



## 钙信号途径参与小斑病菌致病过程的调控\*

赵俊霞<sup>1</sup> 陈颖<sup>2</sup> 王立安<sup>2\*\*</sup>

(河北医科大学基础医学院 石家庄 050017)<sup>1</sup> (河北师范大学生命科学院 石家庄 050016)<sup>2</sup>

**摘要:** 为确定  $\text{Ca}^{2+}$  信号途径与玉米小斑病菌致病过程的相关性, 用可从不同位点阻断  $\text{Ca}^{2+}$  信号转导途径的抑制剂分别处理小斑病菌的分生孢子, 结果表明:  $\text{Ca}^{2+}$  螯合剂 EGTA、 $\text{Ca}^{2+}$  通道抑制剂 Verapamil、影响钙调素与钙调素依赖蛋白激酶作用位点的抑制剂 KN-93, 随着浓度的增加, 对孢子萌发和附着胞形成过程的抑制作用明显增强; 同一浓度下, 抑制剂对附着胞形成过程的抑制作用大于孢子萌发过程; 抑制剂可使附着胞形态明显变小甚至不能形成。以上结果表明钙信号途径参与了玉米小斑病菌主要致病过程的调控。

**关键词:** 钙信号, 抑制剂, 孢子萌发抑制率, 附着胞形成抑制率, 附着胞形态

**中图分类号:** Q935.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2005) 04-0001-04

### $\text{Ca}^{2+}$ Signaling Pathway Involved in *Bipolaris maydis* Conidium Germination and Appressorium Formation \*

ZHAO Jun-Xia<sup>1</sup> CHEN Ying<sup>2</sup> WANG Li-An<sup>2\*\*</sup>

(Basic Medical College of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017)<sup>1</sup>

(Life Science College of Hebei Normal University, Shijiazhuang 050016)<sup>2</sup>

**Abstract:** *Bipolaris maydis*, the causal agent of northern leaf blight of maize, forms a dome-shaped infection structure, an appressorium, to infect its host. To elucidate if calcium signaling pathway is correlated with conidium germination and appressorium formation of *Bipolaris maydis* induced by hydrophobic surface. Conidia were treated by three kinds of inhibitors. Microscopic examination and statistical data showed: ( i ) EGTA, a chelating agent selective for  $\text{Ca}^{2+}$ , Verapamil which could block  $\text{Ca}^{2+}$  channels, KN93, a selective inhibitor of CaMK could inhibit germination and appressorium formation. ( ii ) Under the same concentrations of inhibitors, appressorium formation was inhibited more strongly than conidium germination. These inhibitors caused the formation of small and abnormal appressorium. These results strongly suggested that  $\text{Ca}^{2+}$  signaling pathway was involved in conidium germination and appressorium formation induced by hydrophobic surface.

**Key words:** Calcium signaling pathway, Inhibitor, Inhibition of germination, Inhibition of appressorium formation, Morphology of appressorium.

致病真菌的致病过程是真菌和寄主相互识别、相互作用的过程。目前, 对致病真菌致病过程中的信号机制研究报道较多的是 cAMP 途径和 MAP (mitogen-activated protein, MAP) 激酶信号途径<sup>[1,2]</sup>。 $\text{Ca}^{2+}$  信号途径参与致病真菌致病过程的研究报道近几年也逐步增多。用  $\text{Ca}^{2+}$  信号途径抑制剂从不同位点阻断钙信号通路, 证实  $\text{Ca}^{2+}$  信号途

\* 河北省自然科学基金资助项目 (No. 300163)

\*\* 通讯作者 Tel: 0311-6268425, E-mail: wlian1965@126.com

收稿日期: 2004-08-02, 修回日期: 2005-03-08

径至少参与了三叶草刺盘孢菌 (*Colletotrichum trifolii*)<sup>[3]</sup>、盘长孢状刺盘孢菌<sup>[4]</sup>、稻瘟病菌 (*Magnaporthe grisea*)<sup>[5,6]</sup>、叶点霉 (*Phyllosticta ampellicida*) 致病过程<sup>[7]</sup>。钙信号转导途径的一些重要组分如钙调素 (calmodulin CaM)、钙调素依赖的蛋白激酶 (CaMK) 的基因近年在多种致病真菌中被克隆<sup>[8]</sup>。

玉米小斑病菌致病的生理生化机制研究国内外研究报道较多<sup>[9]</sup>，但对钙信号途径是否参与玉米小斑病菌致病过程的研究国内外均未见报道。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

玉米小斑病菌 (*Bipolaris maydis*) 523 菌株由河北农林科学院遗传生理研究所提供。

### 1.2 方法

**1.2.1 分生孢子的获得：**将小斑病菌菌株接种在 PDA 培养基上，25℃ 黑暗培养 7d 后，向培养基中加入 20mL 无菌水，用毛刷轻轻刷下分生孢子，12,000 r/min 离心 5 min 得孢子沉淀备用。

**1.2.2 抑制剂处理：**将孢子沉淀分别用不同浓度的 EGTA、Verapamil、KN-93 抑制剂溶液配成孢子悬液，调整孢子浓度为  $4 \times 10^4$  个/mL (血球计数板测定)。混匀后将孢子液滴于塑料投影胶片上，每滴 200 $\mu$ L。用铺有湿滤纸的培养皿保湿，于 25℃ 黑暗培养 12h。

**1.2.3 检测：**光镜 (Olympus, 40 $\times$ ) 观察并统计视野内孢子萌发及附着胞数目，每处理取 6 个视野，实验重复 3 次，按下面公式计算孢子萌发抑制率和附着胞形成抑制率。

**1.2.4 孢子萌发：**孢子萌发抑制率 =  $(1 - \text{孢子萌发数} / \text{孢子总数}) \times 100\%$ ；附着胞形成抑制率 =  $(1 - \text{形成附着胞数} / \text{孢子总数}) \times 100\%$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 EGTA 对小斑病菌孢子萌发及附着胞形成的影响

EGTA 作为一种金属螯合剂，可与  $\text{Ca}^{2+}$  形成金属螯合物，影响  $\text{Ca}^{2+}$  信号途径产生的基础。EGTA 处理后的结果见图 1。

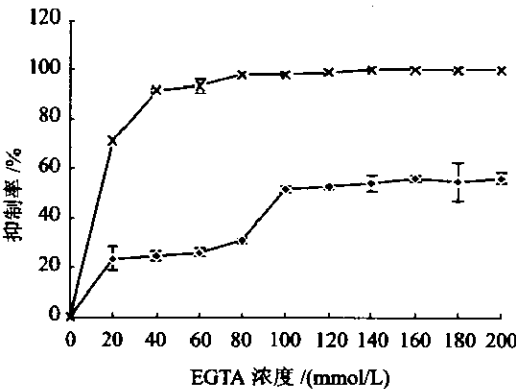


图1 EGTA 对 *Bipolaris maydis* 孢子萌发及附着胞形成的影响  
◆ 孢子萌发, × 附着胞形成

由图 1 可以看出：不同浓度的 EGTA 对孢子萌发和附着胞形成的抑制程度不同。当 EGTA 浓度为 100mmol/L 时，孢子萌发抑制率达到 50%，以后随着抑制剂浓度的增加，抑制率的增势不再明显，且始终达不到 60%。附着胞的形成过程受 EGTA 的影响明显，当 EGTA 浓度增加至 40mmol/L 时，附着胞形成的抑制率可达 90%，但以后抑制率增势也变缓，当浓度增加至 140mmol/L 时，附着胞形成抑制率达到 100%。从浓度上看附着胞形成过程对 EGTA 更敏感。上述结果表明， $\text{Ca}^{2+}$  参与了玉米小斑病菌分生孢子萌发及附着胞的形

成过程。

## 2.2 Verapamil 对玉米小斑病菌孢子萌发及附着胞形成的影响

质膜钙通道对钙信号的产生及灭活具有重要调节作用。Verapamil 是质膜钙通道抑制剂，可抑制钙离子进出细胞膜。用 Verapamil 处理后的结果见图 2。

由图 2 可以看出，当 Verapamil 浓度为 0 ~ 450  $\mu\text{mol/L}$  时，孢子萌发抑制率增势缓慢；但浓度增到 450  $\mu\text{mol/L}$  后，抑制率陡然增大，500  $\mu\text{mol/L}$  抑制剂处理的分生孢子的萌发抑制率为 50%，浓度增至 600  $\mu\text{mol/L}$  时，萌发抑制率达到 100%，完全抑制了孢子萌发。相比而言，附着胞的形成过程对 Verapamil 要敏感得多，当浓度为 100  $\mu\text{mol/L}$  时，附着胞形成抑制率为 50%；浓度增加到 250  $\mu\text{mol/L}$ ，附着胞形成抑制率达 100%。相同浓度下附着胞形成过程受 Verapamil 的抑制程度远远高于孢子萌发过程。该结果表明质膜钙通道的阻断对孢子萌发及附着胞形成过程有明显抑制作用。

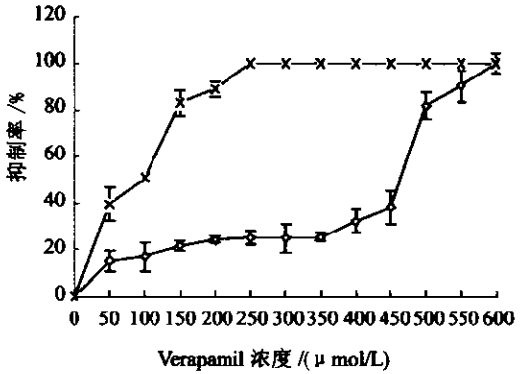


图 2 Verapamil 对 *Bipolaris maydis* 孢子萌发和附着胞形成的影响  
—◇— 孢子萌发，—\*— 附着胞形成

## 2.3 KN-93 对玉米小斑病菌孢子萌发及附着胞形成的影响

CaM 与其下游靶蛋白 CaMK 结合是保证钙信号途径畅通与发挥调控作用所必需的。KN-93 是一种  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  依赖的 CaMK 的竞争性抑制剂，它可选择的结合在 CaM 与 CaMK 的结合位点，从而阻止 CaM 与 CaMK 结合。用 KN-93 处理后的结果见图 3。

由图 3 可以看出，KN-93 使孢子萌发抑制率达 50% 的浓度为 38  $\mu\text{mol/L}$ ，当浓度增加到 70  $\mu\text{mol/L}$  时，萌发抑制率达 80%，但以后抑制率的增势趋缓，100  $\mu\text{mol/L}$  的 KN-93 未能完全抑制孢子萌发。附着胞形成抑制率达 50% 的浓度为 20  $\mu\text{mol/L}$ ，当浓度为 40  $\mu\text{mol/L}$  时，抑制率达到 88.29%，以后对附着胞形成的抑制率的增势也变缓慢，但浓度达 100  $\mu\text{mol/L}$  时可完全抑制附着胞形成。相同浓度下 KN-93 对附着胞形成的抑制作用高于对分生孢子萌发的抑制作用。以上结果表明，KN-93 对小斑病菌分生孢子萌发和附着胞的形成有重要的抑制作用。CaM 依赖的 CaMK 参与了孢子萌发和附着胞形成过程的调控。

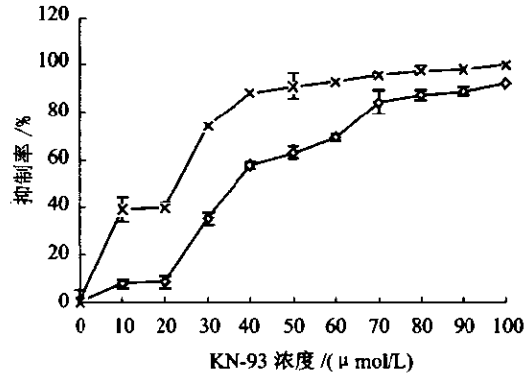


图 3 KN93 对 *Bipolaris maydis* 孢子萌发和附着胞形成的影响  
—◇— 孢子萌发，—\*— 附着胞形成

## 2.4 钙信号途径抑制剂对玉米小斑病菌附着胞形态的影响

EGTA、Verapamil、KN-93 3 种抑制剂均严重影响玉米小斑病菌孢子形成正常附着胞。在无抑制剂条件下，小斑病菌孢子在疏水界面上可形成正常附着胞（图 4-2），但经抑制剂处理后的孢子均不能形成正常附着胞。低浓度抑制剂下形成的附着胞很小

(图 4-3), 而高浓度抑制剂下则完全不能形成 (图 4-4), 在统计抑制剂对附着胞形成的影响时将这两种情况均视为不能形成正常附着胞。

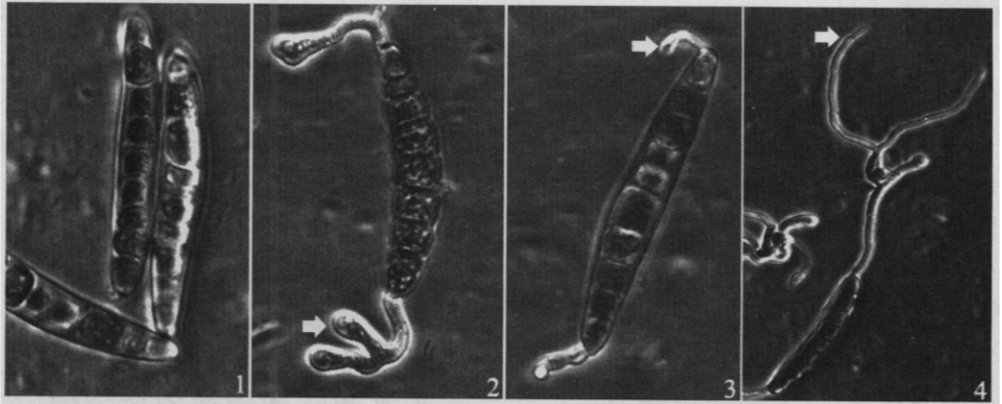


图 4 钙信号途径抑制剂 (EGTA) 对玉米小斑病菌附着胞形态的影响 ( $\times 200$ )

1 玉米小斑病菌分生孢子, 2 分生孢子形成的正常附着胞 (水培), 3 分生孢子形成的小附着胞 (EGTA 浓度 40mmol/L), 4 只有芽管而无附着胞形成 (EGTA 浓度 100mmol/L)

综合上述结果可以看出: 三种抑制剂对玉米小斑病菌孢子萌发及附着胞形成过程均有影响, 表明钙信号途径参与了小斑病菌孢子萌发及附着胞形成过程即主要致病过程的调控; 抑制剂对附着胞形成的抑制作用明显高于对孢子萌发过程, 说明钙信号途径对疏水条件下附着胞形成过程更为重要。

### 3 讨论

在实验中, 我们用 EGTA 使  $\text{Ca}^{2+}$  成为螯合态, 从而降低细胞内、外自由  $\text{Ca}^{2+}$  浓度。结果表明, 随着 EGTA 浓度的增大, 对孢子萌发和附着胞形成的抑制作用加强, 说明自由  $\text{Ca}^{2+}$  浓度降低导致了抑制作用的发生。但随着 EGTA 浓度的增加, 孢子萌发抑制率进入一个平台期, 不再上升, 其原因可能是由于内源钙库的作用, EGTA 只将胞外自由  $\text{Ca}^{2+}$  螯合掉, 但胞内钙库仍可提供钙信号。EGTA 对 *Bipolaris maydis* 孢子萌发不能完全抑制, 然而对附着胞形成的抑制率却达到了 100%, 这与 Kim 等 (1998) 用 EGTA 对 *Collectotrichum gloeosporioides* 孢子萌发的处理结果存在差异, 其报道 16mmol/L EGTA 可完全抑制 *C. gloeosporioides* 孢子萌发<sup>[4]</sup>, 但与王立安等 (2003) 用 EGTA 对稻瘟病菌孢子萌发的处理结果相似<sup>[6]</sup>。此外, Lee 等 (1998) 曾报道 EGTA 等钙信号途径抑制剂对稻瘟病菌孢子萌发无抑制作用<sup>[5]</sup>, 在本实验中, EGTA 和 KN93 均未实现对玉米小斑病菌孢子萌发百分百抑制, 这些差异是否由于实验材料不同所致尚需进一步研究。

### 参考文献

- [1] Xu J R, Hamer J E. *Genes and Development*, 1996, **10**: 2696 ~ 2706.
- [2] Xu J R. *Fungal Genetics and Biology*, 2000, **31**: 137 ~ 152.
- [3] Warwar V, Dickman M B. *Appl Environ Microbiol*, 1996, **62**: 74 ~ 79.
- [4] Kim Y K, Li D X, Kolattukudy P E. *Journal of Bacteriology*, 1998, **180**: 5144 ~ 5150.
- [5] Lee S C, Lee Y H. *Mol Cells*, 1998, **8** (6): 698 ~ 704.
- [6] 王立安, 王源超, 李昌文, 等. 菌物系统 (真菌学报), 2003, **22** (3): 457 ~ 465.
- [7] Shaw B D, Hoch H C. *Fungal Genetics and Biology*, 2000, **31**: 43 ~ 53.
- [8] de Carvalho M J, Amorim J R S, Daher B S, et al. *Fungal Genetics and Biology*, 2003, **39** (3): 204 ~ 210.
- [9] 崔洋, 陈永丽, 魏建昆, 等. 微生物学通报, 1999, **26** (1): 47 ~ 49.