

# 野生稻基因导入系 W6023 对白叶枯菌的 抗谱及转录组差异表达基因分析

张明伟, 徐飞飞, 郝巍, 王春连, 赵开军

(中国农业科学院作物科学研究所/农作物基因资源与基因改良国家重大科学工程, 北京 100081)

**摘要:**水稻白叶枯病是世界性水稻病害, 严重威胁水稻的高产和稳产。为了挖掘水稻抗白叶枯病新基因, 本研究对一个野生稻基因导入系 W6023 进行了白叶枯病多菌系接种鉴定及抗谱分析, 发现 W6023 具有广谱抗病性。用强致病菌 PXO99 诱导 W6023 及其感病轮回亲本 IR24 后进行转录组测序, 分别获得 105644962 和 91022599 条序列, 通过 GO 注释及 KEGG 富集分析, 发现差异表达基因主要富集在次生代谢产物的生物合成、植物激素信号转导及糖代谢途径等方面。在这些差异表达基因中, 发现 203 个基因的表达有显著差异, 其中在 W6023 中上调表达的基因有 114 个 (56.2%), 下调表达的有 89 个 (43.8%), 而且 35.9% 分布在第 11 染色体上。生物信息学分析发现在 203 个差异表达基因中有 16 个属于类抗病基因, 如 NBS-LRR 等; 14 个直接或间接与水稻体内过氧化物的代谢相关, 如编码过氧化物酶和金属硫蛋白等; 6 个编码抗病相关转录因子, 如 WRKY 和 NAC 等; 18 个为信号传导相关基因, 编码钙调素结合蛋白和萜类合成酶等。随机选择 6 个 W6023 中上调表达和 3 个 IR24 中上调表达的基因进行 RT-PCR 及 qRT-PCR 分析, 结果与转录组测序结果一致, 表明本研究获得的转录组测序数据结果是可靠的, 为以后更深入挖掘 W6023 的抗病基因及分子机理研究提供了基础。

**关键词:**水稻; 抗病基因; 白叶枯病; 转录组测序; 差异表达基因

## Resistance Spectrum Against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and RNA-seq Analysis of the Introgression Line W6023 Derived from Cross Between *Oryza rufipogon* and Cultivated Rice

ZHANG Ming-wei, XU Fei-fei, HAO Wei, WANG Chun-lian, ZHAO Kai-jun

(Institute of Crop Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences National Key Facility  
for Crop Gene Resources and Genetic Improvement, Beijing 100081)

**Abstract:** Rice bacterial blight (BB) is a worldwide rice disease devastating rice yield seriously. In order to explore new resistance genes against BB, we investigated resistance spectrum of W6023, an introgression line derived from cross between *O. rufipogon* Griff. and cultivated rice. Inoculation assays showed that W6023 was highly resistant to 23 of the 25 *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae* (*Xoo*) strains tested, and the broad resistance spectrum is different from those conferred by other known BB resistance genes. Subsequently, W6023 and its susceptible recurrent parent IR24 were infiltrated with the broadly virulent *Xoo* strain PXO99 (P6) and RNA-seq analysis was performed. Totally 105644962 and 91022599 sequences were obtained from W6023 and IR24, respectively. GO annotation and KEGG enrichment analysis revealed differentially expressed genes (DEGs) mainly enriched in biosynthesis of secondary metabolites, plant hormone signal transduction and starch & sucrose metabolism. Among these differentially expressed genes, there were 203 significantly differentially expressed genes, of which 114 genes (56.2%) were up-regulated and 89 (43.8%) down-regulated in W6023, and 35.9% of them were located on chromosome

收稿日期: 2016-11-27 修回日期: 2016-12-12 网络出版日期: 2017-02-17

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20170217.1102.004.html>

基金项目: 国家自然科学基金 (31571640)

第一作者研究方向为作物遗传育种。E-mail: vszhang@126.com

通信作者: 王春连, 研究方向为水稻抗病分子生物学及遗传育种。E-mail: wangchunlian@caas.cn

11. Bioinformatics analysis showed that 16 out of the 203 differentially expressed genes belonged to disease resistance genes such as NBS-LRR or receptor kinases; 14 genes were directly or indirectly associated with metabolism of peroxides in rice, encoding peroxidase, metallothionein, and so on; 6 genes encode resistance-related transcription factors, such as WRKY and NAC; 18 signal transduction-related genes encode calmodulin binding proteins, terpene synthase, glucosyltransferase, and so on. Six up-regulated genes of W6023 and three up-regulated genes of IR24 were randomly selected and analyzed by RT-PCR and qRT-PCR. The results were consistent with the data of transcriptome sequencing, indicating that the transcriptome data obtained in this study were reliable. These above results provide a basis for the further isolation of resistance genes in W6023.

**Key words:** rice; resistance gene; bacterial blight; transcriptome sequencing; differentially expressed genes

水稻是世界上最重要的粮食作物之一,为全球超过半数的人口提供食物来源。水稻产量占我国谷物总产的 40%,因此水稻生产的可持续发展直接关系到我国的粮食安全。由革兰氏阴性黄单胞杆菌 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, *Xoo*) 引起的白叶枯病是一个世界性水稻病害,一般减产 20% ~ 30%,严重时损失达 50%,有的甚至颗粒无收<sup>[1-2]</sup>。通过化学农药和生物制剂控制此病常常效果欠佳且容易引起环境和食品安全问题。目前,通过种植抗病品种是防治水稻白叶枯病最经济有效的途径。

国内外已报道 41 个水稻抗白叶枯病基因,但由于多数基因抗谱狭窄或为隐性,只有 *Xa3*、*Xa4*、*Xa21* 等少数基因在育种中被广泛利用。这些利用较多的抗白叶枯病基因已在中国部分水稻产区丧失抗性<sup>[3-4]</sup>。本课题组从野生稻中发掘的 *Xa23* 基因目前对所有测试的国内外代表菌系均表现抗病,正在被育种家利用。但是任何一个抗病基因均有可能因病原菌的进化而丧失抗性。为了抵御不断变化的病原菌小种,必须不断发掘新的抗病基因,以实现基因轮换,达到控制病害的目的。

近年发展起来的转录组测序 (RNA-Seq) 技术为挖掘新基因提供了新途径,它可以解决新基因深度发掘、低丰度转录本发现、代谢途径确定、基因家族鉴定及进化分析等多方面的问题。因为转录水平的基因表达及其动态变化决定了植物对生物和非生物胁迫的反应<sup>[5]</sup>。转录组测序对于解释基因组的功能元件和揭示细胞与组织的分子组成,以及了解发育和抗病型等方面至关重要<sup>[6]</sup>。RNA-Seq 提供了比其他方法更为精确的转录本及其亚型 (异构体) 水平的检测,因此已被广泛应用于医学及农学等众多领域。例如 K. H. Kim 等<sup>[7]</sup> 对大豆细菌性叶脓疱病的抗病和感病近等基因系进行转录组测序,基因差异表达分析显示在抗病品种中具有强大的涉及识别病程相关分子模式的防御机制。L. Xu 等<sup>[8]</sup> 对棉

花黄萎病的抗病材料 (*Gossypium barbadense* L. cv. 7124) 接种前后的转录组测序发现,接种后抗病材料的酶活性、木质素含量明显增高,接种黄萎病菌增加了苯丙氨酸解氨酶 (PAL)、过氧化物酶 (POD) 的酶活性。T. Strauß 等<sup>[9]</sup> 利用转录组测序技术从辣椒中分离出一个受转录激活因子 TALE (transcription activator-like effector) 无毒蛋白 AvrBs4 识别的抗辣椒斑点病基因 *Bs4C*。K. Yang 等<sup>[10]</sup> 利用此技术从小麦材料中克隆出一个对纹枯病菌具有防御反应的 *TaCRK1* 基因。B. He 等<sup>[11]</sup> 构建了疣粒野生稻的转录组数据库,分析发现许多抗病基因在自然条件下即可表达,这为将来发现更多新基因提供了基础,也为研究抗病相关的分子机理提供了依据。因此,转录组测序技术为抗病基因的挖掘提供了重要信息。本课题组早期从野生稻中挖掘出一个高抗水稻白叶枯病种质,通过不断的杂交和回交将其抗病性转育到感病品种 IR24 中,培育出以 IR24 为背景的野生稻基因导入系 W6023。本研究对 IR24 和 W6023 进行转录组测序,目的是从 W6023 中寻找抗病相关基因,为基因克隆及分子机理研究提供基础,为水稻育种提供新的抗病资源。

## 1 材料与方法

### 1.1 水稻材料

本研究使用的水稻材料包括:广谱感白叶枯病品种 IR24,高抗白叶枯病的野生稻基因导入系 W6023,含已知抗白叶枯病显性基因的品种如 IRBB1 (*Xa1*)、IRBB2 (*Xa2*)、IRBB3 (*Xa3*)、IRBB4 (*Xa4*)、IRBB7 (*Xa7*)、IRBB10 (*Xa10*)、IRBB11 (*Xa11*)、IRBB14 (*Xa14*)、Tetep (*Xa16*)、Asominori (*Xa17*)、Miyang (*Xa18*)、IRBB21 (*Xa21*)、扎昌龙 (*Xa22*)、CBB23 (*Xa23*) 和明恢 63 (*Xa25*) 等。W6023 是本课题组以普通野生稻抗病资源 03-66 (由原中国农业科学院作物品种资源研究所庞汉华

副研究员提供)为供体逐步导入到 IR24 中培育成的 BC<sub>4</sub>F<sub>6</sub>。所有材料种植于中国农业科学院作物科学研究所网室(北京),常规水肥管理。

## 1.2 水稻白叶枯病菌株

中国代表菌株: C1、C2、C3、C4、C5、C6、C7、HN08-2 及 LN44; 菲律宾国际鉴别小种: P1、P2、P3、P4、P5、P6、P7、P8、P9 及 P10; 日本鉴别小种: T1、T2 及 T3; 韩国代表菌株: KX085 及 KX0576; 孟加拉代表菌株: PP8511, 共 25 个。所有菌株于甘油中保存在 -80 °C 冰箱, 接种前用 PPS 培养基<sup>[12]</sup>复壮菌株, 置于 28 °C 培养 48 h, 以无菌水配制接种菌液, 浓度调至 OD<sub>600</sub> = 1.0。

## 1.3 接种与调查

多菌系接种鉴定采用人工剪叶接种法<sup>[13]</sup>, 在成株期接种。接种后 14 ~ 20 d, 待感病品种病情趋于稳定时测量病斑长度。病斑长度 < 3 cm 为抗病 (R), 3 ~ 5 cm 为中抗 (MR), 6 ~ 9 cm 为中感 (MS), > 10 cm 为感病 (S)<sup>[14]</sup>。

用于转录组测序的材料采用注射接种法, 在植株苗期约 5 ~ 6 片叶时注射接种, 每个材料注射接种 10 片展开叶, 每个叶片注射的长度约为 10 cm。在接种后的 15 min、1 d 和 2 d 后进行取样, 记作 0 d、1 d 和 2 d。每个时间点收集 3 个植株上的注射叶片, 混合后立刻冻在液氮中, 在 -80 °C 冰箱中保存用于 RNA 提取。

## 1.4 RNA 提取、纯化

采用 Trizol 法 (Invitrogen 公司) 分别提取 IR24 和 W6023 不同时间点的总 RNA。取适量 RNA 用 DNaseI (TAKARA 公司) 消化残留的 DNA, 再用 RNA 纯化试剂盒 (天根生化科技(北京)有限公司, DP412) 纯化 RNA, 方法参照说明书。用 ND-2000 分光光度计 (Nanodrop Technologies) 检测 RNA 的浓度和质量。分别把 IR24 和 W6023 不同时间点取样得到的 RNA 分别进行等量混合, 得到感病和抗病 RNA 池。

## 1.5 转录组测序

取纯化后的 5 μL 总 RNA 构建文库, 用带有 oligo(dT) 的磁珠分离出具有 polyA 尾的 mRNA, 委托上海美吉生物医药科技有限公司在 HiSeq2000 进行建库测序。

## 1.6 差异表达分析

以 FPKM 值评估每个转录本的表达丰度, 转录本丰度越高, 则基因表达水平越高。本研究利用 log<sub>2</sub>FC 作为衡量 2 个材料显著差异的尺度, 要求 FDR ≤ 0.05, |log<sub>2</sub>FC| ≥ 1, 最终对所有基因在各组

样本中的表达进行显著差异性分析, 找出相对差异表达的基因。

## 1.7 功能聚类分析及注释

将有差异表达的基因进行表达模式聚类分析, 采用距离计算法: 样本间为 spearman, 基因间为 pearson, 采用的聚类方法为 hcluster (complete 算法)。转录组基因注释结合 Rice Genome Annotation Project 数据库 (<http://rice.plantbiology.msu.edu/>) 和 NCBI 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=oryza%20sativa>) 数据进行差异基因的功能预测。分别利用 goatools (<https://github.com/tanghaibao/goatools>) 和 KOBAS (<http://kobas.cbi.pku.edu.cn/home.do>) 完成 GO 分析和 KEGG pathway 显著性富集分析。

## 1.8 RT-PCR 和 qRT-PCR 检测

取 2 μg 总 RNA 进行反转录, 参照 FastQuant cDNA 合成试剂盒 (天根生化科技(北京)有限公司天根公司, KR106) 操作。RT-PCR 反应程序为 94 °C 2 min, 然后以 94 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 50 s 扩增 35 个循环, 最后 72 °C 延伸 10 min, 用 Actin 基因作为内标参照。qRT-PCR 采用 SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> II 试剂盒 (TaKaRa 公司), 按照说明书进行操作, 用 Ubiquitin 基因为内标参照。qRT-PCR 反应体系为 20 μL: qPCR Master Mix (2 ×) 10 μL, 5' 和 3' 引物各 1 μL, cDNA 模板 1 μL, Nuclease-Free 水补齐。每个样品设置 3 个重复。参照 K. J. Livak 等<sup>[15]</sup> 方法, 基因相对表达量 = 2<sup>-ΔCT</sup>, 其中 ΔCT = (CT<sub>目标基因</sub> - CT<sub>Ubi</sub>), CT 为荧光阈值。

## 2 结果与分析

### 2.1 基因导入系 W6023 的抗谱分析

用 25 个国内外代表菌系进行剪叶接种鉴定, 结果表明 W6023 对除 P10 和 HN08-2 外的 23 个代表菌系均表现为抗病 (图 1), 对 P2、P3、P6、P7、P8、P9、T2、C3、C4、C5、C6、KX0576 和 PP8511 菌系出现褐色, 表现出明显的过敏性坏死反应 (HR)。前期对 W6023 的遗传分析表明其含有的抗性基因为显性, 因此与已知的显性基因进行抗谱比较 (表 1)。从表中可以看出, W6023 对国际强致病小种 P6 表现抗病, 表明其所含抗病基因有别于那些对 P6 表现感病的基因 (表 1)。已知基因 *Xa17*、*Xa23*、*Xa32(t)* 及 *Xa39* 不仅对 P6 表现抗病, 而且均抗 P10, 而 W6023 对 P10 表现为感病, 表明 W6023 不含有 *Xa17*、*Xa23*、*Xa32(t)* 和 *Xa39*。W6023 对 KX085、C4 表现

抗病,而 *Xa21* 对 KX085 表现感病、*Xa27* 对 C4 表现感病<sup>[16]</sup>,说明 W6023 也不含 *Xa21* 和 *Xa27*。因此,

W6023 可能是一个新抗源,其抗病谱优于包括 *Xa21* 在内的大部分抗病材料,仅次于 *Xa23*。

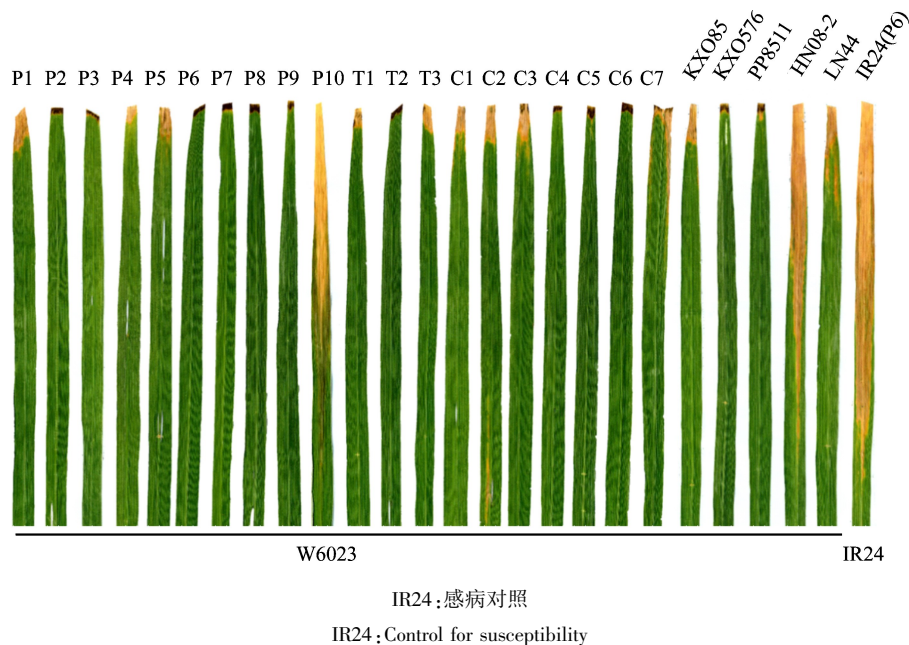


图 1 水稻材料 W6023 对白叶枯病菌的抗性反应

Fig. 1 Resistance reaction of rice line W6023 to *Xoo* strains

表 1 W6023 与已知抗白叶枯病基因的抗谱比较

Table 1 Comparison of resistance spectrum to *Xoo* strains between W6023 and all the known BB resistance genes

材料 Variety	抗性基因 Resistance gene	菲律宾国际鉴别小种										韩国		日本	中国	孟加拉
		Philippine international differential races										Korea		Japan	China	Bangladesh
		P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	KX085	KX0576	T1	C5	PP8511
W6023	?	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R
IRBB1	<i>Xa1</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	MS	S	S	S	S	MS	S
IRBB2	<i>Xa2</i>	S	S	S	S	S	S	S	MS	S	S	R	R	R	MR	S
IRBB3	<i>Xa3</i>	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	R	R	MR	S
IRBB4	<i>Xa4</i>	R	S	S	R	R	S	R	R	S	R	MS	R	R	S	MR
IRBB7	<i>Xa7</i>	R	R	R	S	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	R
IRBB10	<i>Xa10</i>	S	R	S	S	MR	S	MR	S	MS	S	S	S	S	S	R
IRBB11	<i>Xa11</i>	S	S	S	S	S	S	MS	S	MR	S	MR	R	S	S	MS
IRBB14	<i>Xa14</i>	S	S	S	S	R	S	S	R	MS	S	R	R	R	MS	S
TeTep	<i>Xa16</i>	S	S	MR	MR	MS	MS	S	MS	MR	S	MS	R	R	R	R
Asominori	<i>Xa17</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Miyang	<i>Xa18</i>	S	MR	R	R	S	S	S	S	R	S	MS	S	S	R	MS
IRBB21	<i>Xa21</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	R
扎昌龙	<i>Xa22(t)</i>	MR	R	MR	R	R	MS	MS	MS	R	MS	R	R	R	MR	MS
CBB23	<i>Xa23</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
明恢 63	<i>Xa25</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S
IRBB27*	<i>Xa27</i>	\	R	R	MR	R	R	\	\	\	\	\	\	R	\	\
FF329*	<i>Xa39</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	\	\	\	\	\
I554W1*	<i>Xa41(t)</i>	S	S	S	\	S	\	\	\	\	\	\	\	\	\	\
IR24	No	S	S	S	S	S	S	S	S	MS	S	S	S	S	S	MS

R:抗病;MR:中抗;MS:中感;S:感病;\* IRBB27、FF329 和 I554W1 的接种数据分别来自文献[16-18]

R;Resistant, MR;Middle resistant, MS;Middle susceptible, S;Susceptible, \* Data of reaction patterns of IRBB27, FF329 and I554W1 are from the work of reference [16-18], respectively

### 2.2 W6023 对 P6 的过敏性反应及转录组测序取样依据

用强致病菌 P6 对 IR24 和 W6023 注射接种, 3 d 后出现明显不同的症状(图 2)。感病品种 IR24 叶片呈现黄色晕圈, 7 d 后晕圈逐渐变成水浸状, 最后叶片萎焉枯死。而 W6023 则在注射处出现褐化斑, 产生过敏性坏死即典型的 HR 现象。因此, 本研究选择注射 2 d 以内的叶片提取 RNA 用于测序, 以防水稻叶片坏死及病菌繁殖过多干扰 RNA-Seq 结果。也曾试图提取注射 3 d 以后的叶片 RNA, 结果发现注射 3 d 时, W6023 只能提取到很少量的 RNA, 而 IR24 中 RNA 已经提取不到, 感病品种的叶片细胞已经被白叶枯病菌破坏。

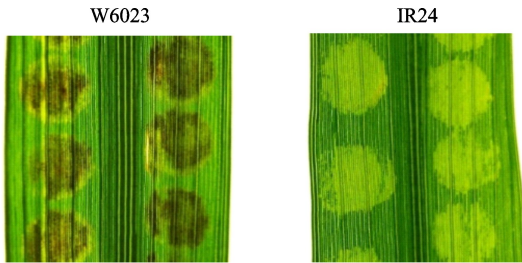
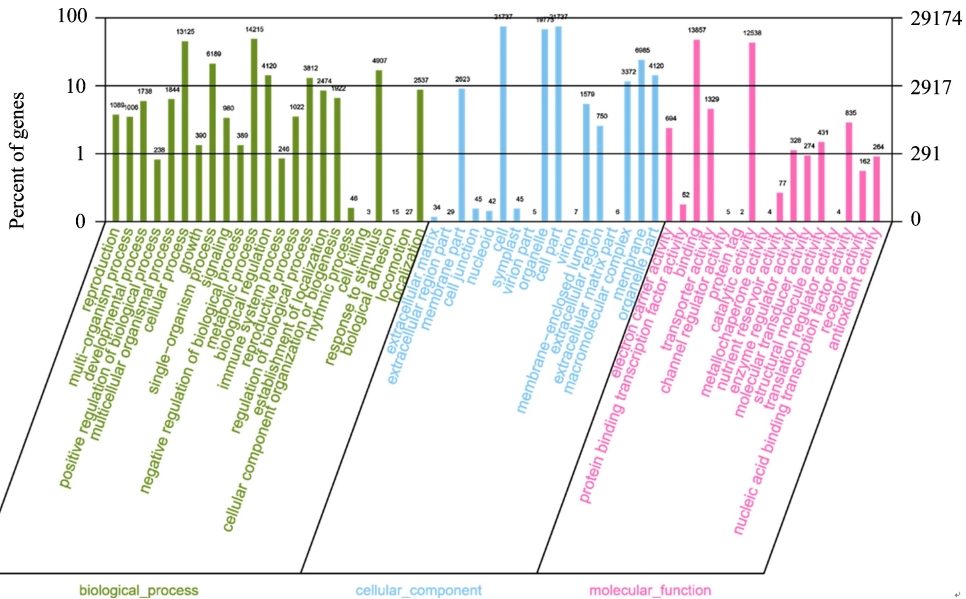


图 2 W6023 和 IR24 注射接种 3 d 后的症状  
Fig.2 Symptoms of W6023 and IR24 infiltrated using P6 strain after 3 days

### 2.3 差异表达基因在不同功能通路中分布

对 W6023 和 IR24 转录组测序并对测得数据去杂处理, 分别得到 105644962 和 91022599 条序列, 每条序列长为 101 bp。把获得的高质量序列数据在 Rice Genome Annotation Project 数据库中进行检索比对, 分别得到 97674093 (92.46%) 和 84277721 (92.61%) 条序列已有注释。

基于序列的相似性原理, 共有 34923 个基因至少与一个 GO 术语相匹配, 并可以进一步细化为 48 个功能小组, 其中包括生物过程、细胞组件和分子功能 3 个部分(图 3)。差异表达的基因在生物过程类别里的 cellular process (19336 个基因, 0.55%, GO:0009987)、single-organism process (9113 个基因, 0.26%, GO:0044699)、metabolic process (19814 个基因, 0.57%, GO:0008152) 等二级分类中较为集中。在细胞组件分类里 organelle (12632 个基因, 0.36%, GO:0043226)、cell part (18596 个基因, 0.53%, GO:0044464)、membrane (8820 个基因, 0.25%, GO:0016020) 和 cell (21407 个基因, 0.61%, GO:0005623) 出现的次数比较多。在分子功能类别中 binding (18093 个基因, 0.52%, GO:0005488) 和 catalytic activity (14213 个基因, 0.41%, GO:0003824) 含量较高。



图中横坐标表示 GO 的二级分类术语, 左边纵坐标表示包含在该二级分类中的基因占总数的百分比, 右边纵坐标表示比对该二级分类的基因数量, 3 个颜色表示三大类, 其中绿色代表 biological process, 蓝色代表 cellular component, 红色代表 molecular function  
The abscissa represents the secondary classification term of GO, the ordinate on the left represents the percentage of the total genes contained in the secondary classification, and the ordinate on the right represents the number of genes in the secondary classification, and the three colors represent three major classes. Green represents biological process, blue represents cellular component, red represents molecular function

图 3 差异表达基因 GO 注释分类统计图

Fig.3 Classification cartogram of GO annotation about differentially expression gene

将 W6023 和 IR24 表达差异的基因在基因本体论联合会数据库(Gene Ontology, <http://www.geneontology.org/>)中进行对比,共有 188 个差异基因比对到 38 个 GO 条目下(图 4)。涵盖 GO 数据库中 35 个上调 GO 条目和 36 个下调 GO 条目。在分子功能类别下, binding (GO:0005488) 和 catalytic activity (GO:0003824) 过程中的基因聚集明显,并且上调和下调基因的数量没有明显区别。生物学过程分类上也如预

期, cellular process (GO:0009987)、response to stimulus (GO:0050896) 和 metabolic process (GO:0008152) 占比例较高,且上调表达和下调表达的基因数之间没有明显差别。但在细胞组分生物膜(membrane, GO:0016020)条目下, W6023 中下调表达的基因数明显多于上调表达的基因数,这可能与接种过后 W6023 中防御性的细胞程序性死亡使得大量细胞组分相关的基因表达受到抑制有关。

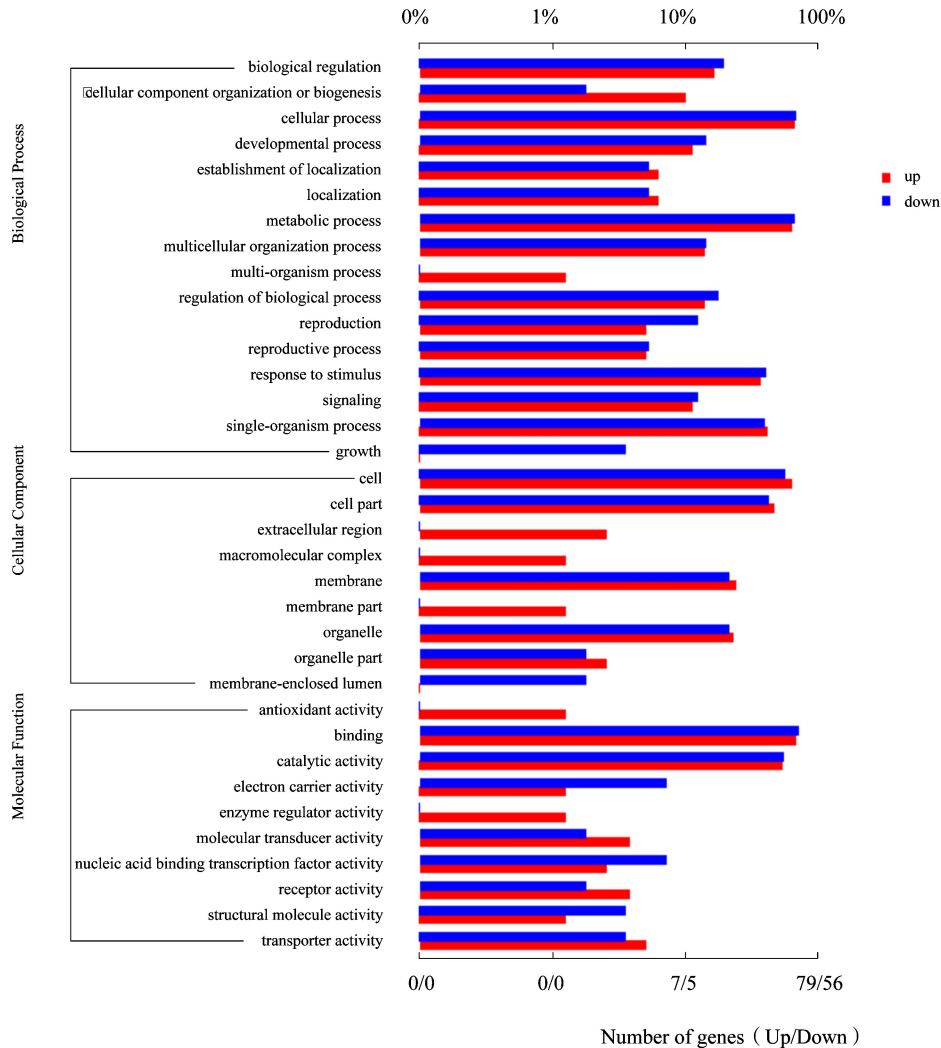


图 4 差异显著表达基因的功能分类

Fig. 4 The function distribution of DEGs

#### 2.4 差异表达基因在 KEGG 通路中分布集中

利用 BLAST 算法 (blastx/blastp 2.2.24+) 对拼接得到的序列与 KEGG 的基因数据库 (<http://www.kegg.jp/>) 进行比较,结果共有 19735 个基因可与 119 个通路相匹配。其中主要的通路为代谢途径 (metabolic pathways, path:osa01100), 次生代谢产物的生物合成 (biosynthesis of secondary metabolites, path:osa01110), 植物激素信号转导 (plant hormone signal

transduction, path:osa04075), 氨基酸生物合成 (biosynthesis of amino acid, path:osa01230) 以及淀粉和蔗糖代谢 (starch and sucrose metabolism, path:osa00500) 等。

#### 2.5 差异表达基因在染色体上的分布

通过比较 2 个测序材料的基因表达水平,本研究筛选到了 203 个显著差异表达基因,其中在 W6023 中表达量比在感病品种 IR24 中上调的有 114 个 (56.2%) 基因,下调的有 89 个 (43.8%) 基

因。同时对 203 个基因在不同染色体上的分布进行统计,发现基因在染色体上的分布具有明显的差异(图 5),其中每条染色体超过 10 个显著差异表达基

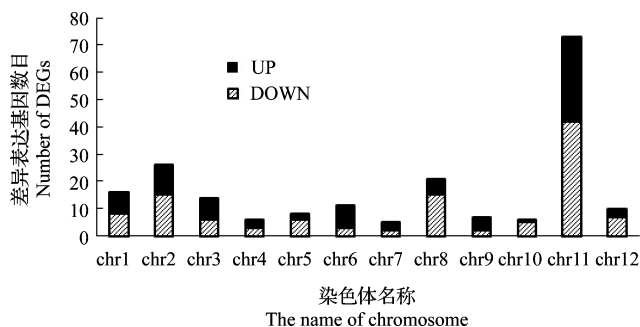


图 5 差异表达基因在不同染色体上的分布

Fig. 5 The distribution of DEGs on different chromosomes

表 2 差异表达基因列表

Table 2 The list of DEGs

编号 Transcript ID	表达差异倍数 Log <sub>2</sub> FC	P 值 P value	误差率 FDR	功能注释 Description
类抗病蛋白				
LOC_Os02g02670.1	-7.79332	4.42E-13	4.92E-10	NBS-LRR disease resistance protein, putative
LOC_Os11g10570.1	-7.58249	3.6E-06	0.001049	NBS-LRR disease resistance protein, putative
LOC_Os11g15670.1	-7.8552	2.77E-10	2.04E-07	NBS-LRR disease resistance protein, putative, expressed
LOC_Os11g29520.1	-5.63815	2.82E-10	2.04E-07	NBS-LRR disease resistance protein, putative, expressed
LOC_Os11g29990.1	3.56861	1.16E-10	9.03E-08	NBS-LRR type disease resistance protein, putative
LOC_Os11g39160.1	7.48314	9.54E-07	0.00033	NBS-LRR disease resistance protein, putative
LOC_Os11g39320.1	7.47635	2.02E-13	2.52E-10	LZ-NBS-LRR class, putative, expressed
LOC_Os11g35890.1	-1.48154	7.46E-05	0.01383	leucine rich repeat protein, putative, expressed
LOC_Os11g41210.1	4.83589	8.3E-05	0.014949	disease resistance protein RPM1, putative, expressed
LOC_Os11g31530.1	2.74173	2.49E-05	0.005459	BRASSINOSTEROID INSENSITIVE-associated receptor kinase precursor, putative
LOC_Os02g02120.1	-6.61177	0	0	OsWAK11-OsWAK receptor-like protein kinase
LOC_Os11g29970.1	9.4393	2.22E-16	4.33E-13	NB-ARC domain containing protein, expressed
LOC_Os11g38000.1	1.55957	5.58E-10	3.78E-07	NB-ARC domain containing protein, expressed
LOC_Os11g39450.1	1.79e + 308	1.57E-07	6.88E-05	cysteine-rich receptor-like protein kinase 7 precursor, putative, expressed
LOC_Os11g35274.1	1.79e + 308	0.000233	1.79e + 308	protein kinase domain containing protein, expressed
LOC_Os11g40970.1	1.79e + 308	1.11E-25	1.21E-05	receptor-like protein kinase precursor, putative, expressed
过氧化物代谢途径				
LOC_Os01g72140.1	1.8161	5.18E-05	0.010276	glutathioneS-transferase, putative, expressed
LOC_Os10g38340.1	1.75695	6.48E-07	0.000232	glutathioneS-transferase GSTU6, putative, expressed
LOC_Os10g38360.1	1.72818	8.11E-06	0.002038	glutathioneS-transferase, putative, expressed
LOC_Os10g38600.1	1.29032	0.000324	0.046198	glutathioneS-transferase GSTU6, putative, expressed
LOC_Os11g18170.1	1.32884	9.58E-05	0.016592	glutathione peroxidase, putative, expressed
LOC_Os08g25990.1	2.96759	4.23E-05	0.008853	alcohol oxidase-related, putative
LOC_Os03g17870.1	2.25093	1.32E-05	0.003106	metallothionein, putative, expressed
LOC_Os05g11320.1	1.24405	8.63E-10	5.61E-07	metallothionein-like protein 3B, putative, expressed
LOC_Os01g61160.1	2.05265	0.000138	0.02301	laccase precursor protein, putative, expressed

因的有 6 个,包括第 1、2、3、6、8 和 11 染色体,分别具有 16、26、14、11、21 和 73 个显著差异表达基因,第 4 和 7 染色体分别只有 5 个和 4 个显著差异表达基因。从统计结果可以看出无论是上调表达基因还是下调表达基因,在第 11 染色体上有明显多于其他染色体的分布,这与抗病基因在第 11 染色体上分布较多的结果是一致的<sup>[19]</sup>。

## 2.6 差异表达基因与抗病过程密切相关

上述 203 个显著差异表达基因通过数据库序列比对及与注释基因的功能进行比较,发现有 16 个基因预测与抗病相关,其中 14 个位于第 11 染色体,2 个位于第 2 染色体。其中有 7 个属于 NBS-LRR 类抗病蛋白,5 个为蛋白激酶类(表 2)。

表 2(续)

编号 Transcript ID	表达差异倍数 Log <sub>2</sub> FC	P 值 P value	误差率 FDR	功能注释 Description
LOC_Os01g63180.1	-1.08492	3.13E-09	1.84E-06	laccase-6 precursor, putative, expressed
LOC_Os04g27060.1	1.54994	0.000355	0.048321	oxidoreductase, aldo/keto reductase family protein, putative, expressed
LOC_Os07g23410.1	-3.0058	0.000257	0.038354	fatty acid desaturase, putative, expressed
LOC_Os11g37200.1	-2.68671	7.02E-06	0.001823	transmembrane BAX inhibitor motif-containing protein, putative, expressed
LOC_Os04g49194.1	-1.37935	4.53E-10	3.14E-07	naringenin, 2-oxoglutarate 3-dioxygenase, putative, expressed
抗病相关转录因子				
LOC_Os01g04800.1	-1.30125	5.34E-05	0.0104701	B3 DNA binding domain containing protein, expressed
LOC_Os02g53100.1	-2.46247	0.000338	0.0475132	OsWRKY32-Superfamily of TFs having WRKY and zinc finger domains, expressed
LOC_Os08g02300.1	-1.45726	3.85E-06	0.00111155	no apical meristem protein, putative, expressed
LOC_Os09g06464.1	-1.0335	0.00013	0.0219612	CCT/B-box zinc finger protein, putative, expressed
LOC_Os10g34884.1	-5.08556	6.66E-16	1.22E-12	RIPER7-Ripening-related family protein precursor, expressed
LOC_Os11g03300.1	1.47861	9.30E-05	0.0162912	NAC domain transcription factor, putative, expressed
信号传导途径				
LOC_Os08g27170.1	1.73604	3.89E-11	3.28E-08	calmodulin binding protein, putative
LOC_Os09g13890.1	2.94662	3.87E-11	3.28E-08	calmodulin binding protein, putative, expressed
LOC_Os11g44340.1	2.13724	1.43E-13	1.86E-10	calmodulin binding protein, putative
LOC_Os11g44600.1	2.38122	4.26E-06	0.001208	calmodulin binding protein, putative, expressed
LOC_Os12g36920.1	1.33282	1.91E-07	8.28E-05	calmodulin binding protein, putative, expressed
LOC_Os03g10640.1	1.88046	2.93E-11	2.61E-08	calcium-transporting ATPase, plasma membrane-type, putative, expressed
LOC_Os10g28240.1	1.63565	7.16E-08	3.19E-05	calcium-transporting ATPase, plasma membrane-type, putative, expressed
LOC_Os02g02930.1	1.34478	3.55E-07	0.000132	terpene synthase, putative, expressed
LOC_Os04g27340.1	2.28092	7.53E-05	0.013893	terpene synthase, putative, expressed
LOC_Os08g07080.1	1.38703	0.000162	0.02612	terpene synthase, putative, expressed
LOC_Os11g17440.1	-2.05082	0.00012	0.020422	enoyl-CoA hydratase/isomerase family protein
LOC_Os01g04050.1	1.25601	8.17E-07	0.000289	BBTI12-Bowman-Birk type bran trypsin inhibitor precursor, expressed
LOC_Os05g45100.1	1.73867	2.07E-06	0.000652	anthocyanidin 5,3-O-glucosyltransferase, putative, expressed
LOC_Os06g18670.1	-1.05328	0.000189	0.029638	anthocyanidin 3-O-glucosyltransferase, putative, expressed
LOC_Os11g26950.1	-1.43297	0.000285	0.041767	UDP-glucuronosyl and UDP-glucosyl transferase domain containing protein, expressed
LOC_Os02g50600.1	1.11551	0.000159	0.025917	glycosyl transferase 8 domain containing protein, putative, expressed
LOC_Os11g09690.1	2.33924	0.000132	0.022043	OsFBX410-F-box domain containing protein
LOC_Os11g38500.1	-5.33904	3.69E-05	0.007778	OsFBDF62-F-box and DUF domain containing protein

在这些差异表达基因中有 14 个基因直接或间接与水稻体内过氧化物的代谢相关(表 2),如谷胱甘肽过氧化酶类似基因、金属硫蛋白基因、漆酶蛋白前体、醇氧化酶和氧化还原酶等。

本次测序结果中有 6 个转录因子在 W6023 和 IR24 之间表达量差异较大(表 2),它们分别属于 RAV、WRKY、NAC、CO-like 和 FAR1 5 个家族。

在显著差异基因中还预测有 18 个信号传导相关基因(表 2),如假定的钙调素结合蛋白、钙转运

ATP 酶、萜类合成酶和糖基转移酶等。

## 2.7 RT-PCR 及 qRT-PCR 验证 RNA-seq 的差异表达基因

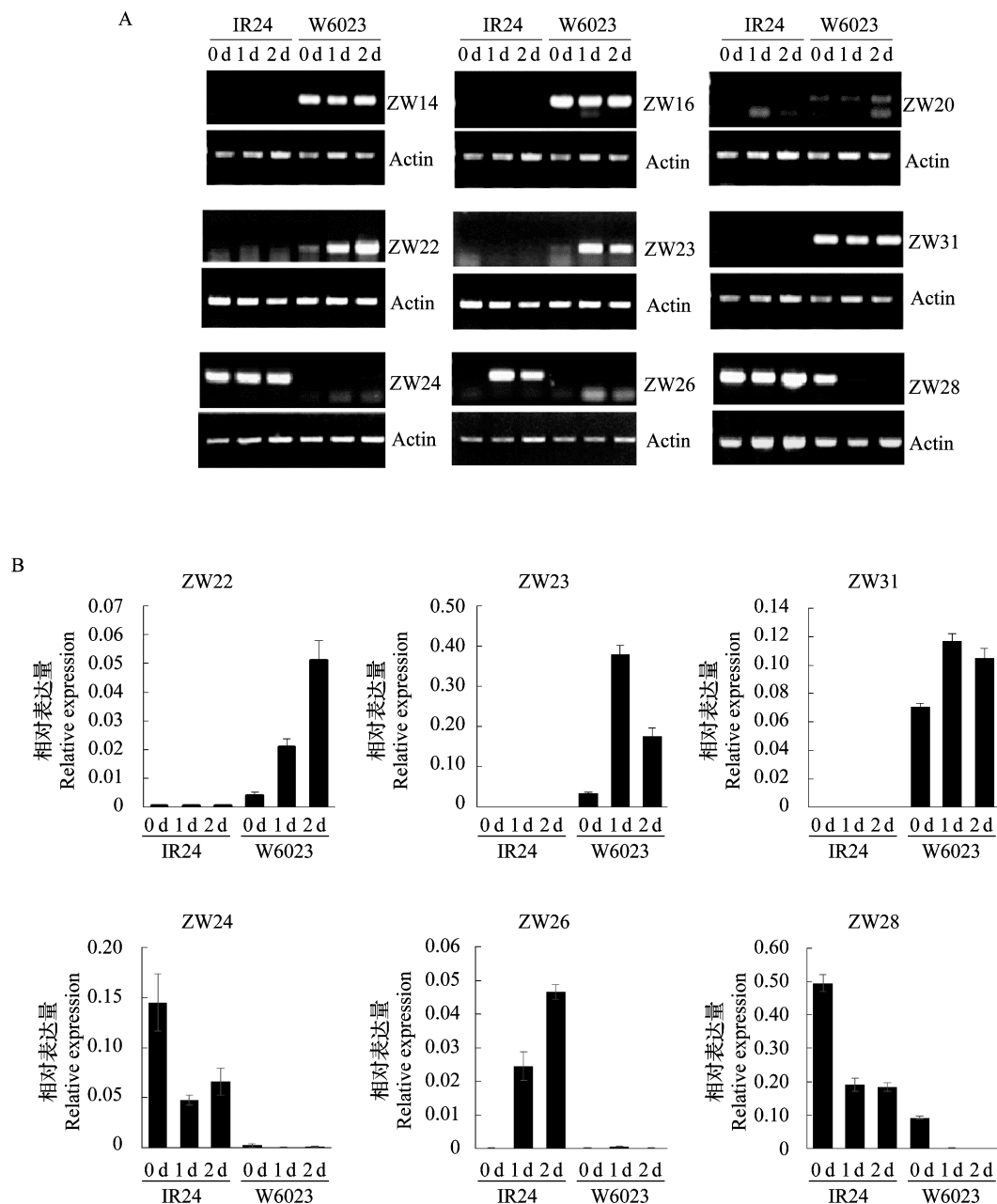
随机挑选转录组测序中在抗病材料 W6023 表达量较高而在感病材料 IR24 中表达量低或不表达的 6 个基因,包括 3 个预测与抗病基因相关,编号为 ZW20、ZW22、ZW23,以及 3 个功能未知蛋白基因 ZW14、ZW16 和 ZW31。分别设计基因特异引物进行 RT-PCR 扩增,结果与转录组测序结果一致(图 6A)。不同的基因在诱导后表现出不同的表达模



式,ZW14、ZW16和ZW31在IR24中0 d、1 d和2 d 3个时间点均不表达,而W6023在3个时间点均大量表达,且无明显变化趋势,说明3个基因不受P6诱导表达。ZW23在IR24中各个时间点均不表达,在W6023中0 d表达很弱,1 d表达最高,到2 d时表达有所下降,受P6诱导表达。ZW22在W6023中表达量随接种时间0 d、1 d和2 d逐渐增高,而在IR24中表达量很低,可能与抗病相关,且受P6诱导表达。对ZW22、ZW23和ZW31分别设计用于qRT-

PCR扩增基因引物,得到结果与RT-PCR扩增结果趋势一致(图6B)。

挑选转录组测序中在感病材料IR24中表达量较高而在抗病材料W6023中表达量低或不表达的3个基因,编号分别为ZW24、ZW26和ZW28,分别设计基因特异引物进行RT-PCR及qRT-PCR扩增,得到结果与转录组测序结果一致(图6A、B)。这些结果表明本研究获得的转录组测序数据结果是可靠的。



A:9个差异表达基因的RT-PCR检测;B:6个差异表达基因的qRT-PCR检测

A:RT-PCR analysis of nine selected DEGs,B;qRT-PCR analysis of six selected DEGs

图6 差异表达基因RT-PCR和qRT-PCR检测

Fig. 6 RT-PCR and qRT-PCR analysis on DEGs

### 3 讨论

虽然目前已经报道有 41 个水稻白叶枯病抗性基因,但多数基因抗谱狭窄或为隐性,被育种利用的较少。由于病原菌致病性变异使抗病基因面临抗性丧失的风险,挖掘新的抗病基因成为长期的策略。本课题组长期从事新基因的挖掘,一般采取的策略是首先对新资源材料进行抗谱鉴定,如果抗谱广,才能对育种有利用价值,再进行深入研究,如分子定位、克隆及转录组分析等。

本研究材料 W6023 是以普通野生稻资源为供体逐步导入到感病品种 IR24 中培育成的 BC<sub>4</sub>F<sub>6</sub>。前期对 W6023 的遗传分析表明其含有的抗性基因为显性,因此用 25 个国内外包括菲律宾、日本、韩国、孟加拉及中国的代表菌株对 W6023 及已知的 18 个显性基因材料进行抗谱分析。结果显示 W6023 只对 2 个菌株表现亲和(不抗病),对其他 23 个菌株高度抗病,说明其具有广谱抗性,且与已知抗白叶枯病基因的抗谱都不同,暗示 W6023 可能含有新的抗病基因。本课题组曾构建 IR24 与 W6023 的杂交作图群体,试图通过图位克隆的方法克隆 W6023 含有的抗病基因。杂交 F<sub>1</sub> 表现抗病,表明含有显性抗病基因,但 F<sub>2</sub> 群体不是很好符合 3:1,暗示其不只含有一个抗病基因。

转录组测序技术与水稻基因组测序数据为挖掘新基因提供了新的途径。利用测序获得的序列与数据库中的信息进行比对,可能挖掘新的基因并预测其功能。本研究利用转录组测序技术对白叶枯病菌诱导后的野生稻基因导入系 W6023 及其轮回亲本 IR24 进行了转录组测序及功能分析,共检测到 203 个表达差异达到显著水平的基因,约占水稻表达基因总数的 0.58%,W6023 中的上调基因多于 IR24。两材料间筛选出的显著差异表达基因数量较少,可能原因是 W6023 是 IR24 高代回交后代,二者具有极为相似的遗传背景。

在这些显著差异表达的基因中预测到 16 个类抗病相关基因,其中 NBS-LRR 类抗病蛋白最多,该类蛋白含有核苷酸识别功能域(nucleotide-binding domains)和亮氨酸串联重复结构(leucine-rich repeats),是水稻已知抗病基因的主要类型<sup>[20]</sup>,例如已经克隆的 26 个抗稻瘟病基因中有 24 个属于此类<sup>[21]</sup>,抗白叶枯病基因 *Xa1* 也属于此类<sup>[22]</sup>。其次是受体激酶类,多数受体激酶由胞外受体结构域、跨膜结构域和胞内激酶结构域 3 个结构域组成,其中

胞外结构域的功能是识别和接收信号,跨膜结构域的功能是使蛋白定位于质膜上,并将识别的信号传递给胞内的激酶结构域,而胞内激酶结构域能够通过磷酸化作用将信号传递给下一级信号传递体<sup>[23]</sup>。因此它们可以识别并响应外来病原物以及植物内源信号刺激,如细菌鞭毛蛋白、真菌几丁质、脂类和糖类等进而诱导植物的抗病免疫反应<sup>[24-25]</sup>,如抗白叶枯病基因 *Xa21* 和 *Xa26* 均属于受体激酶类<sup>[26]</sup>。转录组测序的结果中检测到一个 *RPM1* 基因,该抗病基因在拟南芥中与过敏反应相关<sup>[27]</sup>。

本研究检测到 14 个与过氧化物的代谢相关基因,如谷胱甘肽过氧化酶、金属硫蛋白和漆酶蛋白前体等。许多研究证明,过氧化物酶的活性与植物的抗病性成正相关。即抗病品种和感病品种同时接种过后,抗病品种中的过氧化酶活性迅速升高,而感病品种中则没有变化,或活性升高的时间被滞后<sup>[28]</sup>。H. Bai 等<sup>[29]</sup>在研究 *Xa21* 基因介导的抗病性反应蛋白表达谱中发现,在抗病反应过程中谷胱甘肽 S 转移酶(GST)表达上调,即 GST 在抗性反应中是正调节。同时 C. W. Kao 等<sup>[30]</sup>在研究白菜根系发育过程中发现谷胱甘肽 S 转移酶基因(*BcGSTU*)在拟南芥里表达可以提高根和茎的生长,而且在生物与非生物胁迫下表现出更好的性能。金属硫蛋白可以在植物体内转运重金属并解除其毒性,参与植物多种胁迫抗性的形成和活性氧清除,是植物抗逆过程中的重要信号。例如 S. Jin 等<sup>[31]</sup>将编码水稻类金属硫蛋白 *rgMT* 基因转入到拟南芥后使种子的发芽力显著提高,暗示水稻 *rgMT* 基因可以提高拟南芥对盐和过氧化氢的忍耐力。H. Y. Cho 等<sup>[32]</sup>将来自水稻的漆酶蛋白前体基因 *OsChi1* 在拟南芥中过表达,也可以增加拟南芥对干旱和盐胁迫的耐受性。

植物在遭受病原菌入侵时,一部分转录因子被激活,进而调控下游防御反应基因的表达。与植物逆境反应相关的转录因子有多种,包括 WRKY、MYB、ERF、NAC 和 RAV 等。在病原菌诱导的植物防御反应中,WRKY 转录因子起了很重要的调控作用。如 *WRKY45*、*WRKY13* 和 *WRKY42* 的转录调控对水稻抗稻瘟病起着关键的作用<sup>[33]</sup>,水稻中 *OsWRKY62*、*WRKY76* 被沉默后水稻对病原菌的抗性增强<sup>[34]</sup>。NAC 转录因子是植物中最大的一类转录因子,水稻基因组中有 151 个成员<sup>[35]</sup>,孙利军等<sup>[36]</sup>对 *OsNAC* 基因表达谱分析时,分离了 21 个 *OsNAC* 基因,用 SA、JA 和 ACC 处理分析稻瘟病和白叶枯病菌等病原物侵染后的基因表达模式,结果表明这些基因通

过不同的信号途径参与水稻对稻瘟病菌和白叶枯病菌的响应。F. Wang 等<sup>[37]</sup>研究表明, *TaNAC1* 是一种新型的 NAC 组 NAC 成员, 负调控植物的抗病性, 并可以调节植物的 JA 和 SA 信号防御途径。本研究在抗、感病材料之间检测到表达量差异较大的 6 个转录因子, 涉及 WRKY、RAV、NAC、CO-like 和 FAR1 5 个家族, 在这 6 个转录因子中只有 NAC 在 W6023 中是上调表达, 其余 5 个下调表达, 结果与上述研究结果类似。

信号传导途径涉及很多种类, 包括钙离子信号途径、JA 信号途径、SA 信号途径和乙烯信号途径等。本研究检测到 18 个信号传导相关基因, 包括钙离子信号途径的钙调素结合蛋白和钙转运 ATP 酶、受 JA 诱导的萜类合成酶和酰基 CoA 氧化酶、以糖作为信号分子的糖基转移酶等。这些基因可能作为信号分子参与介导植物抵抗病原菌的防御反应。X. Grand 等<sup>[38]</sup>研究发现一个钙调素结合蛋白 CaMBP 在水稻生长过程中正向调控水稻稻瘟病抗性。X. Zheng 等<sup>[39]</sup>在 2004 年就鉴定出一个钙调素结合蛋白与稻瘟病抗性相关。S. S. Rao 等<sup>[40]</sup>在大豆中过表达钙调素基因 *GmCaM4* 可以增强抗病性和耐盐性。植物生长发育过程中会合成大量萜类化合物, 其中多数具有挥发性。挥发性萜类化合物也可以作为信号介导植物抵抗病原菌的防御反应。S. Taniguchi 等<sup>[41]</sup>从水稻中分离了受 JA 诱导的萜类合成酶, 诱导后产生  $\beta$  榄香烯和  $\beta$  没药烯, 具有显著的抗稻瘟病活性, 但对白叶枯病不产生抗性。K. Yoshitomi 等<sup>[42]</sup>发现水稻受 OsTSP24 萜烯合成酶诱导产生单萜  $\gamma$ -松油烯, 而 OsTSP24 萜烯合成酶的合成同时受到 JA 的诱导。 $\gamma$ -松油烯大量增加, 破坏了白叶枯病菌的细胞膜, 导致白叶枯病致病力下降。因此  $\gamma$ -松油烯在 JA 诱导的抗白叶枯病中起着非常重要的作用。植物糖基转移酶在植物细胞中广泛存在, 部分糖基转移酶通过使植物中次级代谢产物糖基化从而保护植物免受病原菌的侵蚀<sup>[43]</sup>。如林凡云等<sup>[44]</sup>从小麦 (*Triticum aestivum* L.) 中鉴定出一个与植物次级代谢产物修饰有关的糖基转移酶 TaUGT2, 它不仅受赤霉病菌诱导表达, 还可能参与了小麦对盐胁迫的响应。M. Langlois-Meurinne 等<sup>[45]</sup>从拟南芥 D 组糖基转移酶中筛选出 UGT73B3 和 UGT73B5, 发现缺失这 2 种糖基转移酶的突变株对番茄丁香假单胞致病菌的抗性减弱。C. Simon 等<sup>[46]</sup>又进一步证明 UGT73B3 和 UGT73B5 能够增加活性氧 (ROS) 的积累, 提高对番茄丁香假单胞菌

无毒基因 (*Pst-AvrRpm1*) 的过敏性坏死反应。因此糖基转移酶在植物抗病中起着重要作用。

植物抗病受多种因素影响, 本研究通过病原菌诱导抗病和感病材料, 经转录组测序后获得了不同类型的差异表达基因。通过 RT-PCR、qRT-PCR 对部分显著差异表达的基因进行验证, 不管是对抗病材料还是感病材料, 均与测序结果一致, 表明测序所获得的数据是可靠的, 为下一步挖掘抗病相关基因提供了信息。

#### 参考文献

- [1] Mew T. Current status and future prospects of research on bacterial blight of rice [J]. *Annu Rev Phytopathol*, 1987, 25(1): 359-382
- [2] Nino-Liu D O, Ronald P C, Bogdanove A J. *Xanthomonas oryzae* pathovars: model pathogens of a model crop [J]. *Mol Plant Pathol*, 2006, 7(5): 303-324
- [3] 姬广海, 张世光, 钱君. 云南水稻白叶枯病菌生理小种初析 [J]. *植物保护*, 2003, 29(1): 19-21
- [4] 曾列先, 朱小源, 杨健源, 等. 广东水稻白叶枯病菌新致病型的发现及致病性测定 [J]. *广东农业科学*, 2005(2): 58-59
- [5] Brown J W, Calixto C P, Zhang R. High-quality reference transcript data sets hold the key to transcript-specific RNA-sequencing analysis in plants [J]. *New Phytol*, 2016, 9: 1-5
- [6] Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics [J]. *Nat Rev Genet*, 2009, 10(1): 57-63
- [7] Kim K H, Kang Y J, Kim D H, et al. RNA-Seq analysis of a soybean near-isogenic line carrying bacterial leaf pustule-resistant and-susceptible alleles [J]. *DNA Res*, 2011, 18(6): 483-497
- [8] Xu L, Zhu L, Tu L, et al. Lignin metabolism has a central role in the resistance of cotton to the wilt fungus *Verticillium dahliae* as revealed by RNA-Seq-dependent transcriptional analysis and histochemistry [J]. *J Exp Bot*, 2011, 62(15): 5607-5621
- [9] Strauß T, Van Poecke R M, Strauß A, et al. RNA-seq pinpoints a *Xanthomonas* TAL-effector activated resistance gene in a large-crop genome [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(47): 19480-19485
- [10] Yang K, Rong W, Qi L, et al. Isolation and characterization of a novel wheat cysteine-rich receptor-like kinase gene induced by *Rhizoctonia cerealis* [J]. *Sci Rep*, 2013, 3(3): 255-266
- [11] He B, Tao X, Gu Y, et al. Transcriptomic analysis and the expression of disease-resistant genes in *Oryza meyeriana* under native condition [J]. *PLoS One*, 2015, 10(12): e0144518
- [12] Wang C, Fan Y, Zheng C, et al. High-resolution genetic mapping of rice bacterial blight resistance gene *Xa23* [J]. *Mol Genet Genomics*, 2014, 289(5): 745-753
- [13] Kauffman H, Reddy A, Hsieh S, et al. Improved technique for evaluating resistance of rice varieties to *Xanthomonas oryzae* [J]. *Plant Dis Rep*, 1973, 57: 537-541
- [14] Amante-Bordeos A, Sitch L, Nelson R, et al. Transfer of bacterial blight and blast resistance from the tetraploid wild rice *Oryza minuta* to cultivated rice, *Oryza sativa* [J]. *Theor Appl Genet*, 1992, 84(3-4): 345-354
- [15] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408
- [16] Gu K, Tian D, Yang F, et al. High-resolution genetic mapping of *Xa27* (*t*), a new bacterial blight resistance gene in rice, *Oryza sativa* L. [J]. *Theor Appl Genet*, 2004, 108(5): 800-807
- [17] Zhang F, Zhuo D L, Huang L Y, et al. *Xa39*, a novel dominant gene conferring broad-spectrum resistance to *Xanthomonas oryzae*

- pv. *oryzae* in rice [J]. *Plant Pathol*, 2015, 64(3): 568-575
- [18] Hutin M, Sabot F, Ghesquière A, et al. A knowledge-based molecular screen uncovers a broad-spectrum OsSWEET14 resistance allele to bacterial blight from wild rice [J]. *Plant J*, 2015, 84(4): 694-703
- [19] Choisine N, Demange N, Orjeda G, et al. The sequence of rice chromosomes 11 and 12, rich in disease resistance genes and recent gene duplications [J]. *BMC Biol*, 2005, 3(1): 20
- [20] Zipfel C, Rathjen J P. Plant immunity: AvrPto targets the frontline [J]. *Curr Biol*, 2008, 18(5): 218-220
- [21] Fukuoka S, Yamamoto S I, Mizobuchi R, et al. Multiple functional polymorphisms in a single disease resistance gene in rice enhance durable resistance to blast [J]. *Sci Rep*, 2014, 4(4): 4550
- [22] Yoshimura S, Yamanouchi U, Katayose Y, et al. Expression of *Xa1*, a bacterial blight-resistance gene in rice, is induced by bacterial inoculation [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(4): 1663-1668
- [23] Stone J M, Walker J C. Plant protein kinase families and signal transduction [J]. *Plant Physiol*, 1995, 108(2): 451-457
- [24] Chen X, Ronald P C. Innate immunity in rice [J]. *Trends Plant Sci*, 2011, 16(8): 451-459
- [25] Liu B, Li J F, Ao Y, et al. Lysin motif - containing proteins LYP4 and LYP6 play dual roles in peptidoglycan and chitin perception in rice innate immunity [J]. *Plant Cell*, 2012, 24(8): 3406-3419
- [26] Song W Y, Pi L Y, Wang G L, et al. Evolution of the rice *Xa21* disease resistance gene family [J]. *Plant Cell*, 1997, 9(8): 1279-1287
- [27] Kawasaki T, Nam J, Boyes D C, et al. A duplicated pair of *Arabidopsis* RING-finger E3 ligases contribute to the RPM1- and RPS2-mediated hypersensitive response [J]. *Plant J*, 2005, 44(2): 258-270
- [28] Joseph L M, Koon T T, Man W S. Antifungal effects of hydrogen peroxide and peroxidase on spore germination and mycelial growth of *Pseudocercospora* species [J]. *Can J Bot*, 1998, 76(12): 2119-2124
- [29] Bai H, Lan J P, Gan Q, et al. Identification and expression analysis of components involved in rice Xa21-mediated disease resistance signalling [J]. *Plant Biol (Stuttg)*, 2012, 14(6): 914-922
- [30] Kao C W, Bakshi M, Sherameti I, et al. A Chinese cabbage (*Brassica campestris* subsp. *chinensis*)  $\tau$ -type glutathione-S-transferase stimulates *Arabidopsis* development and primes against abiotic and biotic stress [J]. *Plant Mol Biol*, 2016, 92(6): 643-659
- [31] Jin S, Sun D, Wang J, et al. Expression of the *rgMT* gene, encoding for a rice metallothionein-like protein in *Saccharomyces cerevisiae* and *Arabidopsis thaliana* [J]. *J Genet*, 2014, 93(3): 709-718
- [32] Cho H Y, Lee C, Hwang S G, et al. Overexpression of the *OsChII* gene, encoding a putative laccase precursor, increases tolerance to drought and salinity stress in transgenic *Arabidopsis* [J]. *Gene*, 2014, 552(1): 98-105
- [33] Cheng H, Liu H, Deng Y, et al. The WRKY45-2 WRKY13 WRKY42 transcriptional regulatory cascade is required for rice resistance to fungal pathogen [J]. *Plant Physiol*, 2015, 167(3): 1087-1099
- [34] Liu J, Chen X, Liang X, et al. Alternative splicing of rice WRKY62 and WRKY76 transcription factor genes in pathogen defense [J]. *Plant Physiol*, 2016, 171(2): 1427-1442
- [35] Nuruzzaman M, Manimekalai R, Sharoni A M, et al. Genome-wide analysis of NAC transcription factor family in rice [J]. *Gene*, 2010, 465(1): 30-44
- [36] 孙利军, 李大勇, 张慧娟, 等. NAC 转录因子在植物抗病和抗非生物胁迫反应中的作用 [J]. *遗传*, 2012, 34(8): 993-1002
- [37] Wang F, Lin R, Feng J, et al. TaNAC1 acts as a negative regulator of stripe rust resistance in wheat, enhances susceptibility to *Pseudomonas syringae*, and promotes lateral root development in transgenic *Arabidopsis thaliana* [J]. *Front Plant Sci*, 2015, 6(108): 1-15
- [38] Grand X, Espinoza R, Michel C, et al. Identification of positive and negative regulators of disease resistance to rice blast fungus using constitutive gene expression patterns [J]. *Plant Biotechnol J*, 2012, 10(7): 840-850
- [39] Zheng X, Chen X, Zhang X, et al. Isolation and identification of a gene in response to rice blast disease in rice [J]. *Plant Mol Biol*, 2004, 54(1): 99-109
- [40] Rao S S, El-Habbak M H, Havens W M, et al. Overexpression of GmCaM4 in soybean enhances resistance to pathogens and tolerance to salt stress [J]. *Mol Plant Pathol*, 2014, 15(2): 145-160
- [41] Taniguchi S, Miyoshi S, Tamaoki D, et al. Isolation of jasmonate-induced sesquiterpene synthase of rice; product of which has an antifungal activity against *Magnaporthe oryzae* [J]. *J Plant Physiol*, 2014, 171(8): 625-632
- [42] Yoshitomi K, Taniguchi S, Tanaka K, et al. Rice terpene synthase 24 (OsTPS24) encodes a jasmonate-responsive monoterpene synthase that produces an antibacterial  $\gamma$ -terpinene against rice pathogen [J]. *J Plant Physiol*, 2016, 191: 120-126
- [43] Dixon R A. Natural products and plant disease resistance [J]. *Nature*, 2001, 411(6839): 843-847
- [44] 林凡云, 陆琼娟, 徐剑宏, 等. 两个与盐和赤霉菌胁迫相关的小麦糖基转移酶基因的克隆与表达 [J]. *遗传*, 2008, 30(12): 1608-1614
- [45] Langlois-Meurinne M, Gachon C M, Saindrenan P. Pathogen-responsive expression of glycosyltransferase genes UGT73B3 and UGT73B5 is necessary for resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 2005, 139(4): 1890-1901
- [46] Simon C, Langlois-Meurinne M, Didierlaurent L, et al. The secondary metabolism glycosyltransferases UGT73B3 and UGT73B5 are components of redox status in resistance of *Arabidopsis* to *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* [J]. *Plant Cell Environ*, 2014, 37(5): 1114-1129