

# 普通细菌性疫病菌原感染普通菜豆早期的免疫反应研究

王梦菲, 常玉洁, 王兰芬, 王述民, 武晶

(中国农业科学院作物科学研究所/农业农村部粮食作物基因资源评价利用重点实验室, 北京 100081)

**摘要:** 菜豆普通细菌性疫病 (CBB) 是影响菜豆生产最严重的病害之一, 在普通菜豆的全生育期内均可发生, 病害严重时可导致 80% 的产量损失。防治该病最有效的方式是种植抗病品种, 为了挖掘抗病种质, 对 280 份普通菜豆资源进行了抗病性鉴定, 鉴定出 1 份抗病材料, 90 份中抗材料, 189 份感病材料。从材料中选择抗病资源紫花芸豆和感病资源塔朗花菜豆进行病原菌感染早期的免疫反应研究, 结果发现接种后抗病材料的  $H_2O_2$  含量始终高于感病材料, 并且在 12 h-96 h 间, 抗感之间的差异可达到极显著水平, DAB 染色结果也说明抗病材料在病原菌接种处存在  $H_2O_2$  积累。对抗感材料接种后的样本进行台盼蓝染色和胼胝质含量测定, 发现接种后 6 h, 抗病材料中的胼胝质含量显著上调, 台盼蓝染色结果表明抗病材料可以通过控制接种部位的细胞死亡来限制病原菌的扩散, 以上结果表明抗病材料在病原菌感染早期触发了免疫反应, 从而提高了植株的抗病性。

**关键字:** 普通菜豆; 普通细菌性疫病; 免疫反应; 细胞死亡; 胼胝质沉积

## Study on Early Immune Response of Common Bean Infected by Common Bacterial Blight Pathogen

WANG Mengfei, CHANG Yujie, WANG Lanfen, WANG Shumin, WU Jing

(Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences/ Key Laboratory of Grain Crop Genetic Resources Evaluation and Utilization, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Beijing 100081)

**Abstract:** Common bacterial blight (CBB) of common bean is one of the most serious diseases affecting the production of common bean, which occurs throughout the whole growth period of common bean, and leads to be as high as 80% yield loss. The most effective way to control the disease is to plant resistant varieties. In order to excavate disease-resistant germplasm, 280 resources of common bean were identified for resistance to CBB, and 1 resistant, 90 moderately resistant, and 189 susceptible materials were identified. We selected resistant Zihuayundou and susceptible Talanguhuacaidou for the study of immune response in the early stage of pathogen infection. The results showed that  $H_2O_2$  content of resistant material was always higher than that of susceptible material after inoculation, and the difference between resistant and susceptible materials was very significant from 12 h to 96 h. The results of DAB staining also showed that  $H_2O_2$  accumulation existed in resistant materials at the site of pathogen inoculation. Trypan Blue staining and callose content determination were carried out for resistant and susceptible materials after inoculation. It was found that the callose content in resistant material was significantly up-regulated 6 h after inoculation. Trypan blue staining results indicated that resistant material could limit the spread of pathogens by controlling cell death at the inoculation site. These results showed that the resistant variety triggered the immune response at the early stage of the pathogen infestation, and thus increased the resistance of the plants to CBB.

**Key words:** common bean; common bacterial blight; immune reaction; cell death; callose deposition

普通菜豆 (*Phaseolus vulgaris* L.) 又名芸豆、四季豆, 其籽粒富含蛋白质, 膳食纤维等营养元素, 且脂肪含量低, 利于人体吸收, 在保障人民营养需求和调节膳食结构方面发挥着重要作用<sup>[1-2]</sup>。普通菜豆是全球种植面积最大, 消费人群最多的食用豆类, 也是我国重要的栽培作物<sup>[3-4]</sup>。由于各种逆境胁迫的影响, 普通菜豆的单产水平较低, 其中病害是影响菜豆产量的重要因素之一, 在这些病害中, 菜豆普通细菌性疫病 (CBB),

收稿日期: 2024-10-21 网络出版日期:

URL:

第一作者研究方向为食用豆种质资源, E-mail: [1433569104@qq.com](mailto:1433569104@qq.com)

通信作者: 武晶, 研究方向为食用豆种质资源, E-mail: [wujing@caas.cn](mailto:wujing@caas.cn)

基金项目: 国家自然科学基金 (32201748); 国家现代农业产业技术体系-食用豆 (CARS-08);

Foundation projects: National Natural Science Foundation (32201748); The China Agriculture Research System (CARS-08)

common bacterial blight)是影响菜豆生产的主要病害之一。CBB是由地毯草黄单胞菌菜豆变种 *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Xap) 和褐色黄单胞菌褐色亚种 *X. fuscans* subsp. *fuscans* (Xff) 侵染所致的一种细菌性病害, 全生育期内均可发病, 最适宜的发病温度为 28℃, 当病原菌侵染叶片时, 叶片表面首先表现出水浸状斑点, 而后叶片不断变薄, 变透明, 严重时病斑合并, 造成植株死亡, 一般可导致 20%-60% 的产量损失, 严重时可减产 80% [5-8]。目前, 对于 CBB 的防治主要是通过种植无菌种子和喷施化学药剂, 这只能在短时间内降低 CBB 的危害, 而种植抗病品种是防治病害最有效的方式, 但是生产上所用的普通菜豆资源对于 CBB 的抗性均为中低水平, 高抗材料缺乏。

植物在与病原菌的长期互作过程中进化出了高效的免疫系统, 包括模式触发的免疫 (PTI, PAMP-triggered immunity) 和效应子触发的免疫 (ETI, effector-triggered immunity) [9]。当病原菌侵染寄主时, 寄主细胞膜表面的模式识别受体 (PRRs, pattern-recognition receptors) 可以识别病原菌保守的相关分子模式 (PAMPs, pathogen-associated molecular pattern) 触发 PTI, 如细菌鞭毛蛋白 flg22 可以被受体 FLS2 识别, 细菌延伸因子 elf18 可以被 ERF 识别, 从而使植物表现出胼胝质沉积和活性氧 (ROS, reactive oxygen species) 爆发等一系列免疫反应来抵御病原菌的入侵 [10-11]。PTI 是一种即时的免疫反应, 可以阻碍大多数病原菌侵染, 但无法对所有病原菌产生免疫 [12]。为了逃避 PTI, 病原菌向寄主分泌效应因子来破坏植物免疫, 而植物也随之进化出细胞内受体, 如细胞内核苷酸结合域富亮氨酸重复序列受体 (NLRs, nucleotide binding leucine-rich repeat) 来识别效应子, 从而激活 ETI [13-14]。植物在触发免疫反应的过程中涉及一系列信号事件, 如 ROS、超敏反应 (HR, hypersensitive response) 以及胼胝质沉积等 [15]。HR 的主要特征在于接种病原菌后引起细胞快速死亡, 从而限制病原菌定殖, 提升植物抗病性 [16]。植物细胞中的 ROS 包含过氧化氢 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)、超氧化物 (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) 等多种类型, 过量的 ROS 不仅可以直接降低病原菌活力, 还可以作为信号分子触发其他免疫反应, 当植物受到病原菌侵染时, ROS 迅速积累, 对细胞造成损伤, 进一步导致细胞死亡, 抑制病原菌侵染 [17-21]。胼胝质是一种 β-1-3 葡聚糖细胞壁聚合物, 当植物受到病原菌侵染时, 胼胝质可沉积在胞间连丝颈部, 从而阻碍病原菌的运输通道, 提高植株抗病性 [22]。

针对上述问题, 本研究拟对 280 份普通菜豆资源进行 CBB 抗病性鉴定, 从中筛选出抗病种质资源, 为生产上防治 CBB 提供新的抗源, 并对 CBB 抗感材料在接菌后不同时间点引发的细胞死亡情况、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和胼胝质含量进行了监测, 以探讨 ROS、细胞死亡以及胼胝质对普通菜豆 CBB 抗性的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

280 份普通菜豆资源为国家作物种质库保存 (表 1), CBB 病原菌 XS<sub>2</sub> 为地毯草黄单胞杆菌菜豆致病变种 *X. axonopodis* pv. *phaseoli* (Xap), 2010 年分离于山西省岢岚县采集的感病种子 [5], 现保存于本实验室; DAB 染液购于北京酷来博科技有限公司; 水饱和苯酚、乳酸和黑色 96 孔板购于北京万景励志生物技术有限公司; 台盼蓝购于北京索莱宝科技有限公司, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量测定试剂盒购于北京碧云天科技有限公司; 水合氯醛购于北京梦怡美生物科技有限公司, 胼胝质含量测定试剂盒购于苏州科铭生物技术有限公司。

表 1 普通菜豆资源来源信息

Table 1 Source information of common bean

来源 Source	份数 Number	来源 Source	份数 Number	来源 Source	份数 Number	来源 Source	份数 Number
黑龙江	37	四川	12	德国	1	墨西哥	3
云南	10	内蒙古	43	加拿大	1	国际热带农业中心	4
贵州	14	河北	6	美国	9	英国	1
湖北	1	北京	2	危地马拉	1	土耳其	2
吉林	11	山西	15	哥伦比亚	15	日本	4
陕西	20	辽宁	1	西班牙	1	阿根廷	1
甘肃	5	江苏	1	智利	2	国外未知	4
国内未知	53						

## 1.2 试验方法

1.2.1 病原菌活化 将冻存的 *Xap* 菌株 XS<sub>2</sub> 从 -80°C 冰箱取出并在 MT 培养基上活化 (表 2), 28°C 培养 48 h, 长出单克隆后挑取菌体于 NB 液体培养基中, 28°C, 220 rpm 震荡培养 48 h, 用蒸馏水调节菌液浓度为 OD<sub>600</sub>≈0.5。

表 2 MT 培养基配方

Table 2 MT medium formulation

组分 Component	含量 Content	配制方法 Preparation methods
<b>A</b>		
脱脂奶粉	10 g/L	
无菌水	500 mL	
<b>B</b>		
豚蛋白胨	10 g/L	121°C 灭菌 15 min 后, 将 A、B、C 组分混合, 将组分 D 所含抗生素分别溶于 1 mL 70% 乙醇, 待培养基冷却至 50°C 左右加入组分 D, 制平板。
酪氨酸	0.5 g/L	
氯化钙	0.25 g/L	
琼脂粉	15 g/L	
无菌水	500 mL	
<b>C</b>		
吐温 80	10 mL	
<b>D</b>		
制霉菌素	40 mg	
头孢氨苄	80 mg	
盐酸万古霉素	10 mg	

1.2.2 CBB 抗性鉴定方法 280 份资源的抗病性鉴定于冬季在中国农业科学院作物科学研究所检疫基地温室内进行, 温室内白天温度约为 28°C±2°C, 晚上约 20°C±2°C。每份资源选取 7 粒饱满一致的普通菜豆种子播种于 450 mL 纸杯中, 待植株初生叶完全展开时用蘸取菌液的枪头在初生叶右侧距主脉 0.5 cm 处等距离刺穿 3 个位点, 接种后采用温室地面水层自然蒸发的方式进行保湿<sup>[5]</sup>, 接种 14 d 后进行抗性评价。用于台盼蓝染色、DAB 染色、胍胍质测定和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 测定的抗感材料播种于口径为 7 cm × 7 cm 盒中, 每盒播种 1 粒, 一个处理播种 20 粒, 放于 25°C, 光照 16 h, 黑暗 8 h 的培养箱中培养, 待植株三出复叶完全展开时, 用蘸取菌液的枪头在叶片右侧距主脉 0.5 cm 处等距离刺穿 3 个位点, 接种后放于 28°C 培养箱中保湿培养。

1.2.3 表型鉴定标准 观察每片叶子的发病情况, 参照评级标准调查植株叶片的发病程度 (表 3), 并计算平均发病级别, 根据平均发病级别可以将抗性划分为抗 (R,  $\bar{x} \leq 2$ )、中抗 (MR,  $2 < \bar{x} \leq 4$ )、感病 (S,  $4 < \bar{x} \leq 8$ ) 和高感 (HS,  $\bar{x} > 8$ )<sup>[8]</sup>。

表 3 CBB 抗病等级划分标准

Table 3 CBB disease resistance class classification standards

发病级别 Rating scale	叶片病症 Leaf symptoms
1	无明显症状
2	接种区周围开始变色, 区域不超过 2 mm
3	接种区周围变色枯萎 3~5 mm
4	接种区周围变色且连接合并
5	接种区完全变色
6	小于 1/3 的对照区变色
7	1/3 的对照区变色
8	2/3 的对照区变色
9	接种叶片全部变色
10	接种叶片全部变色且其他叶片也变色

1.2.4 台盼蓝染色 采集抗感材料接菌后 0 h、6 h、12 h、24 h、48 h、72 h、96 h 的叶片，每个时间点取 3 片来自不同植株的叶片，放入 50 mL 离心管中，加入约 15 mL 台盼蓝染液(25%乳酸，25%水饱和苯酚，25%甘油，2.5 mg/mL 台盼蓝)，在 95°C-100°C 的沸水中煮沸 5-10 min，期间多次晃动离心管，直至叶片染成蓝色，排出染色液，用 1.25 g/mL 的水合氯醛溶液脱色 3 d，直至叶片变透明。实验设置 3 次生物学重复。

1.2.5 DAB 染色 将抗感材料接菌后 0 h、6 h、12 h、24 h、48 h、72 h、96 h 的叶片，每个时间点取 3 片来自不同植株的叶片，放入 50 mL 离心管中，倒入 DAB 染液，室温过夜染色，次日排出染色液，加入 95% 的无水乙醇煮沸 10 min，直至去除叶绿素进行处理。实验设置 3 次生物学重复。

1.2.6 胍胍质测定 采集抗感材料接菌后 0 h、6 h、12 h、24 h、48 h、72 h、96 h 的叶片，每个时间点取 3 片来自不同植株的叶片进行处理，每片叶子取 0.1 g 左右放入 4 mL 离心管中，加入 1.5 mL 无水乙醇，4°C 放置过夜，次日用蒸馏水洗去残留乙醇。用胍胍质含量测定试剂盒进行测定，测定步骤参照说明书。实验设置 3 次生物学重复。

1.2.7 过氧化氢定量检测 采集抗感材料接菌后 0 h、6 h、12 h、24 h、48 h、72 h、96 h 的叶片，每个时间点取 3 片来自不同植株的叶片进行处理，每片叶子取 0.2 g 左右放入 1.5 mL 离心管中。用 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量测定试剂盒进行测定，测定步骤参照说明书。实验设置 3 次生物学重复。

## 2 结果与讨论

### 2.1 普通菜豆种质资源 CBB 抗性鉴定

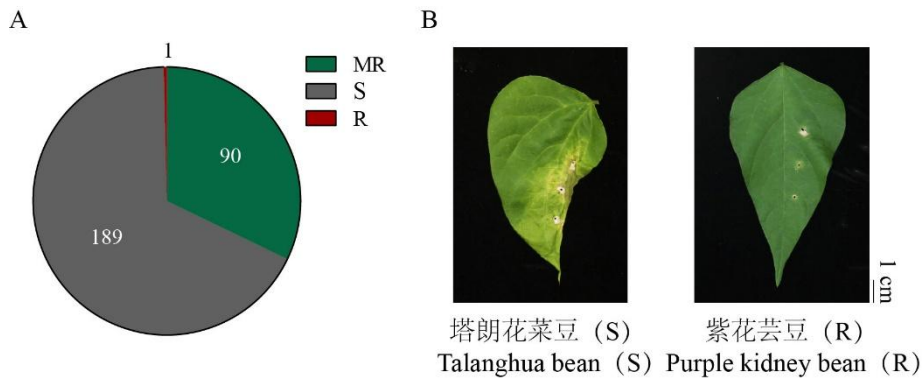
280 份普通菜豆资源用于 CBB 抗性鉴定，其中包括 231 份国内资源，主要来源于内蒙古、黑龙江等地，49 份国外资源，主要来源于哥伦比亚、美国等地。采用针刺叶片法对这些资源进行抗性鉴定，根据抗性评价标准，可以将这些材料的发病级别分为 2-7 级（图 1）。依据平均发病级别，从 280 份材料中鉴定出 1 份抗病种质，90 份中抗种质，189 份感病种质（图 2A）。

为进一步研究普通菜豆响应病原菌侵染早期的免疫反应，选用鉴定出的抗病材料紫花芸豆和感病材料塔朗花菜豆接菌后不同时间点的样本进行 DAB 和台盼蓝染色，并对样本中的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量和胍胍质含量进行测定。紫花芸豆为地方品种，国家统一编号为 F0004662，平均发病级别为 2 级，接种病原菌后，仅在接种部位形成病斑且不向外扩展。塔朗花菜豆也为地方品种，国家统一编号为 F0005368，平均发病级别为 6.67 级，接种病原菌后病斑从接种部位扩散到叶脉左侧，叶片开始变色变薄（图 2B）。



图 1 植株发病症状

Figure 1 Symptoms of plant disease



A: 普通菜豆 CBB 抗性分布图, 标注数字表示资源数量; B: 抗感材料接种 CBB 病原菌表型图。

A: Distribution of CBB resistance in common bean; B: Phenotypes of resistant and susceptible varieties inoculated with CBB pathogens

图 2 普通菜豆 CBB 抗性分布及抗感品种接种 CBB 病原菌表型图

Figure 2 Distribution of CBB resistance in common bean and phenotypes of resistant and susceptible varieties inoculated with CBB pathogens

## 2.2 抗病资源接种后在接种处积累 $H_2O_2$

对抗感资源接种病原菌后 0 h, 6 h, 12 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h 的叶片进行 DAB 染色, 染色结果显示, 与感病材料相比, 抗病材料的叶片在接种后表现出明显的红棕色, 尤其在接种后 6 h 和 12 h 时, 接种部位的染色效果更加明显(图 3)。定量检测抗感材料接种后不同时间点叶片中的  $H_2O_2$  含量, 利用标品绘制标准曲线, 得到趋势方程为  $y=0.0178x+0.1467$ , 相关系数达 0.9949 (图 4A)。利用趋势方程计算样本中  $H_2O_2$  的含量, 发现抗感病材料接种后 0 h, 叶片中的  $H_2O_2$  含量没有显著差异, 接种后 6 h, 抗感材料中的  $H_2O_2$  的含量均有所提高, 但抗感材料间没有显著差异, 接种后 12 h、24 h、48 h、72 h、96 h, 抗感间的差异达到极显著水平, 尤其在接种后 48 h 时, 抗病材料中  $H_2O_2$  的含量达  $20.78 \mu\text{mol/L}$ , 而感病材料中  $H_2O_2$  的含量仅为  $5 \mu\text{mol/L}$  (图 4B)。以上结果表明, 在病原菌侵染植株后 96 h 内, 抗病材料可以在接种部位刺激  $H_2O_2$  积累。

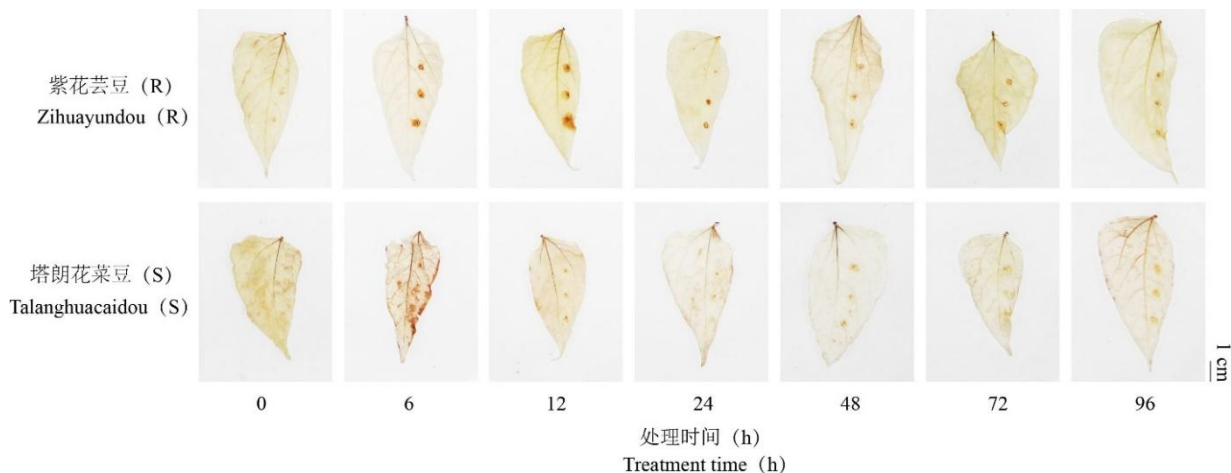
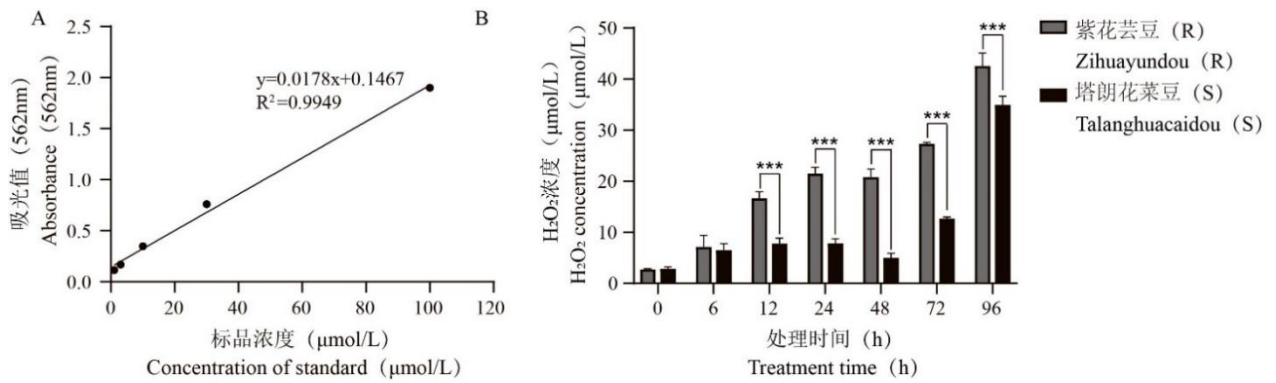


图 3 抗感材料接种后不同时间点叶片 DAB 染色

Figure 3 DAB staining of leaves of resistant and susceptible varieties at different time points after inoculation



A: 利用标准品绘制的标准曲线; B: 抗感材料接菌后不同时间点叶片 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量测定, 值为三个重复的平均值 (±标准差), 采用双尾 t 检验进行显著性分析, \*\*\*代表 0.001 水平上有显著差异

A: Standard curves using standards; B: Determination of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> content in leaves of susceptible and resistant varieties at different time points after inoculation. Values are means (±SE) of three replications. Significance analyses were performed using two-tailed t-tests. \*\*\* indicates a significant difference at the 0.001 level

图 4 抗感材料接菌后不同时间点叶片 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 积累

Figure 4 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation at different time points after inoculation of resistant and susceptible varieties

### 2.3 抗病资源接菌后引发细胞死亡

当植株受到病原菌侵染时, 抗病材料会快速触发免疫反应, 使接种部位的细胞死亡, 以防止病原菌进一步扩散。对抗感材料接菌后不同时间点的叶片进行台盼蓝染色, 如果植物细胞死亡, 则细胞膜的通透性增加, 从而使台盼蓝染液进入细胞, 将细胞染成蓝色, 反之, 活细胞不会被染色, 从染色结果可以看出, 接菌后 0 h 时, 抗病材料接种部位均没有发生细胞死亡, 接菌后 6 h 及之后的时间点, 抗病材料的细胞死亡仅局限于接种部位, 从而将病原菌限制于接种处, 感病材料的叶片接种处虽然也被染成蓝色, 但病原菌的扩散并没有被抑制, 在接种病原菌后 24 h 时就可以看到明显的病斑, 而且随着接种时间变长, 病斑也在逐渐变大 (图 5)。以上结果表明抗病材料在受到病原菌侵染时会触发细胞死亡, 从而限制病原菌的扩散, 提高植株抗病性。

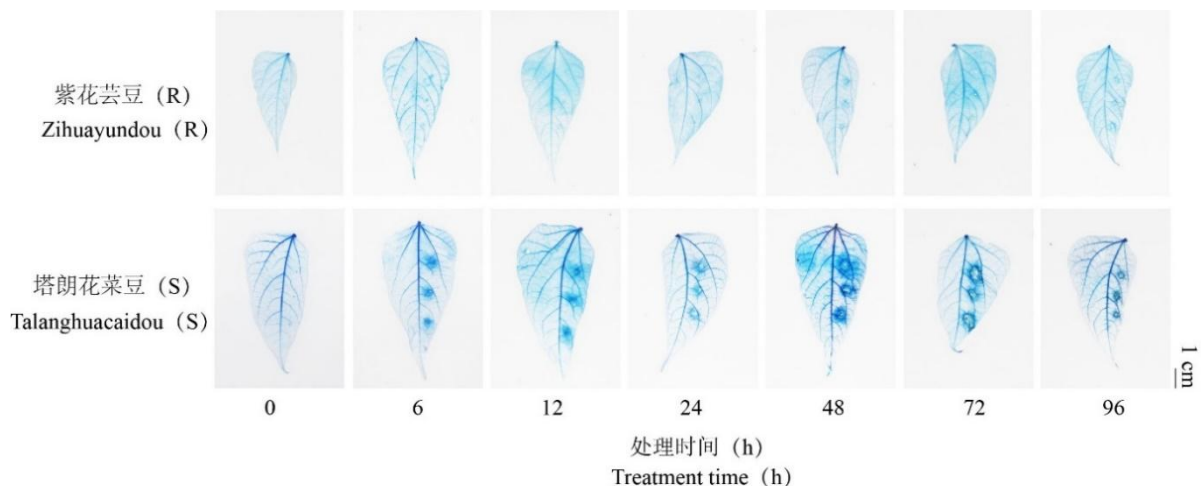
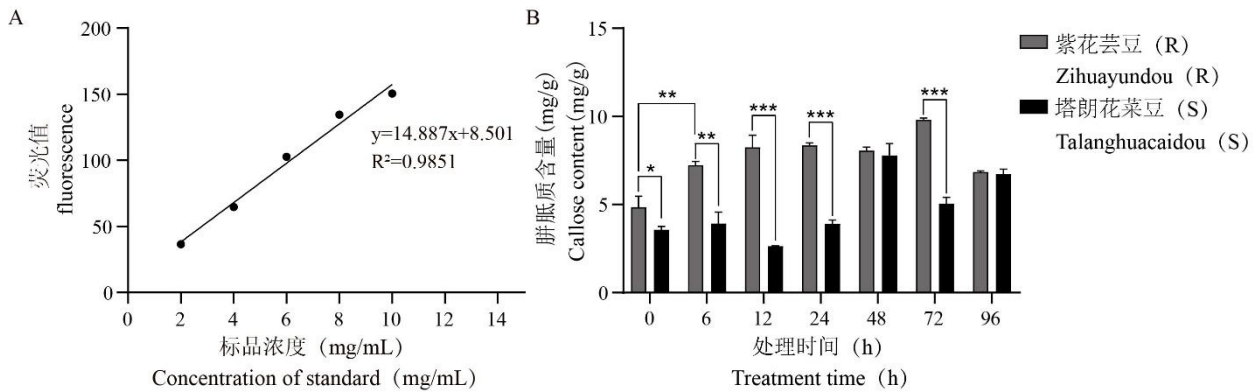


图 5 抗感材料接菌后不同时间点叶片台盼蓝染色

Figure 5 Trypan blue staining of leaves of susceptible and resistant varieties at different time points after inoculation

## 2.4 抗病资源接种病原菌后胼胝质含量升高

对抗感材料接种病原菌后 0 h, 6 h, 12 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h 的叶片进行胼胝质测定, 利用标准品绘制标准曲线, 得到趋势方程为  $y=14.887x+8.501$ , 相关系数达 0.9851(图 6A), 利用趋势方程计算抗感材料接菌后不同时间点的胼胝质含量, 发现抗病材料叶片中的胼胝质含量始终高于感病材料, 接菌后 0 h, 抗感材料间的胼胝质含量就存在显著差异, 接菌后 6 h, 抗病材料中的胼胝质含量显著上调, 而感病材料无显著差异, 在接菌后 12 h、24 h 和 72 h 时, 抗感间的差异可达到极显著水平(图 6B), 尤其在接菌 12 h 后, 抗病材料中的胼胝质含量达 8.25 mg/g, 而感病材料中的胼胝质含量仅 2.63 mg/g, 抗感间的差异最为显著, 表明在受到病原菌侵袭时, 抗病材料可以产生大量的胼胝质来堵塞病原菌的运输通道, 从而提高植物的抗病能力。



A: 利用标准品绘制的标准曲线; B: 抗感品种接菌后不同时间点叶片胼胝质含量测定, 值为三个重复的平均值 (±标准差), 采用双尾 t 检验进行显著性分析, \*、\*\*和\*\*\*分别代表 0.05、0.01、0.001 水平上有显著差异,

A: Standard curves using standards; B: Determination of callus content at different time points after inoculation of susceptible and resistant varieties. Values are means (±SE) of three replications. Significance analyses were performed using two-tailed t-tests. \*, \*\* and \*\*\* indicate significant differences at the 0.05, 0.01 and 0.001 levels, respectively.

图 6 抗感材料接菌后不同时间点叶片胼胝质积累

Figure 6 Callus accumulation at different time points after inoculation of resistant and susceptible varieties

## 2.5 讨论

当植物受到病原菌侵染时, 体内的防御反应被触发, 产生 ROS、细胞死亡和胼胝质沉积等防御反应来阻止病原菌的入侵。ROS 是指含有氧的化学反应性分子, 在植物的生长发育过程中具有重要作用是植物正常代谢的副产物<sup>[23-24]</sup>。正常条件下, 植物体内 ROS 的积累和清除处于平衡状态, 当植物受到生物和非生物胁迫时, 这种平衡被打破, 高水平的 ROS 积累会破坏细胞的氧化还原状态, 导致细胞产生氧化损伤<sup>[24-25]</sup>。植物体内常见的 ROS 包括  $O_2^{\cdot-}$ 、 $\cdot OH$ 、 $H_2O_2$  和  $^1O_2$  等形式, 可以在叶绿体、线粒体、质外体、过氧化物酶体等多个区域产生, 并且 ROS 积累的区域随植物所受胁迫的不同有一定差异<sup>[17, 25]</sup>。植物受到病原菌侵染时产生的 ROS 主要由呼吸爆发氧化酶同源蛋白 (RBOHs, respiratory burst oxidase homologues) 介导, 在质外体中产生, 首先, RBOHs 催化  $O_2$  还原为  $O_2^{\cdot-}$ , 随后质外体中的超氧化物歧化酶 (SOD, superoxide dismutase) 将  $O_2^{\cdot-}$  迅速转化为  $H_2O_2$ , 对细胞造成毒害作用, 从而破坏病原菌生长环境中氧化还原状态的平衡, 并且可以在病原菌感染部位诱导细胞死亡, 以消除病原菌生长的能量来源<sup>[26-28]</sup>。为了破坏宿主的防御反应, 病原物开始分泌过氧化氢酶 (CAT, catalase) 和过氧化物酶 (POD, peroxidase) 等解毒酶来中和宿主的 ROS 爆发, 用核盘菌侵染烟草叶片后, 会触发宿主的 ROS, 而菌体中的 *SsCat2* 基因可以通过影响宿主中  $H_2O_2$  的积累来调节菌株的毒性, *SsCat2* 突变体菌株接种烟草叶片后表现出较小的病斑和更少的  $H_2O_2$  积累<sup>[29-30]</sup>。

$H_2O_2$  是 ROS 中较常见和稳定的一种形式, 通常被认为是二级信使发挥重要的生理作用<sup>[17]</sup>。DAB 染色是一种常见的可以直观反应  $H_2O_2$  积累的方法, 当植物中有  $H_2O_2$  存在时, 细胞中的过氧化物酶将  $H_2O_2$  中的

氧释放出来，氧化 DAB 形成棕色反应产物，根据棕色产物颜色深度和位置就可以看出  $H_2O_2$  是否积累，经常作为一种辅助手段用于评估植物是否触发 ROS，在小麦中沉默 *TaCAMTA4* 后，植株抗病性增强，且接种部位染色也被染成红棕色，在烟草中过表达 *ScOPRI* 后表现出较弱的病症和更深的 DAB 染色<sup>[31-32]</sup>。为了探索普通菜豆在 CBB 病原菌入侵后不同时间  $H_2O_2$  含量的变化，本研究对抗感材料接菌后不同时间点的样本进行 DAB 染色，发现抗病材料接种部位被染成明显的红棕色，表明叶片中存在  $H_2O_2$  的积累，进一步对叶片中的  $H_2O_2$  含量进行定量检测，发现抗病材料中  $H_2O_2$  的含量始终高于感病材料，且抗感间的差异在接种病原菌 12 h 及之后的时间点达到极显著水平，表明抗病材料在病原菌入侵后可以积累 ROS。

持续的 ROS 爆发可以引发 HR，导致细胞坏死，从而将病原菌局限在接种部位，防止其进一步扩散<sup>[33-34]</sup>。台盼蓝染色是一种检测细胞死亡的方法，可用于检测植物是否触发 HR。本研究对抗感材料接菌后不同时间点的叶片进行台盼蓝染色，观察到抗病材料仅在接种部位被染成蓝色，表明在接种处发生了细胞死亡，从而将病原菌限制于接种处，而感病材料在接种处虽然也存在细胞死亡，但随着接菌时间的延长，病斑也在逐渐变大，表明抗病品种可以触发有效的 HR 来抑制病原菌的扩散。ROS 爆发后还会引发植物激素水杨酸的积累和胼胝质的沉积，从而阻止病原体的传播<sup>[17]</sup>。胼胝质是一种植物多糖，沉积在胞间连丝颈区附近的细胞壁上，可以控制胞间连丝的通透性，胼胝质沉积会导致运输空间的收缩，胼胝质降解则促进胞间连丝运输<sup>[35]</sup>。如菊花矮生病毒(CSVd, chrysanthemum stunt virus)对不同品种的菊花的侵染存在差异，主要是由于不同品种的茎间分生组织中胞间连丝胼胝质的水平，敏感品种胼胝质含量低，所以可以促进病原菌在植株中的扩散<sup>[36]</sup>。本研究对抗感品种接菌后不同时间点的样本进行胼胝质含量测定，发现抗病品种中的胼胝质含量始终高于感病品种，且在接菌后 6 h，抗病品种的胼胝质水平显著上调，表明抗病品种在病原菌侵染早期触发了胼胝质积累。



## 参考文献

- [1] Rodríguez L, Mendez D, Montecino H, Carrasco B, Arevalo B, Palomo I, Fuentes E. Role of *Phaseolus vulgaris* L. in the prevention of cardiovascular diseases-cardioprotective potential of bioactive compounds. *Plants (Basel, Switzerland)*, 2022, 11(2): 186
- [2] Hayat I, Ahmad A, Masud T, Ahmed A, Bashir S. Nutritional and health perspectives of beans (*Phaseolus vulgaris* L.): an overview. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2014, 54(5): 580-592
- [3] 常玉洁, 王兰芬, 王述民, 武晶. 菜豆属野生资源概述. *植物遗传资源学报*, 2020, 21(06): 1424-1434
- Chang Y J, Wang L F, Wang S M, W J. Overview of wild resources of *Phaseolus* L. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2020, 21(06): 1424-1434
- [4] 李园, 武晶. 普通菜豆镰孢菌枯萎病研究进展. *植物遗传资源学报*, 2021, 22(03): 603-608
- Li Y, Wu J. Research progress of *Fusarium Wilt* in common bean. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2021, 22(03): 603-608
- [5] 朱吉凤, 武晶, 王兰芬, 朱振东, 王述民. 菜豆种质资源抗普通细菌性疫病鉴定. *植物遗传资源学报*, 2015, 16(03): 467-471
- Zhu J F, Wu J, Wang L F, Zhu Z D, Wang S M. Identification of germplasm resources of *Phaseolus vulgaris* L. against common bacterial blight. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2015, 16(03): 467-471
- [6] Marquez M L, Terán H, Singh S P. Selecting common bean with genes of different evolutionary origins for resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. *Crop Science*, 2007, 47(4): 1367-1374
- [7] Akhavan A, Bahar M, Askarian H, Lak M R, Nazemi A, Zamani Z. Bean common bacterial blight: pathogen epiphytic life and effect of irrigation practices. *SpringerPlus*, 2013, 2(1): 41
- [8] 王述民, 朱振东, 张晓燕. 普通菜豆生产技术. 北京: 北京教育出版社, 2016: 78-82
- Wang S M, Zhu Z D, Zhang X Y. Common bean production technology. Beijing: Beijing education press, 2016: 78-82
- [9] Yuan M, Jiang Z, Bi G, Nomura K, Liu M, Wang Y, Cai B, Zhou J M, He S Y, Xin X F. Pattern-recognition receptors are required for NLR-mediated plant immunity. *Nature*, 2021, 592(7852): 105-109
- [10] 袁婷露, 万里, 唐威华, 姜伊娜. 植物-病原微生物相互作用领域研究进展. *植物生理学报*, 2023, 59(09): 1657-1664
- Yuan T L, Wan L, Tang W H, Jiang Y N. Research progress in the field of plant-pathogenic microorganism interactions. *Plant Physiology Journal*, 2023, 59(09): 1657-1664
- [11] 黄金凤, 吕天星, 王寻, 王颖达, 王冬梅, 闫忠业, 刘志. 苹果 LRR-RLK 基因家族鉴定和表达分析. *中国农业科学*, 2021, 54(14): 3097-3112
- Huang J F, Lyu T X, Wang X, Wang Y D, Wang D M, Yan Z Y, Liu Z. Identification and expression analysis of LRR-RLK gene family in apple. *Scientia Agricultura Sinica*, 2021, 54(14): 3097-3112
- [12] Wilkinson S W, Hannan Parker A, Muench A, Wilson R S, Hooshmand K, Henderson M A, Moffat E K, Rocha P S C F, Hipperson H, Stassen J H M, López Sánchez A, Fomsgaard I S, Krokene P, Mageroy M H, Ton J. Long-lasting memory of jasmonic acid-dependent immunity requires DNA demethylation and ARGONAUTE1. *Nature Plants*, 2023, 9(1): 81-95
- [13] Wang M Y, Chen J B, Wu R, Guo H L, Chen Y, Li Z J, Wei L Y, Liu C, He S F, Du M D, Guo Y L, Peng Y L, Jones J D G, Weigel D, Huang J H, Zhu W S. The plant immune receptor SNC1 monitors helper NLRs targeted by a bacterial effector. *Cell Host & Microbe*, 2023, 31(11): 1792-1803
- [14] Wang Y, Pruitt R N, Nürnberger T, Wang Y C. Evasion of plant immunity by microbial pathogens. *Nature Reviews Microbiology*, 2022, 20(8): 449-464
- [15] Yu X Q, Niu H Q, Liu C, Wang H L, Yin W, Xia X. PTI-ETI synergistic signal mechanisms in plant immunity. *Plant Biotechnology Journal*, 2024, 22(8):

- [16] Yuan M H, Xin X F. Bacterial infection and hypersensitive response assays in *Arabidopsis-Pseudomonas syringae* pathosystem. *Bio-Protocol*, 2021, 11(24): e4268
- [17] Mittler R, Zandalinas S I, Fichman Y, Van Breusegem F. Reactive oxygen species signalling in plant stress responses. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2022, 23(10): 663–679
- [18] Li P, Zhao L, Qi F, Htwe N M P S, Li Q Y, Zhang D W, Lin F C, Shang-Guan K, Liang Y. The receptor-like cytoplasmic kinase RIPK regulates broad-spectrum ROS signaling in multiple layers of plant immune system. *Molecular Plant*, 2021, 14(10): 1652–1667
- [19] Wang N, Fan X, He M Y, Hu Z Y, Tang C L, Zhang S, Lin D X, Gan P F, Wang J F, Huang X L, Gao C X, Kang Z S, Wang X J. Transcriptional repression of *TaNOX10* by TaWRKY19 compromises ROS generation and enhances wheat susceptibility to stripe rust. *The Plant Cell*, 2022, 34(5): 1784–1803
- [20] Zhang L, Wang L, Fang Y, Gao Y, Yang S, Su J, Ni J, Teng Y, Bai S. Phosphorylated transcription factor PuHB40 mediates ROS-dependent anthocyanin biosynthesis in pear exposed to high light. *The Plant Cell*, 2024, 36(9): 3562–3583
- [21] Zhang N, Hu W, Hou R Q, Du P R, Miao X R, Wang R F, Wu H, Li S N, Li Y Z, Zhang Z X, Xu H H. Enhanced fungicidal activity and mechanism of pyraclostrobin nanoparticle with reactive oxygen species responsiveness against *Rhizoctonia solani*. *Journal of Cleaner Production*, 2023, 421: 138494
- [22] Li Y, Jiao M T, Li Y J, Zhong Y, Li X Q, Chen Z Z, Chen S Y, Wang J G. *Penicillium chrysogenum* polypeptide extract protects tobacco plants from tobacco mosaic virus infection through modulation of ABA biosynthesis and callose priming. *Journal of Experimental Botany*, 2021, 72(10): 3526–3539
- [23] Wang P T, Liu W C, Han C, Wang S T, Bai M Y, Song C P. Reactive oxygen species: Multidimensional regulators of plant adaptation to abiotic stress and development. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2024, 66(3): 330–367
- [24] Wu B Y, Qi F, Liang Y. Fuels for ROS signaling in plant immunity. *Trends in Plant Science*, 2023, 28(10): 1124–1131
- [25] Saleem M, Fariduddin Q, Castroverde C D M. Salicylic acid: A key regulator of redox signalling and plant immunity. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2021, 168: 381–397
- [26] Liu Y, Gong T T, Kong X J, Sun J Q, Liu L J. XYLEM CYSTEINE PEPTIDASE 1 and its inhibitor CYSTATIN 6 regulate pattern-triggered immunity by modulating the stability of the NADPH oxidase RESPIRATORY BURST OXIDASE HOMOLOG D. *The Plant Cell*, 2024, 36(2): 471–488
- [27] Hino Y, Inada T, Yoshioka M, Yoshioka H. NADPH oxidase-mediated sulfenylation of cysteine derivatives regulates plant immunity. *Journal of Experimental Botany*, 2024, 75(15): 4641–4654
- [28] Chen Q H, Yang G W. Signal function studies of ROS, especially RBOH-dependent ROS, in plant growth, development and environmental stress. *Journal of Plant Growth Regulation*, 2020, 39(1): 157–171
- [29] Shang S P, He Y H, Hu Q Y, Fang Y, Cheng S F, Zhang C J. *Fusarium graminearum* effector FgEC1 targets wheat TaGF14b protein to suppress TaRBOHD-mediated ROS production and promote infection. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2024, 66(10): 2288–2303
- [30] Huang Z Q, Lu J J, Liu R W, Wang P, Hu Y W, Fang A F, Yang Y H, Qing L, Bi C W, Yu Y. *SsCat2* encodes a catalase that is critical for the antioxidant response, QoI fungicide sensitivity, and pathogenicity of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Fungal Genetics and Biology*, 2021, 149: 103530
- [31] Sun T J, Ma N, Jiao Y Y, Wang Q, Wang Q P, Liu N, Chen Y, Han S F, Hou C Y, Wang R N, Wang D M. TaCAMTA4 negatively regulates H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dependent wheat leaf rust resistance by activating *catalase 1* expression. *Plant Physiology*, 2024, 196(3): 2078–2088
- [32] Zou W H, Sun T T, Chen Y, Wang D J, You C H, Zang S J, Lin P X, Wu Q B, Su Y C, Que Y X. Sugarcane *ScOPRI* gene enhances plant disease

- resistance through the modulation of hormonal signaling pathways. *Plant Cell Reports*, 2024, 43(6): 158
- [33] Noman A, Aqeel M, Qari S H, Al Surhane A A, Yasin G, Alamri S, Hashem M, M Al-Saadi A. Plant hypersensitive response vs pathogen ingress: Death of few gives life to others. *Microbial Pathogenesis*, 2020, 145: 104224
- [34] Sahu P K, Jayalakshmi K, Tilgam J, Gupta A, Nagaraju Y, Kumar A, Hamid S, Singh H V, Minkina T, Rajput V D, Rajawat M V S. ROS generated from biotic stress: Effects on plants and alleviation by endophytic microbes. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13: 1042936
- [35] Wu S W, Kumar R, Iswanto A B B, Kim J Y. Callose balancing at plasmodesmata. *Journal of Experimental Botany*, 2018, 69(22): 5325-5339
- [36] Zhang Z B, Lee Y, Spetz C, Clarke J L, Wang Q C, Blystad D R. Invasion of shoot apical meristems by *Chrysanthemum stunt viroid* differs among *Argyranthemum* cultivars. *Frontiers in Plant Science*, 2014, 6: 53