

局部力学刺激对黄瓜系统抗病性的诱导*

赵虎成** 郑修鹏 高晓晖 席葆树

(清华大学生物力学与医学工程研究所, 北京 100084)

摘要 病原真菌在侵入植物细胞过程中,除了分泌化学物质外还通过物理挤压细胞产生力学作用。用压应力作为力学信号,研究了局部力学刺激对黄瓜系统抗病性的诱导。结果表明,力学刺激可以诱导黄瓜系统抗病性的产生。当细胞壁与质膜间的黏附被 Arg-Gly-Asp (RGD)阻断后,力学刺激对黄瓜系统抗病性的诱导几乎完全被减除。通过薄层色谱和液相色谱分析,发现力学刺激可以使植保素含量明显增加。这表明黄瓜植保素的积累可能是力学刺激诱导其产生抗性的原因之一。而细胞壁与质膜间的黏附被 RGD 阻断后,力学刺激只能诱导植保素的部分积累。即力学刺激对植保素积累的诱导依赖于细胞膜与细胞壁间的黏附。

关键词 力学刺激, 植保素, 信号转导, 黄瓜黑星病菌, 黄瓜

学科分类号 S435.111.41, Q933

植物诱导抗病性,是植物在一定的诱导因子作用下,对随后的病原菌侵染具有抵抗性的特征^[1,2]。许多生物因子都可以诱导植物产生抗病性,如真菌、细菌、病毒或其代谢产物,甚至一些非生物因子如重金属、无机化合物、紫外线、高温等都能诱导植物产生抗病性^[3~6]。大部分病原真菌通过穿透植物细胞壁来侵染植物组织。病原真菌在穿透细胞壁过程中除了分泌化学物质外,还对细胞通过施加直接的物理挤压而产生力学刺激。在单细胞水平上已经证实,力学刺激可诱导胞内活性氧的产生和部分防卫基因的表达^[7~9]。但力学信号是否可以作为一种激发子诱导植物产生系统抗病性尚不清楚。

整合素(integrins)是一种由 α 、 β 亚基组成的异二聚体跨膜蛋白。它在胞外域结合胞外基质(ECM),胞内域与细胞骨架相连接。整合素可参与细胞与胞外基质、细胞与细胞之间的粘连、机械力的感受,并可通过酪氨酸蛋白激酶系统和丝氨酸蛋白激酶系统介导细胞的信息传递^[10,11]。在大豆根尖悬浮细胞、豌豆上胚轴细胞、高盐胁迫下的西红柿悬浮细胞和洋葱表皮细胞中等都发现有类整合素的存在^[12~15]。最近的研究发现,植物防卫基因的表达依赖于类整合素介导的细胞壁和细胞膜之间的黏附^[13]。而包含 RGD 序列的多肽可以特异地干扰整合素介导的细胞壁和细胞膜之间的黏附,导致病原菌的侵染效率增高^[13]。本研究以压应力来模拟病原

真菌侵染时对细胞的物理挤压,研究其是否可诱导植物产生系统抗病性,并用 RGD 阻断植物细胞壁与质膜间的黏附,探索由整合素介导的黏附在力学刺激诱导植物系统抗病性中的贡献。

1 材料与方法

1.1 材料

以黄瓜对黑星病菌感病的品种——山东密刺幼苗为实验材料。将供试植株分为4组:对照组(CK);力学刺激组(F);RGD处理后压力刺激组(DF);DGR处理后压力刺激组(EF)。其中,RGD、DGR分别配制成1 mmol/L的水溶液,用毛刷涂抹于黄瓜幼苗的第一片真叶表面待受压应力刺激的部分,24 h后进行压应力刺激。

黄瓜黑星病菌种(*Cladosporium cucumerinum*)由中国农业科学院植物保护研究所“黄瓜病害研究”课题组提供。接种前用PDA培养基活化菌种,23℃下黑暗培养4天左右,待长出大量墨绿色或褐色分生孢子后即可作接种。接种前30 min用蒸馏水配置成 2×10^6 个/ml浓度的孢子悬液待用。

* 国家自然科学基金资助项目(10602031, 30270354)。

** 通讯联系人。

Tel: 010-62796543, E-mail: zhaohc@mail.tsinghua.edu.cn

收稿日期: 2007-08-27, 接受日期: 2007-11-06

1.2 力学刺激

以黄瓜幼苗的第一片真叶为压应力刺激叶, 叶片下部用平板支撑, 并在每片叶面上放置一片面积为 $2\text{ cm} \times 2\text{ cm}$ 的盖玻片, 将一定重量的砝码放在盖玻片上对叶片进行压应力刺激(图 1), 压应力大小为 980 Pa , 作用时间为 120 min .

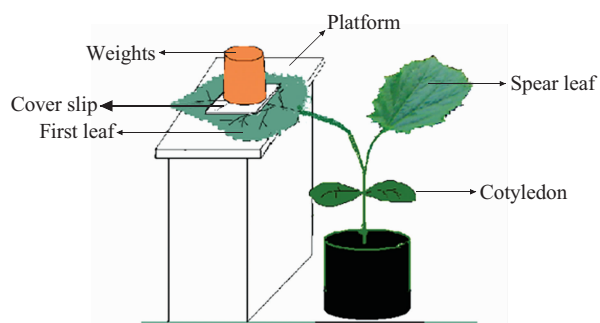


Fig. 1 The model of stress stimulation

力学刺激 24 h 后, 进行接种. 用黑星病菌孢子悬液进行全株喷雾接种, 接种后盖塑料薄膜黑暗保湿 24 h , 然后在室温下常规浇水管理. 发病后进行病害调查.

1.3 病害调查

发病后进行调查, 调查植株全部叶片. 调查项目为病叶率和病株率, 记载反应级别. 最后计算病情指数和相对免疫防效.

黄瓜黑星病病情指数分级标准(自定): 0 级, 无症状; 1 级, 叶片上有零星病斑, 茎上无病斑; 2 级, 叶柄缢缩, 叶上有零星病斑, 茎上有小病斑; 3 级, 叶柄缢缩, 心叶凋萎, 茎上病斑下陷; 4 级, 叶柄缢缩, 心叶干枯, 茎上病斑下陷; 5 级, 叶柄、叶片全部凋萎枯死, 茎上病斑缢缩.

病情指数及诱导效果分别按以下公式计算:

$$\text{病情指数}\% = \frac{\sum(\text{各级株数} \times \text{各级代表值})}{\text{总株数} \times \text{最高级代表值}} \times 100\%$$

1.4 植保素的提取

压应力作用后 24 、 48 、 72 、 96 h 分别取植株的第一片真叶为实验材料进行植保素的提取.

植保素的提取运用 McNally 的方法并加以改进^[6]. 将已收集的样品在液氮中研磨成粉末后, 用 $\text{pH } 2$ 的 80% 甲醇(按叶片鲜重, 1 g/ml)室温提取 20 min 后放入 40°C 水浴中加热 50 min . 减压抽滤, 残渣再用 80% $\text{pH } 2$ 的甲醇(按叶片鲜重, 1 g/ml)冲洗, 合并 2 次滤液后于 40°C 下旋转蒸发, 以除去溶液中的甲醇. 剩余液体用乙醚脱酯后, 水相加入

4 mol/L HCl (按叶片鲜重, 1 g/ml)在 100°C 下水解 90 min . 将水解液冷却后用乙酸乙酯萃取, 合并萃取液并将乙酸乙酯在 38°C 下蒸干, 再用甲醇溶解固体(按叶片鲜重, 2.5 g/ml).

1.5 植保素粗提物的抑菌实验

取压应力刺激 24 、 48 、 72 、 96 h 与对照组的植保素粗提物各 $30\text{ }\mu\text{l}$ 点于直径为 4 mm 的滤纸片上, 然后将滤纸放在灭菌的培养皿底部, 加入 PDA 与孢子悬液的混合液, 24°C 黑暗中使之萌发两天并观测.

1.6 植保素的分离和鉴定

取压应力作用后 24 、 48 、 72 、 96 h 叶片与对照叶片植保素粗提物各 $10\text{ }\mu\text{l}$ 点于 GF254 板上, 用 $1, 2$ -二氯乙烷与乙酸乙酯($7:3$)为展开剂展开, 并于 254 nm 紫外灯下观察和拍照.

向展开并吹干后的薄板上均匀地喷以 3.6×10^6 个/ ml 的孢子悬液, 待稍干后将 PDA 培养基覆于其上, 于 24°C 黑暗中进行抑菌实验^[8].

植保素粗提液离心, 将其上清液稀释 10 倍, $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 的有机滤膜过滤后进行 HPLC 分析, 检测波长为 272 nm .

2 实验结果

2.1 压应力刺激对黄瓜系统抗病性的诱导

由图 2 可以看出, 压应力刺激组黄瓜幼苗的发病指数明显降低, 诱导效果显著. 表明力学刺激可明显地诱导植株产生系统抗病性.

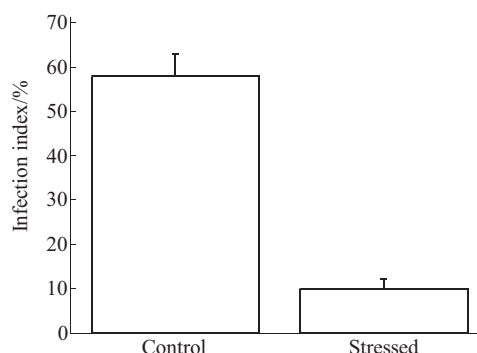


Fig. 2 Effect of mechanical stimulation on the disease resistance of cucumber

RGD 肽是一种能够阻断植物细胞壁与质膜间黏附的有效试剂^[3]. 本研究用 RGD 阻断黄瓜细胞壁与质膜间的黏附后, 进行压应力刺激, 刺激 24 h 后接种. 由图 3 可以看出, RGD 阻断植物细胞壁与质膜的黏附后, 力学刺激组的发病指数与对照组

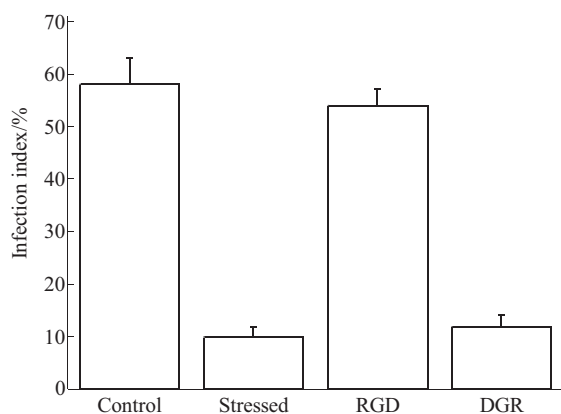


Fig. 3 The effect of stress stimulation on disease resistance of Cucumber treated with RGD

Stressed: Mechanical stimulation; RGD: Mechanical stimulation after RGD treating; DGR: Mechanical stimulation after DGR treating.

无显著差异. 而用 Asp-Gly-Arg(DGR), 不能阻断质膜与细胞壁的黏附, 处理过的黄瓜, 加载压应力后再接种, 植株的发病指数明显降低. 这表明力学刺激对植物抗病性的诱导依赖于质壁间的黏附. DGR 不能阻断细胞壁和细胞膜之间的黏附, 所以力学刺激仍可以诱导其产生抗病性.

2.2 植保素的提取及抑菌实验

将力学刺激组和对照组黄瓜叶片经甲醇提取, 乙醚脱酯后水解, 再经乙酸乙酯萃取后得到的提取物进行抑菌实验. 结果显示, 压力刺激的黄瓜叶片提取物中具有明显的抑菌作用, 在刺激后 48 h 左右抑菌效果最明显, 而未刺激植株叶片的粗提物周围未见抑菌现象(图 4). 这表明, 力学刺激可以诱导黄瓜产生植保素, 其积累具有时间依赖性.

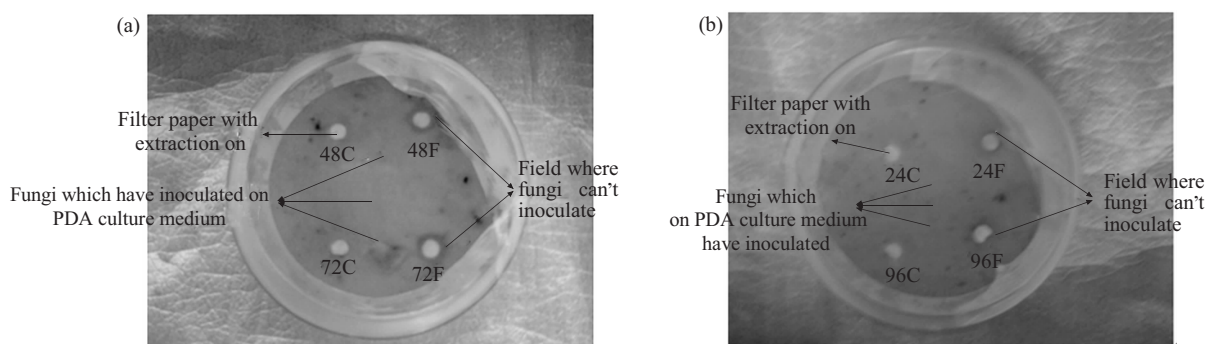


Fig. 4 Fungitoxic activity analysis of extractions from different intervals after stress stimulation

24F, 48F, 72F, 96F represents extracts from the stress stimulated plants, sampled at 24 h, 48 h, 72 h, 96 h after stress stimulus respectively. 24C, 48C, 72C, 96C respectively represents the control plants sampled at the same time with the stress stimulus group described above.

2.3 植保素的分离与鉴定

2.3.1 运用 TLC 法对植保素的分离与抑菌实验.

由图 5a 可以看出, 刺激组在 R_f 为 0.5 左右的位置有一展开点, 力学作用后 48 h 积累最多, 刺激后 24 h 积累最少, 而刺激后 72 h 和 96 h 样品中该物质的浓度呈下降趋势. 在对照组中无此物质的积累. RGD 处理叶片后, 力学刺激组在 R_f 为 0.5 左右的位置有一展开点, 但浓度极低(图 6), 而 DGR 处理并不影响力学刺激诱导该物质的积累. 取力学刺激后 48 h 的提取物进行 TLC 展开后的抑菌实验. 如图 5b 所示, 在 R_f 为 0.5 左右的展开点中所含有的物质具有抑菌作用, 这进一步表明, 在 $R_f=0.5$ 处积累的物质是植保素. 这表明力学刺激对植保素积累的诱导依赖于细胞壁与质膜间的黏附.

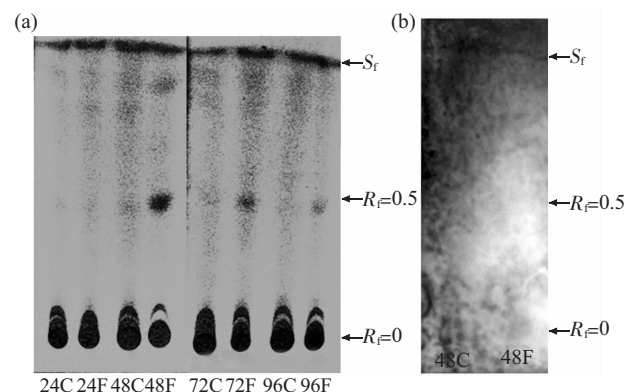


Fig. 5 Isolation of phytoalexin on thin-layer(TLC Assay)

(a) Leaf extracts separated on thin-layer. (b) Antifungal phenomenon on thin-layer. 24F, 48F, 72F, 96F represents extracts from the stress stimulated plants, sampled at 24h, 48h, 72h, 96h after stress stimulus respectively. 24C, 48C, 72C, 96C respectively represents the control plants sampled at the same time with the stress stimulus group described above.

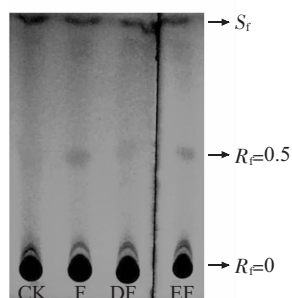


Fig. 6 The effect of RGD on the accumulation of phytoalexin after stress stimulation for 48 h

CK: Control; F: Stress stimulated plants; DF: FGD+stress; EF: DGR+stress.

2.3.2 HPLC 分析. HPLC 分析(图 7a, b)发现, 样品在 272 nm 处存在吸收峰. 与对照组相比, 力学刺激组(图 7b)增加了一个新峰(第 3 峰), 而其他的 1、2、4 三个峰的面积和高度也都有明显提高. 表明在受到压应力诱导之后, 黄瓜叶片中有新的物质产生, 同时原有物质的积累量也有增加.

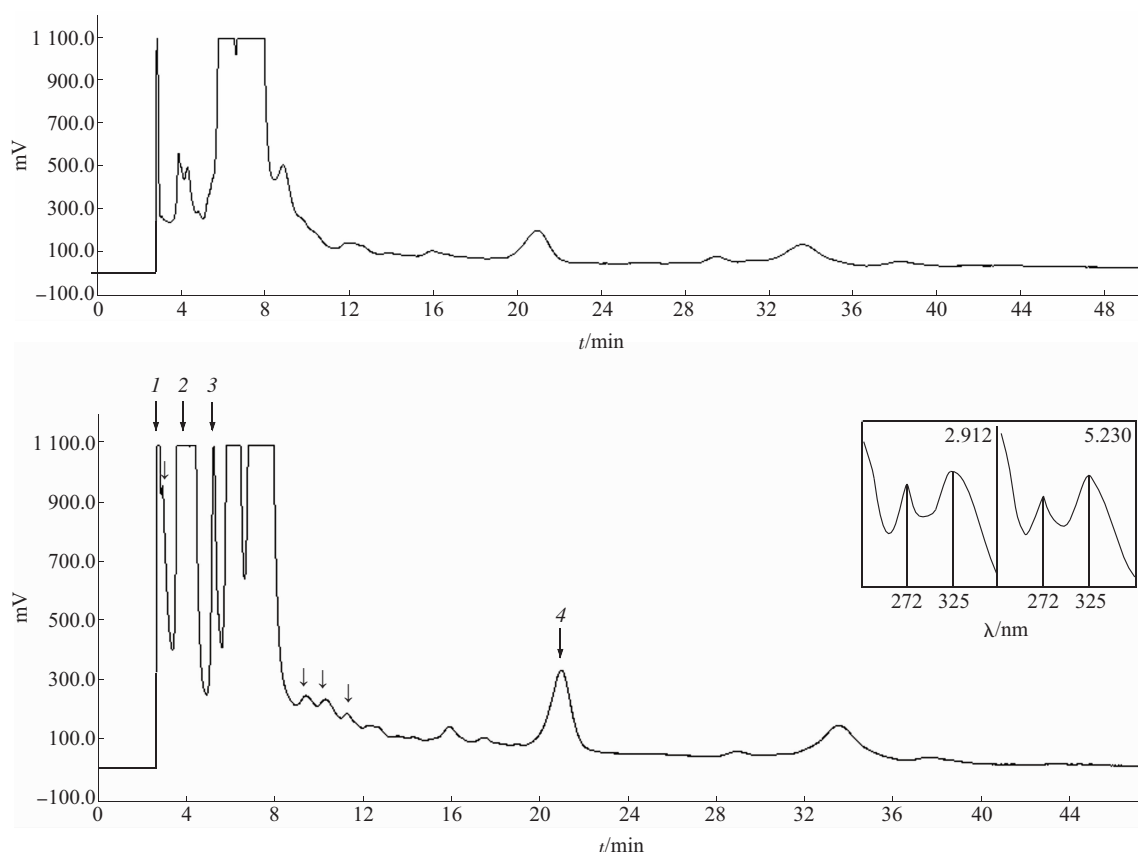


Fig. 7 HPLC analysis of phytoalexin of cucumber leaves after mechanical stimulation for 48 h

(a) Analysis of compounds in the control. (b) Analysis of compounds treated by stress.

3 讨 论

植物在长期进化过程中获得了一系列对病原菌侵染的防御机制. 利用生物或物理、化学因子处理可以改变植物对病原菌的反应, 即诱导植物产生抗病性^[2,3]. 植保素的产生和积累被认为是植物产生诱导抗性的机制之一^[17]. 目前, 在小麦、番茄和大豆等植物上已经发现生物或非生物因子可诱导其产生植保素^[18,19]. 该实验表明, 力学刺激可以诱导黄

瓜植保素的产生和积累, 并使其抗病性明显提高(图 2, 图 5). 病原真菌侵入宿主植物体内时, 除了分泌化学物质外, 还由于挤压而对细胞产生力学刺激. 由此可见, 压应力诱导黄瓜产生抗病性和植保素的积累, 与病原真菌侵入时对细胞产生的物理挤压可能有着相同的生理机制. 黄瓜是用作研究诱导系统抗病性的模式植物, 但有关植保素在其中所起的作用却报道很少^[9], 实验首次发现了力学刺激可以诱导黄瓜抗病性明显提高(图 2), 而力学刺激

后植保素又有明显的积累(图 5)。因此, 植保素的积累可能是黄瓜响应于力学刺激产生抗病性的原因之一。用压力来模拟病原菌侵入植物细胞时产生的力学信号, 但是作用在细胞上的力的大小很难确定, 因为挤压即使引起细胞产生极小的变形, 也会导致压力的大小和方向发生变化。Richard 等^[7]报道, 在植物上生长的真菌附着胞对细胞产生的压力为 80 Bar。本研究中作用在叶面上的压应力为 980 Pa(0.0098 Bar)时即可诱导抗病防卫效应, 这种作用力远小于病原菌侵入细胞所产生的力, 这表明植物细胞对力学刺激具有高度的敏感性。已有的实验还表明, 植物防卫效应的表达依赖于由类整合素介导的细胞壁和细胞膜之间的黏附^[13]。RGD 三肽序列是植物细胞壁蛋白普遍存在的结构域, 可以识别质膜类整合素并与之相互作用。当 RGD 序列处于游离状态时, 能够结合质膜类整合素的胞外域, 从而特异地干扰细胞壁和细胞膜之间的黏附^[12]。我们的实验用 RGD 阻断细胞壁与质膜间的黏附后, 力学刺激对黄瓜抗病性的诱导和植保素积累的影响几乎被完全消除。这表明力学刺激对黄瓜系统抗病性的诱导同样依赖于细胞壁与质膜间的黏附。在哺乳动物细胞的力信号转导中, 信号进入细胞的内部涉及到细胞外基质(ECM)、质膜、细胞骨架。外力传向细胞骨架依赖于与 RGD 相关的黏附, 并由整合素介导的黏附将力学信号转化为化学信号传递到细胞内部^[10, 11]。由此, 我们认为黄瓜细胞对压应力的感受可能与动物细胞有着相同的机制。

参 考 文 献

- Lucas J A. Plant immunisation: from myth to SAR. *Pesticide Science*, 1999, **55**(2): 193~196
- Durrant W E, Wang S, Dong X N. Arabidopsis SN1 and RAD51D regulate both gene transcription and DNA recombination during the defense response. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, **104**(10): 4223~4227
- Pieterse C M J, vanWees S C M, Hoffland E, *et al.* Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by biocontrol bacteria is independent of salicylic acid accumulation and pathogenesis-related gene expression. *Plant Cell*, 1996, **8**(8): 1225~1237
- AL-Kaff N S, Govey S N, Kreike M M, *et al.* Transcriptional and posttranscriptional plant gene silencing in response to a pathogen. *Science*, 1998, **279**(5359): 2113~2115
- Alvarez M E, Pennell R I, Meijer P J, *et al.* Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. *Cell*, 1998, **92**(6): 773~784
- De Nardi B, Dreos R, Del Terral, *et al.* Differential responses of coffee *Arabica* L. leaves and root to chemically induced systemic acquired resistance. *Genome*, 2006, **49**(12): 1594~1605
- Richard J, Margaret A, David H. Penetration of hard substrates by a fungus employing enormous turgor pressures. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, **88**(10): 11281~11284
- Yahraus T, Chandra S, Legendre L, *et al.* Evidence for a mechanically induced oxidative burst. *Plant Physiol*, 1995, **109**(4): 1259~1266
- Gus-Mayer S, Naton B, Hahlbrock K, *et al.* Local mechanical stimulation induces components of the pathogen defense response in parsley. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95**(14): 8398~8403
- Ingber D E. Tensegrity: The architectural basis of cellular mechanotransduction. *Annu Rev Physiol*, 1997, **59**(1): 575~599
- Ingber D E. Integrins as mechanochemical transducers. *Curr Opin Cell Biol*, 1991, **3**(1): 841~848
- Schindler S, Meiner S, Cheresch D A. RGD-dependent linkage between plant cell and plasma membrane: consequence for growth. *J Cell Biol*, 1989, **108**(2): 1955~1965
- Mellersh D G, Heath M C. Plasma membrane-cell wall adhesion is required for expression of plant defense responses during fungal penetration. *Plant Cell*, 2001, **13**(2): 413~424
- Hu J K, Shi J, Singh U, *et al.* Enrichment of vitronectin-and fibronectinlike proteins in NaCl-adapted plant cells and evidence for their involvement in plasma membrane-cell wall adhesion. *Plant J*, 1993, **3**(1): 637~646
- Gens S J, Reuzeau C, Doolittle K W, *et al.* Covisualization by computational optical-sectioning microscopy of integrin and associated proteins at the cell membrane of living onion protoplasts. *Protoplasma*, 1996, **194**(3-4): 215~230
- McNally D J, Wurms K, Labbe C, *et al.* A standardized methodology for the study of induced glycosylated plant phenolics. *Can J Plant Pathol*, 2002, **24**(4): 429~436
- Ongena M, Daayf F, Jacques P, *et al.* Systemic induction of phytoalexins in cucumber in response to treatments with fluorescent pseudomonas. *Plant Pathol*, 2000, **49**(4): 523~530
- Yasuda M, Nishioka M, Nakashita H, *et al.* Pyrazolecarboxylic acid derivative induces systemic acquired resistance in tobacco. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2003, **67**(12): 2614~2620
- Bhuiyan N H, Liu W P, Liu G, *et al.* Transcriptional regulation of genes involved in the pathways of biosynthesis and supply of methyl units in response to powdery mildew attack and abiotic stresses in wheat. *Plant Mol Biol*, 2007, **64**(3): 305~318

Disease Resistance of Cucumber Induced by Local Mechanical Stimulation*

ZHAO Hu-Cheng**, ZHENG Xiu-Peng, GAO Xiao-Hui, XI Bao-Shu

(Institute of Biomechanics and Medical Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract During the process of pathogens penetrating the plant cell, pathogens often secrete some chemicals into plant cells, at the same time, they also produce mechanical signal by physical pressure on the plant cell. Here the pressure is used as the stress signal, to study its effect on phytoalexin accumulation and the induction of plant resistance in cucumber seedling. It is found that stress can induce the resistance in cucumber seedling significantly. When breaking the plant cell wall and plasma membrane adhesion by RGD peptides, the resistance induction is almost eliminated. Results from TLC and HPLC showed that stress stimulation could increase phytoalexin accumulation in cucumber seedling. This suggests that the accumulation of phytoalexin is one possible reason of the increased resistance after stress stimulation. When the adhesion between plant cell wall and plasma membrane was block by RGD, there is only small amount of phytoalexin accumulation compared with the control, suggesting that the stress induced phytoalexin accumulation and resistance is relying on the adhesion of plant cell wall and plasma membrane.

Key words stress stimulation, phytoalexin, signal transduction, *Cladosporium cucumerinum*, cucumber

*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (10602031, 30270354).

**Corresponding author.

Tel: 86-10-62796543, E-mail: zhaohe@mail.tsinghua.edu.cn

Received: August 27, 2007 Accepted: November 6, 2007