

研究报告

Research Reports

乙烯信号传导途径因子 OsEIL6 调控水稻抗稻瘟病反应

赵玉丹[#], 朱晓颖[#], 徐国娟, 王旭丽^{*}

(中国农业科学院植物保护研究所, 植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100193)

摘要 稻瘟病(rice blast)是水稻生产上最严重的病害之一。抗病相关基因的挖掘对稻瘟病的防治具有重要意义。研究表明植物 *EIN3/EIL* 家族基因在抗病过程中发挥着重要作用。本研究采用 RNAi 技术探究 *OsEIL6* 参与的水稻抗稻瘟病反应。稻瘟菌侵染时基因表达谱检测结果表明, *OsEIL6* 在水稻和稻瘟菌非亲和组合中受到诱导表达。稻瘟菌接种结果显示, 水稻 *OsEIL6* 沉默株系和野生型植株‘TG394’相比抗性下降; 实时荧光定量 RT-PCR 结果分析表明, *OsEIL6* 的表达量下降导致乙烯合成途径中 *OsACO1* 和乙烯信号传导途径的 *OsERF063* 和 *OsERF073* 的转录水平下降。亚细胞定位研究发现该基因定位于水稻细胞质。 *OsEIL6* 沉默株系中 ROS 合成途径标记基因 *OsrbohA* 和 *OsrbohB* 的表达量均明显下调, 表明该基因可能通过影响 ROS 的合成调控水稻抗稻瘟病反应。本研究结果将有助于进一步揭示 *OsEIL6* 参与的乙烯信号传导途径介导的水稻抗稻瘟病反应机制。

关键词 水稻; 稻瘟病; 抗病性; 乙烯; *OsEIL6*

中图分类号: S 432.1 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2020153

OsEIL6 is involved in regulating rice resistance to *Magnaporthe oryzae*

ZHAO Yudan[#], ZHU Xiaoying[#], XU Guojuan, WANG Xuli^{*}

(State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract Rice blast is one of the most destructive rice diseases. Understanding the function of rice immune responsive genes to the blast fungus *Magnaporthe oryzae* is essential for effective disease management. Previous research revealed that *ethylene-insensitive 3 (EIN3) /ethylene-insensitive 3-like (EIL)* gene plays essential roles in plant defense responses. In this study, we investigated the role of *OsEIL6* in rice resistance to *M. oryzae*. Expression of *OsEIL6* was significantly induced in rice after infection with an incompatible blast isolate C9240. Silencing of *OsEIL6* in transgenic rice enhanced plant susceptibility to *M. oryzae*. Quantitative RT-PCR assays showed that the transcript levels of *OsACO1* in ethylene biosynthesis, and two key downstream genes, *OsERF063* and *OsERF073*, in ethylene signaling pathways, were down-regulated in the *OsEIL6*-RNAi plants. Subcellular localization analyses showed that the *OsEIL6* protein was localized in the cytoplasm of rice cells. In addition, the expression levels of *OsrbohA* and *OsrbohB*, two key genes for ROS biosynthesis, were down-regulated in the *OsEIL6*-RNAi plants, suggesting that *OsEIL6* may mediate rice resistance by affecting the ROS production. Our findings will contribute to further understanding of the mechanism of *OsEIL6*-mediated resistance to *M. oryzae*.

Key words *Oryza sativa*; rice blast; disease resistance; ethylene; *OsEIL6*

水稻是最重要的粮食作物之一,世界上有超过一半的人口以其为主粮^[1]。因此,水稻的丰产、稳产对粮食安全具有极其重要的战略意义。水稻稻瘟病危害重、防治难,已成为影响水稻丰产稳产的关键因

素。据统计,全球由于稻瘟病危害造成的产量损失高达水稻年总产的 10%~30%^[2-3]。目前,防治稻瘟病最为经济有效和环保的措施是种植抗病品种,而抗病品种的培育则依赖于全面深入认识水稻抗病机理。

收稿日期: 2020-03-26

修订日期: 2020-05-06

基金项目: 国家自然科学基金(31671984,31471737); 转基因生物新品种培育科技重大专项(2012ZX08009001)

* 通信作者 E-mail: wangxuli@caas.cn

为并列第一作者

为了抵御病原物的入侵,植物进化出两个层次的免疫反应 PTI(PAMP-triggered immunity)和 ETI(effector-triggered immunity)^[4]。而在 PTI 和 ETI 所激活的下游免疫反应中,激素信号途径发挥着重要作用,其中乙烯(ethylene, ET)信号扮演重要角色^[1, 4]。乙烯是一种小分子气体植物激素,参与调控植物生命活动的许多过程,如促进叶片和果实成熟,以及植物对生物和逆境胁迫的反应等。在模式植物拟南芥中,结合遗传学、生物化学和分子生物学等技术,科学家们发现了一条近乎线性的乙烯信号传导途径^[5]。近年来,在水稻中也相继鉴定了乙烯信号传导的关键因子,解析了水稻乙烯信号传导途径^[6]。研究表明组氨酸激酶(histidine kinase)家族类受体蛋白识别乙烯后可失去对 OsCTR1 的抑制,随后触发转录因子 EIN2(ethylene insensitive 2)及其下游 EIN3/EIL(ethylene insensitive 3/EIN3-like)介导的级联反应^[7]。最近,Zhao 等在水稻中鉴定了一个乙烯信号传导的新组分—MHZ1/OsHK1,其介导一条平行于 OsEIN2-OsEIL1 通路的乙烯信号传导新途径,但乙烯对 MHZ1 转录的促进仍然依赖于 OsEIL1^[8]。综上,EIN3/EIL 家族基因处于乙烯信号传导的中枢位置,决定着乙烯下游响应基因的表达。

EIN3/EIL 家族基因在调控植物的抗病反应中发挥着重要作用^[9-11]。在拟南芥中 EIN3 和 EIL1 可抑制 SA 合成基因 ICS/SID2 的表达,导致 SA 合成量减少,负调控拟南芥对丁香假单胞菌 *Pseudomonas syringae* 的抗性^[9]。其次,EIN3 和 EIL1 可通过与 JA 信号通路的 MYC2 蛋白相互作用,整合 ET 和 JA 信号,正调控拟南芥对灰葡萄孢 *Botrytis cinerea* 的抗性^[10]。水稻该家族基因 OsEIL1 表达量的下降可引起乙烯含量的下降和对稻瘟病抗性的减弱,OsEIL1 通过靶标 ROS 和茉莉酸(jasmonate, JA)合成的关键酶基因来介导其正向调控水稻抗稻瘟病反应^[11]。由此可见,EIN3/EIL 家族基因既可正调控又可负调控植物抗病反应,其作用结果与病菌和寄主间相互作用的具体特点有关。水稻基因组 EIN3/EIL 家族共有 6 个基因 OsEIL1-6^[12-13],本实验室报道了 OsEIL2 参与调控水稻抗纹枯病反应^[14],进一步检测发现 OsEIL6 的表达受稻瘟菌诱导。本研究将探究 OsEIL6 参与调控的水稻抗稻瘟病反应,研究结果将有助于阐明水稻中乙烯信号途径所参与的抗病反应过程,并可为水稻稻瘟病防控提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

水稻品种‘日本晴’以及稻瘟菌亲和小种 RO1-1 和非亲和小种 C9240 为本实验室保存,转化用水稻品种‘泰粳 394’(‘TG394’)为扬州大学左思敏老师惠赠。试验所用亚细胞定位载体 pYBA-1132 和蛋白表达载体 pRTV-nHA 均为本实验室保存。引物合成和测序由北京擎科生物公司完成。

1.2 试验方法

1.2.1 载体构建

根据 MSU (<http://rice.plantbiology.msu.edu/>)数据库中的 OsEIL6 基因序列,设计特异性引物 OsEIL6-F 和 OsEIL6-R(表 1)扩增获得 OsEIL6 基因全长。

为了确定 OsEIL6 的亚细胞定位,设计特异性引物 pYBA1132-OsEIL6-F 和 pYBA1132-OsEIL6-R(表 1)扩增获得带有酶切位点的片段,采用同源重组的方法将扩增得到的片段连接到融合 GFP 标签的表达载体 pYBA1132 上,获得亚细胞定位表达载体 pYBA1132-OsEIL6。

表 1 文中所用引物列表¹⁾
Table 1 Primers used in this study

引物名称 Primer name	正向引物序列(5'-3') Forward primers	反向引物序列(5'-3') Reverse primers	用途 Purpose
OsEIL6	ATGGACGACAAAGGCAAAGCC	CTAATCCGAGCTCGACCCCCAG	OsEIL6 基因克隆
pYBA1132-OsEIL6	GAGCTCCACCGCGGTGGCGGCCGC ATGGACGACAAAGGCAAAGCC	GATAAGCTTGATATCGAATTCATC- CGAGCTCGACCCCCAG	OsEIL6 亚细胞定位载体 构建
pRTV-nHA-OsEIL6	TACGCTGGATCCCCGGGTGAGCTC ATGGACGACAAAGGCAAAGCC	ACGATCTACTCACTTAGCGGCCGC CTAATCCGAGCTCGACCCCCAG	OsEIL6 蛋白原核表达载体 构建
OsEIL6-qRT	CGACCTGAAGAAGCGGAT	TCCACGATGCCGTACACG	OsEIL6 基因沉默效果检测
OsACO1	GCAGGTACAAGAGCGTGATG	TGCCAGGGTTGTAGAAGGAC	OsACO1 基因表达量检测
OsERF063	ACGTGATGGACAGCCTCCTC	GGGAAGTCTGAAATGGACATG	OsERF063 基因表达量检测
OsERF073	AATGATAATCAAGGCACCAC	ACCCGAATAAGTGTGATAAC	OsERF073 基因表达量检测
OsrbohA	TTCATCAGCAGCAACAAGGCC	TGCTGCCAGATCTCGCGGAG	OsrbohA 基因表达量检测
OsrbohB	TACTTCTACTGGGTGACGAG	TCTTCACACTAGTTCCCGAC	OsrbohB 基因表达量检测
Ubi-qRT	AAGAAGCTGAAGCATCCAGC	TGCTGGACCCGACTCATCATA	水稻内参基因 Ubiquitin 表 达量检测

1) 划线部分为酶切位点, NotI; GCGGCCGC, EcoRI; GAATTC, SacI; GAGCTC。
Underline sequences are cleavage sites of restriction enzyme. NotI; GCGGCCGC, EcoRI; GAATTC, SacI; GAGCTC.

为了表达和纯化 OsEIL6 蛋白,用特异性引物 pRTV-nHA-OsEIL6-F 和 pRTV-nHA-OsEIL6-R (表 1)扩增获得带有酶切位点的片段,同源重组连接到载体 pRTV-nHA 上,获得蛋白表达载体 pRTV-nHA-OsEIL6。

1.2.2 水稻转基因材料的单拷贝纯合株系的获得

按照 Park 等^[15]的试验方法,将供试的水稻材料种子经表面消毒后放置于 1/2 MS 培养基上进行催芽。在 T2 代培养时,选取阳性株和阴性株比例为 3:1 的转基因株系,铺种于含有潮霉素的 1/2 MS 培养基上生长,筛选出阳性率为 100% 的转基因株系即为单拷贝纯合株系,用于后续的接种试验。

1.2.3 稻瘟菌接种与病情调查

参照 Yang 等^[11]的方法,并略作改动。选用培养 3 周的水稻苗用于接种。将配制好的浓度为 1.2×10^5 个/mL 的供试菌株孢子悬浮液均匀地喷洒在叶片表面,26~28℃ 条件下黑暗保湿培养 24 h 后,转入光照条件下继续培养,7 d 左右调查病情。采用 Photoshop 软件对所有拍照病叶进行病斑面积计算,并通过 GraphPad Prism 软件对数据进行分析作图,进行多重比较和单因素方差分析。

1.2.4 RNA 提取、反转录及 qRT-PCR 分析

采用 Trizol 法提取水稻叶片总 RNA,用 DNase I 去除 DNA 后用反转录试剂盒(Promega)反转录为 cDNA。选用 ABI-7500 型荧光定量 PCR 仪进行定量检测。qRT-PCR 的体系为: $2 \times$ SYBR Premix *ExTaq* 10 μ L,稀释后的 cDNA 5 μ L,正反引物各 1 μ L,最后用 ddH₂O 补齐至 20 μ L。qRT-PCR 的程序为: 95℃ 30 s; 95℃ 15 s, 55℃ 30 s, 72℃ 30 s,反应共进行 48 个循环;继续进行熔解曲线反应(55℃, 81 个循环),检测产物的单一性。以 *Ubiquitin* 作为内参基因,根据相对阈值法($2^{-\Delta CT}$)计算基因的表达量,每个样品做 3 次重复,数据选取 3 次重复的平均值,通过 GraphPad Prism 软件进行多重比较和单因素方差分析。

1.2.5 水稻原生质体的制备与转化

‘日本晴’水稻种子经 75% 乙醇浸泡 1 min, 40% 次氯酸钠浸泡 30 min, 无菌水清洗 3 遍后,播种在 1/2 MS 培养基上,放置在 26~28℃ 培养箱黑暗培养 10 d 左右。按照 Zhang 等^[16]原生质体提取和亚细胞定位的方法,将获得的水稻黄化苗茎秆切

成长度为 0.5 mm 左右的茎段,随后转移至酶解液(1.0% 纤维素酶 RS, 0.5% 离析酶 R10, 0.6 mol/L 甘露醇, 10 mmol/L MES, pH 调至 5.7, 10 mmol/L CaCl₂ 和 0.1% BSA)中 28℃ 酶解 5~7 h, 40 μ m 尼龙筛过滤收集原生质体,利用 PEG 介导转化法将目的质粒转化到原生质体中,26~28℃ 培养箱中培养 18~24 h 后,激光共聚焦显微镜下观察拍照。

1.2.6 液相色谱-质谱联用 (liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS) 方法

利用 PEG 介导转化法将目的质粒 pRTV-nHA-OsEIL6 转化到水稻原生质体中,在原生质体中表达带有 HA 标签的 OsEIL6 蛋白,26~28℃ 培养箱中培养 16~24 h 后,利用非变性蛋白提取液提取水稻原生质体蛋白,利用免疫沉淀(IP)技术富集带有 HA 标签的 OsEIL6 蛋白,蛋白凝胶电泳 5 min 后回收胶条,送至中科新生命科技有限公司进行液相色谱-质谱联用(LC-MS)分析,鉴定混合物中的蛋白。

2 结果与分析

2.1 水稻 OsEIL6 在稻瘟病菌非亲和小种侵染时诱导表达

以‘日本晴’为材料,采用喷雾法分别接种稻瘟病菌亲和小种 RO1-1 和非亲和小种 C9240,并以清水处理为对照,检测 OsEIL6 在接种 0、12、24、48、72、96 h 和 120 h 的表达情况。如图 1a 所示,在非亲和小种 C9240 接种 12 h 时,OsEIL6 表达量显著升高,上调约 6 倍;而在亲和小种 RO1-1 接种时,OsEIL6 的表达量无明显变化。由此可见,水稻基因 OsEIL6 在稻瘟病菌侵染时被诱导表达。

2.2 OsEIL6-RNAi 转基因材料基因沉默效果鉴定

通过实时荧光定量 RT-PCR 的方法对获得的 OsEIL6-RNAi 材料的基因沉默效果进行鉴定。如图 1b 所示。与野生型‘TG394’水稻相比,OsEIL6 在 RNAi 转基因材料 3、5、6 号株系中的表达极显著下降,表明 OsEIL6 在其 RNAi 植株中的表达受到抑制。在继代培养的 T2 代获得了 OsEIL6-RNAi 转基因纯合株系,为后续的抗病性表型检测提供了可靠材料。

2.3 OsEIL6 在水稻抗稻瘟病反应中的作用

OsEIL6-RNAi 转基因材料对稻瘟菌抗性的鉴

定结果如图 1c,d 所示。接种稻瘟菌 7 d 后,与野生型‘TG394’水稻相比,OsEIL6-RNAi 纯合株系的叶片在病斑数量和病斑面积上都有明显的差异。OsEIL6-RNAi 转基因材料的病斑面积明显大于

‘TG394’,其中发病最严重的株系 OsEIL6-RNAi-3 的叶片病斑面积可达‘TG394’病斑面积的 2.5 倍(图 1d)。以上结果表明 OsEIL6 在水稻抗稻瘟病侵染过程中起着重要作用。

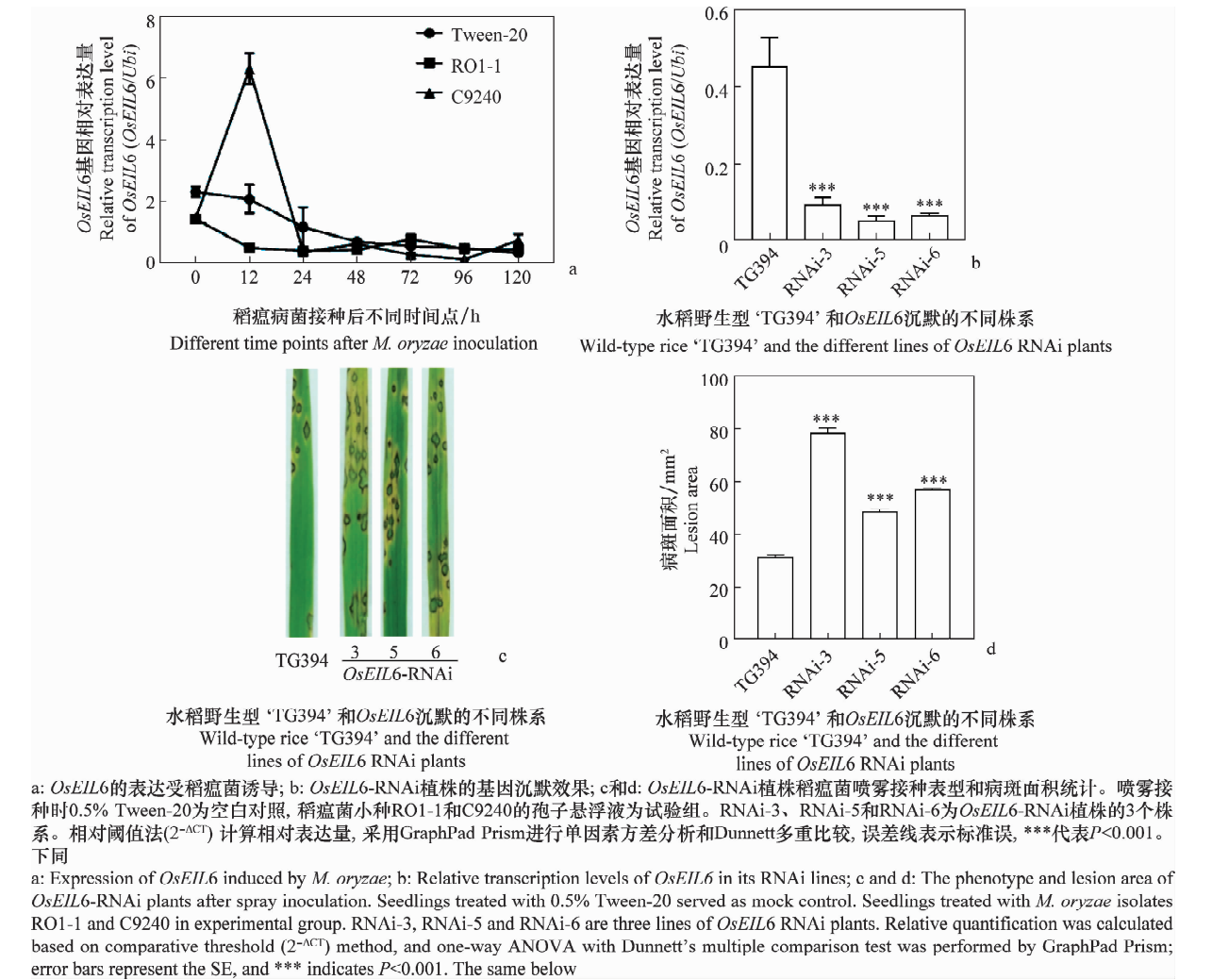


图 1 OsEIL6-RNAi 转基因材料对稻瘟病菌抗性减弱

Fig. 1 The reduced resistance of OsEIL6 RNAi plants to *Magnaporthe oryzae*

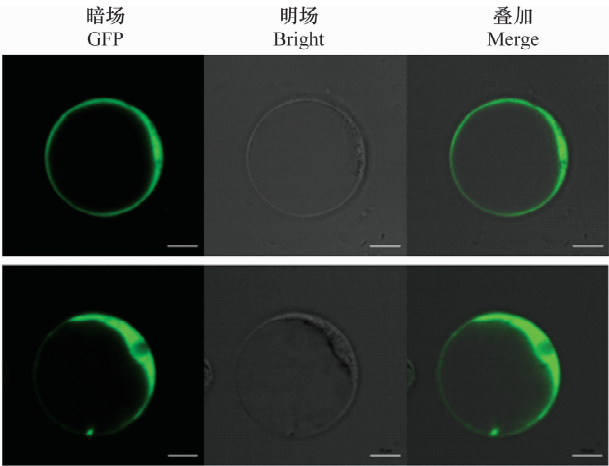
2.4 OsEIL6 定位于水稻细胞质

为了明确 OsEIL6 的功能,构建 OsEIL6 融合 GFP 标签的表达载体 pYBA1132-OsEIL6,转化水稻原生质体后进行激光共聚焦显微观察。结果显示空白载体 pYBA1132 的绿色荧光正常表达,并分布于全细胞(图 2)。经 pYBA1132-OsEIL6 侵染后的水稻原生质体,荧光特异性地出现在细胞质部位,而细胞核处未观察到荧光信号(图 2)。该结果表明 OsEIL6 定位于水稻原生质体的细胞质。

2.5 OsEIL6 正向调控乙烯信号途径基因的表达

为了揭示水稻中 OsEIL6 可能参与的抗病信号

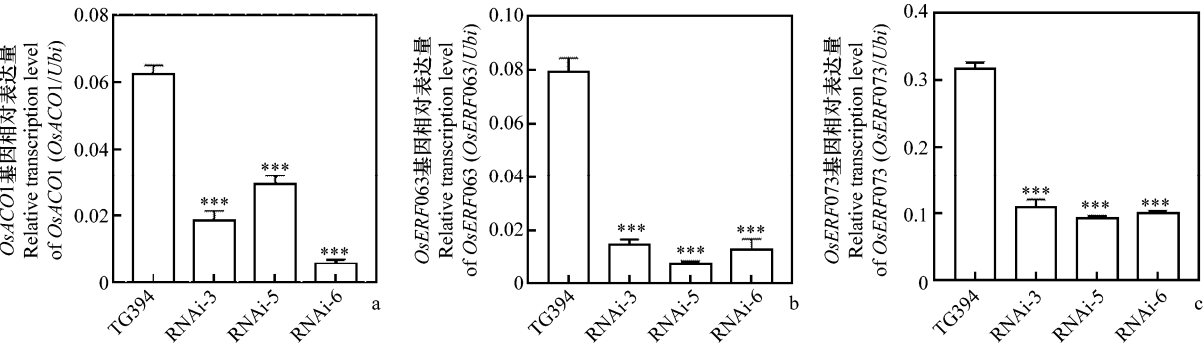
途径,本研究检测了乙烯合成途径标记基因 Os-ACO1(1-氨基环丙烷-1-羧酸氧化酶)和乙烯信号传导途径标记基因 OsERF063、OsERF073 在 OsEIL6 沉默材料中的转录水平。结果如图 3 所示,与‘TG394’相比,OsEIL6 基因沉默能不同程度的降低以上 3 个基因的表达量。其中 OsACO1 的表达量下降了 50%~80%(图 3a),OsERF063 和 OsERF073 的表达量也均显著下调(图 3b,c),其中 OsERF063 的表达量降低了 75%~80%。以上结果表明,OsEIL6 正向调控乙烯信号途径标记基因的表达。



将PYBA1132和PYBA1132-*OsEIL6*转化进水稻原生质体，18~24 h后采用共聚焦显微镜观察并拍照，标尺=10 μm
PYBA1132 and PYBA1132-*OsEIL6* were transformed into rice protoplasts which were imaged using confocal microscope after 18-24 h. Scale=10 μm

图 2 *OsEIL6* 在水稻原生质体中的亚细胞定位

Fig. 2 Subcellular localization of *OsEIL6* in rice protoplast



水稻野生型 ‘TG394’ 和*OsEIL6*沉默的不同株系
Wild-type rice ‘TG394’ and the different lines of *OsEIL6* RNAi plants

a: *OsACO1*在*OsEIL6*-RNAi植株中的表达情况; b和c: *OsERF063*和*OsERF073*在*OsEIL6*-RNAi植株中的表达情况
a: Expression of *OsACO1* in *OsEIL6*-RNAi transgenic plants; b and c: Expression of *OsERF063* and *OsERF073* in *OsEIL6*-RNAi transgenic plants

图 3 乙烯途径标记基因在 *OsEIL6*-RNAi 植株中的表达情况

Fig. 3 Marker genes expression of ET pathway in *OsEIL6* RNAi plants

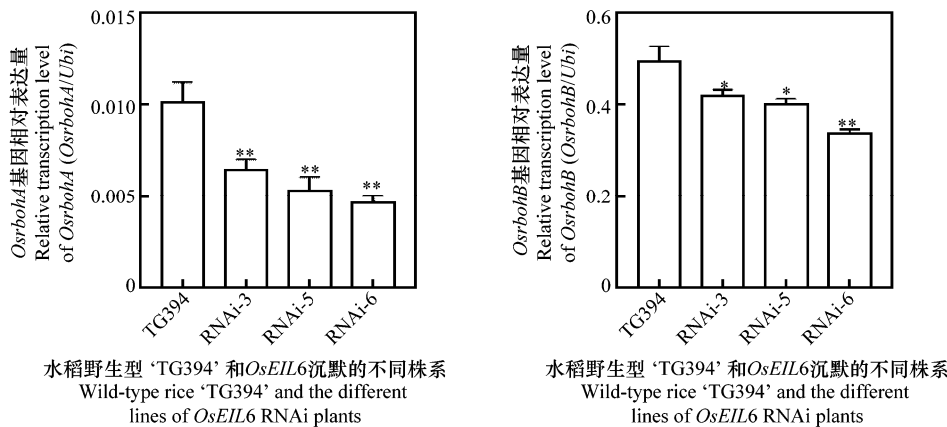
2.6 *OsEIL6* 正向调控水稻活性氧(ROS)合成途径基因的表达式

进一步检测 *OsEIL6* 沉默材料中 ROS 合成途径 NADPH 氧化酶基因 *OsrbohA* 和 *OsrbohB* 的转录水平,结果发现在 *OsEIL6*-RNAi 材料中,*OsrbohA* 和 *OsrbohB* 的表达量均有不同程度的下降,虽然 *OsrbohB* 表达量的下降程度低于 *OsrbohA*,但也达到了显著差异水平(图 4)。上述结果表明,*OsEIL6* 的沉默抑制活性氧合成途径关键酶基因表达,进而降低水稻对稻瘟病的抗性。

2.7 *OsEIL6* 的互作蛋白研究

本研究采用 LC-MS 的方法筛选 *OsEIL6* 在水

稻原生质体中的互作蛋白。质谱分析结果见表 2,共获得 10 个可能与 *OsEIL6* 互作的候选蛋白。通过基因序列信息和功能分析,发现 14-3-3 蛋白和 *OsWRKY29* 都是和植物抗病性直接相关的蛋白。另外,两个受体类蛋白质激酶(LOC_Os05g07740. 1 和 LOC_Os05g44930. 1)以及一个丝氨酸苏氨酸蛋白质激酶(LOC_Os01g66860. 4)很可能会通过磷酸化修饰调控 *OsEIL6* 的功能。而 F-box 类泛素连接酶(LOC_Os12g27750. 1)则可通过 26S 蛋白酶体降解途径调节 *OsEIL6* 的蛋白水平。后续将会进一步验证候选蛋白与 *OsEIL6* 之间的相互作用关系,以及研究它们参与水稻抗稻瘟病反应的功能。



a: *OsrbohA*在*OsEIL6*-RNAi植株中的表达情况; b: *OsrbohB*在*OsEIL6*-RNAi植株中的表达情况。*代表*P*<0.05, **代表*P*<0.01
a: Expression of *OsrbohA* in *OsEIL6*-RNAi transgenic plants; b: Expression of *OsrbohB* in *OsEIL6*-RNAi transgenic plants. * indicates *P*<0.05, ** indicates *P*<0.01

图 4 *OsrbohA* 和 *OsrbohB* 在 *OsEIL6*-RNAi 植株中的表达情况

Fig. 4 The expression of *OsrbohA* and *OsrbohB* in *OsEIL6* RNAi plants

表 2 LC-MS 筛选获得的 *OsEIL6* 互作蛋白

Table 2 Summary of *OsEIL6*-interacting proteins identified by LC-MS

基因号 Gene locus	基因注释 Annotation
LOC_Os01g05630.1	Core histone H2A/H2B/H3/H4 domain containing protein, putative, expressed
LOC_Os04g38870.3	14-3-3 protein, putative, expressed
LOC_Os05g07740.1	receptor-like protein kinase 2 precursor, putative, expressed
LOC_Os05g44930.1	receptor-like protein kinase, putative, expressed
LOC_Os07g02060.1	WRKY29, expressed
LOC_Os12g27750.1	OsFBX441-F-BOX domain containing protein, expressed
LOC_Os10g34960.1	ubiquitin family protein, putative, expressed
LOC_Os01g66860.4	serine/threonine protein kinase, putative, expressed
LOC_Os04g47220.1	aquaporin protein, putative, expressed
LOC_Os07g48800.1	VQ domain containing protein, putative, expressed(OsVQ31)

3 讨论

在水稻 6 个 *EIN3/EIL* 家族基因中^[12-13], *OsEIL1* 和 *OsEIL2* 与拟南芥 *EIN3* 的 *EIL1* 和 *EIL2* 亚族相似性最高, *OsEIL3* 和 *OsEIL4* 与 *SLIM1/EIL3* 关系密切, 可能有相同的功能, 而 *OsEIL5* 和 *OsEIL6* 与报道的 *EIL* 亲缘关系最远^[12]。本研究发现, *OsEIL6* 沉默材料中乙烯合成途径基因 *OsACO1* 以及乙烯信号传导途径基因 *OsERF063* 和 *OsERF073* 的表达量均显著下降, 且对稻瘟病抗性减弱, 表明 *OsEIL6* 参与了乙烯信号途径并正调控

水稻抗稻瘟病。这一研究结果和已报道的 *OsEIL1* 介导的水稻抗稻瘟病的功能相一致^[11, 17]。Yang 等报道 *OsEIL1* 超表达植株对稻瘟病抗性增强, Helliwell 等发现 *OsEIL1*-RNAi 植株对稻瘟病的抗性减弱, 表明 *OsEIL1* 正调控水稻抗稻瘟病。此外, Yang 等还发现 *OsEIL1* 作为转录因子可直接靶标 NADPH 氧化酶基因 *OsrbohA* 和 *OsrbohB* 的启动子区域并激活其转录, 从而调控 ROS 产生所参与的水稻对稻瘟病的抗性^[18]。本研究进一步检测了 *OsEIL6* 沉默材料中 ROS 合成途径标记基因 *OsrbohA* 和 *OsrbohB* 的表达情况, 发现其表达均有不同程度的下降。因此 *OsEIL6* 可能通过影响 ROS 的合成, 进而参与水稻的抗病反应过程。

一般来说, SA 信号传导途径能够帮助植株有效抵抗活体营养型病菌, 而植物抵抗死体营养型病菌则主要依赖于 ET 和 JA 信号途径^[19]。激素之间协同或拮抗的作用, 使植物体内的信号传导途径更加丰富, 所以当植物受到病原物侵染时可以快速精准地调控体内的防卫反应。在拟南芥中, 研究发现 *EIN3* 和 *EIL1* 可直接作用于 SA 合成基因 *SID2* (*salicylic acid induction deficient2*) 的启动子区, 负调控 *SID2* 的表达和 SA 的合成, 从而抑制植物对活体营养型病原菌的免疫反应^[9]。而 JA 信号途径的转录激活子 MYC2 和 *EIN3* 可相互结合, 从而影响了各自的转录活性, 导致 JA 和 ET 信号途径间的相互拮抗作用^[20]。因此, 拟南芥中 *EIN3/EIL* 是控制 ET 和其他两种激素 JA 和 SA 信号传导途径交叉的节点, 并能够调节不同激素信号途径对不同类型病原菌的侵染做出反应。因此, 研究水稻中

*OsEILs*成员是否同样处于调节 3 种激素信号传导途径的关键节点位置,以及其突变体材料对不同类型病原菌如死体营养型纹枯菌和活体营养型白叶枯菌的抗感反应,将对制定水稻的抗病育种策略具有重要意义。

水稻原生质体亚细胞定位分析发现,*OsEIL6*并未定位于水稻细胞核,而是定位于细胞质。这一研究结果不同于 *EIN3* 家族 *OsEIL1* 和 *OsEIL2* 的细胞核定位结果^[14-15],因此,*OsEIL6* 是否作为转录因子执行功能还需要后续进一步研究。蛋白质之间的相互作用是细胞生化反应网络的重要组成部分,对调控细胞及其信号具有重要意义。本研究利用 LC-MS 的方法寻找 *OsEIL6* 的互作蛋白,筛选到 10 个可能与水稻抗病相关的互作蛋白。后续将进一步研究这些互作蛋白在水稻抗病过程中的作用,进一步解析 *OsEIL6* 所介导水稻抗病分子机制。

综上,本研究发现 *OsEIL6* 定位于水稻细胞质,且正调控水稻对稻瘟菌的抗性反应。该结果对于进一步研究 *OsEIL6* 的生物学特性和功能,明确其在激素信号途径中的地位以及 *OsEIL6* 所调控的水稻抗病信号分子网络具有重要作用,并为水稻稻瘟病防控提供新思路。

参考文献

- [1] LIU Wende, LIU Jinling, TRIPLETT L, et al. Novel insights into rice innate immunity against bacterial and fungal pathogens [J]. *Annual Review of Phytopathology*, 2014, 52(1): 213–241.
- [2] TALBOT N J. On the trail of a cereal killer; Exploring the biology of *Magnaporthe grisea* [J]. *Annual Review of Microbiology*, 2003, 57(1): 177–202.
- [3] DEAN R A, TALBOT N J, EBBOLE D J, et al. A P-type ATPase required for rice blast disease and induction of host resistance [J]. *Nature*, 2006, 440 (7083): 535–539.
- [4] GRANT M R, JONES J D G. Hormone (dis)harmony moulds plant health and disease [J]. *Science*, 2009, 324(5928): 750–752.
- [5] JU Chuanli, CHANG Caren. Mechanistic insights in ethylene perception and signal transduction [J]. *Plant Physiology*, 2015, 169(1): 85–95.
- [6] KLEE H J. Ethylene signal transduction moving beyond *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiology*, 2004, 135(2): 660–667.
- [7] YANG Chao, LU Xiang, MA Biao, et al. Ethylene signaling in rice and *Arabidopsis*: conserved and diverged aspects [J]. *Molecular Plant*, 2015, 8 (4): 495–505.
- [8] ZHAO He, DUAN Kaixuan, MA Biao, et al. Histidine kinase MHZ1/*OsHK1* interacts with ethylene receptors to regulate root growth in rice [J/OL]. *Nature Communications*, 2020,

- 11(1):518. DOI: 10.1038/s41467-020-14313-0.
- [9] CHEN Huamin, LI Xue, CHINTAMANANI S, et al. ETHYLENE INSENSITIVE3 and ETHYLENE INSENSITIVE3-LIKE1 repress *SALICYLIC ACID INDUCTION DEFICIENT2* expression to negatively regulate plant innate immunity in *Arabidopsis* [J]. *The Plant Cell*, 2009, 21(8): 2527–2540.
- [10] ZHU Ziqiang, AN Fengying, FENG Ying, et al. Derepression of ethylene-stabilized transcription factors (*EIN3/EIL1*) mediates jasmonate and ethylene signaling synergy in *Arabidopsis* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(30): 12539–12544.
- [11] YANG Chao, LI Wen, CAO Jidong, et al. Activation of ethylene signaling pathways enhances disease resistance by regulating ROS and phytoalexin production in rice [J]. *The Plant Journal*, 2017, 89(2): 338–353.
- [12] MAO Chuanzao, WANG Shaomin, JIA Qiaojun, et al. *OsEIL1*, a rice homolog of the *Arabidopsis* *EIN3* regulates the ethylene response as a positive component [J]. *Plant Molecular Biology*, 2006, 61(1/2): 141–152.
- [13] HIRAGA S, SASAKI K, HIBI T, et al. Involvement of two rice *ETHYLENE INSENSITIVE3-LIKE* genes in wound signaling [J]. *Molecular Genetics & Genomics*, 2009, 282 (5): 517–529.
- [14] 石彦龙,徐国娟,王旭丽,等. 转录因子 *OsEIL2* 正调控水稻对纹枯病的抗性[J]. *植物保护*, 2017, 43(1): 46–53.
- [15] PARK C H, CHEN Songbiao, SHIRSEKAR G, et al. The *Magnaporthe oryzae* effector AvrPiz-t targets the RING E3 ubiquitin ligase AP16 to suppress pathogen-associated molecular pattern-triggered immunity in rice [J]. *The Plant Cell*, 2012, 24(11): 4748–4762.
- [16] ZHANG Yang, SU Jianbin, DUAN Shan, et al. A highly efficient rice green tissue protoplast system for transient gene expression and studying light/chloroplast-related processes [J/OL]. *Plant Methods*, 2011, 7(1): 30. DOI: 10.1186/1746-4811-7-30.
- [17] HELLIWELL E E, WANG Qin, YANG Yinong. Ethylene biosynthesis and signaling is required for rice immune response and basal resistance against *Magnaporthe oryzae* infection [J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2016, 29(11): 831–843.
- [18] YANG Chao, MA Biao, HE Sijie, et al. MAOHUZI6/ETHYLENE INSENSITIVE3-LIKE1 and ETHYLENE INSENSITIVE3-LIKE2 regulate ethylene response of roots and coleoptiles and negatively affect salt tolerance in rice [J]. *Plant Physiology*, 2015, 169 (1): 148–165.
- [19] BARI R, JONES J D. Role of plant hormones in plant defence responses [J]. *Plant Molecular Biology*, 2009, 69(4): 473–488.
- [20] SONG Susheng, HUANG Huang, GAO Hua, et al. Interaction between MYC2 and ETHYLENE INSENSITIVE3 modulates antagonism between jasmonate and ethylene signaling in *Arabidopsis* [J]. *The Plant Cell*, 2014, 26(1): 263–279.