

水稻与纹枯病菌互作中免疫相关基因的表达研究*

刘 列¹, 秦 蔚¹, 孙 场¹, 刘欣茹¹, 罗 琼¹, 韩光煜¹,
李成云¹, 杨根华¹, 董文汉^{2**}

(1. 云南农业大学, 省部共建云南生物资源保护与利用国家重点实验室, 云南 昆明 650201;

2. 云南农业大学 科技处, 云南 昆明 650201)

摘要:【目的】近年来水稻纹枯病的危害不断加重, 在一些地区已成为水稻最严重的病害, 严重威胁到中国水稻的产量和品质。由于引起水稻纹枯病的立枯丝核菌具有强腐生性和广寄主范围的特性, 利用传统方法至今尚未筛选到高抗的资源品种。为了找到与抗性相关的基因和为抗性研究及抗病育种提供帮助。【方法】本研究在苗期和成株期接种抗病性不同的4个水稻品种, 利用qPCR方法研究了在2个生育期接种纹枯病菌后24 h和48 h水稻免疫相关基因的表达量变化。【结果】初步明确 *WARK71* 和 *WARK53* 是介导水稻纹枯病抗性的关键基因, 可作为抗性相关的标记基因。【结论】水稻与纹枯病菌的互作中可能存在受水稻发育时期调控的开关基因。进一步系统分析水稻对纹枯病菌的抗性组分为抗性基因的合理利用、水稻抗病品种的培育和预防纹枯病研究提供理论基础。

关键词: 水稻纹枯病; 抗性相关基因; qPCR; 相对基因表达量

中图分类号: S 435.111.42

文献标识码: A

文章编号: 1004-390X (2019) 05-0731-07

Expression of Rice Immunity Genes Involved in Interaction between *Rhizoctonia solani* and Rice

LIU Lie¹, QIN Wei¹, SUN Yang¹, LIU Xinru¹, LUO Qiong¹, HAN Guangyu¹,
LI Chengyun¹, YANG Genhua¹, DONG Wenhan²

(1. State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Bio-Resources in Yunnan, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China; 2. Division Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

Abstract: [Purpose] Rice sheath blight (RSB) has been getting more and more severe recently and has become the most devastating rice disease in some areas, which significantly affects rice yield and quality in China. Because *Rhizoctonia solani*, the causal fungal pathogen of rice sheath blight is a facultative parasite that has a strong saprophytic capability and a broad host range, it has not been successful in breeding rice cultivars that are highly resistant to the disease through using traditional screening methods. In order to determine RSB related genes for disease resistance researches and breeding programs. [Method] This study was designed to inoculate *R. solani* on the seedlings and mature plants of four rice cultivars that varied in their resistance to RSB, and later determine their res-

收稿日期: 2019-03-01

修回日期: 2019-05-12

网络首发时间: 2019-09-30 09:10:37

*基金项目: 国家重点研发计划资助(2017YFD0200400); 云南省高校科技创新团队支持计划资助; 国家自然科学基金(31160352, 31360423)。

作者简介: 刘列(1994—), 女, 陕西咸阳人, 在读硕士研究生, 主要从事植物真菌病害研究。

E-mail: 1040486742@qq.com

**通信作者 Corresponding author: 董文汉(1969—), 男, 云南大理人, 副教授, 主要从事植物病理学研究。

E-mail: 1959744569@qq.com

网络首发地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/53.1044.S.20190929.1019.008.html>



istant gene expression quantitatively through qPCR 24 and 48 hours post inoculations, respectively.

[**Results**] Both signal transduction genes of *WARK71* and *WARK53* the played a crucial role in interaction between *R. solani* and rice. Both genes could be used as the indicative markers for resistance against RSB. [**Conclusions**] Our results also demonstrated that key switch genes are likely present in regulating interaction between *R. solani* and rice. In addition, it will be helpful to systemically analyze those components of rice resistance to RCB, which can provide a theoretical basis for rational use of resistance genes, cultivation of rice resistant varieties, and prevention and control of rice sheath blight.

Keywords: rice sheath blight; immunity-associated-gene; qPCR; gene expression

水稻纹枯病由立枯丝核菌 (*Rhizoctonia solani* Kühn) 引起, 是世界性的水稻三大病害之一^[1]。随着高产、矮秆和多蘖品种的推广以及种植密度和施氮量的增加, 其危害日趋严重, 湖南、广东、广西、江西等地已将此病列于稻瘟病之前, 目前已位居中国水稻三大病害之首^[2-4]。对水稻纹枯病的研究已有近百年的历史, 但迄今为止, 该病在世界各水稻产区仍有不断加重的趋势, 发生势头得不到有效控制, 培育和种植抗病品种成为水稻生产上的迫切需要和育种者追求的主要目标。

李桦等^[5]鉴定与筛选了 190 份粳稻品种对纹枯病抗性, 其结果无一免疫品种, 抗病材料 6 份, 仅占供鉴总数的 3.2%。左示敏等^[6]鉴定了 299 份不同类群水稻品种的抗性, 结果未发现免疫和高抗品种, 中抗以上品种仅为 36.5%。ANURATHA 等^[7]发现用纹枯病菌感染后的水稻可产生 2 种几丁质酶。有研究表明: MAP 蛋白激酶等一些基因能够参与调节水稻与纹枯病菌等互作的调节^[8]。有学者研究了水稻纹枯病发病过程中 2 个病程相关基因 *PR1* 和 *PBZ1* 的表达动态, 发现这两个病程相关基因随着接种时间的延长, 表达量明显升高^[9], 而 *RPR10b* 与拟斑病的大小有一定的关联, 而 *PR1* 与病斑的大小没有相关性^[10]。由于引起水稻纹枯病的立枯丝核菌具有强腐生性和广寄主范围, 利用传统方法很难找到较高水平的抗原, 给抗性研究及抗病育种带来很大的困难, 因而目前国内外还未深入展开纹枯病的抗性与水稻免疫相关基因表达关系的研究。

本研究通过对 4 个水稻供试品种在苗期和成株期接种纹枯病菌, 观察并记录发病进程、发病程度, 并于接种后 24 h 和 48 h 采样提取接种部

位 RNA, 测定 8 个水稻免疫相关基因的表达变化。通过对不同生育期这些相关基因的表达研究, 找到抗性基因在不同水稻品种间、以及不同接种时间点的关系, 初步分析这些水稻品种对供试菌株的响应属于 PTI 还是 ETI, 为抗性相关基因的合理利用提供理论基础, 为后续对这些水稻抗性基因进行深入研究打下基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料及菌株

本试验所用水稻品种 (云光 14、丽江新团黑谷、云粳 19 和月亮谷, 分别标为 YG14、LTH、YJ19 和 YLG)、纹枯菌 (*R. solani* AG-1 I A) 均由云南农业大学杨根华教授课题组提供。

1.2 试验用主要试剂

2×Easy Taq SuperMix、DNA Marker (DL2000)、Trizol、RQ1 RNase-Free DNase、Prime Script RT reagent Kit With gDNA Eraser 和 DEPC (焦磷酸二乙酯) 均购自全式金生物公司。

1.3 材料种植及菌株接种

水稻种植: 水稻采用育秧盘单粒播种。水稻种子表面消毒 (消毒过程: 75% 酒精浸泡 30 s, 3% NaClO 浸泡 4~5 min, 最后用灭菌水冲洗 3 次) 后在 28 ℃ 恒温培养箱中催芽到露白, 播种于温室育秧盘中。

纹枯病菌的培养: 将纹枯病菌培养在 PDA 培养基上, 培养 3 d, 备用。

接种: 当水稻幼苗长到 3~5 叶期 (即苗期), 将幼苗种在含有纹枯菌菌丝的培养皿中 (培养皿大小为 90 mm), 保湿, 并在恒温箱中继续生长、观察并记录发病情况、采样 (在接种 24 h 和 48 h 分别采样)。待温室中的水稻生长到分蘖后期到抽穗前期之间时 (即成株期), 将菌丝块 (5 cm×

1.5 cm×0.5 cm) 带菌的一面紧贴在水稻叶鞘的靠下部, 用灭菌水浸湿灭菌棉花, 将棉花裹在接菌部位, 再用封口膜缠绕 2 层, 保持高温高湿的条件, 观察并记录发病情况、采样 (在接种 24 h 和 48 h 分别采样)。采回来的样品迅速用液氮速冻, 标记并保存在-80 ℃ 冰箱中。未接种的水稻苗在相同时间点、相同条件下取样保存, 作为对照。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物表
Tab. 1 List of primers for qPCR analysis

基因名称 gene name	正向引物序列 (5'→3') forward primer	反向引物序列 (5'→3') reverse primer
<i>PR1a</i>	GCTACGTGTTTATGCATGTATGG	TCGGATTATTCTCAGCA
<i>PBZ1/PR10a</i>	AATGAGAGCCGCAGAAATGT	GGCACATAAACACAACCACAA
<i>RPR10b</i>	TCTCCGTATTGCTTCCT	CACTCTCACAAAATCAAACACCA
<i>CEBiP</i>	GATGACTGGTTTATCCAGCTTTG	TTCAAGCAGCCGTACAAGTG
<i>WRKY53</i>	CCAATTGTGTTGATTCGTTGC	CGTACGCGTATCCCAAGTGT
<i>WRKY71</i>	AGATGGCGATGACGCTGAC	AGCAATCGTCAATCCTTGGT
<i>NAC4</i>	AAGCGCAGCATCAACAAAG	TCCATCCTTCTCCTCTCGTG
<i>Chit1</i>	CTGGTACTGGACCAACAACG	GTTCTTGCCGTCGCACTC
<i>β-actin</i>	GAGTATGATGAGTCGGGTCCAG	ACACCAACAATCCCAACAGAG

1.5 总 RNA 的提取和 cDNA 第 1 链的合成

RNA 提取试验操作步骤参照全式金 Trizol 总 RNA 提取试剂盒 (ET111-01) 的说明书。利用核酸蛋白分析仪检测 RNA 含量及纯度。DNA 的消化处理步骤参照 RQ1 RNase-Free DNase 试剂说明书。根据检测结果, 进行反转录合成 cDNA 第 1 链。反转录步骤参照 TransScript II First-Strand cDNA Synthesis SuperMix (Trans) 的说明书进行。体系为 20 μL: 400 ng RNA、1 μL Anchored Oligo (dT)、10 μL 2×TS II Reaction Mix、1 μL TransScript II RT/RI Enzyme、无 RNase 的水补足体积。反转录程序: 将 RNA 模板、引物与 RNase-free Water 混匀, 65 ℃ 孵育 5 min 后, 冰浴 2 min, 然后再加入其他反应组分。25 ℃ 孵育 10 min 后, 42 ℃ 孵育反转录 15 min; 85 ℃ 加热 5 s 失活 TrabsScript RT/RI 与 gDNA Remover。

1.6 实时荧光定量 PCR

目的基因的 PCR 扩增, 在冰上添加下列组分, 25 μL 反应体系: 0.5 μL Forward Primer (10 μmol/L)、0.5 μL Reverse primer (10 μmol/L)、12.5 μL 2×TransStart Top Green qPCR SuperMix、2 μL Template DNA、9.5 μL ddH₂O。反应条件: 94 ℃ 30 s; 94 ℃ 50 s; 50~60 ℃ 15 s; 72 ℃ 10 s (40~45 个循环)。

1.4 引物设计

目的基因选用的 8 个水稻免疫相关基因包括病程相关基因 (*PR1a*、*PR10a*、*RPR10b*)、几丁质受体基因 (*CEBiP*)、几丁质酶基因 (*Chit1*)、转录因子相关基因 (*WRKY53*、*WRKY71* 和 *NAC4*)^[11-15]。设计 qPCR 引物, 内参选用管家基因 *β-actin*, 所用引物如表 1 所示。

1.7 相对定量表达分析

本研究中目的基因的相对表达量计算采用 2^{-ΔΔC_t} 法。最终数据计算公式: 相对表达量=2^{-ΔΔC_t}; C_t 值的含义是: 每个反应管内的荧光信号到达设定的域值时所经历的循环数。ΔΔC_t= (C_t 处理组靶基因-C_t 处理组内参)-(C_t 未处理组靶基因-C_t 未处理组内参)^[16]。其中, 靶基因指的是目的基因, 内参基因是 *β-action*。

2 结果与分析

2.1 水稻纹枯病的发病过程观察

苗期接种的水稻样品在纹枯病菌接种 24 h 和接种 48 h 时都没有明显症状, 直至 7 d 后都未观察到发病的症状 (图 1); 成株期接种的水稻在纹枯菌接种 24 h 后即显现症状, 在叶鞘包裹的茎的表面有棕色的线状痕迹, 接种 48 h 时, 病斑明显, 并且已经扩展出了接种部位 (图 2a、b), 对照无症状 (图 2c)。本研究使用的 4 个水稻品种中, 云光 14、LTH 和云梗 19 表现为感病, 月亮谷表现为中抗。

2.2 苗期和成株期接种 24 h 和 48 h 时防御相关基因表达量的比较

纹枯病菌接种苗期 4 个水稻品种 24 h 和 48 h 时的防御相关基因的相对表达量的情况见图 3。



图 1 苗期接种后 7 d 症状图
Fig. 1 Symptom after 7 days of seedling inoculation

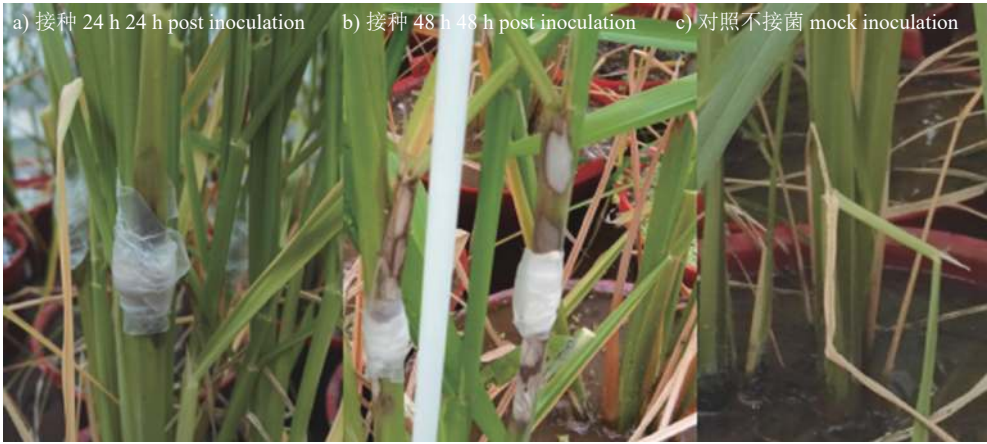


图 2 成株期 (月亮谷) 接种症状图
Fig. 2 Symptoms on the adult rice plants

苗期接种后，检测到个别基因有所上调，尤其是月亮谷中，上调的基因数量较多，上调的量也较大，如 *WRKY53* 和 *WRKY71* 的上调倍数都超过了 50 倍。丽江新团黑谷苗期的各检测基因也都有小幅上调，包括 *WRKY53* 和 *WRKY71*，以及病程相关基因 *PR1a*、*PR10a* 和 *RPR10b*。但总体来说，上调的量都很小，尤其是与成株期相比，上调的量更小。

成株期接种后，基因表达情况与苗期完全不同，不同水稻品种之间的差异也很大 (图 4)。总体来说，在中抗品种月亮谷中，相关基因的表达量都比较大。尤其是 *WRKY53* 和 *WRKY71* 两个

信号转导的相关基因，接种后 24 h 的表达量分别达到 2 384 倍和 2 770 倍。这些结果表明：这 2 个信号相关基因的表达可能与水稻品种的抗性有着重要的作用。此外，2 个与基础防卫相关的基因 *CEBiP* 和 *Chit1* 的表达量也大幅提高。表明基础防卫反应对月亮谷的成株期抗性也起着一定的作用。

3 讨论

水稻纹枯病抗性的相关遗传研究，与稻瘟病、白叶枯病等其他水稻重要病害相比都相对较少^[17]。一方面是由于水稻品种资源中缺乏高抗的

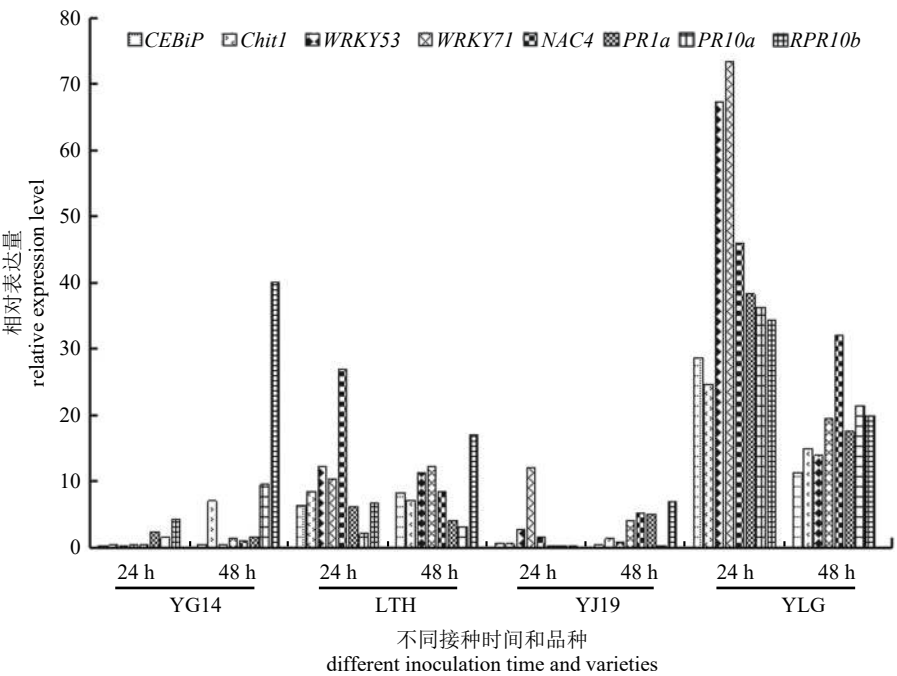


图 3 苗期接种后不同基因的相对表达量

Fig. 3 Relative expression levels of different genes after seedling inoculation

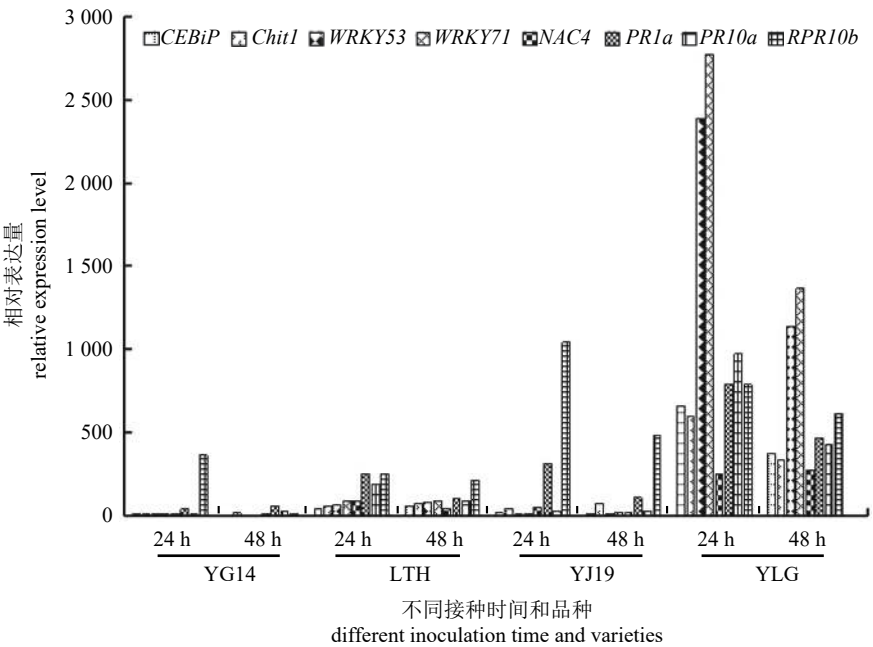


图 4 成株期接种后不同基因的相对表达量

Fig. 4 Relative expression levels of different genes after adult stage inoculation

品种，另一方面也与纹枯病的抗性鉴定需要的周期较长有关^[6]。随着纹枯病在中国及东南亚国家的不断加重，系统研究水稻与丝核菌的互作机制，为培育和利用抗病品种提供理论依据与技术支持，是生产上亟待解决的问题^[17]。本研究从近年水稻免疫的相关研究结果^[13-14]中挑选出 8 个关

键节点上的基因，对 4 个水稻品种在苗期和成株期 2 个生育时期进行纹枯病菌接种 24 h 和 48 h 后的表达分析。结果表明：水稻苗期对纹枯病菌表现不敏感，而成株期较为敏感，意味着水稻对纹枯病菌的抗性可能存在着一个受水稻发育时期调控的开关基因，该基因在水稻苗期处于关闭状

态,因此免疫相关的基因,包括病原相关分子模式诱导的免疫(PTI)和效应蛋白诱导的免疫(ETI)都未启动。此时个别免疫相关的基因可能受到病原菌的细胞壁或是其他次要致病分子的刺激从而少量变化。水稻生长至成株期后,该基因转换为启动模式,能够接收到纹枯病菌的主要互作因子,并激活水稻免疫相关的信号转导系统及其下游的病程相关基因。但可能由于纹枯病菌的致病因子十分强烈,在本研究使用的材料范围内,这些被激活的免疫路径都不足以完全抵御纹枯病菌的侵染,导致病害发生(图5)。图5是根据本研究及前人的相关研究提出的水稻与纹枯病菌在苗期和成株期互作中的水杨酸(SA)信号、*WRKY*转录因子及病程相关基因的互作模式图。图中的开关基因表示受到生育期调控的关键控制因子,也可能是纹枯病抗性的负调控因子的影响,如果能够从遗传上找到该因子,通过该因子的有效调控(如增强正向的调控因子,或敲除抑制负的调控因子),就有希望提高水稻对纹枯病的抗性。

本研究结果表明:与信号转导相关的 *WRKY53* 和 *WRKY71* 两个信号转导的相关基因,不论是苗期或是成株期,在抗性品种与感病品种中的表达差异极为显著,而且与基础抗性相关的2个基因和与病程相关的基因都表现出较好的共表达模式。因此,可作为水稻与纹枯病菌互作过程中的标记,通过其表达模式的检测,从而判断水稻的免疫路径是否被激活。由于在水稻与稻瘟病菌的互作关系中,PR1和RPR10b都属于水杨酸介导的植物系统性获得抗性(systemic acquired resistance)途径中的重要病程相关蛋白,因此,本研究中检测到的这2个基因在成株期的上调,意味着水稻对纹枯病菌的抗性反应也受到水杨酸途径控制(图5)。在将来的研究中,需要系统分析水稻对纹枯病菌的抗性组分,尤其是在互作过程中发挥关键作用的调控基因,可为抗性基因的合理利用、水稻抗病品种的培育、预防纹枯病的开发和进一步研究提供理论基础。

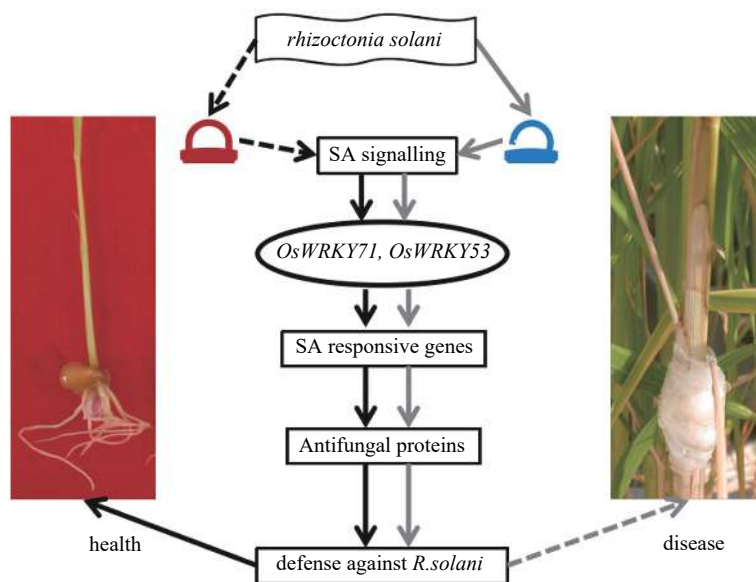


图5 水稻与纹枯病菌在苗期和成株期互作中的SA信号、*WRKY*转录因子及病程相关基因的互作模式

Fig. 5 A model illustrating SA signaling, *WRKY* transcription factors are involved in interaction between rice and *R. solani* in seedling and adult stage

[参考文献]

- [1] 彭绍裘, 曾昭瑞, 张志光. 水稻纹枯病及其防治[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1986.
- [2] 周而勋, 曹菊香, 杨媚, 等. 我国南方六省(区)水稻纹枯病菌遗传多样性的研究[J]. 南京农业大学学报, 2002, 25(3): 36. DOI: 10.3321/j.issn:1000-2030.2002.03.009.
- [3] 周而勋, 杨媚, 陈友林. 土壤环境因素对水稻纹枯病菌腐生定殖能力的影响[J]. 植物病理学报, 2002, 32(3): 214. DOI: 10.3321/j.issn:0412-0914.2002.03.004.
- [4] 黄世文, 王玲, 陈惠哲, 等. 氮肥施用量和施用方法对超级杂交稻纹枯病发生的影响[J]. 植物病理学报, 2009, 39(1): 104. DOI: 10.3321/j.issn:0412.2009.01.017.
- [5] 李桦, 宋成艳, 丛万彪, 等. 粳稻品种抗纹枯病性鉴定与筛选[J]. 植物保护, 2000, 26(1): 19. DOI: 10.3969/j.issn.

- 0529-1542.2000.01.007.
- [6] 左示敏, 陈天晓, 邹杰, 等. 水稻不同类群品种间的纹枯病抗性评价和抗病新种质筛选[J]. 植物病理学报, 2014, 44(6): 658. DOI: [10.13926/j.cnki.apps.2014.06.013](https://doi.org/10.13926/j.cnki.apps.2014.06.013).
- [7] ANURATHA C S, ZEN K C, COLE K C, et al. Induction of chitinases and β -1,3-glucanases in *Rhizoctonia solani*-infected rice plants: isolation of an infection-related chitinase cDNA clone[J]. Physiologia Plantarum, 1996, 97(1): 39. DOI: [10.1111/j.1399-3054.1996.tb00476.x](https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1996.tb00476.x).
- [8] ZHAO C J, WANG A R, SHI Y J, et al. Identification of defense-related genes in rice responding to challenge by *Rhizoctonia solani*[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2008, 116(4): 501. DOI: [10.1007/s00122-007-0686-y](https://doi.org/10.1007/s00122-007-0686-y).
- [9] 赵长江, 鲁国东, 杜晓昱, 等. 水稻纹枯病发病过程 *PR1* 和 *PBZ1* 的表达动态[J]. 植物病理学报, 2006, 36(4): 317. DOI: [10.3321/j.issn:0412-0914.2006.04.007](https://doi.org/10.3321/j.issn:0412-0914.2006.04.007).
- [10] TAKAHASHI A, KAWASAKI T, HENMI K, et al. Lesion mimic mutants of rice with alterations in early signaling events of defense[J]. The Plant Journal, 1999, 17(5): 535. DOI: [10.1046/j.1365-3113X.1999.00405](https://doi.org/10.1046/j.1365-3113X.1999.00405).
- [11] KANEDA T, TAGA Y, TAKAI R, et al. The transcription factor *OsNAC4* is a key positive regulator of plant hypersensitive cell death[J]. The EMBO Journal, 2009, 28(7): 926. DOI: [10.1038/emboj.2009.39](https://doi.org/10.1038/emboj.2009.39).
- [12] CHEN X W, RONALD P C. Innate immunity in rice[J]. Trends in Plant Science, 2011, 16(8): 451. DOI: [10.1016/j.tplants.2011.04.003](https://doi.org/10.1016/j.tplants.2011.04.003).
- [13] LIU W D, LIU J L, TRIPLETT L, et al. Novel insights into rice innate immunity against bacterial and fungal pathogens[J]. Annual Review of Phytopathology, 2014, 52: 213. DOI: [10.1146/annurev-phyto-102313-045926](https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-102313-045926).
- [14] LIU W D, WANG G L. Plant innate immunity in rice: a defense against pathogen infection[J]. National Science Review, 2016, 3(3): 295. DOI: [10.1093/nsr/nww015](https://doi.org/10.1093/nsr/nww015).
- [15] 秦蔚. 纹枯病菌原生质体制备及水稻抗性相关基因表达的研究. [D]. 昆明: 云南农业大学 2013.
- [16] 纪冬, 辛绍杰. 实时荧光定量 PCR 的发展和数据分析[J]. 生物技术通讯, 2009, 20(4): 598. DOI: [10.3969/j.issn.1009-0002.2009.04.041](https://doi.org/10.3969/j.issn.1009-0002.2009.04.041).
- [17] 毛碧增, 李德葆, 李群, 等. 转化双阶防卫基因获得抗段枯病水稻[J]. 植物生理与分子生物学学报, 2003, 29(4): 322.

责任编辑: 何承刚