黑胫病弱毒种和化学诱导剂诱导油菜 对黑胫病抗性的比较研究

刘胜毅 刘仁虎 Akinwunmi O. Latunde-Dada Hans J. Cools
Simon J. Foster * 黄永菊 Bruce D. L. Fitt †

(Rothamsted Research, Harpenden, Hertfordshire AL5 2JQ, UK; 中国农业科学院油料作物研究所, 武汉 430062; 浙江省农业科学院, 杭州 310021. * 现地址, John Innes Centre, UK. † 联系人, E-mail: bruce.fitt@bbsrc.ac.uk, liusy@oilcrops.cn)

摘要 油菜黑胫病是由弱毒种 *Leptosphaeria biglobosa* 和强毒种 *L. maculans* 混合感染引起的油菜严重病害。本文比较研究了弱毒种预接种、化学诱导剂水杨酸类似物(acibenzolar-S-methyl)和维生素 K₃ 类似物(menadione sodium bisulphite)处理所诱导的油菜对强毒种在抗性表型、组织细胞和 RNA 水平上的反应。诱导接种或化学处理后用强毒种接种。强毒种接种后 8~21 d, 受诱导的植株其病斑扩展速度比水处理的对照显著降低, 无论是受诱导的叶(局部效应)还是上部未诱导的叶(系统效应)均如此。强毒种接种后 96 h, 观察到侵入叶组织的病原菌菌丝周围坏死的叶肉细胞, 而在对照的植株上没有观测到。定量 PCR 分析表明, 病害防御反应的标记基因 *PDF1.2*, *PR-1*, *NPR1*, *APX* 和 *CHB4* 在接种后 0~96 h 的表达发生了变化。弱毒种预接种处理优先激活了茉莉酸/乙烯途径的基因表达, 包括 *NPR1* 的诱导加强表达, 这种效应不仅是局部的, 而且是系统的。

关键词 化学诱导剂 防御基因表达 防御信号途径 诱导的系统抗性 油菜 黑胫病

黑胫病是世界油菜生产上的主要病害之一, 每年给油菜生产造成的损失在 3.5 亿美元以上^[1]。该病一般是由 *Leptosphaeria maculans* (Desm.) Ces. & de Not 和 *L. biglobosa* 两种真菌混合感染引起, 但后者不具有生产破坏性, 仅在叶片和茎秆上部形成有限病斑, 而不像前者那样引起茎秆基部腐烂而造成严重的产量损失^[2]。由于病菌子囊孢子外部形态和侵染途径相似, *L. biglobosa* 和 *L. maculans* 曾被认为是同一个种^[3,4], 但近期研究表明两者是不同的真菌种^[5,6]。*L. maculans* 是全球性外来入侵种, 它威胁着中国芸薹属作物生产。目前中国仅存在 *L. biglobosa*^[1]。

植物通过配置一系列的防御机制主动地对病原菌侵染进行反应, 这些机制在抗性上有累加效应。除了“基因对基因”关系中特异性识别外, 植物还有其他可诱导性防御反应, 包括一种病原接种后所激发的非特异性的、具有广谱性的防御抗病反应^[7]。一旦诱导, 这种获得的抗性不仅存在于病原菌侵染点, 而且存在于远离侵染点的植物其他部分。因此, 获得性抗性不仅减少了病斑数目和大小, 而且保护植株免

受随后的真菌侵染^[8]。系统获得性抗性(SAR)与水杨酸的累积和病程相关(PR)蛋白编码基因, 特别是PR-1的表达有关^[9]。在过去的研究中, 一些水杨酸类似物常被用作系统获得性抗性的激发因子, 激发植物产生系统获得抗性, 如 2,6-二氯异烟酸(INA)和苯基(1,2,3)噻二唑-7-硫代羧酸硫甲酯(BTH, 或写作 acibenzolar-S-methyl, ASM)等^[10-12]。

对模式植物拟南芥的研究结果表明, 活体寄生型(biotrophic)病原菌侵染植株后一般诱导水杨酸信号分子介导的抗病反应, 而腐生型(necrotrophic)病原菌侵染植株后一般诱导茉莉酸/乙烯(JA/ET)信号分子和活性氧信号分子介导的抗病反应^[13]。拟南芥对黑胫病菌这类半活体寄生型(hemibiotrophic)真菌的反应途径尚不清楚^[14]。尽管黑胫病菌侵染过程已得到比较详细的研究^[15], 但有关该病原菌与寄主植物在分子水平上的互作还知之甚少。一些化学物激活由JA或ET介导的信号传导途径^[16,17]。近年来, 发现一种水溶性维生素K₃的类似物——亚硫酸氢钠甲萘醌(menadione sodium bisulphite, MSB)可以诱导油菜对

2006-10-09 收稿, 2007-02-09 接受

英国洛桑国际基金, 英国皇家学会基金, 英国生物技术与生物科学研究委员会(BBSRC), 英国环境、食品与乡村事务部(DEFRA)、Chadacre 信托公司和中国农业部共同资助项目

黑胫病的抗性,降低油菜叶片病斑大小^[18].进一步研究表明,抗坏血酸过氧化物酶(APX)基因显著诱导表达,揭示出这一抗病反应是通过活性氧途径诱导的.

在植物和病原菌互作中,预先接种弱毒菌株能诱导寄主对强毒菌株的抗性^[19].在控制条件下预先接种与强毒种*L. maculans*亲缘的弱毒种*L. biglobosa* ‘canadiensis’阻止了由强毒种引起的叶斑病发展^[20].然而,在这些研究中利用分子孢子接种需要损伤叶才能接种成功,而损伤可诱导抗性.相反,自然条件下病害流行是由子囊孢子侵染未损伤的叶引起的^[4].在英国自然条件下,秋季接种弱毒种*L. biglobosa* ‘brassicae’或喷施化学诱导剂ASM减轻了8个月后春季黑胫病发生的严重度^[21].这些研究表明,诱导的抗性不仅是局部的,而且是系统的.由于在黑胫病病原菌自然群体中,*L. biglobosa*和*L. maculans*是天然并存于油菜上^[22],且共侵染油菜的同一部位^[20],因此我们假设弱毒种*L. biglobosa*诱导的对强毒种*L. maculans*主动抗性可能存在于自然中,并可能对油菜黑胫病的防治起着重要的作用.

本文对油菜诱导抗性进行了研究,主要利用显微镜和基因表达技术提供组织/细胞和分子证据.因为单循环病害油菜黑胫病的流行开始于空气传播的子囊孢子,由此引起叶斑病,分生孢子一般不具有侵染性,因此本研究利用子囊孢子接种.

1 材料和方法

() 实验设计. 控制条件下的实验分4批次进行(表1),每次3~6次重复.在所有实验中,植株在预处理后用*L. maculans*进行接种.实验1和2研究预处理对病斑扩展的影响.实验3利用显微镜调查了植株对*L. maculans*侵染的反应.在实验1~3中,预处理包括*L. biglobosa*子囊孢子接种,或ASM,MSB和无菌蒸馏水(对照)喷雾.为基因表达分析收集RNA样品的实验4中不包括MSB处理.

() 植物材料的培养. 研究采用欧洲冬油菜常規品种Madrigal.按9级制划分抗性等级^[23],Madrigal

的抗性等级为6,携带主效抗病基因*Rlm4* (Balesdent M. H., INRA Versailles, 个人通讯).在英国洛桑(Rothamsted)的田间,目前黑胫病菌种群中93%的菌株(携带有*avrLm4*)对带*Rlm4*基因的品种是致病的^[24].油菜种子播于9 cm营养钵,所用营养土为每平方米含1.5 kg PG-Mix™复合肥和2 kg奥绿肥的泥炭土.播种后于温室培养,生长条件为温度20~24℃,自然光照,并补充强度为42 μmol·m⁻²·s⁻¹的荧光.3周后对油菜苗进行预处理.

() 病原菌子囊孢子的制备. 病菌*L. maculans*和*L. biglobosa*的子囊孢子分别从英国和波兰田间残留的染病油菜茎秆上获得.染病油菜茎秆采集后,按Huang等人^[25]的方法进行加工和储存以促进子囊壳成熟,并用PCR方法验证菌种.子囊壳成熟后,挑选长满子囊壳的干燥茎秆碎屑,用凡士林粘在9 cm培养皿盖上,用灭菌的纯净水喷湿后,放入4℃冰箱3 h,子囊孢子会从子囊壳大量释放出来,落在培养皿底部,用无菌水收集子囊孢子以制成子囊孢子悬浮液.用血球计数板计数后稀释到10⁴个/mL,备用.

() 植株抗性诱导和接种. 预处理前将植株移入15℃生长室内生长2 d.植株(每钵1株)按随机区组实验设计进行排列.实验1和2中4个重复,每处理6株;实验3中6个重复,每处理1个植株;实验4中3个重复,每处理9个植株.第1片真叶分别喷施100 mol/L ASM,200 μg/g MSB或预接种*L. biglobosa* (10⁴个孢子/mL)诱导抗性,以喷水处理为对照.预接种量是两滴20 μL的孢子悬浮液,预喷施量是喷到液体开始从叶面流动为止.处理48 h后按预接种的方法进行*L. maculans*挑战接种,接种于叶脉两侧,并与预接种点相隔2 cm.具体方法请参考文献^[21].实验2中预处理叶是从植株基部数的第3叶,其他实验为第1叶.相应地,挑战接种叶是预处理叶与其相邻的上部一个叶.

() 抗病评价和统计分析. 实验1和2在挑战接种后每隔12 h观察病斑是否出现.病斑产生后,每2 d测量一次病斑大小,直至接种后20 d.病斑大小根据病斑的长×宽估算.统计分析采用GenStat®

表1 3个实验中诱导处理、接种叶片部位和考察内容

实验编号	诱导处理 ^{a)}	诱导叶片	挑战接种叶片	考察内容
1	Lb, ASM, MSB, 水	1	1和2	接种后8, 10, 12, 14, 16和18 d叶(叶1和2)病斑大小
2	Lb, ASM, MSB, 水	3	3和4	接种后12, 14, 16, 18和20 d叶(叶3和4)病斑大小
3	Lb, ASM, MSB, 水	1	1和2	显微镜观察接种96 h后植株叶片细胞产生的对 <i>L. maculans</i> 的抗病反应
4	Lb, ASM, 水	1	1和2	接种后1, 6, 24, 48和96 h叶1和2的数量 RT-PCR分析

a) Lb, *L. biglobosa*

Ver 6 软件包 [26] 进行。以回归分析的方法分析病斑在抗性诱导处理叶片和邻近非直接诱导处理叶片上的扩展速度,以方差分析的方法分析病斑大小和扩展速度差异显著性。

() 受侵染叶的显微镜观察。实验3中,为观察植物在细胞水平上的抗病反应,挑战接种 96 h 后,取接种叶片进行固定、脱色和染色,于显微镜下镜检和拍照。固定/脱色液由 3 倍体积乙醇和 1 倍体积氯仿混合后加总体积 0.15% (质量体积比) 三氯醋酸配制而成。染色液为 0.025% (质量体积比) 的苯胺蓝乳酸酚溶液。

() RNA 提取和 cDNA 第一链的合成。实验 4 中,分别取挑战接种后 1, 6, 24, 48 和 96 h 的叶片提取总 RNA, 每时间点从 3 株苗上取样混合, 经抗性诱导处理的叶片用于研究局部诱导抗性效果, 相邻非处理的上部叶片用于研究诱导的系统抗性。植物总 RNA 提取采用 Concert™ RNA 提取试剂盒(Invitrogen)。总 RNA 用 Ambion DNA-free™ 试剂盒去除迹量 DNA 污染。取 5 μ g 总 RNA 与 150 pmol Oligo(dT)₁₂₋₁₈ (Sigma-Genosys) 引物混合, 按 SuperScript™ 逆转录试剂盒的说明合成 cDNA 第 1 链。产物稀释 20 倍用于定量 PCR 分析。

() 定量 PCR 分析基因表达量。研究选取了植物抗病信号传递中的 5 个标记(指示)基因 *PDF1.2*, *PR-1*, *NPR1*, *APX* 和 *CHB4* 进行定量 PCR 分析, 来检测各处理中的抗病反应。定量 PCR 所用的 Taqman 探针和引物用专用软件 Primer Express (Applied Biosystems) 设计。引物组合和对应的探针序列见表 2。目标基因探针用 HEX 标记, 参比基因 *Actin* 探针用 FAM 标记。每反应含 Invitrogen 公司定量 PCR 专用的 1 $\times$ Platinum® Quantitative PCR SuperMix-UDG 反

应预混合液 12.5 μ L, cDNA 第 1 链 20 倍稀释液 5 μ L, 以及相应浓度的引物和探针(表 2), 加水至总体积 25 μ L。通过预备实验确定各引物和探针的最佳使用浓度(表 2)。每反应设 3 个重复。各基因相对表达量以 *Actin* 为参比计算 [27]。

2 结果与分析

2.1 不同诱导处理的植株抗黑胫病的表型分析

与对照的水预处理比较, 在挑战接种 14 d 后, *L. biglobosa* 预接种或用 ASM 和 MSB 预处理减小了诱导叶和非诱导叶上病斑大小(图 1)。在两次独立实验中, 病斑大小和时间均呈线型关系增加(图 2)。回归直线的斜率代表了病斑扩展速度。*L. biglobosa* 预接种及 ASM 或 MSB 预处理的线型回归直线的斜率显著 ($P < 0.001$) 小于对照(表 3), 对预处理叶(实验 1 的叶 1, 图 2(a); 实验 2 的叶 3, 图 2(c)) 和邻近的上部未预处理叶(实验 1 的叶 2, 图 2(b); 实验 2 的叶 4, 图 2(d)) 均如此。除实验 2 的第 4 叶外, 经 ASM 诱导处理的斜率显著 ($P < 0.001$) 小于 *L. biglobosa* 和 MSB 处理。在实验 1 中, 挑战接种后 18 d, 对照植株第 1 叶上病斑已有 18.8 mm², 而经诱导处理的植株第 1 叶上病斑只有 7.6 (*L. biglobosa*), 8.3 (MSB) 和 1.7 mm² (ASM), 显著小于对照 ($P < 0.001$)。同样, 经诱导处理的植株, 第 2 叶虽然没有直接诱导, 但同样提高了抗性, 病斑大小分别为 10.3 (*L. biglobosa*), 8.3 (ASM), 10.1 (MSB) 和 17.1 mm² (CK), 说明诱导的抗性是系统性的。

2.2 预处理引起 *L. maculans* 侵染点油菜组织细胞的坏死

为观察侵染点处菌丝的生长及寄主的反应, 在预处理的植株被挑战接种后 96 h, 每处理(表 1)取 3

表 2 定量 PCR 实验中各基因的引物和探针序列以及它们的最优浓度组合

基因名称	基因注释	GenBank 登录号	正向引物 (5'→3')	反向引物 (5'→3')	Taqman 探针	正反引物和探针最佳浓度组合/(nmol·L ⁻¹ a)
<i>PDF1.2</i>	甘蓝型油菜防御素	AY884023	gctaagtgtgtgcgagaggtcaa	ctgattcttgcaggcgttattg	(HEX)ttccacagactcctgacatgtccca(BHQ2)	400, 400, 200
<i>PR-1</i>	甘蓝型油菜病程相关蛋白 PR-1	U70666	tcagcgcggtgaaccttt	tgaaggcattctccattgca	(HEX)ttaacgagaaggctaacataac-cacgattcgaaca(BHQ2)	400, 600, 200
<i>NPR1</i>	甘蓝型油菜 NPR1	AF527176	acactcgcggcggaatac	gctgtaaacgtacgccagaaca	(HEX)cgtcgggttcgattctgtgttg(BHQ2)	600, 400, 200
<i>APX</i>	甘蓝型油菜抗坏血酸过氧化物酶	Y11461	accaggacattgtcgtctgtt	cgaagccagacctatcctgtg	(HEX)tggtgccacactctggagatg(BHQ2)	400, 400, 200
<i>ChB4</i>	甘蓝型油菜几丁质酶	X61488	acgtgactactgcgacgagaac	accacgaccgaagtagccttt	(HEX)acaggcagtagccatgtgcaccagg(BHQ2)	400, 400, 200
<i>Actin</i> b)	甘蓝型油菜肌动蛋白	AF111812	tgggttctggtgacgat	tgtgcctaggacgaccaaca	(FAM)ctcccaggctgtgttcccagt(BHQ2)	200, 200, 100

a) 以不同浓度梯度的 DNA 为模板经预备实验确定的正反引物和探针使用的最佳浓度组合; b) 组成型表达的参比基因

图 1 经不同诱导处理植株上诱导叶和非诱导叶黑胫病病斑大小比较.

(a)~(d)为诱导叶; (e)~(h)为非诱导叶. (a)和(e)为 *L. biglobosa* 诱导处理, 白箭头示挑战接种点, 黑箭头示诱导接种点; (b)和(f)为 ASM 诱导处理; (c)和(g)为 MSB 诱导处理; (d)和(h)为喷水对照. 图示为挑战接种后 14 d. 标尺示 0.5 cm

图 2 病斑大小与接种时间的回归直线

(a)和(c)为 2 次独立重复实验中受诱导叶片(实验 1 的第 1 片叶和实验 2 的第 3 片叶)上病斑扩展速度. (b)和(d)为对应处理叶片邻近的上部非诱导叶片上病斑扩展速度. $\diamond$, $\square$, $\triangle$ 和 $\circ$ 分别表示 *L. biglobosa*, ASM, MSB 诱导处理和喷施水的对照, 诱导处理后 48 h 做挑战接种. 数据为 6 次重复的平均值, 回归直线参数估计值列于表 3

片接种叶片进行固定、脱色、染色后于显微镜下观察. 结果表明, 诱导处理对病原菌穿透组织没有影响, 病原菌从叶片气孔侵入植物, 但诱导处理后侵染点周围有细胞迅速凋亡的现象, 而未经诱导处理的对照却无细胞凋亡现象发生(图 3). 在 *L. biglobosa* 预接种(图 3(a)), ASM(图 3(b))或 MSB(图 3(c))预处理中, 侵

入寄主的 *L. maculans* 菌丝周围由坏死的寄主细胞包围, 而在水处理的对照(图 3(d))中菌丝生长正常, 不受阻, 寄主无可见的细胞坏死反应. 挑战接种后 7 d, 与对照相比, 经诱导处理的叶片和同株其他叶片上病斑显著减小, *L. biglobosa* 接种诱导和 ASM, MSB 喷施诱导的效果相似.

表 3 油菜黑胫病病斑大小与接种时间线性回归分析的参数估计

诱导物 ^{a)}	参数估计 ^{b)}			
	实验 1		实验 2	
	叶片 1	叶片 2	叶片 3	叶片 4
截距 $a \pm SE$				
<i>L. biglobosa</i>	-4.54 ± 0.75	-6.14 ± 0.42	-3.01 ± 0.30	-5.63 ± 0.72
ASM	-0.74 ± 0.13	-5.17 ± 0.57	-1.91 ± 0.37	-6.61 ± 0.80
MSB	-3.56 ± 1.21	-6.02 ± 0.20	-2.11 ± 0.10	-5.91 ± 0.87
水(CK)	-16.40 ± 1.88	-12.52 ± 1.53	-15.49 ± 3.04	-9.15 ± 0.65
斜率 $b \pm SE$				
<i>L. biglobosa</i>	0.69 ± 0.06	0.90 ± 0.03	0.30 ± 0.02	0.53 ± 0.04
ASM	0.14 ± 0.01	0.73 ± 0.04	0.17 ± 0.02	0.54 ± 0.05
MSB	0.71 ± 0.09	0.90 ± 0.02	0.20 ± 0.01	0.49 ± 0.05
水(CK)	1.95 ± 0.14	1.61 ± 0.11	1.33 ± 0.19	0.84 ± 0.04

a) 预处理包括(实验 1 的第 1 片叶和实验 2 的第 3 片叶)*L. biglobosa* 子囊孢子预接种、ASM 或 MSB 或蒸馏水(对照)预处理; b) 按线性方程 $y = a + bt$ 对病斑抗展速度进行回归分析, y 表示病斑大小, t 表示接种时间, a 和 b 为直线待估参数截距和斜率。实验 1 中, 第 1 片真叶为诱导处理叶片, 第 2 片叶为挑战接种叶; 实验 2 中, 第 3 片真叶为诱导处理叶片, 第 4 片叶为挑战接种叶。回归直线如图 2 所示

图 3 经 *L. Biglobosa* 或化学诱导剂诱导处理后植株叶片细胞产生的对 *L. Maculans* 挑战接种的反应

(a) *L. biglobosa* 诱导接种处理; (b) ASM 诱导处理; (c) MSB 诱导处理; (d) 水诱导处理对照。S 示叶片气孔。在(a)~(c)的诱导处理中, 侵入的菌丝周围由寄主的坏死细胞包围。箭头所指为叶肉细胞在侵入点处的局部坏死反应。标尺示 10 μm

2.3 基因表达分析

在对照植株上, *L. maculans* 可诱导 *PDF1.2* 基因表达。该基因指示了茉莉酸/乙烯途径的抗病信号传递。在对照植株的第 1 叶上, 接种后 24, 48, 96 h 都检测到该基因诱导表达, 其表达量是接种前的 2 倍以上, 最高表达量在 48 h 处(图 4)。在第 2 叶上的表达规律与第 1 叶类似。同时, 也检测到 *PR-1* 基因诱导表达, 但与 *PDF1.2* 相比, 该基因诱导表达稍晚, 在接种后 96 h 才大量诱导表达。*NPR1* 的诱导表达在接种后 1 h 即被检测到, 在此后检测的时间点上一直维持在 2 倍左右。*APX* 的表达在接种后 48 h 才达到 2 倍以上。

CHB4 基因的表达在接种后迅速大幅攀升, 在接种后 24 h 达到高点并保持相对稳定。

在经过诱导处理的植株上, 各基因表达量的变化规律显著不同(图 4)。在经过 *L. biglobosa* 诱导的植株上, 挑战接种 24 h 后 *PDF1.2* 表达量显著高于 ASM 诱导处理和对照, 在接种叶和非接种叶上均如此。在 *L. biglobosa* 诱导处理中, *NPR1* 基因在挑战接种后的接种叶和非接种叶中均加强了表达, 在接种叶中 24 h 后是对照的 2 倍, 在非接种叶 6 h 后是对照的 2 倍, 48 h 后减小并维持在对照的水平。*L. biglobosa* 诱导处理中的 *APX* 加强表达的变化与上述相似, 接种叶和非接种叶在挑战接种后 24 h 增加到 2 倍以上。*L. biglobosa* 诱导处理叶中 *PR-1* 表达量在接种后 96 h 比对照高。但这种表达变化在第二叶上未检测到。*CHB4* 的表达在接种后快速上升, 变化趋势和对照相似, 接种后 24 h 达到最高水平。

对 *L. maculans* 的反应中, ASM 诱导处理的基因表达变化与对照及 *L. biglobosa* 诱导的基因增强表达变化不同(图 4)。例如, 接种叶和非接种叶中 ASM 处理的 *PDF1.2* 表达量低于 *L. biglobosa* 诱导和对照处理。而 ASM 处理中 *PR-1* 的基因表达比 *L. biglobosa* 诱导和对照处理的早, 最大的表达量出现在挑战接种后 6 h, 尽管在非接种叶中没有检测到。在接种叶中 *NPR1* 基因表达量在挑战接种后 6 h 比对照增加 2 倍(与无任何处理的植株比较), 但在非接种叶中没有检测到。在 ASM 处理中, *APX* 在第 1 叶和第 2 叶中的表达量均在挑战接种后 24 h 即达到 2 倍以上, 随后有所下降并

图 4 抗病信号传导途径中部分相关基因的相对水平变化

(a) *PDF1.2*; (b) *PR-1*; (c) *NPR1*; (d) *APX*; (e) *CHB4*(对数范围). $\bullet$, $\circ$, $\blacktriangledown$ 分别代表 *L. biglobosa* 诱导接种、ASM 诱导处理和喷水处理(对照). 叶 1, 诱导处理叶片; 叶 2, 诱导处理叶相邻的上部非诱导处理叶片. 相对表达量为接种或处理后较未预接种或处理叶的基因表达量上升倍数

维持在 2 倍左右. *CHB4* 在第 1 叶上的诱导表达量快速增加, 在 24 h 达到一个稳定的水平, 但在第 2 叶上, 快速上升后有所下降, 最后在 96 h 又上升至高水平.

3 讨论

研究结果显示, 黑胄病弱毒种 *L. biglobosa* 子囊孢子可以诱导油菜产生对强毒种 *L. maculans* 的抗性,

该结果和 Mahuku 等人 [20] 利用分子孢子接种的结果一致. 在 Mahuku 等人 [20] 的研究中, 诱导接种 *L. biglobosa* 采用的是加拿大小种, 本研究采用的欧洲小种具有同样的效果. 诱导抗性表现为病斑大小和扩展速度都显著降低. Mahuku 等人 [20] 认为该诱导的抗性是一种系统获得性抗性(SAR), 但本研究显示这不是一种

系统获得性抗性。通常, SAR定义为通过预处理(强毒种、弱毒种、非病原或化学物, 如水杨酸及其类似物)所诱导的植株对强毒种的全身性(系统性)抗性^[28]。它的典型特征是水杨酸信号途径信号传导所需的水杨酸局部和系统地积累, 一套防御基因协调地表达, 其中多数为病程相关蛋白^[9]。

然而, 本研究数据显示, 由黑胫病弱毒种 *L. biglobosa* 诱导的获得性抗性更适合被描述为一种非水杨酸依赖的获得性抗性。通过比较研究 *L. biglobosa* 预接种、ASM预处理和水处理对照中分属不同防御信号传导途径基因的表达(局部和系统的)模式, 可以推测, 由 *L. biglobosa* 预接种所诱导的油菜对强毒种的抗性主要由茉莉酸/乙烯信号途径所介导。在强毒种接种后, 被普遍用作茉莉酸/乙烯途径标记基因的 *PDF1.2*^[29] 加强表达, 而水杨酸途径基因 *PR-1* 推迟表达, 表明油菜对该病原的抗性依赖于茉莉酸/乙烯途径。在经 *L. biglobosa* 诱导的植株上, 尽管 *PR-1* 在接种 96 h 也有大量诱导表达, 但与 *PDF1.2* 的诱导表达相比, *PR-1* 的诱导表达显著延后。该结果进一步从ASM处理中基因表达模式得到证实。在ASM处理中, *PR-1* 更早诱导表达, 而 *PDF1.2* 的诱导会被抑制。

本研究中观察到的茉莉酸/乙烯信号途径在黑胫病抗病信号传递中的重要作用类似于在拟南芥中腐生病原菌诱导的抗病信号传递途径, 即独立于水杨酸的获得性抗性。例如, 在拟南芥接种十字花科蔬菜黑斑病菌 (*Alternaria brassicicola*) 后, 检测到大量茉莉酸在接种叶和非接种叶中积累, 并伴随着 *PDF1.2* 的大量表达^[30]。在拟南芥上, 水杨酸代谢酶 NahG 组成型超表达后, 拟南芥对黑斑病和灰霉病 (*Botrytis cinerea*) 的抗性并未减弱^[31], 而茉莉酸/乙烯信号途径被阻断以后, 抗性显著降低^[30]。在 *L. biglobosa* 诱导接种的植株上, *NPR1* 基因表达更早更强, 表明该诱导抗性与 *NPR1* 有关。但研究表明, 拟南芥对黑斑病和灰霉病的抗性是与 *NPR1* 无关的^[30]。 *NPR1* 最初克隆时认为是介导水杨酸信号途径的反应^[31], 受具吸器的活体寄生病原菌诱导^[32], 然而最近研究表明它在各信号途径的交互作用中发挥重要作用^[33], 如由根际微生物诱导的系统抗性与水杨酸无关^[9]。本研究的基因表达分析结果显示, 在像 *L. biglobosa* 这样的半活体寄生真菌诱导的获得性抗性中 *NPR1* 可能有重要功能。该菌虽然没有吸器^[32], 但侵染后首先是一个无症状的菌丝生长过程(活体寄生), 然后才是造

成黑胫病的腐生过程。

本研究结果不同于拟南芥突变体的研究结果^[14]。后者研究结果表明, 黑胫病抗病信号传递独立于水杨酸途径和茉莉酸/乙烯途径, 只与植保素和活性氧的产生有关。然而, 拟南芥不是黑胫病寄主, 与非寄主感病有关的基因和与寄主抗病有关的基因可能不是一回事。而且, 该研究采用分生孢子为接种体, 需要损伤叶片, 从而不可避免地诱导了病原和损伤相关的防御信号途径。相反, 本研究采用子囊孢子接种, 不需损伤叶片菌丝即可侵入, 更接近于自然侵染过程, 避免了伤害诱导信号的干扰, 诱导的防御反应仅由病原引起的。

细胞程序性死亡是植物抵抗病菌侵染的重要途径。尽管存在上述差异, 但细胞死亡调节在拟南芥对该病原的感病性反应中的重要作用与本研究的结果相似。在本研究中, 经诱导处理的油菜叶片在挑战接种后侵染点叶肉细胞的细胞质降解, 染色加深(图3), 显示诱导处理后引起植株过敏性反应(HR), 以起到限制病原菌扩展速度、降低病斑大小的作用。类似的过敏反应也发生在抗病基因介导的油菜抗病反应上。用含无毒基因 *AvrLm1* 的黑胫病原菌接种含对应抗病基因 *Rlm1* 的油菜, 在侵染点处发现细胞程序性死亡^[34], 这种细胞程序性死亡可以限制病原菌生长^[35]。由此可见, 弱毒种和化学诱导处理后, 油菜植株和病原菌互作的相容(Compatible)和不相容(Incompatible)性会发生变化, 就像是一种“基因对基因”的关系。由于黑胫病属于单循环病害, 一般是病原菌子囊孢子释放早, 危害更严重^[4,25], 因此在黑胫病病原菌子囊孢子释放前, 可以采用生物(如弱毒种诱导接种)和化学(如喷洒ASM, MSB诱导剂)诱导处理的方法来降低黑胫病的感病程度并控制其流行。据欧洲的鉴定结果, 中国的油菜品种对黑胫病极其感病, 因此在强致病型的病原侵入中国时, 这些处理可能有助于减少病害的流行^[1]。

致谢 感谢 Rothamsted Research 的 Alan Todd 教授在统计分析中给予的大力帮助, Kim Hammond-Kosack 教授和 John Lucas 教授为本文的写作提出了宝贵的意见, 在此一并致谢。

参 考 文 献

- 1 Fitt B D L, Brun H, Barbetti M J, et al. World-wide importance of phoma stem canker (*Leptosphaeria maculans* and *L. biglobosa*) on oilseed rape (*Brassica napus*). *Eur J Plant Pathol*, 2006, 114: 3–15 [DOI: 10.1007/s10653-007-52-6-660]
- 2 Williams R H, Fitt B D L. Differentiating A and B groups of *Lep-*

- Leptosphaeria maculans*, causal agent of stem canker (blackleg) of winter oilseed rape. *Plant Pathol*, 1999, 48: 161–175[DOI]
- 3 Johnson R D, Lewis B G. DNA polymorphism in *Leptosphaeria maculans*. *Physiol Mol Plant Pathol*, 1990, 37: 417–424[DOI]
- 4 West J S, Kharbanda P D, Barbetti M J, et al. Epidemiology and management of *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker) on oilseed rape in Australia, Canada and Europe. *Plant Pathol*, 2001, 50: 10–27[DOI]
- 5 Shoemaker R A, Brun H. The teleomorph of the weakly aggressive segregate of *Leptosphaeria maculans*. *Can J Bot*, 2001, 79: 412–419[DOI]
- 6 Mendes-Pereira E, Balesdent M H, Brun H, et al. Molecular phylogeny of the *Leptosphaeria maculans*-*L. biglobosa* species complex. *Mycol Res*, 2003, 107: 1287–1304[DOI]
- 7 Hammerschmidt R. Induced disease resistance: How do induced plants stop pathogens? *Physiol Mol Plant Pathol*, 1999, 55: 77–84[DOI]
- 8 Lucas J A. Plant immunization: From myth to SAR. *Pestic Sci*, 1999, 55: 193–196[DOI]
- 9 Durrant W E, Dong X. Systemic acquired resistance. *Ann Rev Phytopathol*, 2004, 42: 185–209[DOI]
- 10 Jensen B, Latunde-Dada A O, Hudson D, et al. Protection of *Brassica* seedlings against downy mildew and damping-off by seed treatment with CGA245704, an activator of systemic acquired resistance. *Pestic Sci*, 1998, 52: 63–69[DOI]
- 11 Latunde-Dada A O, Lucas J A. The plant defence activator acibenzolar-S-methyl primes cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] seedlings for rapid induction of resistance. *Physiol Mol Plant Pathol*, 2001, 58: 199–208[DOI]
- 12 Cools H J, Ishii H. Pre-treatment of cucumber plants with acibenzolar-S-methyl systemically primes a phenylalanine ammonia lyase gene (*PAL1*) for enhanced expression upon attack with a pathogenic fungus. *Physiol Mol Plant Pathol*, 2002, 61: 273–280[DOI]
- 13 Thomma B P H J, Eggermont K, Penninckx I A M A, et al. Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defence-response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens. *Proc Nat Acad Sci USA*, 1998, 95: 15107–15111[DOI]
- 14 Bohman S, Staal J, Thomma B P H J, et al. Characterisation of an *Arabidopsis*-*Leptosphaeria maculans* pathosystem: Resistance partially requires camalexin biosynthesis and is independent of salicylic acid, ethylene and jasmonic acid signalling. *Plant J*, 2004, 37: 9–20[DOI]
- 15 Hammond K E, Lewis B G, Musa T M. A systemic pathway in the infection of oilseed rape plants by *Leptosphaeria maculans*. *Plant Pathol*, 1985, 34: 557–563[DOI]
- 16 Cohen Y, Gisi U, Niederman T. Local and systemic protection against *Phytophthora infestans* induced in potato and tomato plants by jasmonic acid and jasmonic-methyl-ester. *Phytopathol*, 1993, 83: 1054–1062[DOI]
- 17 Knoester M, van Loon L C, van den Heuvel J, et al. Ethylene-insensitive tobacco lacks nonhost resistance against soil-borne fungi. *Proc Nat Acad Sci USA*, 1998, 95: 1933–1937[DOI]
- 18 Borges A A, Cools H J, Lucas J A. Menadione sodium bisulphite: A novel plant defence activator which enhances local and systemic resistance to infection by *Leptosphaeria maculans* in oilseed rape. *Plant Pathol*, 2003, 52: 429–436[DOI]
- 19 Sequiera L. Mechanisms of induced resistance in plants. *Ann Rev Microbiol*, 1983, 37: 51–59[DOI]
- 20 Mahuku G S, Hall R, Goodwin P H. Co-infection and induction of systemic acquired resistance by weakly and highly virulent isolates of *Leptosphaeria maculans* in oilseed rape. *Physiol Mol Plant Pathol*, 1996, 49: 61–72[DOI]
- 21 Liu S Y, Liu Z, Fitt B D L, et al. Resistance to *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker) in *Brassica napus* (oilseed rape) induced by *L. biglobosa* and chemical defence activators in field and controlled environments. *Plant Pathol*, 2006, 55: 401–412[DOI]
- 22 West J S, Balesdent M H, Rouxel T, et al. Colonization of winter oilseed rape tissues by A/Tox⁺ and B/Tox⁰ *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker) in France and England. *Plant Pathol*, 2002, 51: 311–321[DOI]
- 23 Anonymous. HGCA Recommended list for cereals and oilseeds. London: HGCA, 2003. 35
- 24 Stachowiak A, Olechnowicz J, Jedryczka M, et al. Frequency of avirulence alleles in field populations of *Leptosphaeria maculans* in Europe. *Eur J Plant Pathol*, 2006, 114: 67–75[DOI]
- 25 Huang Y J, Fitt B D L, Jedryczka M. Patterns of ascospore release in relation to phoma stem canker epidemiology in England (*Leptosphaeria maculans*) and Poland (*Leptosphaeria biglobosa*). *Eur J Plant Pathol*, 2005, 111: 263–277[DOI]
- 26 Payne R W. The guide to GenStat: Part 2. Oxford: Oxford University Press, 2000
- 27 Muller P Y, Janovjak H, Miserez A R, et al. Processing of gene expression data generated by quantitative real-time RT-PCR. *Bio-techniques*, 2002, 32: 1372–1379
- 28 Ryals J A, Neuenschwander K H, Willits M G, et al. Systemic acquired resistance. *Plant Cell*, 1996, 8: 1809–1819[DOI]
- 29 Penninckx I A M A, Thomma B P H J, Buchala A, et al. Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant defensin gene in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 1998, 10: 2103–2113 [DOI]
- 30 Penninckx I A M A, Eggermont K, Terras F R G, et al. Pathogen-induced systemic activation of a plant defensin gene in *Arabidopsis* follows a salicylic acid-independent pathway. *Plant Cell*, 1996, 8: 2309–2323 [DOI]
- 31 Cao H, Bowling S A, Gordon S, et al. Characterization of an *Arabidopsis* mutant that is nonresponsive to inducers of systemic acquired resistance. *Plant Cell*, 1994, 6: 1583–1592[DOI]
- 32 Oliver R P, Ipcho S V S. *Arabidopsis* pathology breathes new life into necrotrophs-vs-biotrophs classification of fungal pathogens. *Mol Plant Pathol*, 2004, 5: 347–352[DOI]
- 33 Bostock R M. Signal crosstalk and induced resistance: Straddling the line between cost and benefit. *Ann Rev Phytopathol*, 2005, 43: 545–580 [DOI]
- 34 Roussel S, Nicole M, Lopez F, et al. *Leptosphaeria maculans* and cryptogin induce similar vascular responses in tissues undergoing the hypersensitive reaction in *Brassica napus*. *Plant Sci*, 1999, 144: 17–28[DOI]
- 35 Li H, Sivasithamparam K, Barbetti M J, et al. Germination and invasion by ascospores and pycnidiospores of *Leptosphaeria maculans* on spring-type *Brassica napus* canola varieties with varying susceptibility to blackleg. *J Gen Plant Pathol*, 2004, 70: 261–269[DOI]

<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/csb2007-52-6-660>