最近 Seo 等首次证明在水稻抗稻瘟病真菌 *Magnaporthe oryzae* 的 HR 反应中, 伴随乙烯产生的氰化物才是抑制病原的关键物质^[13]。氰化物在小麦抗白粉病反应中的作用还有待进一步研究。

TST 在感病反应中的高水平诱导表达并不能否定其在抗病反应中也具有重要作用。首先, TST 是抗病反应中合理的活性氧水平调控所必须的。其次, 很早以前人们就发现硫磺对植物具有保护作用, 能够抵抗病虫害, 其原因就在于 TST 可能通过参与体内硫的代谢和转移、参与含硫防卫化合物的诱导合

成影响植物抗病反应^[3,15]。再次, Caplan 等^[25]还发现烟草上一个 TST (NRIP1) 能够协助 N 基因识别 TMV p50 效应子或通过激活 N 基因参与抗病反应。番茄^[3]、小麦^[7]、笋瓜^[8]等植物上及本研究抗病反应中 *TaTST* 基因的上调表达暗示 TST 参与植物抗病反应的客观性。Bartels 等^[10]还报道了导入拟南芥 *AtStr1* 的烟草提高了对细菌病原抗性的报道。本研究中抗病材料 *TaTST* 的低水平诱导则可能对于氰化物的平衡、活性氧积累的平衡至关重要, 有利于抗病反应的精细调控。抗病材料 *TaTST* 第 2 次诱导表达峰值出现时间较早则可能与抗病材料上 TST 参与的防卫反应启动更迅速有关。抗病材料上 *TaTST* 沉默导致 H_2O_2 积累行为发生变化, 与对照相比, 基因沉默植株 H_2O_2 积累集中在乳突位置, 向整个细胞扩散时间延缓。基因沉默对乳突密度和大小的影响可能也与 H_2O_2 积累行为变化有关, 但其机制还需要进一步研究。抗病材料上 *TaTST* 基因的部分沉默, 一定程度上导致侵染早期白粉菌侵入频率的增加和次级菌丝的有限生长。接种白粉菌 7 d 后, *TaTST* 沉默植株上并未观察到肉眼可见的白粉菌孢子堆, 与 *TaTST* 未沉默情况差异不明显, 其原因之一可能是 *TaTST* 基因沉默只导致与活性氧及乳突形成相关的抗侵入机制被部分解除, 而阻止白粉菌进一步生长、扩展和

繁殖的其他抗病机制未受到显著影响。此外,小麦是 6 倍体物种,含有 A、B、D 基因组,多个基因同源拷贝有可能导致功能冗余和突变缓冲能力,因此家族内同源基因及其他同功基因的代偿可能部分或全部掩盖单个基因的突变或沉默的表型变化信息。因此,尽可能克隆小麦全部 TST 基因并构建插入保守区片段的 VIGS 载体进行同时沉默将有助于进一步阐明该基因在小麦抗白粉病反应中的功能。还有一个原因可能是, TST 参与抗病反应过程,但并不参与病原识别,也不是信号转导的关键节点成分或调控其它抗病相关基因表达的转录因子。

病原侵染通常导致植物总呼吸和抗氰呼吸途径的增强^[26],而 TST 也与胁迫条件下呼吸作用的调节密切相关。本研究中对呼吸作用的变化分析所涉及的互作时间较短(接种后 24 h),白粉菌侵染并未引起对照小麦呼吸作用增强,但却反而引起 *TaTST* 沉默植株呼吸作用下降,推测 *TaTST* 在白粉菌侵染早期具有正调控呼吸作用的功能。病原侵染后的小麦叶片对抗氰呼吸途径抑制剂很敏感,经 SHAM 处理抑制抗氰呼吸,总呼吸速率不降反升,这可能是抗氰途径的抑制导致细胞色素途径的更充分激活,或其他呼吸途径的激活^[27]。*TaTST* 基因沉默植株因不能及时清除诱导产生的氰化物,抗氰呼吸途径更强,因而该途径被 SHAM 抑制后总呼吸速率上升幅度低于野生型对照。

92R137/扬麦 158⁷ 携带 *Pm21* 基因,该基因调控广谱白粉病抗性,几乎对所有已发现的白粉菌小种免疫。本研究证明 *TaTST* 参与该基因调控的抗病反应。关于 TST 在其他抗病基因调控的抗病反应及在不同的抗病基因-*Bgt* 生理小种互作系统中的功能分析也将是我们下一步的研究重点。

4 结论

小麦硫代硫酸硫转移酶基因 *TaTST* 能够被白粉菌诱导表达,并在接种白粉菌后 0~48 h 范围内有 2 次诱导峰值,分别与白粉菌初次接触识别和附着胞侵入、吸器形成时间相对应,也与 2 次氧突发时间对应。*TaTST* 在感病近等基因系材料上的诱导表达水平明显高于抗病材料,由此导致的活性氧过度清除可能是导致感病反应的原因之一。尽管 *TaTST* 沉默的抗病植株叶片上并未观察到肉眼可见的病斑,但侵染早期白粉菌成功侵入频率的增加和次级菌丝的有限伸长说明 *TaTST* 沉默植株抗病水平下降。*TaTST* 沉默导致乳突致密度下降、 H_2O_2 在细胞内的

扩散时间延迟。因此, *TaTST* 可能通过参与活性氧的积累和扩散、乳突的形成等小麦-白粉菌互作早期的寄主细胞反应而调节小麦对白粉菌的抗侵入过程。

References

- [1] Cipollone R, Ascenzi P, Visca P. Common themes and variations in the rhodanese superfamily. *IUBMB Life*, 2007, 59: 51-59
- [2] Saidu Y. Physicochemical features of rhodanese: a review. *Afr J Biotechnol*, 2004, 3: 370-374
- [3] Papenbrock J, Guretzki S, Henne M. Latest news about the sulfurtransferase protein family of higher plants. *Amino Acids*, 2011, 41: 43-57
- [4] Bartels A, Mock H P, Papenbrock J. Differential expression of *Arabidopsis* sulfurtransferases under various growth conditions. *Plant Physiol Biochem*, 2007, 45: 178-187
- [5] Papenbrock J, Schmidt A. Characterization of two sulfurtransferase isozymes from *Arabidopsis thaliana*. *Eur J Biochem*, 2000, 267: 5571-5579
- [6] Mao G H, Wang R G, Guan Y F, Liu Y D, Zhang S Q. Sulfurtransferases 1 and 2 play essential roles in embryo and seed development in *Arabidopsis thaliana*. *Biol Chem*, 2011, 286: 7548-7557
- [7] Niu J-S(牛吉山), Yu L(于玲), Ma Z-Q(马正强), Chen P-D(陈佩度), Liu D-J(刘大钧). Molecular cloning, characterization and mapping of a rhodanese like gene in wheat. *Acta Genet Sin* (遗传学报), 2002, 29(3): 266-272 (in Chinese with English abstract)
- [8] Walz C, Giavalisco P, Schad M, Juenger M, Klose J, Kehr J. Proteomics of curcubit phloem exudate reveals a network of defence proteins. *Phytochemistry*, 2004, 65: 1795-1804
- [9] Dubuis P H, Marazzi C, Staedler E, Mauch F. Sulphur deficiency causes a reduction in antimicrobial potential and leads to increased disease susceptibility of oilseed rape. *Phytopathology*, 2005, 153: 27-36
- [10] Bartels A. Functional Characterisation of Sulfurtransferase Proteins in Higher Plants. PhD Dissertation of Leibniz University, Hannover, Germany, 2006
- [11] Vennesland B, Castric P A, Conn E E, Solomonson L P, Volini M, Westley J. Cyanide metabolism. *Fed Proc*, 1982, 41: 2639-2648
- [12] Grossmann K. A role for cyanide, derived from ethylene biosynthesis, in the development of stress symptoms. *Physiol Plant*, 1996, 97: 772-775
- [13] Seo S, Mitsuhashi I, Feng J, Iwai T, Hasegawa M, Ohashi Y. Cyanide, a coproduct of plant hormone ethylene biosynthesis, contributes to the resistance of rice to blast fungus. *Plant Physiol*, 2011, 155: 502-514
- [14] Donadio S, Shafiee A, Hutchinson R. Disruption of a rhodanese like gene results in cysteine auxotrophy in *Saccharopolyspora*

- erythraea*. *J Bacteriol*, 1990, 172: 350–360
- [15] Rausch T, Wachter A. Sulfur metabolism: a versatile platform for launching defence operations. *Trends Plant Sci*, 2005, 10: 504–509
- [16] Papenbrock J, Bartels A, Hartmann F, Hartmann J, Triulzi T. Reduced sulfur in the plant cell: enzymatic formation and functional roles. In: Sirko A, De Kok L J, Haneklaus S, Hawkesford M J, Rennenberg H, Kaito S, Schnug E, Stulen I, eds. Sulfur metabolism in higher plants. Weikersheim: Markgraf Publishers, 2009. pp 217–219
- [17] Nandi D L, Horowitz P M, Westley J. Rhodanese as a thioredoxin oxidase. *Int J Biochem Cell Biol*, 2000, 32: 465–473
- [18] Petty I T, Hunter B G, Wei N, Jackson A O. Infectious barley stripe mosaic virus RNA transcribed in vitro from full-length genomic cDNA clones. *Virology*, 1989, 171: 342–349
- [19] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods*, 2001, 25: 402–408
- [20] Hüchelhoven R, Fodor J, Preis C, Kogel K H. Hypersensitive cell death and papilla formation in barley attacked by the powdery mildew fungus are associated with hydrogen peroxide but not with salicylic acid accumulation. *Plant Physiol*, 1999, 119: 1251–1260
- [21] Caldo R A, Nettleton D, Wise R P. Interaction-dependent gene expression in *Mla*-specified response to barley powdery mildew. *Plant Cell*, 2004, 16: 2514–2528
- [22] Hüchelhoven R, Kogel K H. Reactive oxygen intermediates in plant-microbe interactions: who is who in powdery mildew resistance? *Planta*, 2003, 216: 891–902
- [23] Liu G S, Sheng X Y, Greenshields D L, Ogieglo A, Kaminskyj S, Selvaraj G, Wei Y D. Profiling of wheat class III peroxidase genes derived from powdery mildew-attacked epidermis reveals distinct sequence-associated expression patterns. *Mol Plant Microbe Interact*, 2005, 18: 730–741
- [24] Harrach B D, Fodor J, Pogány M, Preuss J, Barna B. Antioxidant, ethylene and membrane leakage responses to powdery mildew infection of near-isogenic barley lines with various types of resistance. *Eur J Plant Pathol*, 2008, 121: 21–33
- [25] Caplan J L, Mamillapalli P, Burch-Smith T M, Czymbek K, Dinesh-Kumar S P. Chloroplastic protein NRIP1 mediates innate immune receptor recognition of a viral effector. *Cell*, 2008, 132: 449–462
- [26] Feng H Q, Sun K, Li M Q, Li H Y, Li X, Li Y, Wang Y F. The expression, function and regulation of mitochondrial alternative oxidase under biotic stresses. *Mol Plant Pathol*, 2010, 11: 429–440
- [27] Li Z-H(李政红), Gao D-S(高东升), Li X-L(李宪利). The relation between endormancy and changes in two main electron transport pathways of nectarine (*Prunus persica* var. *nectariana*) buds. *J Plant Physiol Mol Biol* (植物生理与分子生物学学报), 2006, 32(2): 156–162 (in Chinese with English abstract)