

水稻对穗枯病的抗病机理初步研究

李路^{1,2} 徐以华^{1,2} 梁梦琦² 王玲² 刘连盟² 侯雨萱² 黎起秦^{1,*} 黄世文^{1,2,*}

(¹广西大学 农学院, 南宁 530003; ²中国水稻研究所, 杭州 310006; *通讯联系人, E-mail: qqli5806@gxu.edu.cn; huangshiwen@caas.cn)

A Primary Study on the Mechanism Behind Resistance to Bacterial Panicle Blight of Rice

LI Lu^{1,2}, XU Yihua^{1,2}, LIANG Mengqi², WANG Ling², LIU Lianmeng², HOU Yuxuan², LI Qiqin^{1,*}, HUANG Shiwen^{1,2,*}

(¹College of Agronomy, Guangxi University, Nanning 530003, China; ²China National Rice Research Institute, Hangzhou 310006, China; *Corresponding author, E-mail: qqli5806@gxu.edu.cn, huangshiwen@caas.cn)

Abstract: 【Objective】Rice is more susceptible to bacterial panicle blight at the booting stage than seedling stage. The objective of the study is to understand the resistant mechanism in different growing stage of rice and lay a basis for breeding rice varieties with high resistance.【Method】The spraying and injection method were used to inoculate seedlings and panicles of resistant and susceptible rice with *Burkholderia glumae*, respectively. The activities of three antioxidant enzymes (peroxidase, catalase and superoxide dismutase) of treatments and control were investigated. Real-time PCR was used to detect the expression of five defense response genes (*PR1a*, *PR10b*, *Rcht*, *LOX* and *PAL*).【Result】The infection of *B. glumae* induced the accumulation of reactive oxygen species, the increase of antioxidant enzymes activities and the higher expression of some defense genes. However, the defense response was different at the seedling stage and booting stage of rice. At the booting stage, the activities of antioxidant enzymes (peroxidase, catalase and superoxide dismutase) and the expression of *PR10b*, *Rcht* and *PAL* were higher, but the expression levels of *PR1a* and *LOX* were lower than those at the seedling stage.【Conclusion】*B. glumae* could induce more defense response of rice in booting stage, salicylic acid signaling pathway played an important role during the defense.

Key words: rice; bacterial panicle blight; antioxidant enzyme; defense gene; real-time fluorescence quantitative PCR

摘要:【目的】水稻在孕穗期比苗期更容易感染穗枯病(Bacterial panicle blight of rice)并出现病症。本研究旨在探究水稻不同时期对穗枯病的抗性机理,为培育抗病水稻品种奠定基础。【方法】采用喷雾法和注射法分别对苗期和孕穗期的抗、感病水稻品种接种颖壳伯克氏菌(*Burkholderia glumae*),测定处理组与对照组的3种抗氧化酶(POD、CAT、SOD)活性的差异,并利用实时荧光定量PCR测定5种防卫反应基因(*PR1a*、*PR10b*、*Rcht*、*LOX*、*PAL*)的表达量。【结果】*B. glumae*的侵染能引起水稻活性氧的积累,提高抗氧化酶活性,使部分防卫反应基因大量表达,但是苗期和孕穗期的应答有较大区别。水稻孕穗期的抗氧化酶(SOD、CAT和POD)活性和防卫反应基因(*PR10b*、*Rcht*和*PAL*)的表达量比苗期高,但*PR1a*和*LOX*的表达量却低于苗期。【结论】*B. glumae*能诱导孕穗期的水稻产生更多抗病反应,参与抗病反应的主要是水杨酸信号传导途径。

关键词: 水稻; 穗枯病; 抗氧化酶; 防卫反应基因; 实时荧光定量PCR

中图分类号: S435.111.4⁺5

文献标识码: A

文章编号: 1001-7216(2017)05-0551-08

水稻穗枯病(Bacterial panicle blight of rice, BPBR)又称水稻细菌性谷枯病(Bacterial grain rot of rice),由Goto等^[1]于1956年在日本发现,随后在亚洲、南北美洲和非洲的20多个国家和地区均有报道^[2],可造成水稻大幅减产。2007年,水稻穗枯病被我国列为检疫性病害^[3],但近几年水稻穗枯病的发生越来越严重^[4]。颖壳伯克氏菌(*Burkholderia glumae*)是穗枯病的病原菌,在水稻苗期和穗期分别

引起水稻烂秧、谷粒变色和稻穗枯死^[4]。当病原菌群体数量不大时,被侵染的苗期水稻不会表现明显的病症,病原菌潜伏在稻株内,到孕穗期才爆发,引起稻穗枯死,但少量病原菌侵染稻穗,却可以迅速引起谷粒变色^[5]。同一种病原菌在寄主不同生长期侵染不同部位,以及寄主在不同生长期的抗性差异还鲜有报道。

植物在抵御病原菌侵染时能产生并积累活性

收稿日期: 2016-12-20; 修改稿收到日期: 2017-02-14。

基金项目: 国家重点研发计划资助项目(2016YFD0200801); 中国农业科学院科技创新工程资助项目(CAAS-ASTIP-2013-CNRR1); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(2014RG005-2); 浙江省三农六方项目(CTZB-F160728AWZ-SNY1-4)。

氧(reactive oxygen species, ROS)。过多的 ROS 使植物体内产生氧化胁迫,导致细胞膜脂质的过氧化,蛋白质、色素、酶、核酸的氧化损伤,甚至植物死亡^[6]。植物本身的防御机制,如一些酶促反应对 ROS 的累积进行清除,使 ROS 处于低水平的动态平衡,以此来维持植物的正常形态^[7]。其中,超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)可将超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)歧化成 H_2O_2 和 O_2 , 过氧化物酶(peroxidase, POD)和过氧化氢酶(catalase, CAT)催化 H_2O_2 向 H_2O 的转化^[8-9]。POD 还是木质素合成的关键酶,它参与木质素的合成,促进伤口愈合,参与富含羟脯氨酸糖蛋白(HRGP)结构的形成和将酚类物质氧化为醌,增强植株对病原菌的抗性^[10]。

防卫反应基因在植物体内快速累积和大量表达是植物抵抗病原菌侵染的必要条件。防卫反应相关基因主要包括与植保素合成相关基因(如苯丙氨酸解氨酶基因 *PAL*、脂氧合酶合成基因 *LOX*)、病程相关基因(如几丁质酶基因 *Rcht*、PR1 酸性蛋白基因 *PR1a*、类似核糖核酸酶基因 *PR10b*)、与结构抗性有关的基因(木质素合成有关基因)、核糖体失活蛋白(RIP)基因等。其产物直接作用于病原菌,限制病原菌的扩展、增殖和对寄主的破坏^[11]。病程相关基因(PR 基因)的表达是一种广谱、非专性的抗性^[12]。PR 基因的诱导和表达与植物信号传导途径的启动有关。目前研究较多的有茉莉酸(jasmonic acid, JA)信号传导途径和水杨酸(salicylic acid, SA)信号传导途径。JA 途径是亚麻酸通过脂氧合酶(lipoxygenase, LOX)等酶的反应生成茉莉酸甲酯。SA 途径源于苯丙烷类代谢途径,苯丙氨酸解氨酶(phenylalanine ammonia-lyase, PAL)是与苯丙烷代谢途径相关的关键酶^[13], PAL 活性增强则进一步促进植物内源 SA 的合成^[14]。PAL 还参与木质素、植保素和酚类化合物的合成,与植物抗病性有密切联系^[15]。

本研究选用高感穗枯病和中抗水稻品种,通过喷雾法接种幼苗以及注射法接种幼穗,测定了受病原菌侵染后,苗期和穗期的水稻植株抗氧化酶的活性,以及防卫反应基因的表达变化,初步探讨了水稻不同时期对穗枯病的抗病机理差异。

1 材料与方 法

1.1 供试材料与培养

1.1.1 水稻材料和菌种来源

经两年的接种鉴定,我们筛选出对穗枯病表现中抗的水稻品种鄂宜 105 以及高感品种辐恢 838。

所用水稻种子由国家水稻种质资源中期库提供。LMG2196(*B. glumae*)由浙江大学谢关林教授提供。

1.1.2 水稻秧苗培育及种植

水稻种子用 3%过氧化氢消毒 24 h,灭菌水浸泡 24 h 后催芽。播种到含有灭菌土的塑料盒(18 cm×14 cm×12 cm)中,置温室(30℃)中培养。需长至穗期的水稻在苗龄 25 d 左右进行移栽。

1.1.3 菌悬液配制

将已活化的菌株接种至 LB 液体培养基中 28℃ 下振荡培养 18 h,此时 LMG2196 处于生长对数期。4000 r/min 下将菌体离心至管底,加 0.9%灭菌生理盐水稀释,用分光光度计(UnicoUV-4802, 中国)调菌液浓度至 7×10^8 CFU·mL⁻¹($OD_{600} = 0.517$)。

1.2 接种及取样

1.2.1 喷雾接种

于水稻 2 叶期,将浓度 7×10^8 CFU·mL⁻¹ 的菌悬液均匀喷施在水稻叶片上,以喷施等体积生理盐水的水稻为对照。

1.2.2 注射接种

水稻孕穗期时,用 5 mL 注射器将浓度 7×10^8 CFU·mL⁻¹ 的菌悬液注射进穗苞,至穗苞顶部有菌悬液溢出,以注射等体积生理盐水的水稻为对照。

1.2.3 取样

试验设 8 个时间点取样,分别为接种后 0、6、12、24、48、72、96 和 120 h。水稻苗期取茎叶,孕穗期取幼穗。样品取完后放液氮速冻,置 -80℃ 下保存。

1.3 抗氧化酶活性测定

1.3.1 酶液的制备

称取 0.1 g 样品,加 0.9 mL 灭菌生理盐水,冰浴匀浆后,4℃、2500 r/min 下离心 10 min,取上清备用。

1.3.2 过氧化物酶(POD)活性的测定

用 POD 测定试剂盒(南京建成生物工程研究所,中国)测定样品中 POD 的活性。利用 POD 催化 H_2O_2 反应的原理,用分光光度计(UnicoUV-4802, 中国)测定 420 nm 处的 OD 值,根据以下公式计算 POD 活性:

$$\text{POD 活性(U/mg)} = (A_{\text{测定管}} - A_{\text{空白管}}) / (12 \times \text{样品蛋白浓度}) \times 4000/3$$

1.3.3 过氧化氢酶(CAT)活性的测定

用 CAT 测定试剂盒(南京建成生物工程研究所,中国)测定样品中 CAT 的活性。CAT 分解 H_2O_2 可被 $H_8MoN_2O_4$ 迅速中止,剩余的 H_2O_2 与 $H_8MoN_2O_4$ 产生淡黄色络合物,测定其在 405 nm 处的 OD 值,

表 1 荧光定量 PCR 的引物

Table 1. Specific primers for real-time PCR

基因 Gene	登录号 Accession No.	引物序列 Primer sequence	扩增长度 Length/bp
<i>PR1a</i>	CA758799.1	F:GTTATCCTGCTGCTTGCTG R:GTACCACTGCTTCTCCGACACCCAC	299
<i>PR10b</i>	CA755132.1	F: TGAGGTGTTGGAGGTTAAGAG R:AGGGTGAGCGACGAGGTA	217
<i>Rcht</i>	AB016497.1	F:CGCCGTCATCCAGAACCAG R:AGATAAACAAAGGCGACTTCTCCAC	179
<i>LOX</i>	FJ607153	F:CGCCATCATCGTCACCAA R: CGTCTGTCCCGCAAGTAA	199
<i>PAL</i>	EF576408	F:TTCCCGCTCTACCGCTTCGT R:GCTCGCCGTTCCACTCCTTG	193
<i>Ubq</i>	AY072820.1	F: CTCGCCGACTACAACATC R: GACATCAGCACCAAAATAC	147

根据以下公式计算 CAT 的活性。

CAT活力(U/mg)=($A_{\text{对照管}} - A_{\text{测定管}}$)/60×271/(取样量×样品蛋白浓度)

1.3.4 超氧化物歧化酶(SOD)活性的测定

用 SOD 测定试剂盒(南京建成生物工程研究所, 中国)测定样品中 SOD 的活性。 O_2^- 氧化羟胺形成亚硝酸盐, 加入显色剂后呈现紫红色。测定其在 550 nm 处的吸光值, 根据以下公式计算总 SOD 活力。

总 SOD 活力(U/mg)= $2 \times (A_{\text{对照管}} - A_{\text{测定管}}) / A_{\text{对照管}} \times$ 反应液总体积/(取样量×样品蛋白浓度)

1.4 防卫基因表达量分析

1.4.1 RNA 提取及检测

采用 Trizol 法提取叶片的总 RNA^[16]。叶片用液氮研磨后加入 1 mL 的 Trizol(Invitrogen, 美国)混匀, 12 000 r/min、4℃下离心 5 min, 取上清加 500 μ L 氯仿混匀, 12 000 r/min、4℃下离心 15 min, 取上清加入 500 μ L 异丙醇混匀, 12 000 r/min、4℃下离心 10 min, 弃上清, 加入 1 mL 80%乙醇(-80℃提前预冷)混匀, 12 000 r/min、4℃下离心 2 min, 弃乙醇, 加入适量 DEPC ddH₂O 溶解。取 1 μ L 用 Nanodrop 2000(ThermoScientific, 美国)测定 RNA 的浓度。剩余 RNA 保存于-80℃下备用。

1.4.2 cDNA 合成

根据反转录试剂盒说明书(ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover kit, ToYoBo, 日本)的步骤, 将总 RNA 加 DEPC 水至 12 μ L, 65℃下变性后放冰上冷却 2 min, 加 4 μ L 4 倍浓度的降解预混液(4× DNA Master Mix)与基因组 DNA 清除剂(gDNA Remover)的混合物, 37℃下放置 15 min, 去除总 RNA 中的 gDNA, 加 4 μ L 5 倍浓度的反转

录预混液(5×RT Master Mix II), 37℃下放置 15 min, 50℃下放置 5 min, 最后 98℃下放置 5 min。

1.4.3 目的基因的实时 PCR 扩增

试验所用的引物列在表 1, 其中泛素基因(*Ubq*)为内参基因。PCR 扩增反应体系为 20 μ L, 其中包括 1 μ L 模板, 10 μ L 2 倍浓度的 SYBR Green 染色法 PCR 预混液(2×SYBR Green PCR Master Mix, VazymeAceQTM, 中国), 0.2 μ L 引物(10 μ mol/L)和 8.6 μ L ddH₂O。扩增条件如下: 95℃下 5 min; 95℃下 5 s, 55℃/58℃下 10 s, 72℃下 15 s, 40 个循环。扩增结束后, Bio-Rad FX96 荧光定量 PCR(Bio-Rad, 德国)自动显示 *Ct* 值。

1.4.4 数据分析

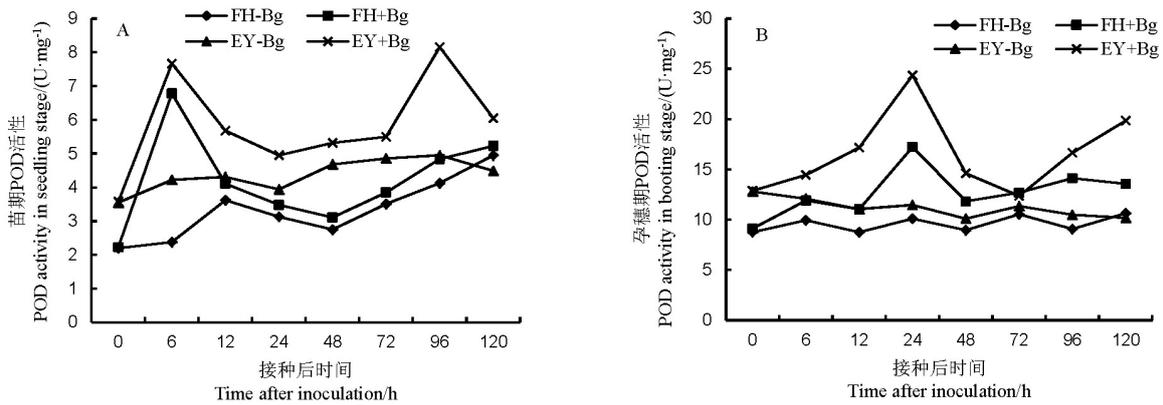
水稻苗期以未接种病原菌的处理(-Bg)为对照, 采用相对定量 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法^[17]计算接种病原菌处理(+Bg)中各基因的相对表达量。孕穗期以苗期表达量为对照, 计算孕穗期相对苗期的各基因表达量变化。取 3 个重复的平均值计算样品和对照处理的差异表达比率。

2 结果与分析

2.1 苗期和穗期不同抗性水稻品种抗氧化酶的活性

2.1.1 POD 的活性

接种病原菌后, 两个水稻品种的 POD 活性总体高于同期对照。苗期, 非亲和反应比亲和反应的 POD 活性更强且相对于对照的净增加值也更大。非亲和反应在接种 6 h 和 96 h 有两次高峰, 而亲和反应只在 6 h 有最高峰(图 1-A)。水稻孕穗期的 POD 活性高于苗期, 亲和反应与非亲和反应的 POD 在



“FH”代表高感品种“辐恢 838”，“EY”代表中抗品种“鄂宜 105”，“-Bg”表示未接种处理，“+Bg”表示接种处理。下同。
 ‘FH’ refers to susceptible variety ‘Fuhui 838’, ‘EY’ to resistant variety ‘Eyi 105’, ‘-Bg’ means control treatment, ‘+Bg’ means inoculation treatment. The same as in figures below.

图 1 不同抗性水稻品种中过氧化物酶(POD)的活性

Fig. 1. Activity of peroxidase(POD) in rice varieties with different resistance to bacterial panicle blight.

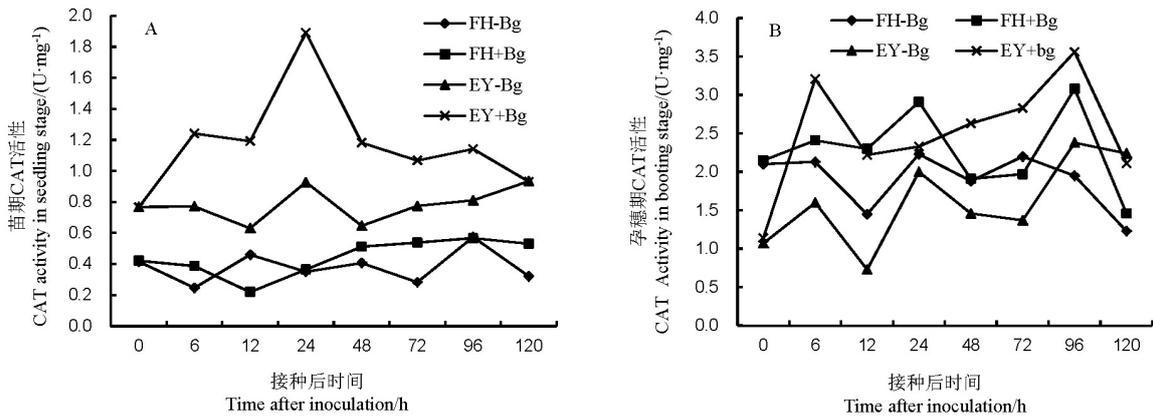


图 2 不同抗性水稻品种中过氧化氢酶(CAT)的活性

Fig. 2. Activity of catalase(CAT) in rice varieties with different resistance to bacterial panicle blight.

接种后 24 h 有最高活性，非亲和反应在 72 h 后有上升趋势(图 1-B)。说明水稻孕穗期的 POD 活性净增加量高于苗期，非亲和反应中的 POD 活性高于亲和反应。

2.1.2 CAT 的活性

接种 *B. glumae* 后，水稻苗期和孕穗期的 CAT 活性都处于低水平，非亲和反应中的活性更高，净增加值更大。苗期接种后，非亲和反应的 CAT 活力在 24 h 有最高峰，亲和反应相比对照的增幅不大(图 2-A)。在孕穗期接种后，非亲和反应在 6 h 和 96 h 有较高活性，亲和反应在 24 h 和 96 h 的活性较高，但增长量小于非亲和反应(图 2-B)。说明非亲和反应中 CAT 活性的增强比亲和反应更快，净增加量更高；水稻孕穗期的 CAT 活性高于苗期。

2.1.3 SOD 的活性

苗期接种后，两个水稻品种的 SOD 活性均在

6~12 h 较高，此后亲和反应的变化与对照相似，而非亲和反应在 48~120 h 中高于对照(图 3-A)。孕穗期接种后，亲和反应的 SOD 在 72 h 有最大活性，非亲和反应在 24 h 活性最高，并从 72 h 开始呈上升趋势(图 3-B)。说明非亲和反应中的 SOD 活性上升速度更快，净增加量也高于亲和反应；水稻孕穗期的 SOD 净增加量高于苗期。

2.2 苗期和穗期不同抗性水稻品种防卫基因的表达

2.2.1 *PR1a* 的表达量

苗期接种后，非亲和反应的 *PR1a* 在接种后 6~12 h 的表达量均为对照的 1.5 倍以上，而亲和反应在病原菌侵染前期都处于低水平，120 h 才约为对照 1.7 倍。孕穗期接种后，非亲和反应与亲和反应的 *PR1a* 均为下调表达(图 4)。说明苗期的非亲和反应比亲和反应中 *PR1a* 的表达量更高，表达时间更早；*B. glumae* 的侵染对 *PR1a* 的诱导作用不大。

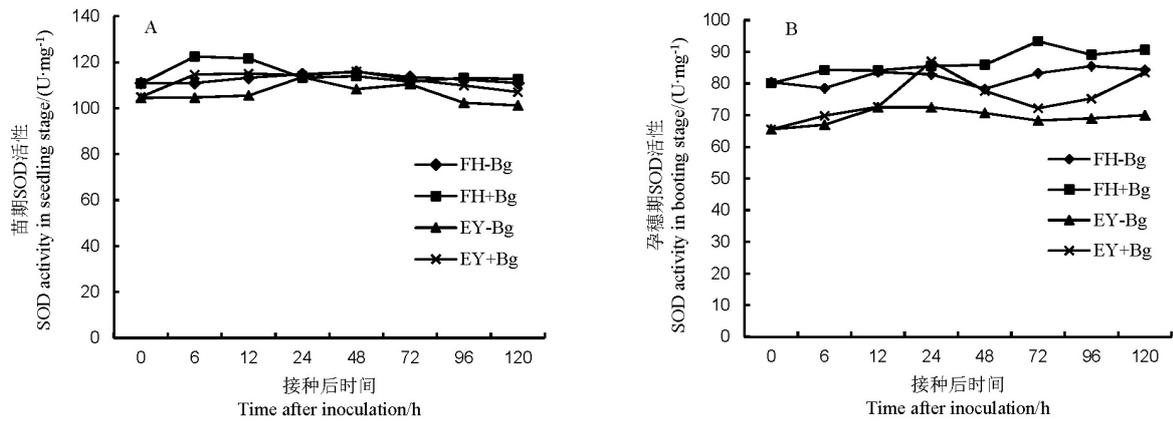


图 3 不同抗性水稻品种中超氧化物歧化酶(SOD)的活性
 Fig. 3. Activity of superoxide dismutase(SOD) in rice varieties with different resistance to bacterial panicle blight.

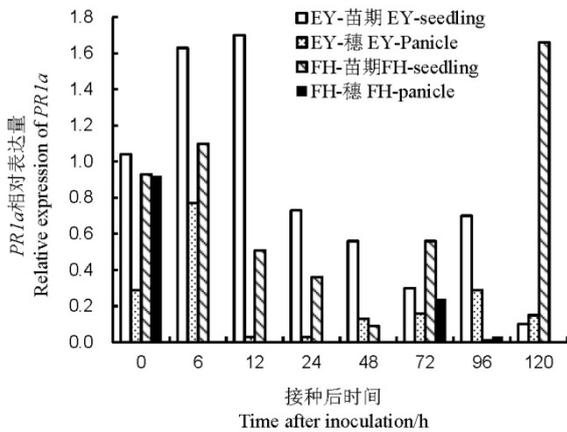


图 4 不同抗性水稻品种中 *PR1a* 相对表达量
 Fig. 4. Relative expression of *PR1a* in rice varieties with different resistance to bacterial panicle blight.

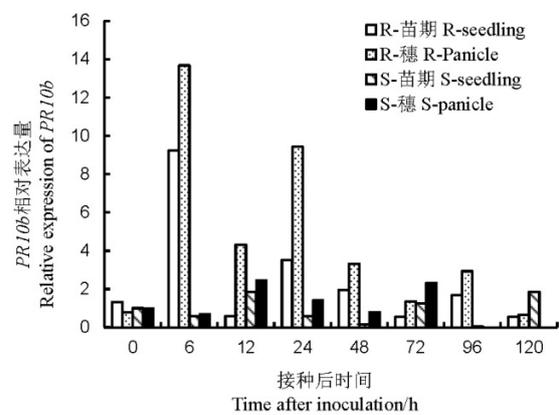


图 5 不同抗性水稻品种中 *PR10b* 相对表达量
 Fig. 5. Relative expression of *PR10b* in rice varieties with different resistance to bacterial panicle blight.

2.2.2 *PR10b* 的表达量

苗期接种后, 非亲和反应的 *PR10b* 在 6 h 表达量约为对照的 9 倍, 在 24~48 h 和 96 h 也有很高的表达; 而亲和反应在 12 h 和 120 h 约为对照 1.8 倍。孕穗期接种后, 非亲和反应的 *PR10b* 在 6~96 h 比苗期有更高的表达量; 亲和反应在 6~72 h 的表达也高于苗期(图 5)。以上结果说明, *B. glumae* 的侵染能诱导水稻 *PR10b* 的大量表达, 且孕穗期的表达量高于苗期; 非亲和反应比亲和反应中 *PR10b* 的表达量更高且表达时间更早。

2.2.3 *Rcht* 的表达量

苗期接种后, 非亲和反应中 *Rcht* 在 6~12 h 的表达量是对照的 2.31~3.78 倍, 而亲和反应在 72~96 h 才有高水平表达。孕穗期接种后, 非亲和反应中 *Rcht* 在 6~24 h 和 72~120 h 的表达均高于苗期, 而亲和反应仅在 6 h 和 96 h 有约为苗期 2 倍的表达量

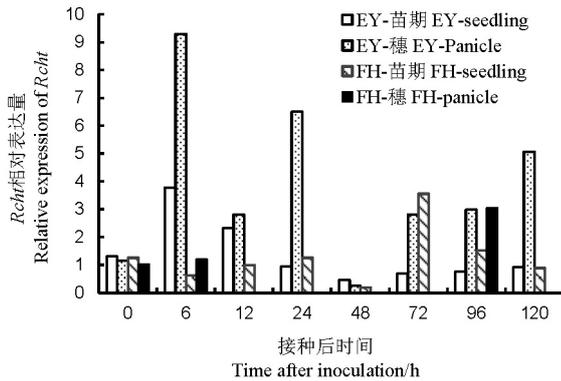
(图 6)。可见, *B. glumae* 与水稻互动时能诱导 *Rcht* 的大量表达, 其表达量与水稻品种和生长时期有关, 非亲和反应比亲和反应的 *Rcht* 表达量更高且表达时间更早, 水稻孕穗期的表达量高于苗期。

2.2.4 *LOX* 的表达量

苗期接种后, 非亲和反应的 *LOX* 在接种 24 h 后有对照 1.86 倍的表达量; 亲和反应在接种后 6 h 的表达量为对照的 1.53 倍。两个组合中的 *LOX* 在孕穗期的表达都显著低于苗期 (图 7)。说明 *B. glumae* 不能通过诱导 *LOX* 的表达来启动水稻的 JA 信号传导途径。

2.2.5 *PAL* 的表达量

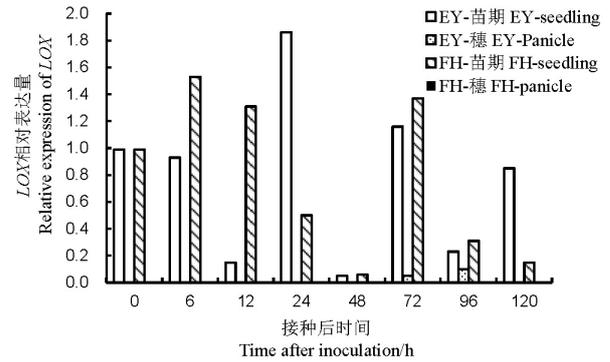
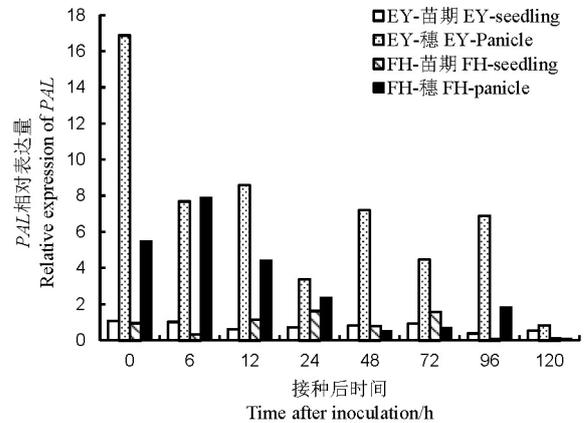
苗期接种后, 非亲和反应的 *PAL* 的表达量与对照相似; 但亲和反应在 24 和 72 h 的表达量分别为对照 1.63 和 1.58 倍。孕穗期接种后, *PAL* 的表达量显著高于苗期。非亲和反应中 *PAL* 的表达在 0~96 h

图6 不同抗性水稻品种中 *Rch1* 相对表达量Fig. 6. Relative expression of *Rch1* in rice varieties with different resistance to bacterial panicle blight.

均显著高于苗期；亲和反应中 *PAL* 在 0~24 和 96 h 也有很高表达，但表达量小于非亲和反应（图 8）。可见，孕穗期的 *PAL* 在两个水稻品种中都有很高的表达，且非亲和反应的表达量高于亲和反应。可推断 *PAL* 参与的 SA 信号传导途径在水稻孕穗期抵抗 *B. glumae* 的侵染中有重要作用。

3 讨论

植物体内的抗氧化性酶主要由 SOD、CAT 和 POD 等组成，SOD 清除 O_2^- 、POD 和 CAT 都能分解 H_2O_2 ，酶活较低时，植物大量积累 O_2^- ，与 H_2O_2 发生 Harber-Weiss 反应，产生更具毒性的 $\cdot OH$ ，引起膜脂过氧化反应，从而使寄主表现病症^[18-19]。由于寄主与病原物的不同组合，植物的抗病机制会有所差异^[20]。在稻瘟菌(*Magnaporthe grisea*)与水稻互作过程中，POD 的活性与抗稻瘟病的能力正相关，但其他酶的作用说法不一。宋海超等^[20]提出，早期的 SOD 和 CAT 活性与抗稻瘟病的能力呈负相关。而葛秀春等^[21]的结果表明 SOD 和 CAT 活性与对照相似。杨民和等^[22]对稻瘟菌(*M. grisea*)侵染的水稻组织中的 CAT 进行了定位观察，发现 CAT 主要产生于细胞壁、细胞质和囊泡膜上，并且非亲和性互作中的累积量更高。植物在生长过程中，各种酶的活性都是动态变化的，并且不同生育期的水稻抗氧化酶活性也有差异^[15]。本研究以未接种病原菌的水稻作为对照，排除了水稻自身氧化酶表达变化的影响。研究发现，POD、SOD 和 CAT 在非亲和反应中的净增加量高于亲和反应，并且水稻孕穗期的活性更高。各类酶在水稻苗期出现的最高值时间与水稻品种无关，但 SOD 和 CAT 在孕穗期的非亲和反

图7 不同抗性水稻品种中 *LOX* 相对表达量Fig. 7. Relative expression of *LOX* in rice varieties with different resistance to bacterial panicle blight.图8 不同抗性水稻品种中 *PAL* 相对表达量Fig. 8. Relative expression of *PAL* in rice varieties with different resistance to bacterial panicle blight.

应中上升速度更快。因此，推测水稻孕穗期的抗病反应比苗期更强，抗病品种与感病品种的抗病性差异在孕穗期更为明显。

本研究中，CAT 的活性在接种病原菌后的增量并不高。Baker 等^[9]报道，细胞中 H_2O_2 水平很低时，CAT 的清除能力也很低。因此对两个时期接种后的水稻 H_2O_2 水平进行测试，发现两个时期的 H_2O_2 含量均处于低水平，且孕穗期的 H_2O_2 含量比苗期高，非亲和反应高于亲和反应(数据未发表)。推测 CAT 的低活性可能是因为水稻体内 H_2O_2 的含量不够高。

稻瘟病菌(*M. grisea*)侵染后，水稻的 *LOX* 和 *PAL* 都能高度表达，因此 JA 和 SA 信号传导途径能迅速启动^[13]，而细条病菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*)侵染后的水稻只能启动 JA 信号途径^[23]。本研究发现，JA 途径的关键酶脂氧合酶的基因表达量非常低，而 SA 途径的关键酶苯丙氨酸解氨酶的

基因表达量非常高, 这个现象在孕穗期尤其明显。因此, 推测 SA 途径是水稻抵御颖壳伯克氏菌(*B. glumae*)侵染的过程中的主要信号传导途径。但 *B. glumae* 侵染后的水稻是否能通过其他通路诱导启动 JA 途径还需要更多研究去证实。据报道, SA 与具有 CAT 活性的蛋白(SABP)结合能抑制 CAT 活性, 使其失去催化 H_2O_2 的能力^[24]。这可能是本研究中 CAT 活性较低的另一原因。

与其他寄主与病原菌互作过程相似, *B. glumae* 侵染水稻后, PR 基因能不同程度地被诱导表达来激活防御反应, 非亲和反应中的表达水平高于亲和反应, 并且表达时序也有差异。*B. glumae* 能诱导 *PR10b* 和 *Rcht* 的显著上调表达, 但对 *PR1a* 的诱导作用不大。说明水稻与 *B. glumae* 互作的前期, 不是所有抗病基因都能被诱导表达。但前期未表达的基因能否在后期被诱导, 还需要进一步验证。

在寄主与病原互作时, 植物的生长与其抗病性的关联性还不清楚^[25]。Hugot 等^[26]报道, 烟草被霜霉(*Peronospora tabacina*)侵染时, 其抗性从营养期到生殖期表现出增加的趋势。Kus^[27]研究发现, 成熟的拟南芥植株比幼苗对丁香假单胞菌(*Pseudomonas syringae*)的抗性更强, 但是 Chen 等^[28]的试验没有发现这个差异。本研究中, 水稻孕穗期的抗病性比苗期更强, 这个现象可能与植物不同生育期的抗病性有关, 也可能与 *B. glumae* 的侵染方式有关。据报道, 水稻孕穗期之前, 若病原菌群体数量不大, *B. glumae* 侵入稻株后可以潜伏在水稻体内, 对水稻不会造成较大伤害, 但在孕穗期开始急剧增殖并对寄主造成毁灭性破坏^[5]。说明病原菌的群体数量或者群体感应对寄主的抗病性有重要作用。因此, 不同时期的水稻对穗枯病的抗性差异可能与 *B. glumae* 的侵染方式有关。水稻苗期抗穗枯病而穗期感病的机制揭示, 对培育抗穗枯病的水稻材料具有科学借鉴意义。

参考文献:

- [1] Goto K, Ohata K. New bacterial diseases of rice (brown stripe and grain rot). *Ann Phytopathol Soc Japan*, 1956, 21: 46-47.
- [2] CABI/EPPO. Distribution Maps of Plant Diseases, No.732. Wallingford, 2013, UK: CAB International.
- [3] 罗金燕, 徐福寿, 王平, 徐丽慧, 谢关林. 水稻细菌性谷枯病病原菌的分离鉴定. *中国水稻科学*, 2008, 22(1): 82-86.
Luo J Y, Xu F S, Wang P, Xu L H, Xie G L. Isolation and identification of the causal organism of bacterial grain rot from rice. *Chin J Rice Sci*, 2008, 22(1): 82-86 (in Chinese with English abstract)
- [4] 李路, 刘连盟, 王国荣, 汪爱娟, 王玲, 孙磊, 黎起秦, 黄世文. 水稻穗腐病和穗枯病的研究进展. *中国水稻科学*, 2015, 29(2): 215-222.
Li L, Liu L M, Wang G R, Wang A J, Wang L, Sun L, Li Q Q, Huang S W. Research progress of spikelet rot disease and bacterial panicle blight of rice. *Chin J Rice Sci*, 2015, 29(2): 215-222 (in Chinese with English abstract)
- [5] Li L, Wang L, Liu L M, Hou Y X, Huang S W, Li Q Q. Infection process of *Burkholderia glumae* before booting stage of rice. *J Phytopathol*, 2016, 164: 825-832.
- [6] 何俊瑜, 任艳芳, 朱诚期, 蒋德安. 镉胁迫对镉敏感水稻突变体活性氧代谢及抗氧化酶活性的影响. *生态环境学报*, 2008, (3): 1004-1008.
He J Y, Ren Y F, Zhu C Q, Jiang D A. Effects of cadmium stress on reactive oxygen species metabolism and antioxidant enzyme activities in Cd-sensitive mutant rice seedlings. *Ecol Environ Sci*, 2008, (3): 1004-1008. (in Chinese with English abstract)
- [7] 宋凤鸣, 郑重, 葛秀春. 活性氧及膜脂过氧化在植物-病原物互作中的作用. *植物生理学通讯*, 1996, 32(5): 377-385.
Song F M, Zheng Z, Ge X C. Role of active oxygen and membrane lipid peroxidation in plant-pathogen interactions. *Plant Physiol Comm*, 1996, 32(5): 377-385 (in Chinese with English abstract)
- [8] 王娟, 李德全. 逆境条件下植物体内渗透调节物质的积累与活性氧代谢. *植物学通报*, 2001, 18(4): 459-465.
Wang J, Li D Q. The accumulation of plant osmoticum and activated oxygen metabolism under stress. *Chinese Bull Bot*, 2001, 18(4): 459-465 (in Chinese with English abstract)
- [9] Baker C J, Orlandi E W. Active oxygen in plant pathogenesis. *Ann Rev Phytopathol*, 1995, 33: 299-321.
- [10] Christensen J H, Boerjan W. Purification and characterization of peroxidases correlated with lignification in poplar xylem. *Plant Physiol*, 1998, 118(1):125-135.
- [11] 赵长江. 纹枯病菌侵染后水稻防御反应相关基因的表达分析. 福州: 福建农林大学, 2005.
Zhao C J. Defense gene expression analysis on infection process of rice sheath blight. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2005 (in Chinese with English abstract)
- [12] Ponciano G, Yoshikawa M, Lee J L, Ronald P C, Whalen M C. Pathogenesis-related gene expression in rice is correlated with developmentally controlled *Xa21*-mediated resistance against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Physiol Molecul Plant Pathol*, 2006, 69:131-139.

- [13] 乐关旺, 陈实, 潘庆华, 曾任森, 刘迎湖, 骆世明. 水稻和稻瘟病菌互作中的信号传导及防御反应基因诱导表达的研究. *植物病理学报*, 2007, 37(1): 42-49.
Le G W, Chen S, Pan Q H, Zeng R S, Liu Y H, Luo S M. Induced expression of signaling pathway and related genes in interaction between rice and *Magnaporthe grisea*. *Acta Phytopathol Sin*, 2007, 37(1): 42-49 (in Chinese with English abstract)
- [14] 余朝阁, 李天来, 杜妍妍, 周娣, 魏爽. 植物诱导抗病信号传导途径. *植物保护*, 2008, 34(1): 1-4.
Yu C G, Li T L, Du Y Y, Zhou D, Wei S. Signaling pathways in plant-induced resistance. *Plant Prot*, 2008, 34(1): 1-4 (in Chinese with English abstract)
- [15] 于方明, 刘可慧, 刘华, 邓华, 周振明, 陈朝述, 李明顺. 镉污染对水稻不同生育期抗氧化系统的影响. *生态环境学报*, 2012, 21(1):88-93.
Yu F M, Liu K H, Liu H, Deng H, Zhou Z M, Chen Z S, Li M S. Antioxidative responses to cadmium stress in the leaves of *Oryza sativa* L. in different growth period. *Ecol Environ Sci*, 2012, 21(1):88-93 (in Chinese with English abstract)
- [16] 李思未, 罗桂花, 乔枫, 王法军, 赵开军, 王春连. 白叶枯病菌 PX099 对 CBB23 抗氧化酶活性和防御基因表达的影响. *应用与环境生物学报*, 2013, 19(6): 980-985.
Li S W, Luo G H, Qiao F, Wang F J, Zhao K J, Wang C L. Influence of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* PX099 inoculation on antioxidant enzyme activity and defense gene expression in CBB23. *Chin J Appl Environ Biology*, 2013, 19(6): 980-985 (in Chinese with English abstract)
- [17] 范程岚. 硅对不同抗感纹枯病水稻品种的生理生化和分子机制影响. 南宁: 广西大学, 2012.
Fan Z L. Effect of silicon on the physiology and biochemistry and molecular mechanism of different resistance level varieties to the sheath blight (*Rhizoctonia solani*). Nanjing: Guangxi University, 2012 (in Chinese with English abstract)
- [18] 胡泽友, 邓小波, 彭喜旭, 何艳, 刘威海, 戴光宇, 王海华. 外源钙对镍胁迫下水稻幼苗抗氧化酶活性及膜脂过氧化的影响. *中国水稻科学*, 2007, 21(4): 367-371.
Hu Z Y, Deng X B, Peng X X, He Y, Liu W H, Dai G Y, Wang H H. Effects of external calcium on activities of antioxidant enzymes and membrane lipid peroxidation in rice seedlings under nickel stress. *Chin J Rice Sci*, 2007, 21(4): 367-371 (in Chinese with English abstract)
- [19] 杜秀敏, 殷文璇, 赵彦修, 张慧. 植物中活性氧的产生及清除机制. *生物工程学报*, 2001, 17(2): 121-125.
Du X M, Yin W X, Zhao Y X, Zhang H. The production and scavenging of reactive oxygen species in plants. *Chin J Biotechnol*, 2001, 17(2): 121-125 (in Chinese with English abstract)
- [20] 宋海超, 史学群. 稻瘟菌侵染后水稻抗氧化酶类的变化与抗病性的关系. *海南大学学报自然科学版*, 2006, 24(4): 378-382.
Song H C, Shi X Q. The relationships of changes in antioxidant enzymes of rice seedling infected by *Magnaporthe grisea* to the blast resistance. *Natural Science J Hainan Univ*, 2006, 24(4): 378-382 (in Chinese with English abstract)
- [21] 葛秀春, 宋凤鸣, 郑重. 稻瘟菌侵染后水稻幼苗活性氧的产生与抗病性的关系. *植物生理学报*, 2000, 26(3): 227-231.
Ge X C, Song F M, Zheng Z. Active oxygen production in rice seedlings infected by *Magnaporthe grisea* is involved in the blast resistance. *Acta Phytophysiol Sin*, 2000, 26(3): 227-231 (in Chinese with English abstract)
- [22] 杨民和, 郑重, Leach J E. 水稻受稻瘟病菌侵染后过氧化酶定位的超微观察. *中国水稻科学*, 2002, 16(1): 57-62.
Yang M H, Zheng Z, Leach J E. Histochemical and ultrastructural demonstration of peroxidase activity during infection of rice by *Magnaporthe grisea*. *Chin J Rice Sci*, 2002, 16(1): 57-62 (in Chinese with English abstract)
- [23] 王丽娟. 水稻病程相关基因 *XIOsPR10* 的功能研究. 厦门: 厦门大学, 2011.
Wang L J. Functional study on a pathogenesis related protein gene *XIOsPR10* from rice. Xiamen: Xiamen University, 2011 (in Chinese with English abstract)
- [24] 汪尚, 徐鹭芹, 张亚仙, 曾后清, 杜立群. 水杨酸介导植物抗病的研究进展. *植物生理学报*, 2016, 52(5): 581-590.
Wang S, Xu L Q, Zhang Y X, Zeng H Q, Du L Q. Recent advance of salicylic acid signaling in plant disease resistance. *Plant Physiol J*, 2016, 52(5): 581-590 (in Chinese with English abstract)
- [25] Whalen MC. Host defence in a developmental context. *Mol Plant Pathol*, 2005, 6: 347-360.
- [26] Hugot K, Aime S, Conrod S, Poupet A, Galiana E. Developmental regulated mechanisms affect the ability of a fungal pathogen to infect and colonize tobacco leaves. *Plant J*, 1999, 20: 163-170.
- [27] Kus JV, Zaton K, Sarkar R, Cameron R K. Age-related resistance in *Arabidopsis* is a developmentally regulated defense response to *Pseudomonas syringae*. *Plant Cell*, 2002, 14: 479-490.
- [28] Chen C, Chen Z. Potentiation of developmentally regulated plant defense response by AtWRKY18, a pathogen-induced *Arabidopsis* transcription factor. *Plant Physiol*, 2002, 129: 706-716.