

OsHsp18.0-CI 调控水稻对白叶枯病的抗性

左丽萍^{1,3}, 张瑞华², 金桂秀², 巨延虎¹, 田红娟³, 储昭辉¹, 丁新华^{1,3*}

(¹作物生物学国家重点实验室, 山东农业大学, 泰安 271018; ²临沂市农业科学院, 临沂 276012; ³山东农业大学植物保护学院, 泰安 271018)

摘要:热激蛋白广泛存在于各种生物中, 响应多种生物胁迫和非生物胁迫。前期研究结果显示, 在水稻中超量表达小热激蛋白 *OsHsp18.0-CI* 基因, 能通过增强水稻的基础防卫反应提高对水稻细菌性条斑病的抗性。本研究发现, *OsHsp18.0-CI* 基因也能够受到白叶枯病菌的诱导表达, 超量表达 *OsHsp18.0-CI* 的转基因水稻也增强了对多个白叶枯病致病菌株的抗性。转录组测序分析发现, *OsHsp18.0-CI* 基因介导的水稻对白叶枯病的抗病信号途径有部分类似于其介导的对细菌性条斑病的抗性路径, 同时也有大量新的未知功能基因的参与。以上结果表明, *OsHsp18.0-CI* 基因受到病原菌的侵染时, 也能通过增强水稻的基础防卫反应来提高对白叶枯病的抗性。

关键词: 水稻; 白叶枯病; 热激蛋白; *OsHsp18.0-CI*; RNA-Seq

OsHsp18.0-CI regulates disease resistance to bacterial blight in rice ZUO Li-ping^{1,3}, ZHANG Rui-hua², JIN Gui-xiu², JU Yan-hu¹, TIAN Hong-juan¹, CHU Zhao-hui¹, DING Xin-hua^{1,3*}

(¹State Key Laboratory of Crop Biology, Shandong Agricultural University, Taian 271018, China; ²Linyi Academy of Agricultural Science, Linyi 276012, China; ³College of Plant Protection, Shandong Agricultural University, Taian 271018, China)

Abstract: Heat shock proteins are widely present in various organisms and respond to a variety of biotic and abiotic stresses. Previous studies showed that over-expression of the small heat shock protein gene *OsHsp18.0-CI* can increase the resistance to bacterial leaf streak by enhancing rice basic defense response. This study found that the *OsHsp18.0-CI* gene can also be induced by PXO99, a strain of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) which caused bacterial blight in rice. Over-expression of *OsHsp18.0-CI* could enhance resistance to several *Xoo* strains in rice. Transcriptome sequencing analysis showed that *OsHsp18.0-CI* gene-mediated resistance to bacterial blight is not only partly similar to its resistance pathway to bacterial leaf streak, but also a large number of new unknown function genes are involved. The above results indicate that the *OsHsp18.0-CI* gene can increase resistance to bacterial blight by enhancing the basic defense response of rice infected with pathogenic bacteria of *Xoo*.

Key words: *Oryza sativa*; bacterial blight; heat shock protein; *OsHsp18.0-CI*; RNA-Seq

中图分类号: Q945.8

文献标识码: A

文章编号: 0412-0914(2019)01-0090-11

水稻是主要的粮食作物, 由革兰氏阴性菌 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) 所引起的白叶枯病是世界水稻生产中严重的细菌性病害之一。水稻白叶枯病菌通过叶尖或叶缘上的水孔和伤口侵染水稻, 在细胞间隙中繁殖, 由木质部进入并蔓

延至整株植物。其主要危害水稻叶片, 也可侵染叶鞘, 在水稻的整个生育期均可发生, 以苗期和分蘖期最为严重。发病时严重危害水稻的生长和产量, 一般能减产 10%~30%, 严重时能达 50%, 甚至颗粒无收^[1]。近几年, 大量的防御反应相关基因

收稿日期: 2018-05-28; 修回日期: 2018-08-12; 网络出版时间: 2018-08-13

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2184.Q.20180813.1709.003.html>

基金项目: 山东省自然科学基金杰出青年基金(JQ201807); 山东省现代农业产业技术体系(SDAIT-17-06); 转基因生物新品种培育重大专项(2016ZX08001-002)

通讯作者: 丁新华, 教授, 主要从事病原微生物与植物互作方向研究; E-mail: xhding@sdau.edu.cn

第一作者: 左丽萍, 女, 硕士研究生, 专业方向为分子植物病理学; E-mail: lipingzuo@126.com。

(Defense-related, DR) 被报道能参与水稻对白叶枯病的抗性^[2,3]。超量表达 *OsNPR1*、*OsWRKY13*、*OsWRKY71* 和 *OsGAP1* 通过激活水杨酸(SA)信号路径提高对水稻白叶枯病的抗性^[4-7]。*C3H12* 和 *OsWRKY45-2* 通过激活茉莉酸(JA)信号路径介导对白叶枯病的抗性^[8,9],超量表达 *OsWRKY45-1* 和 *OsEDR1* 通过调节 SA 和 JA 信号路径参与对白叶枯病的抗性^[9,10]。超量表达 *Os2H16* 通过调节 PR (pathogenesis-related) 基因的上调表达增强水稻对白叶枯病的抗性^[11],抑制 *OsDR8* 基因的表达增加水稻对白叶枯病菌的敏感性^[12]。由此可见,深入研究 DR 基因的分子生物学功能对于解析水稻抗病分子机制非常重要。

热激蛋白广泛存在于各种生物中,是进化中最为保守的蛋白家族之一^[13]。热激蛋白是生物体响应温度变化等逆境胁迫时产生的一种可帮助蛋白质正确折叠和防止蛋白质不可逆聚集的一种分子伴侣蛋白^[14]。根据植物热激蛋白的分子量大小可分为 HSP100s、HSP90s、HSP70s、HSP60s 和 sHSPs (small HSP,小热激蛋白)五大类^[15]。其中分子量为 12 ~ 42 kDa 的小热激蛋白是数量和种类最为丰富的热激蛋白^[16]。小热激蛋白不仅参与植物对热胁迫的响应,还能参与植物对氧化胁迫、重金属胁迫、冷害胁迫、干旱胁迫以及生物胁迫等的响应^[17-24]。在拟南芥中超量表达 *OsHsp18.0-CI* 基因能增强拟南芥对镉胁迫和盐胁迫的耐受性^[17,19],过表达小热激蛋白基因 *AtHSP17.6A* 能增强拟南芥对盐胁迫和干旱胁迫的耐受性^[22],过表达小热激蛋白基因 *Hsp17.7* 能增强胡萝卜的耐热性^[23],过表达小热激蛋白基因 *OsHsp18.0* (AK071240)能增强水稻对白叶枯的抗病性^[24]。

OsHsp18.0-CI 基因遗传定位于水稻细菌性条斑病抗性 QTL 位点 *qBlsr3a* 中,正向调控水稻对另一种稻黄单胞菌致病变种细菌性条斑病菌 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*, *Xoc*) 的抗性,转录组分析显示超量表达该基因能够显著提高水稻基础防卫反应相关基因的表达^[25]。本研究在此基础上探究 *OsHsp18.0-CI* 基因在水稻抗白叶枯病中发挥的功能,并通过转录组测序比较分析该基因在介导水稻对细菌性条斑病和白叶枯病抗性中的异同。

1 材料与方法

1.1 供试菌株和植物材料

本研究所用的水稻材料为粳稻 (*Oryza sativa* ssp. *japonica*) 品种圣稻 806 (S806) 和以圣稻 806 为受体通过遗传转化得到的 *OsHsp18.0-CI* 基因的超量表达 (CD39R) 和 RNAi 抑制表达的转基因株系 (CD40R)^[25]。

所用白叶枯病致病菌株包括 PXO99、PXO86、PXO61 和 PXO339^[26],由本实验室保存。

1.2 实验方法

1.2.1 基因相对表达量检测 参照试剂盒 Plant RNA Kit (OMEGA Bio-tek, USA) 说明书提供的方法抽提水稻叶片组织的 RNA,水稻 RNA 的第一链 cDNA 合成按试剂盒 (FSQ-301, TOYOBO, Japan) 的说明书进行。实时荧光定量 PCR 按试剂盒 (QKD-201, TOYOBO, Japan) 的说明书进行。PCR 反应体系如下:100 ng 的 cDNA 模板,Forward Primer 和 Reverse Primer 各 0.2 μ L, KOD SYBR[®] qPCR Mix 5 μ L 用灭菌的双蒸水补足至 10 μ L 的体系。PCR 的反应程序为 98 $^{\circ}$ C 变性 2 min;98 $^{\circ}$ C 变性 10 s,60 $^{\circ}$ C 退火 10 s,68 $^{\circ}$ C 延伸 30 s/500 bp,循环数为 40 个循环;然后进行融解曲线的分析。水稻内源肌动蛋白基因 *OsActin1* (LOC_Os03g50885) 的表达量用于 RNA 样品的内参均一化评价,利用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 相对定量的方法比较分析基因表达量。实验中所用引物序列见表 1。

Table 1 Primers used in this study

Primer	Sequence(5'-3')
<i>OsActin1F</i>	TGTATGCCAGTGGTCGTACCA
<i>OsActin1R</i>	CCAGCAAGGTCGAGACGAA
<i>OsPR8F</i>	GTTTCATCTGGTCAGCGGATAGC
<i>OsPR8R</i>	TCATAAGTATTATCACGACCGTTCGA
<i>OsPR10F</i>	CCCTGCCGAATACGCTTAA
<i>OsPR10R</i>	CTCAAACGCCACGAGAATTTG
<i>OsOPR5F</i>	TTTTCTTGCGAACCCTGACT
<i>OsOPR5R</i>	TCCAACAATTGGGTCTTGAGTGT
<i>OsPAL1F</i>	GGGCAACCCAGTGACCAA
<i>OsPAL1R</i>	CGATTGCCTCGTCGGTCTT
<i>OsLOX9F</i>	GCATCCCCAACAGCACATC
<i>OsLOX9R</i>	AATAAAGATTTGGGAGTGACATATTGG
<i>OsWRKY11F</i>	CTGCTGTGGCTGGCGG
<i>OsWRKY11R</i>	GTGGAAGGGAAAAGGTCTTGC

1.2.2 转基因植株的抗病性鉴定 水稻对白叶病的抗病性检测参照之前描述的方法^[25]进行。保存在-80℃的病原菌株首先在 PSA 培养基上活化 2 次后,以 10 mmol·L⁻¹的 MgCl₂悬浮菌液并调节 OD₆₀₀ = 0.5。白叶枯病菌的接种采用剪叶法。接种 14 d 后调查接种材料的发病情况,以病斑长度作为评价依据,调查数据进行 *t* 检验并进行差异显著性分析。

1.2.3 水稻白叶枯病菌生长数量统计 采用 1.2.2 方法进行接种 PXO99, 取样时间点分别为 0、4、8 和 12 d, 0 d 为接种后 2 h 取样。同一份材料取接种剪口下方约 6 cm 长度的 3 片叶,用 75% 的无水乙醇表面消毒 1 min, 用无菌水清洗 3 次每次 1 min, 晾干, 置于用酒精消毒过的研钵中加入 1.5 mL 的无菌水充分研磨成匀浆, 无菌水进行 10 倍梯度的稀释。根据前人经验选取 4 个梯度涂在 PSA 培养基上, 每个梯度点 3 个重复, 28℃ 放置 2~3 d 进行菌落计数, 以每片叶子菌落的 LOG 值绘制图标进行分析。

1.2.4 表达谱测序和分析 采用注射法用无针头的 2.5 mL 注射器对野生型圣稻 806 和超量表达 *OsHsp18.0-CI* 基因的转基因材料 CD39R 接种白叶枯病菌 PXO99, 分别取接种后 0 和 24 h 的样品 RNA 进行 RNA-seq 测序, 测序方法为 BGISEQ-500^[26]。本实验中 RNA 文库的构建、测序工作以及初步的数据分析委托深圳华大基因股份有限公司完成。差异基因的 GO 富集分析采用软件 AgriGO (<http://bioinfo.cau.edu.cn/agriGO>) 完成。

2 结果分析

2.1 *OsHsp18.0-CI* 在水稻和白叶枯病菌互作中的表达模式

为了探究 *OsHsp18.0-CI* 基因是否参与水稻对白叶枯病的抗性, 首先检测了 *OsHsp18.0-CI* 基因在圣稻 806 接种白叶枯病菌 PXO99 后 6、12、24 和 72 h 的表达变化, 结果发现接种 PXO99 后 6 h 该基因就显著上调表达, 24 h 达到峰值, 提高了约 5 倍, 72 h 恢复到与对照相同水平 (图 1)。表明 *OsHsp18.0-CI* 基因能快速响应白叶枯病菌的侵染。

2.2 *OsHsp18.0-CI* 基因影响水稻对白叶枯病的抗性

为了验证小热激蛋白基因 *OsHsp18.0-CI* 是否

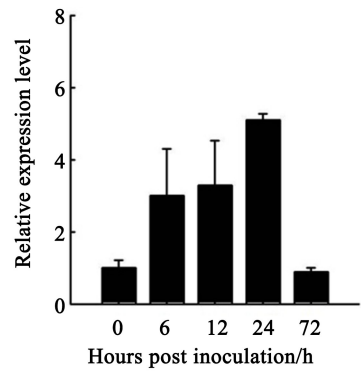


Fig. 1 The expression pattern of *OsHsp18.0-CI* post inoculation with PXO99

The bars represent the means (three replicates for gene expression) ± SD.

参与水稻对白叶枯病的抗性, 分别对超量表达 *OsHsp18.0-CI* 的转基因 T₂ 代植株 CD39R-7、CD39R-12 和抑制 *OsHsp18.0-CI* 基因表达的转化植株 CD40R-9、CD40R-12 接种了白叶枯病菌 PXO99, 14 d 后调查并统计发病情况。结果显示, CD39R-7 和 CD39R-11 株系的病斑长度分别为 6.72 cm ± 0.81 cm 和 6.87 cm ± 1.05 cm, 均显著低于野生型植株的发病斑度 8.35 cm ± 0.58 cm (图 2-A、B, *t* 检测, *P* < 0.01); 而两个 RNAi 株系 CD40R-9 和 CD40R-12 接种 PXO99 后病斑长度分别为 9.10 cm ± 1.12 cm 和 8.95 cm ± 1.38 cm, 大于野生型, 但尚未达到显著性差异水平。说明超量表达 *OsHsp18.0-CI* 基因能增强对 PXO99 的抗性。为进一步验证这一结果, 分别对野生型、CD39R-7 和 CD40R-12 植株接种 PXO99 后进行细菌生长数量的统计, 结果发现在接种后第 8 和 12 d, 超量表达 *OsHsp18.0-CI* 的转基因株系 CD39R-7 中的细菌生长量相比于野生型减少了 10 倍 (*t* 检测, *P* < 0.01), 而 CD40R-12 植株中细菌生长数量与野生型无显著性差异 (图 2-C)。

为了调查 *OsHsp18.0-CI* 基因介导的水稻对白叶枯病菌的抗性是否存在小种特异性, 分别对野生型、CD39R-7 和 CD40R-12 接种了白叶病菌菌株 PXO339、PXO61 和 PXO86。结果显示, 超量表达 *OsHsp18.0-CI* 基因的转基因株系 CD39R-7 同样增强了水稻对这 3 个菌株的抗性, 病斑长度相比野生型显著变短; 而 RNAi 抑制表达转基因株系

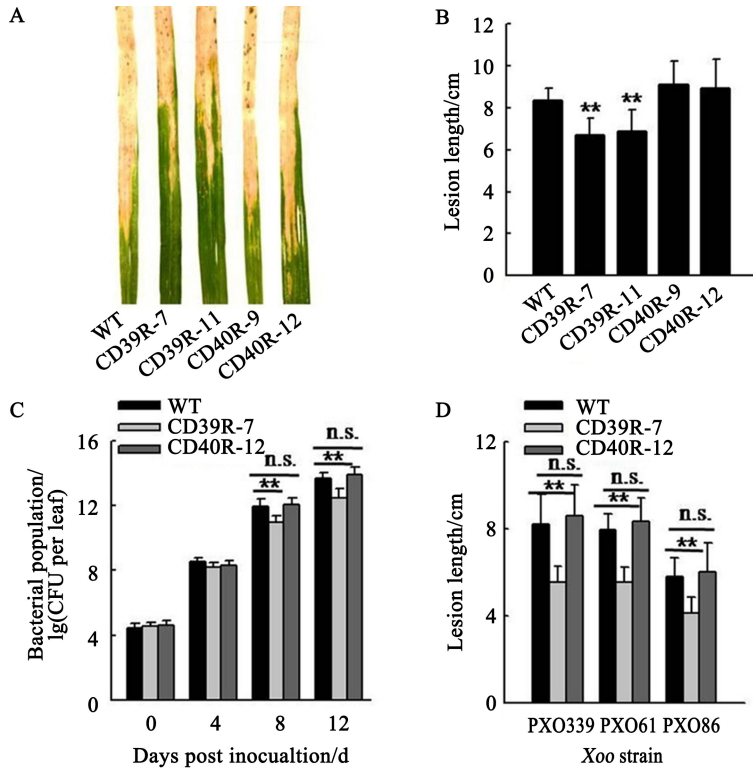


Fig. 2 Over-expression of *OsHsp18.0-CI* enhances resistance to *Xoo* strains

A: Disease symptom for plants at 14 dpi with PXO99. B: The average lesion length scored for T_2 transgenic plants of two *OsHsp18.0-CI* over-expression lines (CD39R-7 and CD39R-10) and two RNAi lines (CD40R-9 and CD40R-12) at 14 dpi with PXO99. The bars represent the means \pm SD. C: Statistical analysis of bacterial population growth in transgenic plants of CD39-7, CD40R-12 and wild-type (WT) inoculated with PXO99. Error bars represent standard deviation of three independent leaves. D: Lesion length of CD39R-7, CD40R-12 and WT inoculated with PXO339, PXO61 and PXO86. The bars represent the means \pm SD. “*” and “**” indicate a significant (t test, $P < 0.05$) and extremely significant (t test, $P < 0.01$) differences, and “n.s.” means no significant in lesion length between WT and the transgenic plants, respectively.

CD40R-12 的病斑长度均长于野生型,但未达到显著差异水平(图 2-D)。

2.3 超量表达 *OsHsp18.0-CI* 基因增强了水稻的基础免疫反应

分别对超量表达 *OsHsp18.0-CI* 基因的转基因植株 CD39R-7(称 OE)和圣稻 806(WT)在接种白叶枯病菌前后的样品进行了转录组测序(RNA-seq),平均获得了 2 341 万个 clean reads, clean reads 与参考基因的平均比率为 89.81%,每个样品中平均表达了 24 254 个基因。对样品间差异表达基因(Differentially Expressed Genes, DEGs)进行分析,圣稻 806 在接种 PXO99 后 24 h 共有 835 个基因上调表达,67 个基因下调表达;而 OE 植株接种 PXO99 后 941 个基因上调表达,45 个基因下

调表达(图 3-A、B)。通过 GO 功能分析软件(<http://bioinfo.cau.edu.cn/agriGO>)对这些差异表达基因(DEGs)进行富集分析显示它们主要富集在胁迫响应(response to stress)、生物胁迫响应(response to abiotic stimulus)、信号过程(signaling)、生物过程调控(regulation of biological process)等 48 个 GO 功能分类,而且 OE 接种白叶枯病菌后(OE-24)的差异基因与 WT 接种后(WT-24)的差异基因在 GO 功能分类中的分布呈现出高度的类似性($r = 0.995$, $\alpha = 0.05$, $n = 48$)。另外,OE-24 在其中 40 个 GO 功能类别中富集到的上调表达的基因数量高于 WT-24(图 3-C,表 2)。这一结果暗示在水稻与白叶枯病菌的互作中,*OsHsp18.0-CI* 基因超量表达增强了水稻的生物进程。

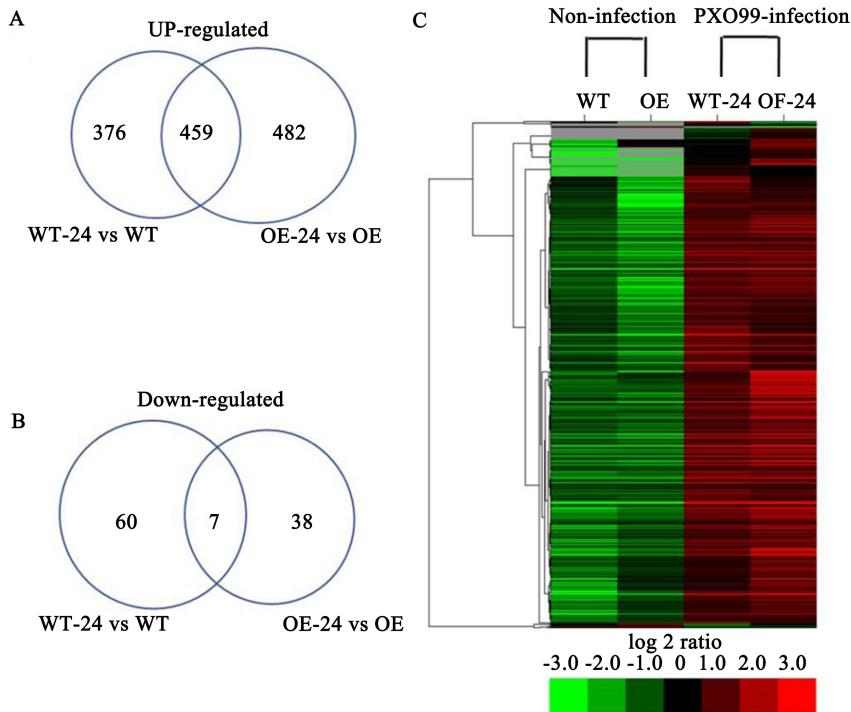


Fig. 3 Gene expression profiling performed by RNA-seq

A: WT-24 vs WT, and OE-24 vs OE up-regulated genes for statistics.

B: Down-regulated genes for statistics. C: Cluster analysis of differentially expressed genes.

Table 2 Pathway annotation and enrichment analyses OE-24 compared with WT-24

GO term	Description	Number in input list of OE24	Number in Ref	Number in input list of WT24
GO:0006950	Response to stress	178	4660	153
GO:0009607	Response to biotic stimulus	76	1404	65
GO:0019748	Secondary metabolic process	41	583	37
GO:0009628	Response to abiotic stimulus	112	3022	87
GO:0008152	Metabolic process	495	19328	410
GO:0009719	Response to endogenous stimulus	67	2015	60
GO:0023052	Signaling	76	2409	68
GO:0005975	Carbohydrate metabolic process	49	1439	34
GO:0007154	Cell communication	20	512	15
GO:0007165	Signal transduction	58	1951	54
GO:0009991	Response to extracellular stimulus	16	393	10
GO:0023046	Signaling process	58	1972	54
GO:0050789	Regulation of biological process	62	2132	56
GO:0009875	Pollen-pistil interaction	7	118	6
GO:0009605	Response to external stimulus	22	681	16
GO:0065007	Biological regulation	76	2871	66
GO:0009856	Pollination	12	337	10
GO:0009056	Catabolic process	51	2007	46

Continued Table 2

GO term	Description	Number in input list of OE24	Number in Ref	Number in input list of WT24
GO:0051179	Localization	79	3278	70
GO:0016049	Cell growth	15	567	9
GO:0009653	Anatomical structure morphogenesis	26	1141	15
GO:0006629	Lipid metabolic process	31	1376	19
GO:0006464	Protein modification process	88	3977	91
GO:0009058	Biosynthetic process	160	7335	135
GO:0022414	Reproductive process	21	985	21
GO:0007275	Multicellular organismal development	76	3543	58
GO:0009987	Cellular process	396	18214	340
GO:0032502	Developmental process	81	3791	59
GO:0032501	Multicellular organismal process	77	3619	59
GO:0048856	Anatomical structure development	34	1665	23
GO:0003006	Reproductive developmental process	13	668	13
GO:0065008	Regulation of biological quality	17	863	12
GO:0000003	Reproduction	40	1965	28
GO:0030154	Cell differentiation	13	710	6
GO:0009790	Embryonic development	14	810	8
GO:0009791	Post-embryonic development	35	2033	24
GO:0044238	Primary metabolic process	268	13205	229
GO:0044267	Cellular protein metabolic process	90	4849	96
GO:0006807	Nitrogen Compound metabolic process	97	5399	81
GO:0019538	Protein metabolic process	108	6088	112
GO:0010467	Gene expression	6	1076	7
GO:0016043	Cellular component organization	25	1935	20
GO:0043170	Macromolecule metabolic process	113	6691	115
GO:0044237	Cellular metabolic process	191	10280	176
GO:0044249	Cellular biosynthetic process	0	890	5
GO:0044260	Cellular macromolecule metabolic	91	5364	98

在 OE 和 WT 接种白叶枯病菌均表现出上调表达的 DEGs 为 459 个。对其进行 GO 分析,发现这些基因显著富集在应激响应(response to stimulus)、生物胁迫响应(response to biotic stimulus)、胁迫响应(response to stress)、代谢过程(metabolic process)等生物进程以及催化活性(catalytic activity)、转移酶活性(transferase activity)、激酶活性(kinase activity)等生物功能类别($P < 0.05$, 图 4)。对这 459 个共同上调表达的基因进行分析发现,其中 324 个基因在 OE-24 中上调的倍数明显高于 WT-24。这一结果也暗示 *OsHsp18.0-CI* 基因的超量表达介导了水稻更强烈的基础免疫反应。

从 459 个差异表达基因中鉴定到了 16 个基

因,包括 9 个病程相关基因(pathogenesis-related gene, PR 基因),4 个 SA 合成相关基因(LOC_Os02g41650、LOC_Os05g35290、LOC_Os02g41630、LOC_Os02g41680)编码推定的苯丙氨酸裂解酶,3 个 JA 合成相关基因(LOC_Os05g51520、LOC_Os08g39840、LOC_Os06g11240)分别编码磷脂酶 A2、脂氧合酶和 12-氧-植物二烯酸还原酶,均能被接种 PXO99 诱导表达,且在 OE-24 中上调表达倍数高于 WT-24($P < 0.05$)(图 5-A),选取了 6 个基因进行了实时荧光定量 RT-PCR 的验证,发现全部检测基因的表达趋势与 RNA-seq 的结果保持一致(图 5-B),证实了 RNA-seq 数据的可靠性。

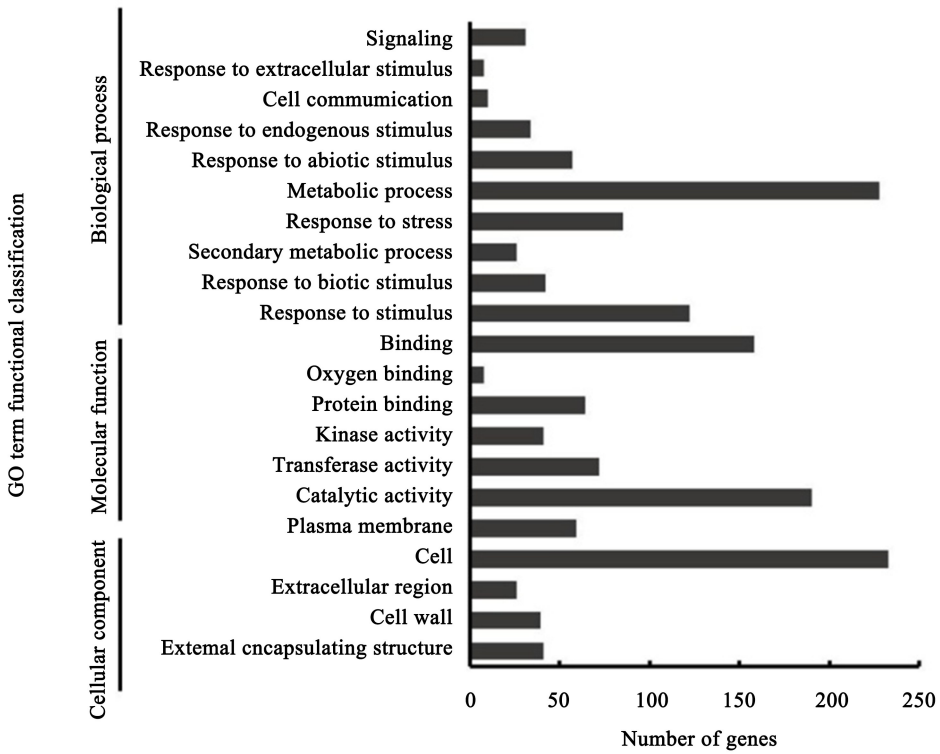


Fig. 4 GO functional classification analyses of up-regulated DEGs

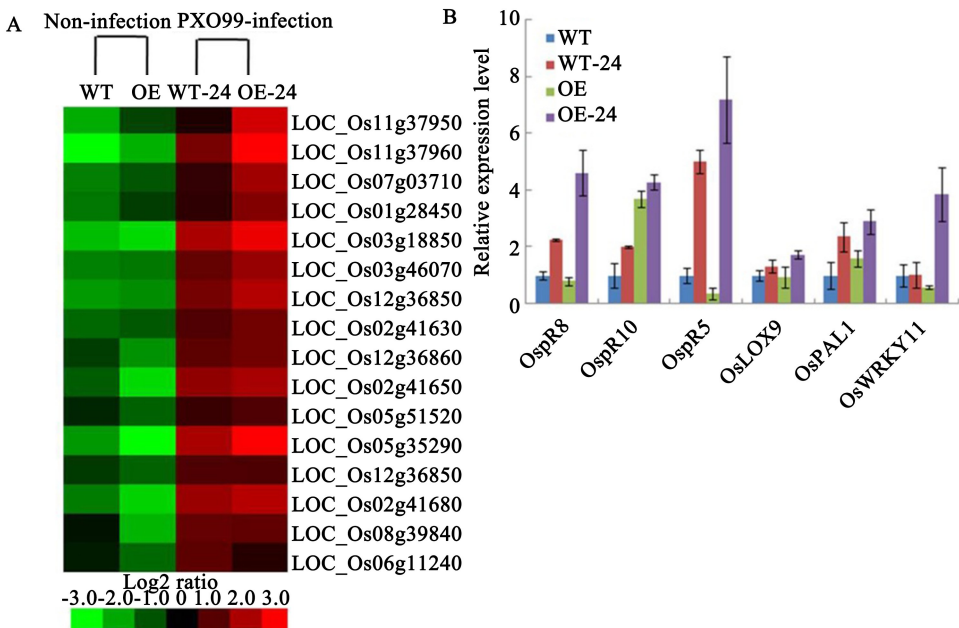


Fig. 5 Expression of pathogenesis-related genes, SA- and JA-biosynthesis-related genes in wild-type and transgenic lines

A: Hierarchical clustering analysis of *PR* genes, SA- and JA-biosynthesis-related genes using RNA-seq data. B: Quantitative RT-PCR analysis of six selected genes to validate the RNA-seq data. The bars represent the means (three replicates for gene expression) \pm SD.

2.4 *OsHsp18.0-CI* 转基因材料接种 PXO99 和 RS105 RNA-Seq 差异基因分析

前期我们发现 *OsHsp18.0-CI* 基因能正调控水稻对细菌性条斑病的抗性^[24], 也获取了接种前后的 RNA-seq 数据, 对两组转录组数据进行比较分析发现, 在 OE-24 vs OE 组合中, 本研究检测到的 941 个上调表达基因中有 51.33% (483 个) 的基因同时也受 *Xoc* 诱导表达(图 6-A)。对其 GO 分析, 发现共同参与的信号路径包括: 响应生物刺激(response to biotic stimulus), 响应胁迫(response stress)、多糖代谢(polysaccharide metabolic)、纤维

素的合成(cellulose metabolic)、几丁质代谢(chitin metabolic process)等生物学进程和结合活性(binding)、磷酸化(phosphorylation)、激酶活性(kinase activity)、抗氧化活性(antioxidant activity)等分子生物学功能(图 6-B)。在 483 个上调表达基因中, 有 399 个基因在接种细菌性条斑病菌和白叶枯病菌条件下, OE-24 中的表达量均高于 WT-24, 这其中包含了和抗病相关的 *PR* 基因、SA 和 JA 合成相关基因。表明 *PR* 基因、SA 和 JA 合成相关基因共同参与了 *OsHsp18.0-CI* 基因介导的对 *Xoo* 和 *Xoc* 的抗性。

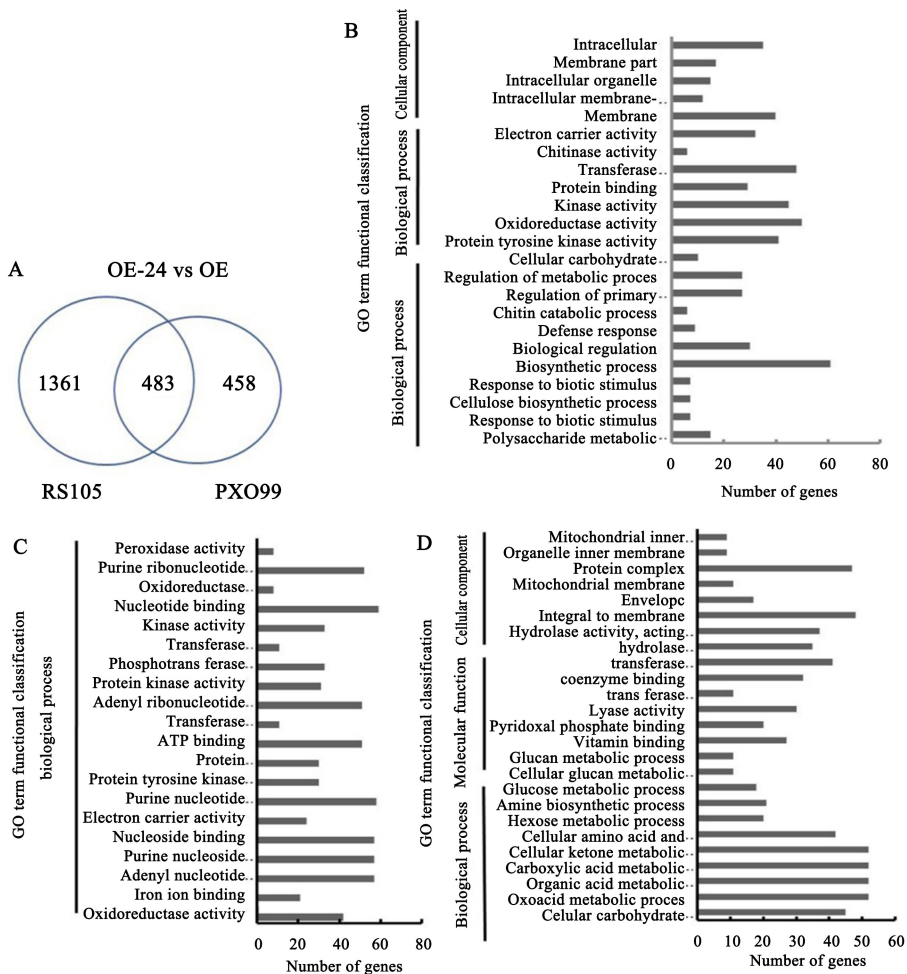


Fig. 6 Functional analysis of up-regulated DEGs between inoculated with *Xoo* and *Xoc* in *OsHSP18.1-CI* transgenic plants

A: Comparison of up-regulated DEGs between post inoculation of RS105 and PXO99 in *OsHSP18.0-CI* over-expression lines.

B: GO functional classification of common up-regulation of genes genes inoculated with RS105 and PXO99. C: GO functional classification of specific up-regulated genes inoculated with PXO99. D: GO functional classification of specific up-regulated genes inoculated with RS105.

此外,有 458 个基因在 OE 中被白叶枯病菌 PXO99 诱导表达而不被条斑病菌 RS105 诱导表达,对这些基因进行 GO 分析,发现显著富集在蛋白激酶活性、氧化还原酶活性、转移酶活性、核苷酸结合等生物进程(图 6-C)。其中包含了跟抗病相关的丝裂原活化蛋白激酶(LOC_Os03g17700)、鞘氨醇-1-磷酸裂解酶基因(LOC_Os01g01080)、胁迫响应基因(LOC_Os01g01540)和赤霉素(GA)合成相关的基因(LOC_Os01g08220、LOC_Os01g08260、LOC_Os01g11150)等。有 1 361 个基因在 OE 中被条斑病菌 RS105 诱导表达而不被白叶枯病菌 PXO99 诱导表达,对其进行 GO 分析,显著富集在细胞代谢、葡萄糖代谢、生物合成等生物进程,维生素结合、水解酶活性、辅酶结合等分子功能和各种细胞组分等信号通路(图 6-D),包含 NAC 转录因子(LOC_Os11g33000)、乙烯应答因子(LOC_Os07g47790、LOC_Os03g08470)等。说明除部分相同抗性外,接种 PXO99 后,*OsHsp18.0-CI* 基因主要通过调节各种生物进程增强水稻对白叶枯的抗性,而接种 RS105 后,*OsHsp18.0-CI* 基因可以通过调节生物进程、分子功能、细胞组分参与对条斑病的抗性。

3 结论与讨论

OsHsp18.0-CI 基因是一个非常重要的基因,此前报道参与多种生物和非生物胁迫进程。在非生物胁迫方面,*OsHsp18.0-CI* 基因能被缺氧、热、冷、盐、干旱、L-氮杂环丁烷-2-羧酸和镉处理诱导表达^[17-19];在拟南芥中超量表达该基因能增强拟南芥对镉胁迫的耐受性^[17],还能增强对盐胁迫的耐受性^[19]。在响应生物胁迫层面,*OsHsp18.0-CI* 基因能响应稻瘟病菌和多种水稻病毒的侵染^[20,21];超量表达 *OsHsp18.0-CI* 基因能增强水稻对细菌性条斑病的抗性^[25]。本研究发现,*OsHsp18.0-CI* 基因能被白叶枯病菌诱导表达,超量表达 *OsHsp18.0-CI* 基因的转基因株系能增强对多个白叶枯病菌菌株的抗性。表明 *OsHsp18.0-CI* 基因是一个重要的基因资源,能正调控水稻对生物和非生物胁迫的抗性。

由于植物在共同进化中,会形成了两道防线来抵抗病原菌的侵害。病原相关分子(PAMP)被模式识别受体(PRR)识别,引发 PTI,为植物的第一

道屏障和基础免疫反应,可以阻止病原菌的进一步定殖。第二道防线中植物进化出识别效应因子的 R 蛋白,导致效应子触发免疫反应(ETI)^[27]。为研究 *OsHsp18.0-CI* 基因的超量表达是否会激发水稻的免疫反应,转录组测序发现在接种 PXO99 后分别有 941 和 835 个基因在 OE 和 WT 中上调表达。对其进行 GO 富集分析发现,多数信号通路中 OE 中富集到的基因个数多于 WT。接种 PXO99 后,459 个基因在 OE 和 WT 中共同上调表达,其中 324 个表达量在 OE 中高于 WT。由于野生型在受到病原菌的侵染时会激发基础免疫反应,在 *OsHsp18.0-CI* 超量表达转基因植株中上调表达基因的倍数和富集在信号通路上的基因个数均高于野生型。表明 *OsHsp18.0-CI* 基因介导的抗性是增强了基础的免疫反应,它类似于野生型水稻受到病原侵染时表现为更强烈的免疫反应。这与我们课题组之前发现超量表达 *OsHsp18.0-CI* 基因能增强对 *Xoc* 的抗性非常相似^[25]。虽然白叶枯病菌和条斑病菌有很相近的亲缘关系,同属于稻黄单胞菌不同致病变种,但其在水稻中定殖的部位以及与水稻的互作方式不完全相同^[11],*OsHsp18.0-CI* 同时介导对两种不同病害的抗性,并在更广泛的层面介导各种生物和非生物胁迫的逆境信号^[17-21],进一步暗示 *OsHsp18.0-CI* 基因介导的抗性基础是水稻的基础免疫。

本研究还为研究 *OsHsp18.0-CI* 基因所介导的对水稻白叶枯病和细菌性条斑病的异同提供了初步的研究基础。对其转录组数据比较分析,发现 *OsHsp18.0-CI* 基因对响应两种病原菌的侵染存在部分相同性,受到病原菌的侵染都能诱导 PR 基因、SA 和 JA 合成相关基因的上调表达。但也存在部分基因在 *OsHsp18.0-CI* 超量转基因株系中能特异性受白叶枯病菌或条斑病菌诱导表达,并富集在不同信号路径上。超量表达 *OsHsp18.0-CI* 基因的转化材料受白叶枯病菌特异性诱导,上调表达的基因全部显著富集在生物学进程中的不同信号路径上,如丝裂原活化蛋白激酶(LOC_Os03g17700)过表达能激活水稻的免疫应答反应^[28],稻瘟病菌能诱导鞘氨醇-1-磷酸裂解酶基因(LOC_Os01g01080)的表达^[29]。受 *Xoc* 特异诱导上调表达的基因较多,能显著富集在生物进程、细胞组分、分子功能中的不同信号路径上。表明 *OsHsp18.0-CI*

基因除能介导对白叶枯病和条斑病的相同抗性外,也能通过参与不同信号路径分别提高对两种细菌性病害的抗性。

参考文献

- [1] Nino-Liu D O, Ronald P C, Bogdanove A J. *Xanthomonas oryzae* pathovars: model pathogens of a model crop [J]. *Molecular Plant Pathology*, 2006, 7 (5):303-324.
- [2] Chu Z, Ouyang Y, Zhang J, et al. Genome-wide analysis of defense-responsive genes in bacterial blight resistance of rice mediated by the recessive R gene *xal3* [J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2004, 271 (1): 111-120.
- [3] Li Q, Chen F, Sun L, et al. Expression profiling of rice genes in early defense responses to blast and bacterial blight pathogens using cDNA microarray [J]. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2006, 68 (1-3):51-60.
- [4] Chern M, Fitzgerald H A, Canlas P E, et al. Over-expression of a rice NPR1 homolog leads to constitutive activation of defense response and hypersensitivity to light [J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2005, 18(6):511-520.
- [5] Liu X, Bai X, Wang X, et al. *OsWRKY71*, a rice transcription factor, is involved in rice defense response [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2007, 164 (8):969-979.
- [6] Qiu D, Xiao J, Ding X, et al. *OsWRKY13* mediates rice disease resistance by regulating defense-related genes in salicylate-and jasmonate-dependent signaling [J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2007, 20 (5): 492-499.
- [7] Cheung M Y, Zeng N Y, Tong S W, et al. Constitutive expression of a rice GTPase-activating protein induces defense responses [J]. *New Phytologist*, 2008, 179(2):530-545.
- [8] Deng H, Liu H, Li X, et al. A CCCH-type zinc finger nucleic acid-binding protein quantitatively confers resistance against rice bacterial blight disease [J]. *Plant Physiology*, 2012, 158(2):876-889.
- [9] Tao Z, Liu H, Qiu D, et al. A pair of allelic WRKY genes play opposite roles in rice-bacteria interactions [J]. *Plant Physiology*, 2009, 151(2):936-948.
- [10] Shen X, Yuan B, Liu H, et al. Opposite functions of a rice mitogen-activated protein kinase during the process of resistance against *Xanthomonas oryzae* [J]. *Plant Journal*, 2010, 64(1):86-99.
- [11] Li N, Kong L, Zhou W, et al. Over-expression of *Os2H16* enhances resistance to phytopathogens and tolerance to drought stress in rice [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 2013, 115(3):429-441.
- [12] Wang G, Ding X, Yuan M, et al. Dual function of rice *OsDR8* gene in disease resistance and thiamine accumulation [J]. *Plant Molecular Biology*, 2006, 60 (3):437-449.
- [13] Sun W, Bernard C, Van De Cotte B, et al. *AtHSP17.6A*, encoding a small heat-shock protein in Arabidopsis, can enhance osmotolerance upon over-expression [J]. *Plant Journal*, 2001, 27(5):407-415.
- [14] Waters E R. The evolution, function, structure, and expression of the plant sHSPs [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2012, 64(2):391-403.
- [15] Larkindale J, Mishkind M, Vierling E. Plant responses to high temperature [J]. *Plant Abiotic Stress*, 2005, 100: 144.
- [16] Jaspard E, Hunault G. sHSPdb: a database for the analysis of small heat shock proteins [J]. *BMC Plant Biology*, 2016, 16(1):135.
- [17] Cui Y, Xu G, Wang M, et al. Expression of *OsMSR3* in Arabidopsis enhances tolerance to cadmium stress [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 2013, 113(2):331-340.
- [18] Guan J C, Jinn T L, Yeh C H, et al. Characterization of the genomic structures and selective expression profiles of nine class I small heat shock protein genes clustered on two chromosomes in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Plant Molecular Biology*, 2004, 56(5):795-809.
- [19] Ham D J, Moon J C, Hwang S G, et al. Molecular characterization of two small heat shock protein genes in rice: Their expression patterns, localizations,

- networks, and heterogeneous over-expressions [J]. *Molecular Biology Reports*, 2013, 40 (12): 6709-6720.
- [20] Sarkar N K, Kim Y K, Grover A. Rice sHsp genes; genomic organization and expression profiling under stress and development [J]. *BMC Genomics*, 2009, 10:1.
- [21] Li J, Xiang C Y, Yang J, *et al.* Interaction of HSP20 with a viral RdRp changes its sub-cellular localization and distribution pattern in plants [J]. *Scientific Reports*, 2015, 5:14016.
- [22] Sun W, Bernard C, Van De Cotte B, *et al.* *At-HSP17.6A*, encoding a small heat-shock protein in Arabidopsis, can enhance osmotolerance upon over-expression [J]. *Plant Journal*, 2001, 27(5):407-415.
- [23] Malik M K, Slovin J P, Hwang C H, *et al.* Modified expression of a carrot small heat shock protein gene, *Hsp17.7*, results in increased or decreased thermo tolerance [J]. *Plant Journal*, 1999, 20(1):89-99.
- [24] Kuang J, Liu J, Mei J, *et al.* A Class II small heat shock protein *OsHsp18.0* plays positive roles in both biotic and abiotic defense responses in rice [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1):1333.
- [25] Ju Y, Tian H, Zhang R, *et al.* Over-expression of *OsHSP18.0-CI* enhances resistance to bacterial leaf streak in rice [J]. *Rice*, 2017, 10(1):12.
- [26] Feng W J, Chang Q L, Yang L, *et al.* Screening and detecting of diagnostic molecular markers to distinguish *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* from *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* (in Chinese) [J]. *Acta Phytopathologica Sinica (植物病理学报)*, 2013, 43(6): 581-599.
- [27] Jones J D G, Dangl J L. The plant immune system [J]. *Nature*, 2006, 444(7117):323-32.
- [28] Kim S H, Oikawa T, Kyoizuka J, *et al.* The bHLH Rac immunity1 (RAI1) is activated by *OsRac1* via *OsMAPK3* and *OsMAPK6* in rice immunity [J]. *Plant and Cell Physiology*, 2012, 53(4):740-754.
- [29] Zhang H, Jin X, Huang L, *et al.* Molecular characterization of rice sphingosine-1-phosphate lyase gene *OsS-PL1* and functional analysis of its role in disease resistance response [J]. *Plant Cell Reports*, 2014, 33(10): 1745-1756.

责任编辑:曾晓葳