北京林业大学学报
JOURNAL OF BEIJING FORESTRY UNIVERSITY

# 西府海棠微丝结合蛋白MmADF1和MmADF11抵御病菌侵染机制

连懿 杜婷婷 薛婧怡 李娜 田慧婕 王天翼 曹红燕 孟冬 杨清

# Mechanism of microfilament-binding proteins MmADF1 and MmADF11 against pathogen infection in *Malus micromalus*

Lian Yi, Du Tingting, Xue Jingyi, Li Na, Tian Huijie, Wang Tianyi, Cao Hongyan, Meng Dong, Yang Qing

引用本文:
连懿, 杜婷婷, 薛婧怡, 李娜, 田慧婕, 王天翼, 曹红燕, 孟冬, 杨清. 西府海棠微丝结合蛋白MmADF1和MmADF11抵御病菌侵染机制[J]. 北京林业大学学报, 2025, 47(8):10–22. doi: 10.12171/j.1000–1522.20240177
Lian Yi, Du Tingting, Xue Jingyi, Li Na, Tian Huijie, Wang Tianyi, Cao Hongyan, Meng Dong, Yang Qing. Mechanism of microfilament-binding proteins MmADF1 and MmADF11 against pathogen infection in *Malus micromalus*[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2025, 47(8):10–22. doi: 10.12171/j.1000–1522.20240177

在线阅读 View online: https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20240177

**您可能感兴趣的其他文章**
**Articles you may be interested in**

草地早熟禾及其矮化突变材料锈病病原菌鉴定及抗病机制初探
Rust pathogen identification and mechanism of disease-resistance research on Kentucky bluegrass dwarf mutant
北京林业大学学报, 2017, 39(3): 87–92. https://doi.org/10.13332/j.1000–1522.20160315

胶孢炭疽菌侵染杨树叶片的组织病理学研究
Histopathology study of poplar leaves infected by *Colletotrichum gloeosporioides*
北京林业大学学报, 2018, 40(3): 101–109. https://doi.org/10.13332/j.1000–1522.20170385

松针鞘瘿蚊气味结合蛋白TjapOBP1的同源模建及活性气味分子的筛选
Homology modeling of the odorant binding protein TjapOBP1 of *Thecodiplosis japonensis* and screening of active odorant molecules
北京林业大学学报, 2021, 43(9): 77–86. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20210188

榛实象甲高致病力菌株筛选及侵染过程的显微观察
Screening of a highly pathogenic strain against hazelnut weevil and microscopic observation on its infection process
北京林业大学学报, 2017, 39(3): 32–37. https://doi.org/10.13332/j.1000–1522.20160322

2006—2016年间北京五环内居住区绿地树种组成变化
Change of tree species composition in green area of residential quarter within the Fifth Ring in Beijing from 2006 to 2016
北京林业大学学报, 2018, 40(7): 9–17. https://doi.org/10.13332/j.1000–1522.20170381

刺激植物响应蛋白基因*Epl1*克隆、原核表达及功能初探
Cloning, prokaryotic expression and function of the eliciting plant response protein of *Trichoderma asperellum*
北京林业大学学报, 2018, 40(1): 17–26. https://doi.org/10.13332/j.1000–1522.20170249

DOI:10.12171/j.1000−1522.20240177

# 西府海棠微丝结合蛋白 MmADF1 和 MmADF11 抵御病菌侵染机制

连 懿　杜婷婷　薛婧怡　李 娜　田慧婕　王天翼
曹红燕　孟 冬　杨 清
（北京林业大学林学院，森林培育与保护教育部重点实验室，北京 100083）

**摘要:【目的】**鉴定西府海棠肌动蛋白解聚因子（ADF）家族基因对病菌胁迫应答的功能，为西府海棠抗病遗传改良提供一定的参考。**【方法】**筛选出 4 个响应病菌胁迫的候选基因 *MmADF*1、*MmADF*3、*MmADF*8 和 *MmADF*11，对其表达模式和顺式作用元件进行分析，构建 *MmADF*1 和 *MmADF*11 过表达载体。利用真空渗透转化法将这些载体导入西府海棠和海棠近缘植物嘎啦叶片，在叶片和花瓣上接种致病的链格孢属真菌 R1。通过统计侵染效率、侵染面积以及细胞死亡的百分比，明确这些基因在抵抗病菌侵染中的作用。**【结果】**结果显示，在侵染后的植物组织中，*MmADF*1 和 *MmADF*11 的表达量显著高于其他基因。*MmADF*1 和 *MmADF*11 过表达能够显著降低西府海棠叶片气孔开度，从而增强西府海棠抵御病菌的能力。此外，*MmADF*1 和 *MmADF*11 在不同组织器官中均表现出一定的抗病作用，说明 ADF 在不同植物组织中作用保守。**【结论】**本研究通过不同植物揭示了 *MmADF*1 和 *MmADF*11 在西府海棠抵御真菌侵染过程中发挥的重要作用，为利用分子技术调控 ADF 基因、培育抗病西府海棠提供了理论依据。

**关键词：**西府海棠；肌动蛋白解聚因子；链格孢属
**中图分类号：**S763.1　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1000−1522(2025)08−0010−13
**引文格式：**连懿，杜婷婷，薛婧怡，等. 西府海棠微丝结合蛋白 MmADF1 和 MmADF11 抵御病菌侵染机制［J］. 北京林业大学学报，2025，47(8)：10−22. Lian Yi, Du Tingting, Xue Jingyi, et al. Mechanism of microfilament-binding proteins MmADF1 and MmADF11 against pathogen infection in *Malus micromalus*［J］. Journal of Beijing Forestry University, 2025, 47(8): 10−22.

# Mechanism of microfilament-binding proteins MmADF1 and MmADF11 against pathogen infection in *Malus micromalus*

Lian Yi　Du Tingting　Xue Jingyi　Li Na　Tian Huijie　Wang Tianyi
Cao Hongyan　Meng Dong　Yang Qing
(Key Laboratory for Silviculture and Conservation of Ministry of Education, School of Forestry, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

**Abstract:**［**Objective**］The function of actin depolymerization factor (ADF) family genes in *Malus micromalus* in response to pathogen stress was identified, which provided a certain reference for the genetic improvement of disease resistance in *Malus micromalus*.［**Method**］Firstly, four candidate genes *MmADF*1, *MmADF*3, *MmADF*8 and *MmADF*11 in response to pathogen stress were screened. The expression patterns and cis-acting elements of these four genes were analyzed to construct *MmADF*1 and *MmADF*11 overexpression vectors. These vectors were introduced into the leaves of *Malus micromalus* and its related plant Gala (*Malus pumila*) by vacuum infiltration transformation, and then inoculated with pathogenic *Alternaria* R1 on the leaves and petals. By counting the infection efficiency, infection area and the

**收稿日期:** 2024−06−03　**修回日期:** 2024−12−31
**基金项目:** 北京市自然科学基金项目（6212023），国家自然科学基金项目（32371835、31922058）。
**第一作者:** 连懿。主要研究方向：森林学。Email: 1250391556@qq.com　地址：100083 北京市海淀区清华东路 35 号北京林业大学林学院。
**责任作者:** 杨清，副教授。主要研究方向：经济林次生代谢物调控发育及抗逆分子机制。Email: yang.qing1020@163.com　地址：同上。
**本刊网址:** http://j.bjfu.edu.cn；http://journal.bjfu.edu.cn

percentage of cell death, the role of these genes in resisting pathogen infection was clarified. [**Result**] The results showed that the expression levels of *MmADF*1 and *MmADF*11 in infected plant tissues were significantly higher than those of other genes. Overexpression of *MmADF*1 and *MmADF*11 can significantly reduce the stomatal aperture of *Malus micromalus* leaves and enhance the ability of *Malus micromalus* to resist pathogens. In addition, *MmADF*1 and *MmADF*11 showed certain disease resistance in different tissues and organs, which indicated that ADF was conservative in different plant tissues. [**Conclusion**] This study illustrates the important role of *MmADF*1 and *MmADF*11 in the resistance of *Malus micromalus* to fungi by different plants, and provides a theoretical basis for regulation of ADF gene and cultivation of disease-resistant *Malus micromalus* by molecular technology.

**Key words:** *Malus micromalus*; actin depolymerizing factor; *Alternaria*

链格孢属(*Alternaria*)广泛存在于自然界，包含多种植物病菌，宿主范围广，可在多种植物中以内生菌形式存在，并对园艺生产造成重大经济损失[1]。该病菌可感染各种农作物和经济林木的叶子、花朵或果实，并在受感染的植物中作为分生孢子和菌丝体越冬。链格孢菌的致病机制分为两步：首先，通过毒素杀死宿主细胞或诱导程序性细胞死亡；其次，利用碳水化合物活性酶(CAZys)以及细胞壁降解酶(CWDEs)，分解死亡组织，从而导致植物感染[2]。因此，对该病菌的易感性是植物育种、引种驯化的重要因素。

西府海棠(*Malus micromalus*)属于蔷薇科(Rosaceae)苹果属(*Malus*)，是中国独有的园林景观资源。因其养护简单，花色绚丽，有“花中仙子”之称[3]。西府海棠的果实中含有人体必需的氨基酸和多种矿物质元素[4]，因此是我国广泛种植的经济林木之一[5]。然而，链格孢属真菌可导致蔷薇科植物感染叶斑病和果斑病，对果实生产构成威胁，每年都会造成巨大经济损失，并显著降低植物的观赏价值[6−7]。目前，防治链格孢属真菌手段较为基础，多数为喷洒农药和剪去病枝以阻止染病进一步扩散[8]。然而，这些化学和物理防治效果有限，且可能造成环境污染以及损害植物本身。因此，对于分子生物的防治机制进行研究，探索其在植物的功能和健康方面所发挥的重要作用。肌动蛋白解聚因子(actin depolymerizing factors，ADFs)作为一类关键防御蛋白，通过动态调控植物细胞骨架重塑参与抗病免疫应答，大量研究表明其在植物基础防御和对各种病菌的抗性中发挥着关键作用[9−11]。这为研究 ADFs 蛋白家族在西府海棠抗链格孢菌防御反应中的具体分子机制提供了重要的理论基础和研究切入点。

肌动蛋白解聚因子(ADFs)是一类分子量较小的保守的微丝结合蛋白，主要参与细胞骨架的调节，具有重要的生物学意义[12−13]。在植物细胞中，肌动蛋白(actin)通过聚合形成微丝(actin filament)构建复杂的细胞骨架网络。肌动蛋白细胞骨架负责调节细胞器和抗性物质向植物—病菌互作位点的转运，从而增强细胞壁抗性，阻止病菌的侵入[14]。ADFs 通过切割和解聚丝状肌动蛋白调节微丝的动态变化[15]，从而影响植物生长和胁迫响应中的多种生理过程，包括但不限于花粉的发育、棉纤维的发育、根毛和毛状体(叶毛)的形态发生、病原体的防御、气孔的关闭以及耐旱性等方面[16−19]。

近年来，微丝结合蛋白在植物抗逆调控中的作用日益受到关注，然而其在西府海棠(*Malus micromalus*)中的研究较少。作为我国重要的经济林木和观赏树种，西府海棠的抗病性改良具有重要应用价值。本研究对肌动蛋白解聚因子家族成员 *MmADF*1、*MmADF*3、*MmADF*8 和 *MmADF*11 在病菌侵染下的变化进行分析，用 qRT-PCR 检测这 4 个基因表达量，筛选表达量上调且较高的基因并构建对应的过表达株系。通过观察表达株系植物叶片和花瓣在病菌 R1 侵染 3 d 下的相关生理指标与病害表型，评估 *MmADF*1 和 *MmADF*11 对于链格孢属真菌侵染的防御能力。同时，本研究也将探究这些 ADF 基因在西府海棠不同组织器官中的抗病功能。以期为深入解析西府海棠响应病菌侵染的分子作用机制以及西府海棠品种改良提供一定的参考依据。

## 1　材料与方法

### 1.1　植物材料

本研究以西府海棠及其近缘植物嘎啦(*Malus pumila*)为试验材料。西府海棠样品采集自北京林业大学校区(116°20′51″E、40°00′21″N)健康植株，选取 1 月生嫩叶片以及开花 15 d 后的花瓣。嘎啦苹果采用组培苗体系，选取继代培养 2 个月、生存于 0.3 mg/L 6-苄基腺嘌呤(6-BA)和 0.2 mg/L 吲哚乙酸(IAA)的 MS 培养基中的无菌苗，用于农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)介导的瞬时转化和后续的功能验证。

试验所用病菌为链格孢属真菌 R1 菌株，保存于−80 ℃ 超低温冰箱。将−80 ℃ 储存真菌的冻存管取出，待在超净台中解冻后打开，随后用灭菌牙签挑出菌饼，接种到 PDA 培养基上，在 28 ℃ 培养箱中暗培养 6 d，使用 2 mL 无菌水洗脱孢子备用。

### 1.2 西府海棠响应生物胁迫的 ADF 筛选

选取生长状态一致的西府海棠嫩叶片，设置接菌处理（试验组）与接无菌水处理（对照组）。其中包含两个时间节点，处理前（0 d）与处理后（7 d）。取不同处理的根和叶片，送上海元莘生物医药科技有限公司进行后续的转录组测序。其中 $\log_2$（变化倍数，fold change）> 1 或 < −1，$P < 0.05$ 认为是显著上调或下调的基因。分析西府海棠 ADF 基因在接水和接菌处理 0 和 7 d 的转录水平，利用 TBtools 软件绘制热图。

### 1.3 蛋白系统发育分析以及保守基序分析

以拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）和苹果（*Malus pumila*）为参考，采用 MEGA 6.0 软件中的邻域连接方法，引导值以 1 000 次重复的百分比计算。引导程序的值显示在分支的旁边。通过 GENEDOC 软件进行多序列比对，参考之前相关研究[13,19]，用 Adobe Illustrator 软件对保守基序进行标注。

### 1.4 蛋白结构域、motif、顺式作用元件分析以及转录因子预测

使用 Expasy 工具（https://web.expasy.org/protparam/）计算理论等电点、分子量和氨基酸数量。通过CELLO（http://cello.life.nctu.edu.tw/cgi/main.cgi）预测蛋白亚细胞定位；使用 SWISS-MODEL（https://swissmodel.expasy.org/）预测 ADF 蛋白质的三维结构，利用 MEME 网站（http://meme-suite.org/tools/meme）对 motif 进行分析。利用 Plant CARE 网站（http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/）对基因起始密码子上游 2 000 bp 进行顺式作用元件预测，并结合 TBtools 软件和 Graph Pad Prism9 进行可视化。此外，motif 分析也通过 TBtools 软件进行可视化。利用 Plant pan 网站（http://plantpan.itps.ncku.edu.tw/plantpan4/index.html）对基因起始密码子上游 2 000 bp 进行转录因子预测，并结合 TBtools 软件进行可视化。

### 1.5 *MmADF*1 和 *MmADF*11 过表达植株的转化

在叶片、花瓣和嘎啦中过表达基因 *MmADF*1 和 *MmADF*11，参照文献 [20] 的方法，并且对此方法进行了一定的改良。通过 5 000 rpm 离心 10 min 并使用重悬液（20 g 蔗糖、2.21 g MS、1 mL AS）重悬至 $OD_{600}$ 值为 2，在 0.7 MPa 的真空下进行抽滤 10 min，随后用无菌水清洗并擦干，放置在无糖 MS 培养基上 25 ℃ 条件下培养 3 d，获得 *MmADF*1 和 *MmADF*11 瞬时过表达西府海棠花瓣、叶片和嘎啦叶片。

### 1.6 病菌侵染下过表达 *MmADF*1 和 *MmADF*11 侵染面积和生理指标测定

接菌和接水处理下 7 d 后，通过 Image J 对于病斑面积大小进行计算。称量叶片 0.1 g（3 个生物学重复），用剪刀剪成细条状后，于 50 mL 无水乙醇黑暗浸提 48 h，测定时以 95% 乙醇为空白，在波长 665、649、470 nm 测定吸光值将数据进行分析，使用 Graph Pad Prism9 进行可视化。

### 1.7 *MmADF*1、*MmADF*11 和 F-actin 的共定位

参照文献 [21] 的研究方法，进行 GV3101 根癌农杆菌介导烟草（*Nicotiana benthamiana*）叶片瞬时转化，使 *MmADF*1和 *MmADF*11 分别与 F-actin 进行共定位。利用激光扫描共聚焦显微镜（Leica，德国）对转化烟草的细胞进行观察。

### 1.8 叶片保卫细胞的气孔成像和长度测量

用蒸馏水将叶片表面冲洗干净，截取中间段将表皮撕下（保证每个镜头下气孔 20 个左右），用徕卡倒置显微镜对不同处理下的叶片背面的保卫细胞进行气孔成像。随后，用 Image J 统计气孔宽度、长度和面积，并统计了保卫细胞的宽度、长度和面积。

### 1.9 台盼蓝染色

将叶片浸泡在台盼蓝溶液中（0.3 g 台盼蓝，10 mL 苯酚，10 mLMDA 和 10 mL 乳酸溶解在 100 mL 蒸馏水中），置于摇床上 180 rpm，染色过夜。然后将叶子浸入 75% 乙醇中，在沸水中摇晃脱色 30 min，最后放入 95% 乙醇中静置直至完全脱色。

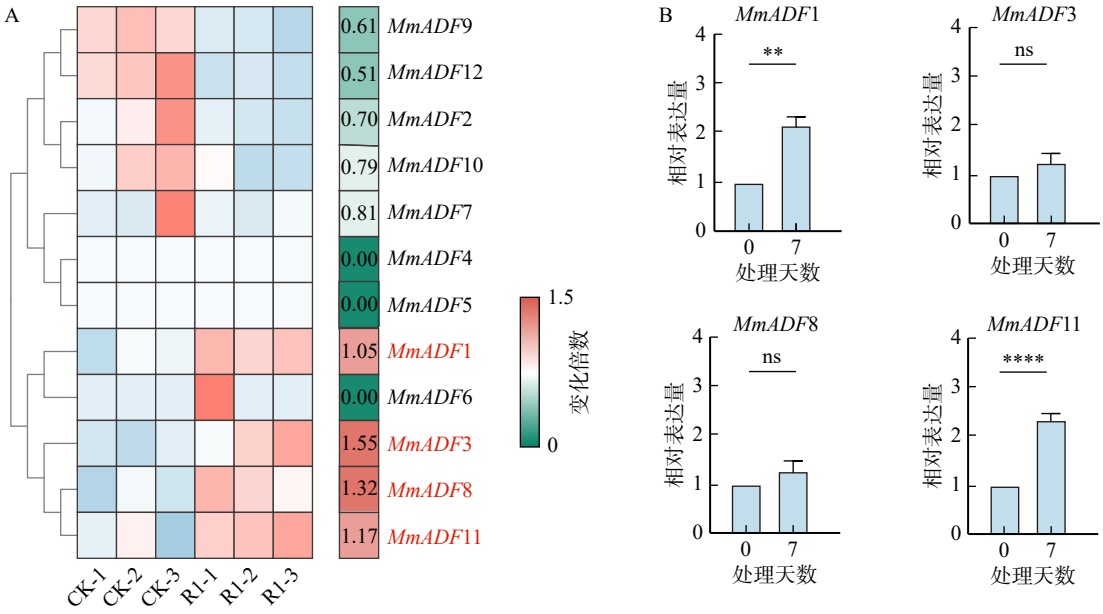
### 1.10 统计分析

采用 Graph Pad Prism 9 软件对数据进行统计学处理。每个样本至少重复 3 次得到平均值 ± 标准差（SD），并分析对照组和处理组之间差异显著性。

## 2 结果与分析

### 2.1 *MmADFs* 响应病菌胁迫基因的筛选

基于转录组测序数据，西府海棠 ADF 基因家族成员对链格孢属真菌 R1 侵染呈差异化响应（图 1）。在病菌侵染之后 *MmADF*1 表达量上调 1.05 倍、*MmADF*3 表达量上调 1.55 倍、*MmADF*8 表达量上调 1.32 倍和 *MmADF*11 表达量上调 1.17 倍。其余的 ADF 表达量下降，其中 *MmADF*1、*MmADF*3、*MmADF*8 以及 *MmADF*11 相对表达量较高，而 *MmADF*6 的相对表达量较低。这表明在病菌侵染下，*MmADF*1、*MmADF*3、*MmADF*8 以及 *MmADF*11 可能发挥着主要功能（图 1A）。qRT-PCR 验证试验（图 1B）进一步证实，接种 7 d 后，*MmADF*1 和 *MmADF*11 分别为对




0 天表达为对照组。内部参考基因是 *MmPR*，误差条显示为 3 个生物重复的误差范围。除 ns 表示差异不显著外，不同*表示不同程度的显著性。ns 代表 $P > 0.05$；**代表 $P < 0.01$；****代表 $P < 0.000\ 1$。下同。

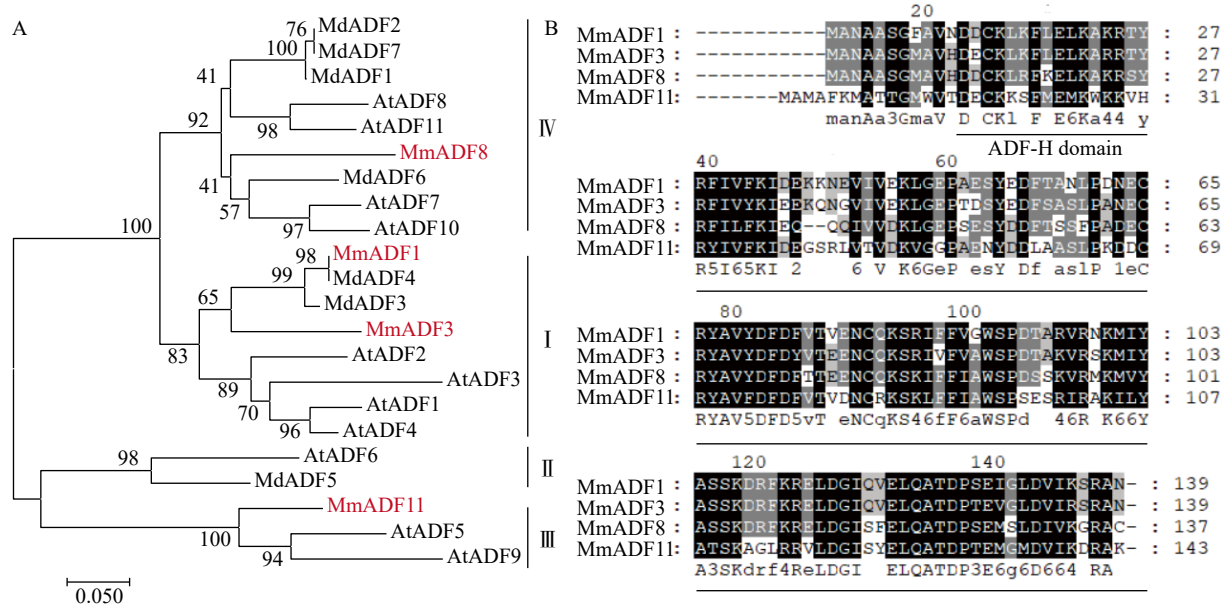
图 1　西府海棠 ADF 基因在病菌侵染下的表达模式

Fig. 1　Expression patterns of ADF gene in *Malus micromalus* under infection by pathogenic bacteria

照的 2 倍左右，*MmADF*3 和 *MmADF*8 分别为对照的 1 倍多。

### 2.2　MmADF1、MmADF3、MmADF8 和 MmADF11 系统发育及蛋白保守结构域分析

为解析西府海棠 ADF 蛋白的进化关系，下载拟南芥（11 个），苹果（7 个）ADF 家族共 18 个蛋白的氨基酸序列（数据来源于已发表文献 [22–23]、TAIR、RAP-DB 和 NCBI 数据库），使用 MEGA7.0 构建系统发育树（图 2A）。系统发育分析表明（图 2A）：ADF 蛋白可分为 4 个亚家族（Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ和Ⅳ）；西府海棠 ADF 在Ⅰ、Ⅲ和Ⅳ亚家族均有分布，其中，MmADF1 和 MmADF3 属于第Ⅰ亚家族，MmADF11 属于第Ⅲ亚家族，MmADF8 属于第Ⅳ亚家族。MmADF1 和 MdADF4，MmADF11、AtADF5 和 AtADF9 的进化时间较为相近，序列相似，推测其功能可能相似。通过 GENEDOC 软件对 4 个 MmADF




拟南芥、苹果和西府海棠 ADF 蛋白的系统发育树。采用 MEGA7.0 软件的最大似然（ML）方法，进行 1 000 次重复，构建系统发育树。不同的亚组用罗马数字标注（Ⅰ～Ⅳ）。深黑色背景突出了相同的氨基酸，黑色的下划线表示 ADF-H 结构域的位置。

图 2　MmADF1、MmADF3、MmADF8 和 MmADF11 进化树以及蛋白保守结构域

Fig. 2　Phylogenetic tree and conservative protein domains of MmADF1, MmADF3, MmADF8 and MmADF11

蛋白序列进行了比对发现序列大致相同(图 2B)。

### 2.3 MmADF1、MmADF3、MmADF8 和 MmADF11 蛋白结构分析

对MmADF1、MmADF3、MmADF8 和MmADF11 蛋白序列的生物信息学进行分析显示，MmADF 家族基因编码氨基酸数为 137 ~ 143 aa，蛋白分子质量介于 15 803.94 ~ 16 357.98 kDa，跨度较大，理论等电点为 5.33 ~ 8.72。根据酸碱性质分类，MmADF1、MmADF3、MmADF8 为酸性蛋白，MmADF11 为碱性蛋白。亚细胞定位预测结果表明，成员定位预测结果显示 MmADF1 位于细胞质，MmADF3、MmADF8 和 MmADF11 位于叶绿体中(表 1)。在 ADF 蛋白二级结构中，α 螺旋介于 30.94% ~ 36.69%，延伸链 25.18% ~ 27.74%，β 转角 5.04% ~ 6.29%，无规则卷曲为 30.66% ~ 35.97%(表 2)。4 种 ADF 蛋白三级结构整体特征较为一致(图 3)。

### 2.4 MmADF1、MmADF3、MmADF8 和 MmADF11 的 motif 分析

利用 MEME 在线网站上传西府海棠 ADF 基因家族蛋白序列，对 Motif 进行预测(图 4)。结果显示，在西府海棠 ADF 基因家族中共存在 5 个保守基序(Motif 1 ~ Motif 5)。西府海棠 ADF 基因家族成员的保守 Motif 数量为 4 ~ 5 个, 分别对其出现的次数进行统计发现 Motif1 出现频率为 5 次，Motif 2 和 Motif 4 出现频率为 4 次，Motif 3 和 Motif 5 出现频率为 3 次。MmADF3、MmADF8 和 MmADF11 高度近似。根据 MmADF1、MmADF3、MmADF8 和 MmADF11 进化关系分析，进化关系相近的同一亚族成员在保守基序组成上具有较高相似性，表明同一亚族成员在基因功能上也具有较高的相似性。

### 2.5 *MmADF*1、*MmADF*3、*MmADF*8 和 *MmADF*11 顺式作用元件分析转录因子预测

顺式作用元件在植物生长发育及逆境应答过程中发挥着关键的作用，并可影响基因的表达。对 *MmADF*1、*MmADF*3、*MmADF*8 和 *MmADF*11 启动子的顺式元件进行分析，每个成员启动子的顺式作用元件具有相似性(图 5A)。并且 *MmADF*1、*MmADF*3、*MmADF*8 和 *MmADF*11 中存在多种与植物生长发育相关的功能性元件，与激素调节和非生物胁迫响应等多种生理过程相关。其中 *MmADF*1 和 *MmADF*11 中茉莉酸甲酯和水杨酸的响应元件相较于其他元件来说数量最多。

植物拥有多种分子来抵御疾病。转录因子(TF)在控制植物生长和防御各胁迫因素的调控网络中充当基因连接。对 *MmADF*1 和 *MmADF*11 的转录因子结合位点进行预测(图 5B)，用 Excel 表格筛选之后得到 5 个抗病相关的转录因子，AP2、BZIP、MYB、NAC、WRKY。通过 TBtools 可视化以及对于数量的统计发现在除去重复位置转录因子之后，*MmADF*1 预测结果中数量最高为 58 个；*MmADF*11 预测结果中为 57 个(图 5C)。可知 *MmADF*1 和 *MmADF*11 中转录因子响应元件较多。综上所述 *MmADF*1 和 *MmADF*11 在对西府海棠抵御链格孢属真菌胁迫方面可能起着关键性的作用，对西府海棠中 *MmADF*1

**表 1 ADF 基因家族成员理化性质**

Tab. 1 Physical and chemical properties of ADF gene family members

| 蛋白质 | 氨基酸数量 | 分子量/kDa | 等电点(pI) | 亚细胞定位 |
|---|---|---|---|---|
| MmADF1 | 139 | 15 993.13 | 5.33 | 细胞质 |
| MmADF3 | 139 | 15 916.02 | 5.54 | 叶绿体 |
| MmADF8 | 137 | 15 803.94 | 5.50 | 叶绿体 |
| MmADF11 | 143 | 16 357.98 | 8.72 | 叶绿体 |

**表 2 ADF 基因家族成员蛋白二级结构预测**

Tab. 2 Prediction of secondary structure of ADF gene family member proteins %

| 蛋白质 | α螺旋 | 延伸链 | β转角 | 无规则卷曲 |
|---|---|---|---|---|
| MmADF1 | 30.94 | 27.34 | 5.76 | 35.97 |
| MmADF3 | 36.69 | 25.18 | 5.04 | 33.09 |
| MmADF8 | 35.77 | 27.74 | 5.84 | 30.66 |
| MmADF11 | 34.27 | 27.27 | 6.29 | 32.17 |

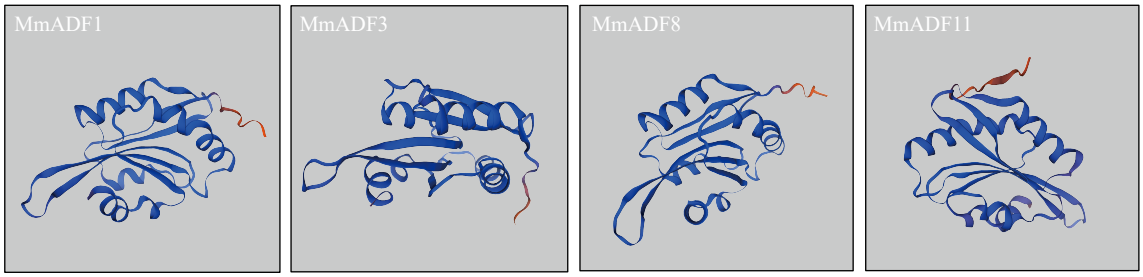



图 3 蛋白的三级结构预测

Fig. 3 Prediction of tertiary structure of proteins

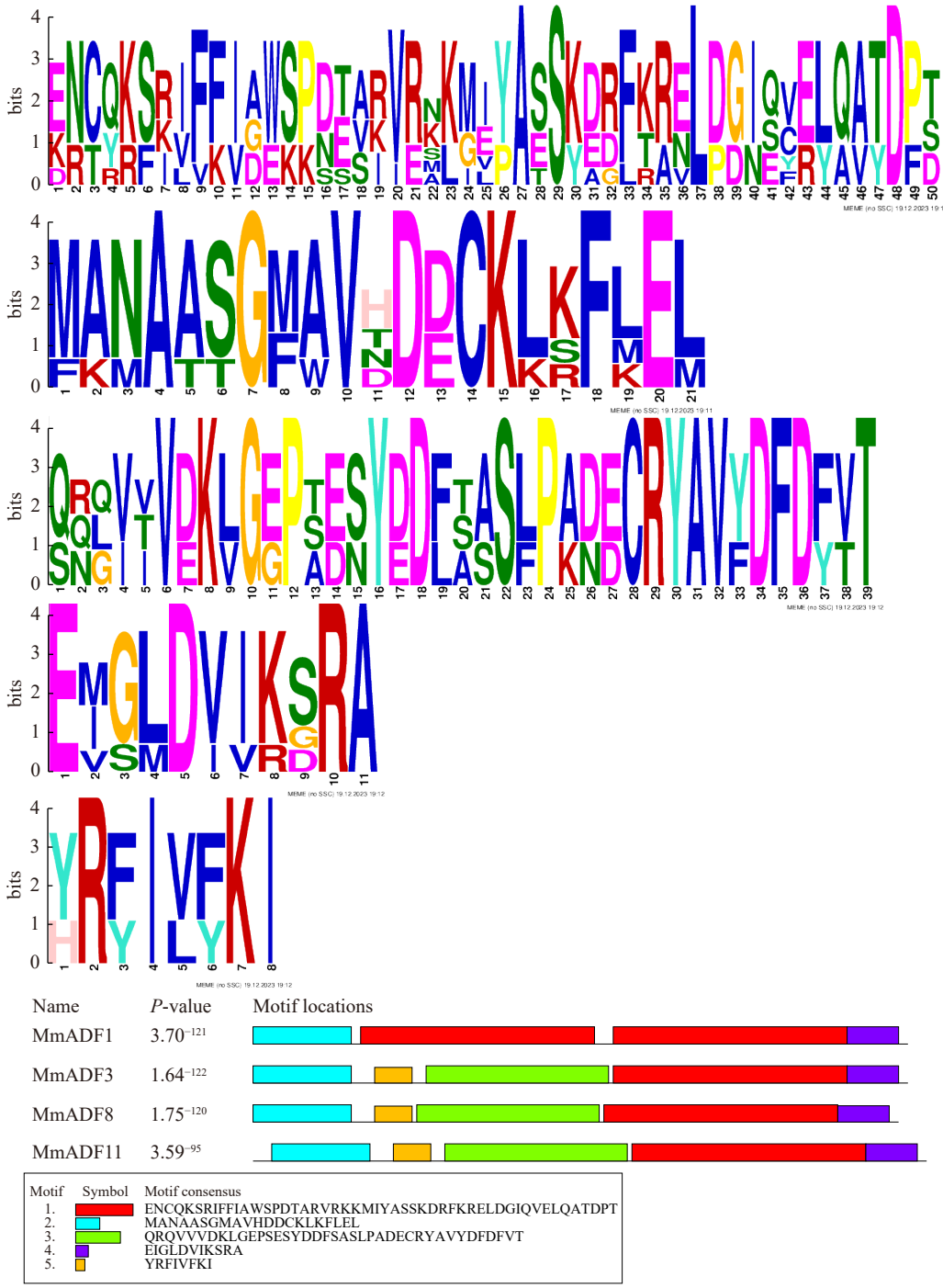



图 4　MmADF1、MmADF3、MmADF8 和 MmADF11 中的基序分布

Fig. 4　Distribution of motifs in MmADF1, MmADF3, MmADF8 and MmADF11

和 *MmADF*11 的分子调控网络研究以及西府海棠植物品种改良奠定基础。

### 2.6　*MmADF*1 和 *MmADF*11 抵御真菌病害

为研究 *MmADF*1 和 *MmADF*11 过表达对病菌侵染的生理意义，使用瞬时转化方法，在西府海棠叶片和海棠近缘植物嘎啦叶片（Gala）中过表达 *MmADF*1 和 *MmADF*11，利用 qRT-PCR 分析了过表达之后 *MmADF*1 和 *MmADF*11 的含量，结果显示相对表达量 2～3 之间（图 6B～C；图 6G～H）。随后开展后续相关验证试验，分别在西府海棠叶片以及嘎啦叶片表面进行真菌接种，并维持 3 d 的观察，将过表达空载体的叶片作为对照组。发现在病菌侵染过程中，过表达 *MmADF*1 和 *MmADF*11 的西府海棠和嘎啦的叶片普遍表现出较强的抗性（图 6A 和图 6F）。随后利用 Image J 软件对叶片侵染效率进行统计，结果显示，未过表达 ADF 的叶片在第 72 小时后均出现较严重的感染，而过表达 *MmADF*1 和 *MmADF*11 的叶片，病菌在其上面的扩张面积均明显减少。此外，分别统计西府海棠叶片和嘎啦叶片 3 组受感染的叶片的叶绿素含量，发现也表现出显

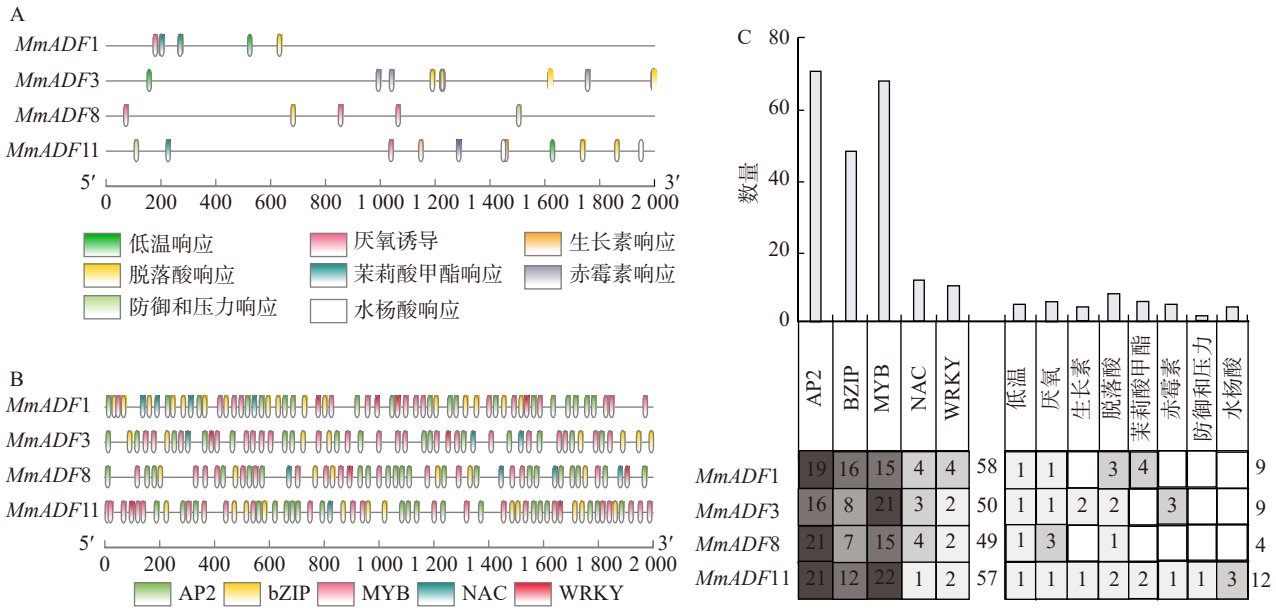
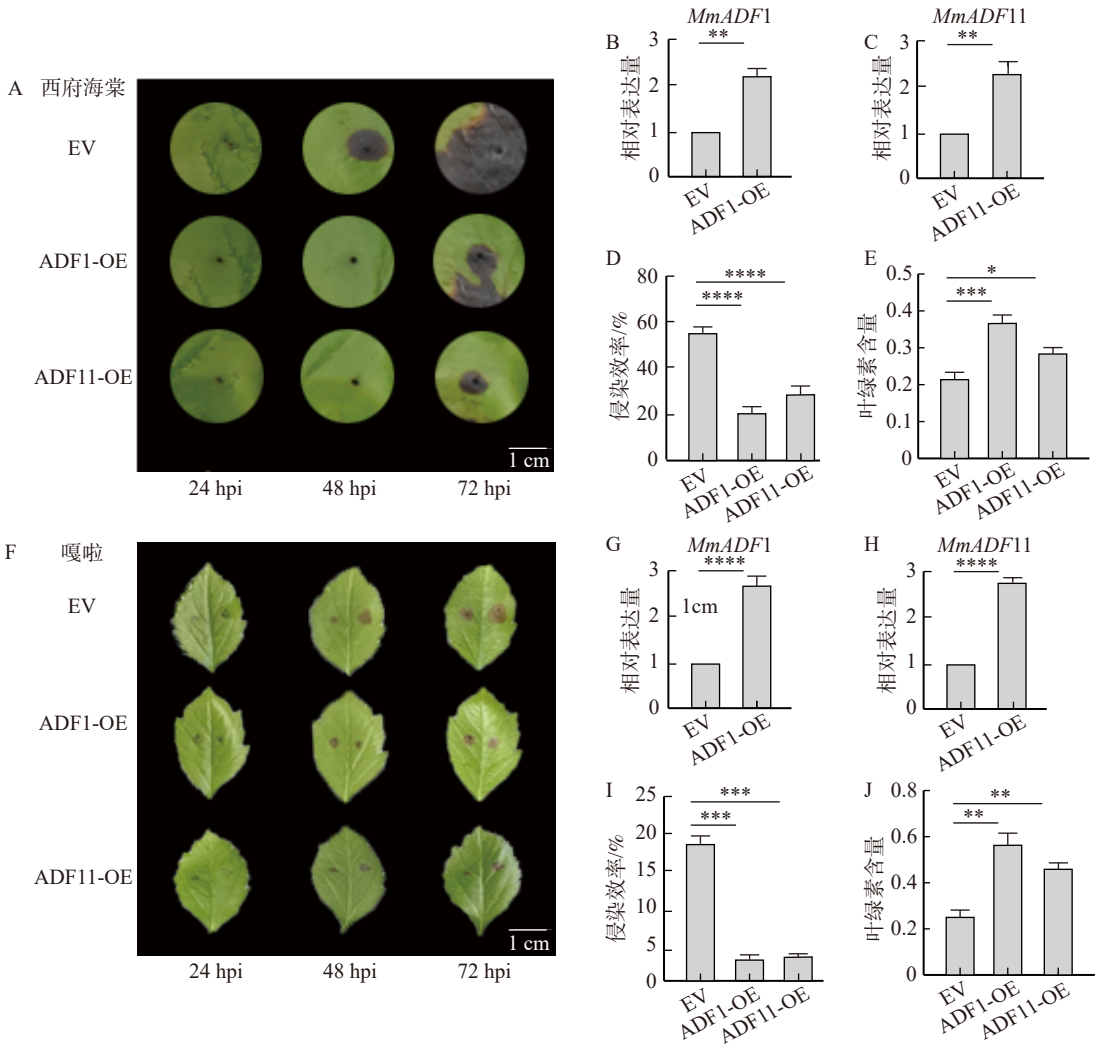



图 5 *MmADF*1、*MmADF*3、*MmADF*8 和 *MmADF*11 顺式作用元件、转录因子分布与统计

Fig. 5 Cis-acting elements, transcription factor distribution and statistics of *MmADF*1, *MmADF*3, *MmADF*8 and *MmADF*11




采用 qRT-PCR 技术研究 2 个 *MmADF* 基因的表达水平。内部参考基因是 *MmPR* 和 *MdActin*。EV 为空载体对照；ADF1-OE 为 MmADF1 过表达；ADF11-OE 为 MmADF11 过表达。hpi 是 hour post infection 的缩写，指病菌持续侵染的时间。***代表 $P < 0.001$。下同。

图 6 过表达 *MmADF*1 和 *MmADF*11 表型、相对表达量、侵染效率和生理指标统计

Fig. 6 Statistics in phenotype, relative expression, infection efficiency and physiological index of overexpressed *MmADF*1 and *MmADF*11

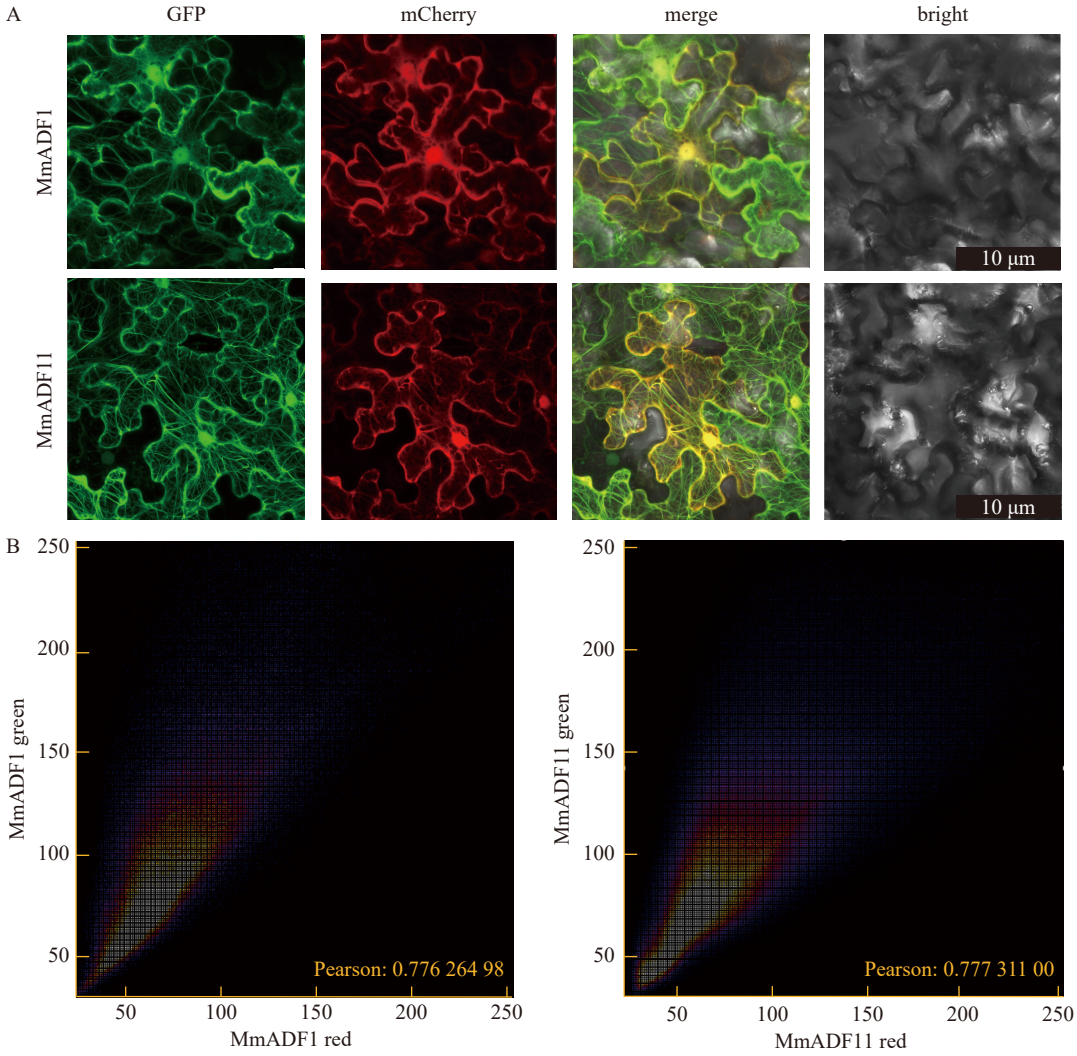
著差异，过表达 *MmADF*1 和 *MmADF*11 的叶绿素含量明显高于对照组（图 6D ~ E；图 6I ~ J）。以上研究结果表示，*MmADF*1 和 *MmADF*11 的上调可以对西府海棠抵御病菌侵染产生积极影响。

### 2.7　MmADF1 和 MmADF11 与微丝共定位分析

为了确定 MmADF1 和 MmADF11 是否直接与 F-actin 结合，进行了共定位试验。如（图 7A）微丝蛋白 F-actin-pROK2-GFP 作为一个蛋白 Marker，将这 3 个农杆菌分别 1∶1 混合共注射进行观察，从图中可以观察到不管是 MmADF1 的红色荧光还是 MmADF11 发出的红色荧光，以及 F-actin 发出的绿色荧光都能进行共定位，初步验证 ADF 蛋白与微丝在空间上重合。随后对其共定位情况进行统计，如（图 7B）分别得到 MmADF1、MmADF11 的绿色荧光和红色荧光重叠情况，皮尔逊系数均为 0.77 左右，证明重合率较高，MmADF1 和 MmADF11 会对微丝发挥一定的作用。

### 2.8　*MmADF*1 和 *MmADF*11 通过对西府海棠叶片气孔开闭影响响应病菌侵染

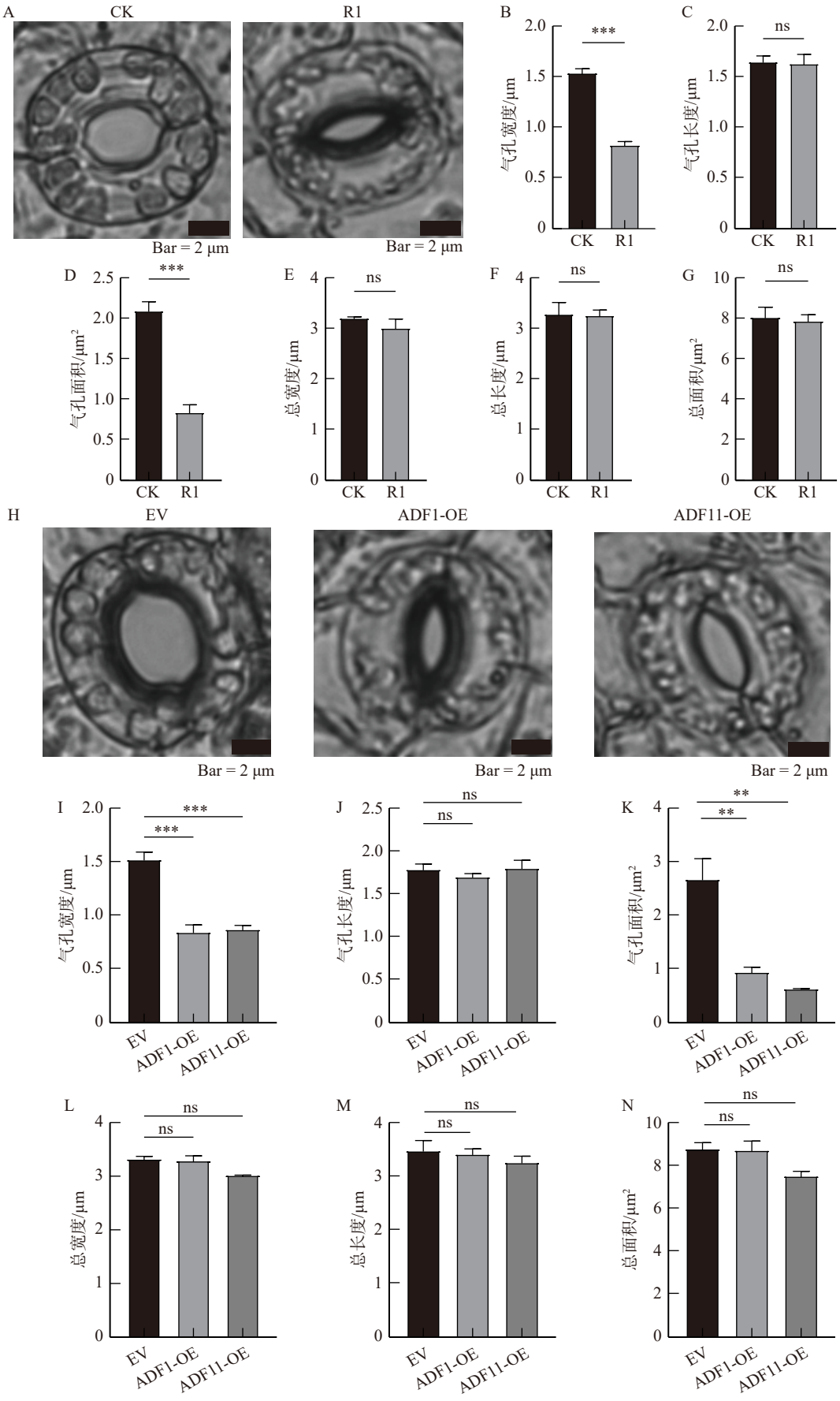
对不同处理下的气孔开度进行表型拍摄以及数据统计，发现在链格孢属真菌侵染下、过表达 *MmADF*1 以及过表达 *MmADF*11 均可使气孔开度下降（图 8A ~ B；图 8H ~ I）。并且对于气孔长度、气孔面积、保卫细胞总宽度、保卫细胞总长度以及保卫细胞总面积进行数据统计（图 8C ~ G；图 8J ~ N）。发现 *MmADF*1 和 *MmADF*11 对于气孔的开度具有一定下调作用，如（图 8B）中 CK 气孔宽度为 1.5 μm 左右，接菌后为 0.7 μm 左右；图 8I 中 EV 气孔宽度为 1.5 μm 左右，过表达 *MmADF*1 和 *MmADF*11 后为 0.8 左右。对气孔长度、气孔总宽度、长度以及面积的数据进行显著性分析，发现均为无显著差异（图 8E ~ G；图 8L ~ N），因此认为其会对气孔的开度产生一定影响而对保卫细胞大小不会产生明显影响。




A. MmADF1、MmADF11 和 F-actin 在烟草中的亚细胞定位，标尺 = 10 μm。B. Image J 共定位分析

图 7　MmADF1、MmADF11 和 F-actin 的共定位

Fig. 7　Co-localization of MmADF1, MmADF11 and F-actin




A、H. 不同处理条件下气孔光学图片。B ~ G、J ~ N. 不同处理下 48 h 后西府海棠的叶片气孔宽度、长度和总面积，保卫细胞宽度、长度和总面积统计。

图 8 CK、病菌侵染、EV、过表达 *MmADF*1、过表达 *MmADF*11 条件下气孔开度表型与统计

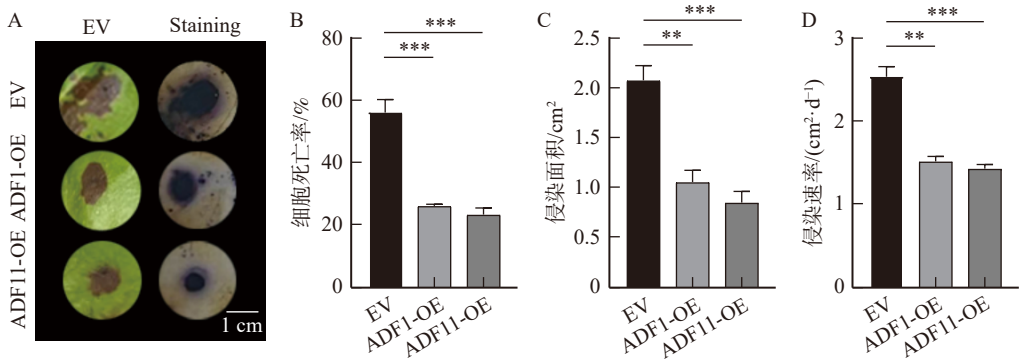
Fig. 8 Phenotype and statistics of stomatal aperture under CK, pathogen infection, EV, overexpressed *MmADF*1 and *MmADF*1 conditions

### 2.9　过表达 *MmADF1* 和 *MmADF11* 对病菌胁迫下叶片细胞死亡影响

分别对细胞死亡的百分比、侵染面积和侵染速率进行统计发现（图 9B ~ D），过表达 *MmADF1* 和 *MmADF11* 之后均有明显的差别，通过柱形图可观察到，对照细胞死亡为 60% 左右，过表达 ADF 为 20% 左右；对照侵染面积约为 2 $cm^2$，过表达 *MmADF1* 和 *MmADF11* 为 1 $cm^2$ 左右；对照侵染速率约为 2.5 $cm^2/d$，过表达 *MmADF1* 和 *MmADF11* 约为 1.5 $cm^2/d$。再次验证了 *MmADF1* 和 *MmADF11* 在西府海棠抗病菌侵染的情况下发挥着重要作用。

### 2.10　过表达 *MmADF1* 和 *MmADF11* 对病菌胁迫下花瓣的表型和表达量统计

随后为了验证 *MmADF1* 和 *MmADF11* 是否也在别的部位产生作用，在花瓣中过表达（图 10B），并且对染病状况也进行了统计，发现过表达 *MmADF1* 和 *MmADF11* 的花瓣比对照组侵染速率和侵染面积均有明显的下降，EV 的侵染效率为 60% 左右，过表达 *MmADF1* 和 *MmADF11* 后侵染效率下降为 20% 左右；EV 的侵染速率约为 2 $cm^2/d$，过表达 *MmADF1*




A. 台盼蓝染色表型图，B ~ D. 细胞死亡率、侵染面积和侵染速率的统计。

图 9　台盼蓝染色

Fig. 9　Trypto blue staining

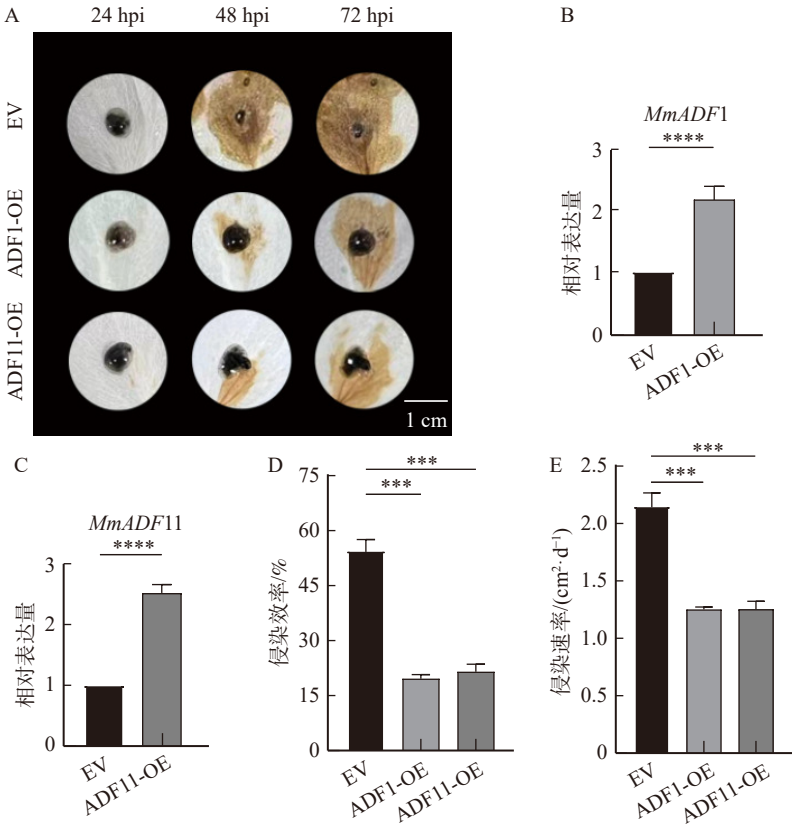



图 10　过表达 *MmADF1* 和 *MmADF11* 花瓣表型、相对表达量、侵染效率和侵染速率统计

Fig. 10　Statistics in petal phenotype, relative expression, infection efficiency and infection rate of overexpressed *MmADF1* and *MmADF11*

和 *MmADF*11 下降为 1 $cm^2$/d 左右(图 10D、E),证明 *MmADF*1 和 *MmADF*11 不仅仅在叶片中发挥作用,也在花瓣抵抗病菌侵染中发挥着一定的作用。

## 3 讨 论

肌动蛋白解聚因子(ADF)在高等植物中成员数量相对较少,例如在水稻、拟南芥、玉米、番茄和杨树中分别只有 12、12、13、11 和 14 个成员[24]。ADF 作为一类关键的肌动蛋白结合蛋白,通过调控肌动蛋白纤丝的聚合与解聚动态平衡,在细胞骨架重塑中发挥双重作用[13]。在植物生长发育和逆境响应中,ADF 家族具有多重功能。在抗病防御方面,ADF 作为一种特殊的病原相关蛋白,在受到链格孢属真菌侵染后,其表达量出现明显变化。通过比较肌动蛋白解聚因子在链格孢属真菌侵染前后的表达差异,发现病菌侵染的条件下,*MmADF*1、*MmADF*3、*MmADF*8 和 *MmADF*11 的表达量上调的较为显著。

本研究通过分析西府海棠两个 ADF 蛋白(MmADF1 和 MmADF11)在链格孢属真菌侵染下的表型变化,发现 ADF 家族对病菌胁迫具有显著抑制作用。随后通过对 ADF 家族蛋白的系统分析发现,MmADF1 和 MmADF11 属于不同的亚家族。motif 分析显示,MmADF11 与 MmADF3、MmADF8 高度近似而 MmADF1 与这 3 个蛋白有着一定区别,但其中保守结构与先前研究报道结果均相似[19],说明 ADF 家族在进化的过程中维持了结构和功能的保守性。值得注意的是,ADF 蛋白的生物学功能与植物逆境响应机制密切相关。当植物遭受非生物胁迫时,其基因调控网络能够通过激素信号传导快速激活防御反应,或许可促进次生代谢产物合成以增强抗逆能力[25−27]。通过启动子顺式作用元件分析,发现 *MmADF*1 和 *MmADF*11 均含有茉莉酸甲酯(MeJA)等植物激素响应元件,以及非生物胁迫响应元件,这表明二者可能参与植物抗逆调控。其中,茉莉酸甲酯作为重要的胁迫信号分子,已经被证实可以增强植物的抵御胁迫的能力。MeJA 会诱导防御性化合物的合成,并诱导植物体内抗病相关基因的表达[22]。并对相关转录因子进行预测,转录因子是植物有效的保护剂,因为它们可以增强植物对病菌侵染下的耐受性[28]。本研究方向为分子机制抗病,因此综合分析决定对 *MmADF*1 和 *MmADF*11 进行后续进一步的研究。

真菌侵染会引发植物保卫细胞中肌动蛋白骨架的动态重塑,其中微丝解聚是气孔关闭的关键步骤[13]。气孔是由一对特化的保卫细胞及其间孔隙构成的结构,分布于植物叶表皮,负责调控光合作用、呼吸作用的气体交换及蒸腾作用的水分散失。作为植物与外界环境交互的主要途径,其同时也是多种病菌侵入植物体内的通道。面对病菌的威胁,植物进化出了主动防御机制——“气孔免疫”[29]。因此对于 *MmADF*1 和 *MmADF*11 过表达后的西府海棠叶片的气孔进行了观察和数据统计。发现在病菌侵染和过表达 ADF 的条件下,气孔都有一定程度的闭合。随后对于西府海棠叶片的细胞死亡程度进行了统计,说明 ADF 通过调节气孔开闭,影响叶片细胞死亡程度,从而增强叶片对病原体的抗性。而 ADF 如何增强西府海棠花瓣抗病的相关机制还待探索(图 11)。

此外,气孔免疫是植物先天免疫的核心环节,其分子机制涉及微丝骨架重塑。未来需要对受真菌侵染后的西府海棠细胞骨架解聚和气孔内的微丝变化进行分析,并进一步研究激素和其他转录因子对 ADF 的调控机制,通过观察微丝的动态结构变化以及 ADF 相关抗病基因的变化进一步验证西府海棠 ADF 基因家族对真菌的抗性作用。本研究为进一步探讨西府海棠在病菌胁迫下 *MmADF*1 和 *MmADF*11 所发挥的重要功能提供了线索。

## 4 结 论

植物中 ADF 在生长、发育和防御相关功能中发挥着关键作用[30−32]。对西府海棠嫩叶进行病菌侵染,观察热图中 *MmADFs* 的相对表达量得到 *MmADF*1、

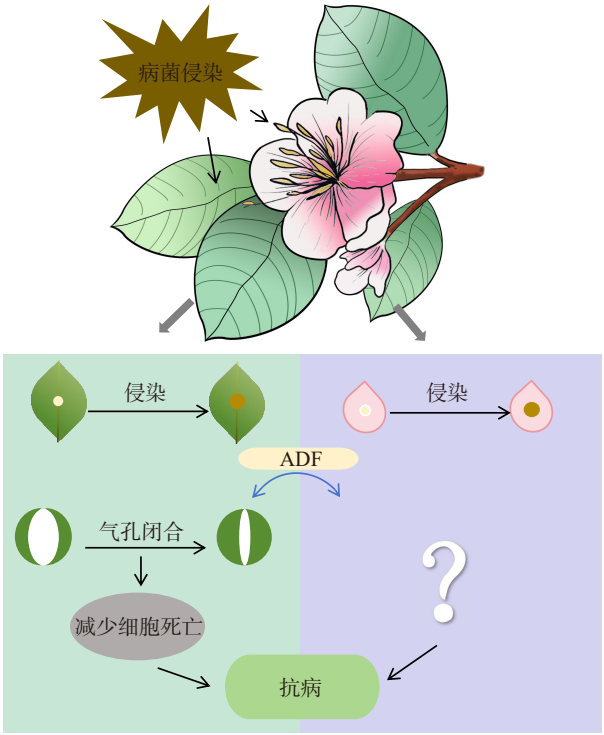



图 11 西府海棠抵御链格孢属真菌分子机制

Fig. 11 Molecular mechanism of *Malus micromalus* resisting *Alternaria* fungi

*MmADF*3、*MmADF*8、*MmADF*11。系统发育分析表明，这些蛋白与拟南芥和苹果 ADF 蛋白具有进化保守性。多序列比对和 motif 分析进一步验证了 ADF 蛋白核心结构和保守性。随后对其顺式作用元件进行分析，发现 *MmADF*1 和 *MmADF*11 的抗病相关响应元件数量较多。通过瞬时过表达 *MmADF*1 和 *MmADF*11，发现其显著增强西府海棠和嘎啦叶片对于病菌的抗性。F-actin 共定位试验验证 *MmADF*1 和 *MmADF*11 直接作用于微丝骨架。最后对于病菌侵染和过表达 *MmADF*1 和 *MmADF*11 条件下气孔开度进行观测，发现气孔开度显著下降，从而增强西府海棠抗病性。除叶片外，*MmADF*1 和 *MmADF*11 在花瓣中也表现出抗病作用，说明其功能具有组织广谱性。综上所述，从多角度说明了 *MmADF*1 和 *MmADF*11 参与了西府海棠抵御真菌的作用。研究结果为 MmADF 的功能研究奠定了基础，也为西府海棠抗逆育种提供了有价值的参考。

## 参　考　文　献


[1] Fernandes C, Casadevall A, Gonçalves T. Mechanisms of alternaria pathogenesis in animals and plants[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2023, 47(6): fuad061.

[2] Cho Y. How the necrotrophic fungus alternaria brassicicola kills plant cells remains an enigma[J]. Eukaryotic Cell, 2015, 14(4): 335−344.

[3] 王学府, 狄红梅, 曹秋芬. 梨胶锈菌侵染西府海棠和山荆子转录组比较 [J]. 分子植物育种, 2023, 21(3): 754−763.
Wang X F, Di H M, Cao Q F. Comparative transcriptome of *Malus micromalus* and *Malus baccata* infected by *Gymmosporangium haraeanum*[J]. Molecular Plant Breeding, 2023, 21(3): 754−763.

[4] Yang H, Hua J L, Wang C. Anti-oxidation and anti-aging activity of polysaccharide from *Malus micromalus* Makino fruit wine[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 121: 1203−1212.

[5] Wang M, Li H Y, Wang Y. *Malus micromalus* Makino polyphenols and its antioxidant activity[J]. Modern Food Science & Technology, 2013, 29(11): 2633−2637.

[6] Xu Y X, Wang H B. Effects of extracting technology of total flavonoids in *Malus micromalus* Makino by enzymic treatment and its flavonoid crude extract on proliferation of Hela cells in vitro[J]. Journal of China Agricultural University, 2013, 18(1): 119−127.

[7] Harteveld D O C, Akinsanmi O A, Drenth A. Multiple alternaria species groups are associated with leaf blotch and fruit spot diseases of apple in Australia[J]. Plant Pathology, 2013, 62(2): 289−297.

[8] 刘建敏, 王曼, 肖靖, 等. 石家庄市西府海棠常见病虫害发生现状及其防治建议 [J]. 中国林副特产, 2019(4): 56−59.
Liu J M, Wang M, Xiao J, et al. Occurrence and control of *Malus micromalu* common diseases and pests in Shijiazhuang City[J]. Forest By-Product and Speciality in China, 2019(4): 56−59.

[9] Fu Y, Duan X, Tang C, et al. TaADF7, an actin-depolymerizing factor, contributes to wheat resistance against *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*[J]. The Plant Journal, 2014, 78(1): 16−30.

[10] Henty-Ridilla J L, Li J, Day B, et al. ACTIN DEPOLYMERIZING FACTOR4 regulates actin dynamics during innate immune signaling in arabidopsis[J]. The Plant Cell, 2014, 26(1): 340−352.

[11] Wang R, Duan D, Metzger C, et al. Aluminum can activate grapevine defense through actin remodeling[J]. Horticulture Research, 2022, 9: uhab016.

[12] Gibbon B C, Kovar D R, Zonia L E. Profilin and actin-depolymerizing factor: modulators of actin organization in plants[J]. Trends in Plant Science, 1997, 2(7): 275−281.

[13] Huang J, Sun W, Ren J, et al. Genome-wide identification and characterization of actin-depolymerizing factor (ADF) family genes and expression analysis of responses to various stresses in *Zea mays* L.[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(5): 1751.

[14] Qin L, Liu L, Tu J, et al. The ARP2/3 complex, acting cooperatively with class Ⅰ formins, modulates penetration resistance in arabidopsis against powdery mildew invasion[J]. The Plant Cell, 2021, 33(9): 3151−3175.

[15] Yang Q, Wang S N, Wu C B, et al. *Malus domestica* ADF1 severs actin filaments in growing pollen tubes[J]. Functional Plant Biology, 2017, 44(4): 455−463.

[16] Yan S, Tang Z, Su W, et al. Proteomic analysis of salt stress-responsive proteins in rice root[J]. Proteomics, 2005, 5(1): 235−244.

[17] Zheng W, Jiang Y, Wang X, et al. AP3M harbors actin filament binding activity that is crucial for vacuole morphology and stomatal closure in arabidopsis[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2019, 116(36): 18132−18141.

[18] Peng L, He J, Yao H, et al. CARK3-mediated ADF4 regulates hypocotyl elongation and soil drought stress in arabidopsis[J]. Frontiers in Plant Science, 2022, 13: 1065677.

[19] Nan Q, Qian D, Niu Y, et al. Plant actin- depolymerizing factors possess opposing biochemical properties arising from key amino acid changes throughout evolution[J]. Plant Cell, 2017, 29(2): 395−408.

[20] Song Z H, Dong B Y, Yang Q, et al. Screening of CBL genes in pigeon pea with focus on the funcional analysis of CBL4 in abiotic stress tolerance and flavonoid biosynthesis[J]. Environmental and Experimental Botany, 2020, 177: 104102.

[21] Spankes I A, Runions J, Kearns A, et al. Rapid, transient

expression of fluorescent fusion proteins in tobacco plants and generation of stably transformed plants[J]. Nature Protocols, 2006, 1(4): 2019−2025.

[22] Cao H, Yang Q, Wang T, et al. Melatonin-mediated CcARP1 alters F-actin dynamics by phosphorylation of CcADF9 to balance root growth and salt tolerance in pigeon pea[J]. Plant Biotechnology Journal, 2024, 22(1): 98−115.

[23] Yang Q, Meng D, Gu Z, et al. Apple S‐RN ase interacts with an actin-binding protein, Md MVG, to reduce pollen tube growth by inhibiting its actin-severing activity at the early stage of self-pollination induction[J]. The Plant Journal, 2018, 95(1): 41−56.

[24] Xu K, Zhao Y, Zhao S, et al. Genome-wide identification and low temperature responsive pattern of actin depolymerizing factor (ADF) gene family in wheat (*Triticum aestivum* L. )[J]. Frontiers in Plant Science, 2021, 12: 618984.

[25] 张凤, 陈伟. 代谢组学在植物逆境生物学中的研究进展 [J]. 生物技术通报, 2021, 37(8): 1−11.
Zhang F, Chen W. Research progress of metabolomics in plant stress biology[J]. Biotechnology Bulletin, 2021, 37(8): 1−11.

[26] Yan Z, Wang H, Kou X, et al. Metabolomics analysis reveals that MeJA treatment induces postharvest blueberry resistance to *Botrytis cinerea*[J]. Postharvest Biology and Technology, 2022, 194: 112075.

[27] Yu M, Shen L, Fan B, et al. The effect of MeJA on ethylene biosynthesis and induced disease resistance to *Botrytis cinerea* in tomato[J]. Postharvest Biology and Technology, 2009, 54(3): 153−158.

[28] Yu Y, Zhang S, Yu Y, et al. The pivotal role of MYB transcription factors in plant disease resistance[J]. Planta, 2023, 258(1): 16.

[29] Zou M, Guo M, Zhou Z, et al. MPK3-and MPK6-mediated VLN3 phosphorylation regulates actin dynamics during stomatal immunity in arabidopsis[J]. Nature Communications, 2021, 12(1): 64−74.

[30] Sun Y, Zhong M, Li Y, et al. GhADF6-mediated actin reorganization is associated with defence against *Verticillium dahliae* infection in cotton[J]. Molecular Plant Pathology, 2021, 22(12): 1656−1667.

[31] Tholl S, Moreau F, Hoffmann C, et al. Arabidopsis actin-depolymerizing factors (ADFs) 1 and 9 display antagonist activities[J]. FEBS Letters, 2011, 585(12): 1821−1827.

[32] Wang L, Qiu T, Yue J, et al. Arabidopsis ADF1 is regulated by MYB73 and is involved in response to salt stress affecting actin filament organization[J]. Plant and Cell Physiology, 2021, 62(9): 1387−1395.

（责任编辑 范 娟
责任编委 戴思兰）