

溃疡病菌侵染早期柑橘细胞程序性死亡的响应特征及机制

龙 琴, 谢 宇, 许兰珍, 何永睿, 邹修平*, 陈善春*

(西南大学/中国农业科学院柑桔研究所, 国家柑桔工程技术研究中心, 重庆 400712)

摘 要: 为进一步研究柑橘溃疡病抗性与细胞程序性死亡的关系, 以高感品种晚锦橙(甜橙类, *Citrus sinensis* Osbeck) 和高抗品种金弹(金柑类, *Fortunella crassifolia* Swingle) 为试材, 从抗性特征、发病早期的相关信号变化、抗氧化酶活性和基因表达变化等方面探讨柑橘细胞程序性死亡响应溃疡病菌(*Xanthomonas citri* subsp. *citri*) 侵染的特征及机制。接种溃疡病菌后, 晚锦橙叶片出现明显的海绵状凸起, 为典型的溃疡病症状; 而金弹则出现超敏化反应细胞坏死症状。接种前, 过氧化氢(H_2O_2) 在金弹中的基础水平较晚锦橙高; 接种后, 两品种的 H_2O_2 含量均上升, 但金弹上升幅度高于晚锦橙。随着 H_2O_2 水平升高, 代表膜脂过氧化程度的丙二醛(MDA) 含量在两个品种中均增加, 但金弹中增加幅度更大。抗氧化酶系统中的超氧化物歧化酶(SOD) 活性在晚锦橙和金弹叶片中均呈下降趋势; 过氧化氢酶(CAT) 活性在两个品种中均提高且差异不大; 过氧化物酶(POD) 活性在两个品种中均提高, 但晚锦橙的上升更快, 且提高程度低于对照。参与细胞程序性死亡正调控的基因 *CsCEP1-1*、*CsCEP1-2* 和 *CsMCA1* 在两个品种中均受溃疡病菌诱导上调表达, 但金弹中的表达水平显著高于晚锦橙; 参与细胞程序性死亡负调控的 *CsDAD1-1*、*CsDAD1-2*、*CsMLO2* 和 *CsMLO3* 的转录水平在晚锦橙中变化不大, 而金弹中随着接种时间的延长逐渐降低。结果表明, 溃疡病菌胁迫下晚锦橙和金弹在发病早期均启动了超敏化反应, 但在金弹中更为强烈, 有助于诱导发生细胞程序性死亡, 而限制病原菌的生长, 这可能是金弹抗病性强的内在原因之一。

关键词: 柑橘; 溃疡病; 细胞程序性死亡; 活性氧; 丙二醛; 抗氧化酶; 基因表达

中图分类号: S 666

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2020) 06-1047-12

Characteristics and Mechanism of Programmed Cell Death in Response to Citrus Canker Pathogen in the Early Stage of Infection

LONG Qin, XIE Yu, XU Lanzhen, HE Yongrui, ZOU Xiuping*, and CHEN Shanchun*

(National Citrus Engineering Research Center, Citrus Research Institute, Southwest University/Chinese Academy of Agricultural Sciences, Chongqing 400712, China)

Abstract: To further investigate the relationship between citrus canker disease resistance and programmed cell death (PCD), the dynamics of PCD related signals, antioxidant enzyme activities and

收稿日期: 2019-12-02; **修回日期:** 2020-03-31

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFD1000300); 重庆市自然科学基金—博士后基金项目(cstc2019jcyj-bshX0024); 中央高校基本科研业务费项目(XDJK2019C027); 国家现代农业产业技术体系建设专项资金项目(CARS-26)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: chenshanchun@cric.cn; zouxiuping@cric.cn)

gene expression upon *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*Xcc*) infection were studied in susceptible variety Wanjincheng orange (*Citrus sinensis* Osbeck) and resistant variety Jindan (*Fortunella crassifolia* Swingle). Typical canker symptoms of pustule were observed in Wanjincheng orange, while hypersensitive necrosis (blown region) occurred in Jindan after inoculation with *Xcc*. The base level of hydrogen peroxide (H_2O_2) in Jindan was higher than that of in Wanjincheng orange before inoculation. After inoculation, the content of H_2O_2 increased in the two varieties, but the content in Jindan was always higher than that in Wanjincheng orange. Following the increase of H_2O_2 level, the content of malondialdehyde (MDA), which indicates the degree of membrane lipid peroxidation also increased in two varieties, but much higher in Jindan. The activity of superoxide dismutase (SOD), which is involved in scavenging reactive oxygen species decreased in the leaves of two varieties. The activity of catalase (CAT) increased in the two varieties, but no significant difference between them. Moreover, the activity of peroxidase (POD) increased in both varieties, but more rapidly in Wanjincheng orange, and the increase was lower than that of the water treatment control. The expression of *CsCEP1-1*, *CsCEP1-2* and *CsMCA1* which positively regulate the PCD were up-regulated by *Xcc* in two varieties, while much higher in Jindan. The transcription levels of *CsDAD1-1*, *CsDAD1-2*, *CsMLO2* and *CsMLO3*, which negatively regulate the PCD did not significantly change in Wanjincheng orange, but gradually decreased in Jindan. The results showed that both susceptible and resistant varieties initiated the hypersensitive reaction in response to the *Xcc* infection. However, the reaction was more drastic in the resistant variety, which may lead to the induction of PCD and resulted to the resistance of Jindan to *Xcc*.

Keywords: citrus; canker disease; programmed cell death; reactive oxygen species; malondialdehyde; antioxidant enzyme; gene expression

近年来中国柑橘产业发展迅速, 其栽培面积和产量均居世界第一 (齐乐和祁春节, 2016; 沈兆敏, 2017), 但病虫害始终是限制柑橘产业发展的重要因素。其中由地毯草黄单胞杆菌柑橘致病变种 (*Xanthomonas citri* subsp. *citri*, *Xcc*) 所引起的柑橘溃疡病 (Citrus bacterial canker) 是柑橘检疫性病害之一 (Brunings & Gabriel, 2003; 姚廷山 等, 2015), 且柑橘产业中大部分栽培品种属于溃疡病易感品种 (李红叶, 2011)。柑橘溃疡病在世界范围内造成了巨大的经济损失, 但至今无法根治 (Brown, 2001; Schubert et al., 2001; He & Yuan, 2007)。寄主植物的抗病性与多方面因素有关, 比如先天存在的组织结构, 包括气孔大小及密度 (李淼 等, 2005)、表皮蜡质层和角质层厚度 (沈万芳, 2008) 及细胞结构的致密度 (李海英 等, 2002) 等; 此外还包括病原菌入侵后诱发产生的一系列防御反应, 如抗病相关基因的表达、防御酶活性的变化和防御蛋白的积累等 (Kohler et al., 2002; Glazebrook, 2005; 沈万芳, 2008; Boutrot & Zipfel, 2017; Ma et al., 2017; Liu et al., 2018)。因此, 深入研究柑橘溃疡病抗 (感) 机理和挖掘重要的抗 (感) 病基因, 寻找抗病的新方法, 进而创制抗病的新种质, 对产业的健康稳定发展有重要意义。

植物超敏反应 (Hypersensitive response) 相关的细胞程序性死亡 (Programmed cell death) 是植物细胞为限制病原菌生长的一种快速死亡, 是植物抗病的一种常见反应 (Greenberg & Yao, 2004; 王媛 等, 2008)。病原菌侵染后感病部位会出现活性氧的急剧上升, 从而诱导植物发生细胞程序性死亡, 这种“活性氧爆发”被称作是细胞水平上寄主植物对病原菌侵染的最早应答之一, 其中过氧化氢 (H_2O_2) 不仅是重要的活性氧之一, 而且是活性氧相互转化的枢纽 (Hammond & Jones, 1997;

Heath, 2000; Greenberg & Yao, 2004)。过剩的活性氧能够引发和加剧膜脂过氧化作用, 从而破坏膜的结构与功能。丙二醛 (Malondialdehyde, MDA) 是膜脂过氧化作用的最终产物之一, 其含量是评价膜脂过氧化程度的重要指标 (陈少裕, 1991; 王建明 等, 2001)。为避免活性氧的过量积累而对细胞产生伤害, 植物体通过活性氧清除系统来进行自我调节 (Wojtaszek, 1997)。其中超氧化物歧化酶 (Super oxide dismutase, SOD) 是一种能够催化超氧化物通过歧化反应转化为 O_2 和 H_2O_2 的酶, 它是活性氧清除系统中第一个发挥作用的酶 (朱大海和马旭俊, 2003)。过氧化氢酶 (Catalase, CAT) 和过氧化物酶 (Peroxidase, POD) 的作用是将 SOD 歧化和 Haber-Weiss 反应产生的 $\cdot OH$ 和 H_2O_2 分解为 H_2O 和 O_2 , 从而避免对细胞产生伤害 (Chat & Duke, 1987; Alvarez et al., 2000; 魏颖颖 等, 2005)。研究显示, SOD、CAT 和 POD 活性与植物抗病性紧密联系 (陈利锋 等, 1997; 宋凤鸣 等, 1997; 程鹏 等, 2013)。此外, 已从植物细胞中找到了大量细胞程序性死亡相关的基因, 如半胱氨酸蛋白酶 CEP1 (Cysteine protease 1)、Mid1 - 互补活性蛋白 MCA1 (Mid1-complementing activity 1)、抗细胞凋亡因子 DAD1 (Defender against cell death 1) 和 MLO (Mildew resistance locus O) 蛋白基因等 (Mitsuhara et al., 1999; Hoeberichts et al., 2003; Wang et al., 2011, 2012; Kim & Hwang, 2012; 马岩岩 等, 2014; Zhang et al., 2014)。目前在模式植物拟南芥和水稻的抗病研究中关于超敏反应相关细胞程序性死亡的报道较多 (Rustérucci et al., 2001; Wituszynska et al., 2013; Tian et al., 2014; Tsunazuka et al., 2015), 但在柑橘中报道较少。

柑橘不同品种对溃疡病的抗性不一, 其中甜橙类 (*Citrus sinensis* Osbeck) 最易感病, 而金柑类 (*Fortunella crassifolia* Swingle) 抗性最强 (Brown, 2001; 宋盛英 等, 2002)。甜橙类在接种部位出现典型的溃疡病症状; 而金柑类则出现细胞坏死症状, 且在感染早期 (3 ~ 5 d) 就出现明显的细胞程序性死亡反应 (Khalaf et al., 2011; Fu et al., 2012), 暗示感染早期寄主细胞程序性死亡的快速反应在柑橘溃疡病抗性中起重要作用, 但其具体机制有待深入研究。有报道 H_2O_2 浓度和抗氧化酶活性等与柑橘溃疡病抗性紧密联系, 但多集中在单一品种的研究上 (Naveen Kumar et al., 2011a, 2011b, 2011c), 或侧重于对结构的影响和感染病原菌后的宏观比较 (王引, 2010)。因此, 深入解析感染早期不同抗性柑橘细胞程序性死亡响应溃疡病侵染的特征和机制, 挖掘其关键基因, 有助于更好地了解柑橘溃疡病的抗 (感) 机制, 促进柑橘抗病育种的发展。

本研究中以柑橘溃疡病感病品种晚锦橙和抗病品种金弹为试材, 比较了两个品种接种溃疡病原菌后不同时间点超敏反应细胞坏死症状的差异; 分析了接种后前 3 d 与细胞程序性死亡相关的信号、抗氧化酶活性和相关基因表达在这两个不同抗性品种中对病原菌的响应情况。发现 *Xcc* 侵染后, 晚锦橙 (感) 和金弹 (抗) 都迅速产生了超敏反应, 但在抗病品种金弹中更为强烈, 有助于其细胞程序性死亡的快速启动, 这可能是其抗病的遗传基础。本研究结果为阐明柑橘不同品种溃疡病抗性差异的分子机制提供了新视角, 为改良柑橘溃疡病抗性提供了理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

2018 年 4 月底在西南大学柑桔研究所温网室, 以健壮无病虫害且树龄均为 8 年生的柑橘溃疡病感病品种晚锦橙 (*Citrus sinensis* Osbeck) 和抗病品种金弹 (*Fortunella crassifolia* Swingle) 植株为试验材料, 选取枝干外围健康的 6 月龄的叶片用于试验。

溃疡病原菌 (*Xanthomonas citri* ssp. *citri*, *Xcc*) 由国家柑橘苗木脱毒中心提供, 分离自感病

的甜橙，是亚洲种A株系。

1.2 体外接菌试验

采集晚锦橙和金弹叶片，用自来水冲洗灰尘，然后用 75%乙醇消毒表面，用无菌水清洗 3 次后于无菌的培养皿中保湿备用。将病原菌培养至 OD₆₀₀ 为 0.5，再用无菌水稀释 1 000 倍到浓度为 $5 \times 10^5 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 备用。用 5 mL 注射器将菌悬液注入柑橘叶片（注射法）或先用直径为 0.5 mm 的针在叶片背面刺孔后取 1 μL 菌悬液接种于每个针刺孔上（针刺法），以水处理为对照。处理后叶片用含无菌水的棉球保湿，于 28 $^{\circ}\text{C}$ 、80%湿度、16 h 光照/8 h 黑暗的培养箱中培养。每天观察并记录发病情况。

参照 Peng 等（2015）的方法用 0.5 cm 打孔器取感染部位叶片，加入 200 μL 无菌水将叶圆片捣碎，稀释到适宜浓度后取 50 μL 匀浆液于平板上培养，统计菌落数，然后计算单位面积 (cm^2) 菌落数。

1.3 过氧化氢、丙二醛含量及酶活性的测定

取接种部位 1.0 g 鲜叶，用液氮研磨，加入 9 mL PBS 缓冲液 ($10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7.2) 匀浆抽提 10 min。将制备好的 10%匀浆液用低温低速离心机 $8\,000 \times g$, 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min。取上清液置冰上待测。用植物过氧化氢含量检测试剂盒 - 微量法（上海优选生物科技有限公司）对 H_2O_2 含量进行测定。用植物丙二醛 ELISA 检测试剂盒（上海优选生物科技有限公司）对 MDA 含量进行测定。用上海优选生物科技有限公司植物超氧化物歧化酶（SOD）ELISA 检测试剂盒、植物过氧化氢酶（CAT）ELISA 检测试剂盒和植物过氧化物酶（POD）ELISA 检测试剂盒对酶活性进行测定。

1.4 RNA 的提取和相关基因表达量的分析

利用 Aidlab 公司的试剂盒 EASY Spin Plant RNA Kit 提取植物总 RNA，取 0.5 ~ 1.0 μg RNA 用 Fermentas 公司的反转录试剂盒 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 合成 cDNA。用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 进行相关基因相对表达水平分析，以 $\beta\text{-actin}$ 为内参基因。用 NCBI 在线软件 Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) 设计基因特异性引物（表 1）。用 Bio-Rad 公司的 CFX96TM Real-Time System 进行检测，荧光染料选用 Bio-Rad 公司的 iTaqTM universal SYBR Green Supermix。PCR 程序采用 3 步法：95 $^{\circ}\text{C}$ 3 min，然后 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s，56 $^{\circ}\text{C}$ 30 s，72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s（共 40 个循环）。用 Bio-Rad 公司的 CFX Manager 3.1 软件对数据进行分析；用熔解曲线对引物特异性进行判断。

表 1 qRT-PCR 引物列表
Table 1 Primers used for qRT-PCR

基因 ID Gene ID	引物名称 Primer name	引物序列 (5' - 3') Primer sequence	退火温度/ $^{\circ}\text{C}$ Annealing temperature	产物长/bp Product length
Cs1g05000	Actin	F: CTGCCTGATGGCCAGATCAT; R: TACCAGCAGCTTCCATTCCG	60	97
Cs5g06570	CsCEP1-1	F: AACAGCCTGTGTCTAGTAGCC; R: AGCTCTGTGCCACATTCTCC	60	91
Cs2g15700	CsCEP1-2	F: AATCAGCCAGTGGCAGTCTC; R: CCAGCTGGTCCCCATGAAT	60	180
Cs1g25850	CsMCA1	F: GGGGTTTAACGAAGTGCTGC; R: TCGGTGAAACCTCCTCTGGA	60	161
Cs3g09200	CsDAD1-1	F: TTTCTTGTGTGGGACGGCA; R: AAAGCTCGCTCTGGTGGTAG	60	97
Cs6g04780	CsDAD1-2	F: CTTATGCTGCCACTCCACA; R: ACAGCAAGTATGGCTGTCCC	60	166
Cs8g16910	CsMLO2	F: AGACATCGTTTGGCAGGAGG; R: ATCAACCTTGGAACCGACC	60	107
Cs8g16920	CsMLO3	F: CCCCTTGTAACCCAACGA; R: GAGAGATTGATACCGTGACCCA	60	133

1.5 数据分析

结果均为 3 次重复试验的平均值，数据的整理、标准偏差的计算、显著性分析及图表的绘制均采用 Excel 2016 进行。由双尾学生 *t* 检验确定相关的统计学意义 (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$)。

2 结果与分析

2.1 金弹和晚锦橙接种溃疡病菌后超敏反应细胞坏死症状的比较分析

注射接种溃疡病菌病原菌 (*Xanthomonas citri* subsp. *citri*, *Xcc*) 9 d 后，晚锦橙叶片的感染部位出现海绵状凸起，表现为典型的溃疡病症状；而金弹叶片的感染部位褐化塌陷，呈超敏反应细胞坏死症状，未形成溃疡病斑 (图 1, A)。针刺接种有相似的结果，在接种后 3 d 就出现了明显的差异，此时晚锦橙病斑尚未凸起，金弹已出现明显的细胞坏死症状，随着接种时间的延长，晚锦橙的海绵状凸起病症逐渐加剧，而金弹仍呈现细胞坏死症状 (图 1, B)。分析病原菌的生长情况 (图 2) 发现，针刺接种 3 d 时开始，两个品种叶片上病原菌的生长速度出现明显的区别，感病品种晚锦橙单

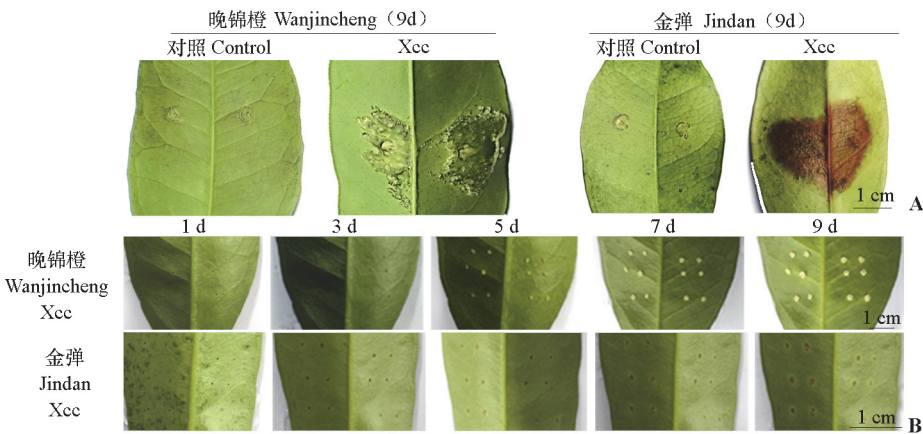


图 1 晚锦橙和金弹注射法 (A) 和针刺法 (B) 接种 *Xcc* 后超敏反应细胞坏死症状的差异

Fig. 1 The difference of hypersensitive response related cell necrosis on leaves of Wanjincheng orange and Jindan after inoculation with *Xcc* by injection (A) and pin-prick (B)

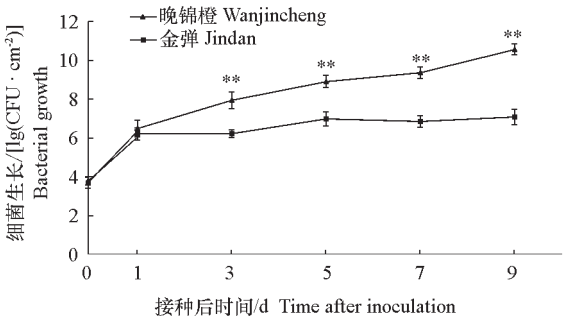


图 2 晚锦橙和金弹中针刺法接种 *Xcc* 后的细菌生长曲线

t 检验确定同一时间点两品种有显著性差异 (** $P < 0.01$)。

Fig. 2 Growth of *Xcc* in leaves of Wanjincheng orange and Jindan after inoculation with canker pathogen by pin-prick
Statistical significance between the two varieties at the same time was determined by two-tailed Student's *t*-test (** $P < 0.01$) .

位面积叶片培养出的菌落数大幅度增加，而金弹只轻微增加。说明接种病原菌后金弹迅速启动了超敏反应细胞死亡，进而抑制了 *Xcc* 的增殖和进一步扩散；而晚锦橙没有出现类似症状，感病严重。

2.2 柑橘溃疡病发病早期过氧化氢和丙二醛含量的动态变化

采集接种部位叶片测定过氧化氢和丙二醛含量。从接种前 (0 h) 到发病早期 (72 h)，抗病品种金弹中过氧化氢 (H_2O_2) 的含量始终高于感病品种晚锦橙 (图 3)。在 0 h 时，金弹叶片中 H_2O_2 含量为 $15.91 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ ，比晚锦橙 ($11.74 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$) 高出 35.6%。接种溃疡病菌后，晚锦橙和金弹中 H_2O_2 含量均提高，但金弹中的上升幅度大于晚锦橙，且在 24 h 时达到高峰，比对照高出 27.3%；而此时晚锦橙中 H_2O_2 含量比对照高出 13.9%，随着接种时间延长略有上升，但其最高值也只与抗病品种金弹接种前的本底水平相当。

此外，接种溃疡病菌后晚锦橙和金弹叶片中丙二醛 (MDA) 含量先轻微降低随后逐渐提高，但金弹的变化幅度远大于晚锦橙，而对照变化较小 (图 3)。在接种后 12~72 h，晚锦橙中 MDA 含量增幅为 43.76%，而金弹中增幅为 62.28%。表明 *Xcc* 侵染后晚锦橙和金弹叶片膜脂过氧化程度均增加，但在金弹中更强烈。

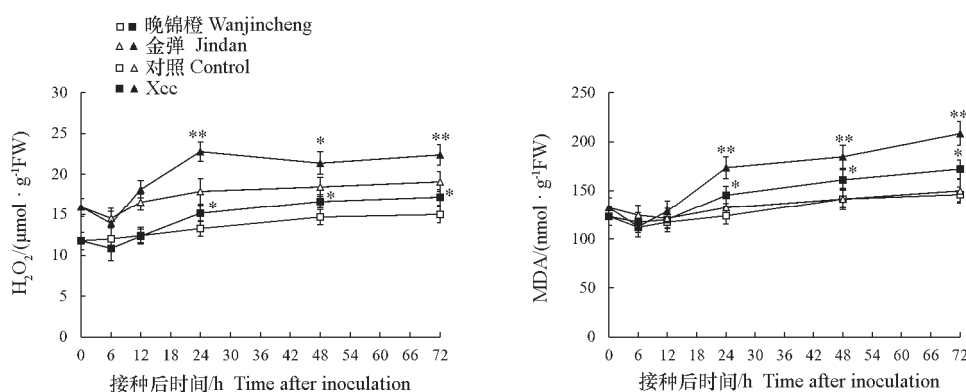


图 3 注射接种溃疡病菌 (*Xcc*) 后晚锦橙和金弹叶片中 H_2O_2 和 MDA 含量的变化

Fig. 3 Changes of H_2O_2 and MDA content in leaves of Wanjincheng orange and Jindan after inoculation with canker pathogen (*Xcc*) by injection

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

2.3 溃疡病菌胁迫下抗氧化酶活性的动态变化

如图 4 所示，接种溃疡病菌后，不论晚锦橙还是金弹叶片中超氧化物歧化酶 (SOD) 活性整体呈下降趋势，且下降程度大于对照。接种 0~72 h，晚锦橙中 SOD 活性下降了 23.02%，金弹下降了 32.64%，与 H_2O_2 含量的变化呈相反趋势。在溃疡病菌胁迫下过氧化氢酶 (CAT) 和过氧化物酶 (POD) 活性均提高。在接种前，晚锦橙中 CAT 活性略高于金弹，到接种后 72 h，二者 CAT 活性相近。在溃疡病菌胁迫下，不论晚锦橙还是金弹的 POD 活性都有提高，但提高程度均低于水处理对照；另外，接种前金弹中 POD 活性较晚锦橙高，但在接种后却逐步低于晚锦橙，接种后 72 h 时金弹比晚锦橙低 13.42%，表明在溃疡病菌胁迫下晚锦橙和金弹中都存在抑制 POD 活性的因素，且在金弹中更明显。

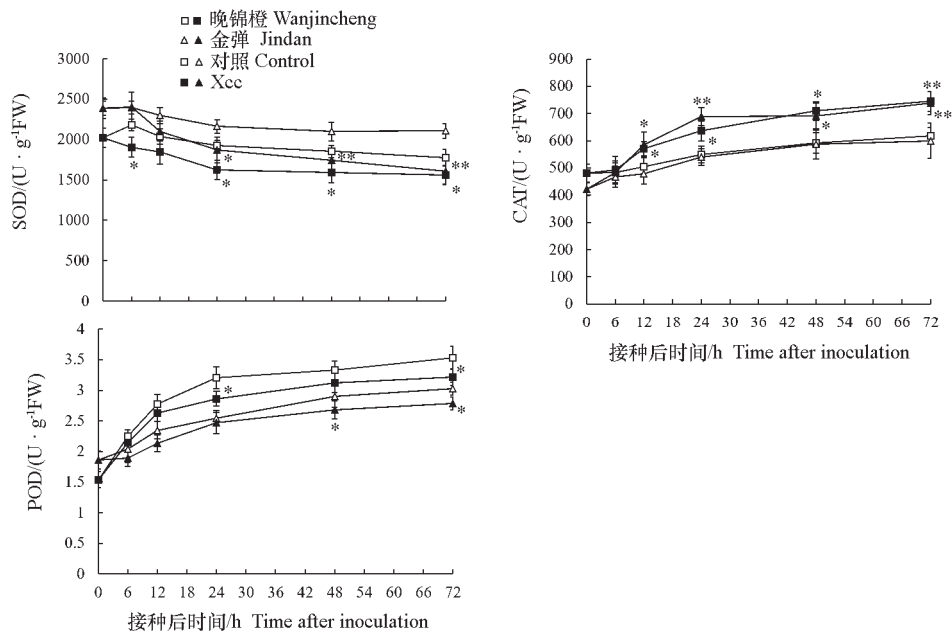


图 4 注射接种溃疡病菌 (*Xcc*) 后晚锦橙和金弹叶片中抗氧化酶活性的变化

Fig. 4 Changes of antioxidant activity in leaves of Wanjincheng orange and Jindan after inoculation with canker pathogen (*Xcc*) by injection

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

2.4 溃疡病菌胁迫下细胞程序性死亡相关基因的差异表达

CEP1 和 *MCA1* 为植物细胞程序性死亡的正调控基因, *DAD* 和 *MLO* 为细胞程序性死亡的负调控基因 (Hoeberichts et al., 2003; Wang et al., 2011; Kim & Hwang, 2012; Zhang et al., 2014)。为探究细胞程序性死亡相关基因在柑橘抗感品种中对病原菌的响应情况, 利用实时荧光定量 PCR 技术检测了 *CsCEP1*、*CsMCA1*、*CsDAD1*、*CsMLO2* 和 *CsMLO3* 在溃疡病菌侵染中的表达谱。结果 (图 5) 显示, *CsCEP1-1* 的转录水平在接种后晚锦橙中 0~48 h 变化不大, 48~72 h 小幅上升; 金弹中

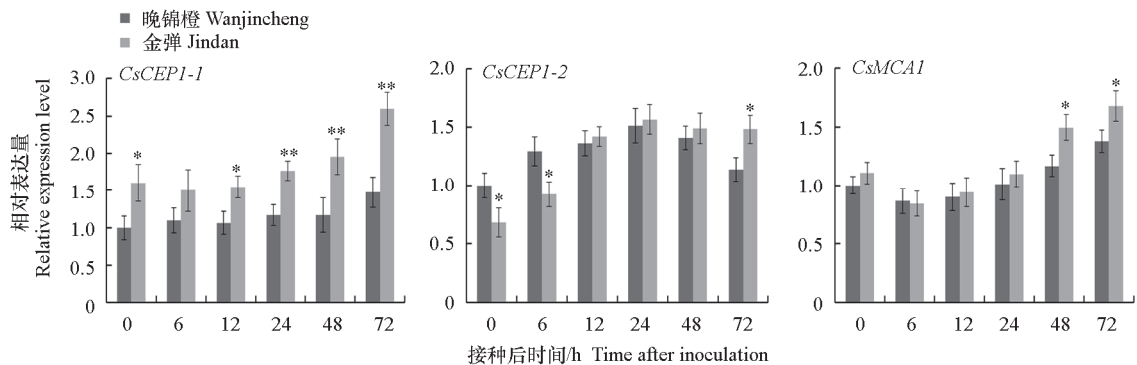


图 5 注射接种溃疡病菌 (*Xcc*) 后晚锦橙和金弹叶片中细胞程序性死亡正调控基因的表达量

Fig. 5 Expression levels of positive regulatory genes of programmed cell death in Wanjincheng orange and Jindan leaves after inoculation with canker pathogen (*Xcc*) by injection

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

在接种 24 h 后开始升高, 48 ~ 72 h 急剧上升。*CsCEPI-2* 在金弹 (抗) 接菌后 24 h 的表达量是接菌前的近 3 倍, 而晚锦橙 (感) 上升幅度不及金弹 (抗), 比接菌前只提高了 51.16%。*CsMCA1* 的变化趋势在抗、感柑橘品种中相似, 先经历轻微下调, 随即上升, 但金弹 (抗) 中上升的幅度大于晚锦橙 (感)。如图 6 所示, *CsDAD1-1* 和 *CsDAD1-2* 的转录水平在晚锦橙中变化不大, 而在金弹中随着接种时间的延长逐渐降低; 晚锦橙中 *CsMLO2* 和 *CsMLO3* 的转录水平在接种后变化不大, 而金弹中在 0 ~ 24 h 显著下调, 24 h 后一直处于低表达水平。推测 *Xcc* 侵染后, 抗感品种中细胞程序性死亡相关基因的动态变化与柑橘细胞程序性死亡及溃疡病抗性有一定关联。

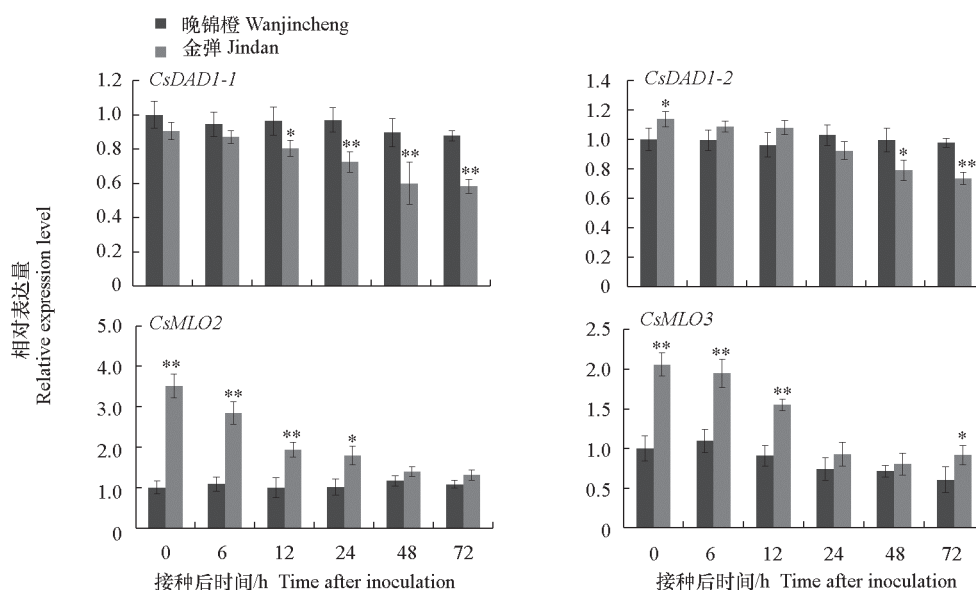


图 6 注射接种溃疡病菌 (*Xcc*) 后晚锦橙和金弹叶片中细胞程序性死亡负调控基因的表达量

Fig. 6 Expression levels of negative regulatory genes of programmed cell death in Wanjincheng orange and Jindan leaves after inoculation with canker pathogen (*Xcc*) by injection

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

3 讨论

研究表明甜橙类 (*C. sinensis* Osbeck) 对溃疡病易感, 而金柑类 (*F. crassifolia* Swingle) 对溃疡病有较好的抗性 (Koizumi, 1982; 宋盛英 等, 2002)。本研究中从甜橙和金柑中各选取了 1 个代表品种晚锦橙和金弹进行对比研究。结果表明: 接种溃疡病菌 *Xcc* 后晚锦橙叶片逐渐出现凸起的溃疡病病斑, 感病部位病原菌数量也不断提高; 金弹叶片的感染部位并无明显溃疡病病症, 而出现褐化塌陷, 呈典型的超敏反应细胞坏死症状, 感染部位病原菌数量也未见大幅提高。说明金弹的抗病性强, 而晚锦橙对溃疡病易感; 金弹在病原菌入侵后产生的超敏反应细胞程序性死亡限制了病原菌的生长, 可能是其抗病的重要原因。另外, 从病原菌的生长曲线可以明确在接种 1 d 后晚锦橙和金弹叶片上病原菌数量便开始出现较大差异, 说明此时金弹便开始对病原菌的生长有抑制作用。因此, 发病前期 (3 d 前) 宿主细胞受病原菌侵染所激发的生理生化反应可能对抗病性起到重要的作用。

大多数植物受病原菌侵染后会激发活性氧的爆发, 这是宿主细胞对病原菌入侵的早期响应, 被认为是过敏性反应的重要特征 (Huckelhoven & Koge, 2003)。研究表明, 活性氧不仅能够直接对抗

病原菌的入侵, 也是植物进一步防御反应的信号分子, 比如激发植物细胞局部过敏性死亡 (Wojtaszek, 1997; 芦光新, 2002)。活性氧包括超氧阴离子、羟基自由基 ($\cdot\text{OH}$) 和过氧化氢 (H_2O_2)。有研究显示, 外源添加 H_2O_2 可抑制真菌和细菌的生长, 还能够诱导细胞程序性死亡的产生; 内源 H_2O_2 的积累可增强植物抗病性 (Mussell, 1973; Wu et al., 1995)。本研究中, 受溃疡病病原菌侵染后抗病品种金弹叶片中 H_2O_2 的含量上升幅度远大于感病品种晚锦橙, 且在接种前到接种后整个过程中金弹的 H_2O_2 的含量均比晚锦橙高。值得注意的是, 虽然晚锦橙 (感) 在接种后的 H_2O_2 有所上升, 但其最高值也只与金弹 (抗) 接种前的本底水平相当, 这可以解释为什么晚锦橙 (感) 没有出现超敏反应细胞程序性死亡。推测一定范围内 H_2O_2 的含量与柑橘溃疡病抗性正相关。

病原菌侵染后诱导活性氧的积累, 过剩的活性氧能够引发和加剧膜脂过氧化作用, 从而破坏膜的结构与功能。此过程可通过检测其最终产物 MDA 含量来进行判断。本研究中接种溃疡病菌后, 晚锦橙和金弹中 MDA 含量的变化趋势与 H_2O_2 含量变化有相似之处, 说明膜脂过氧化程度与活性氧含量紧密联系。接种 12 h 后, 金弹中 MDA 含量大幅度增加, 可能由于溃疡病菌胁迫激发了活性氧的大量积累, 引发了膜脂的过氧化使细胞破坏。这可能是金弹并未出现溃疡病症状而出现超敏反应细胞坏死症状的重要原因。

大量研究显示, SOD、CAT 和 POD 活性与植物抗病性相关。例如, 小麦接种赤霉病菌后抗病品种中 SOD 活力下降, 且低于未接种对照, 而感病品种 SOD 活性先下降后升高并显著高于对照; 抗病品种接种后的 CAT 活性始终高于对照, 而感病品种则相反, 表明 SOD 和 CAT 活性可能在小麦的抗赤霉病过程中有重要作用 (陈利锋 等, 1997)。王引 (2010) 发现在纽荷兰脐橙和宁波金柑中, 接种病原菌后 CAT 和 POD 活性变化存在较大差异, 与溃疡病抗性紧密联系。此外, 在病原菌胁迫下抗病的棉花和大豆品种中 POD 活性快速上升, 增加幅度大于感病品种 (宋凤鸣 等, 1997; 程鹏 等, 2013)。本研究中, 接种溃疡病菌后不论晚锦橙还是金弹叶片中 SOD 活性都呈现整体下降趋势, 与 H_2O_2 含量的变化呈相反趋势。表明 SOD 酶可能受到 H_2O_2 产生的影响而被抑制。此外, 在溃疡病菌胁迫下不论晚锦橙还是金弹的 POD 活性都有提高, 但都低于水处理的对照。在接种前金弹中 POD 活性较晚锦橙高, 但接种后逐步低于晚锦橙, 表明在溃疡病菌胁迫下, 金弹 (抗) 中存在某种阻碍 POD 活性升高的因素, 限制了对过剩活性氧的清除, 从而引发和加剧膜脂过氧化程度, 这也可能是金弹能够快速进行细胞程序性死亡的原因之一; 相比而言, 晚锦橙 (感) 清除活性氧的效率更高, 以致没能启动细胞程序性死亡。

前人的研究结果表明, *CEPI* 和 *MCA* 为植物细胞程序性死亡的正调控基因, 而 *DAD* 和 *MLO* 为负调节基因。在拟南芥中半胱氨酸蛋白酶基因 *CEPI* 是调控细胞程序性死亡的关键因子 (Zhang et al., 2014); 在夏橙中也发现细胞程序性死亡发生的程度与 *CEPI* 基因的表达量呈正相关 (马岩岩 等, 2014)。番茄 *LeMCAI* 基因在灰霉病菌 (*Botrytis cinerea*) 侵染诱导的细胞程序性死亡过程中表达量升高 (Hoeberichts et al., 2003); 同时也有报道其他 *MCA* 基因在细胞程序性死亡过程中也发挥重要作用 (Wang et al., 2012)。小麦 *TaDAD2* 受条锈病菌 (*Puccinia striiformis*) 诱导后的表达量下降, 从而诱导细胞程序性死亡的产生, 增强植株抗性; 而过量表达 *TaDAD2* 能够抑制细胞程序性死亡的产生, 使植株感病性增强 (Wang et al., 2011)。此外, 在辣椒中沉默 *CaMLO2* 能够加速活性氧的爆发, 促进超敏反应的产生来抑制病原菌的生长, 从而增强植株对细菌性疮痂病菌 (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*) 的抗性; 而在拟南芥中过量表达 *CaMLO2* 能够抑制细胞程序性死亡反应, 从而提高植株对细菌的敏感性, 使植株更易感病 (Kim & Hwang, 2012)。在本研究中, 接种溃疡病菌后仅抗病品种金弹出现明显的细胞程序性死亡症状, 同时检测到金弹中 *CsCEPI* 和 *CsMCAI* 的转

录水平比感病品种晚锦橙升高的幅度更大; *CsDADI* 和 *CsMLO* 的转录水平在晚锦橙中变化不大, 而在抗病品种金弹中逐渐降低。该结果与前人的研究结果相吻合。表明 *CsCEPI*、*CsMCAI*、*CsDADI* 和 *CsMLO* 的转录水平与柑橘细胞程序性死亡及溃疡病抗性有密切联系。

本研究中基本明确了柑橘溃疡病抗性与超敏反应相关的细胞程序性死亡之间的关系, 并对溃疡病发病早期抗感品种中细胞程序性死亡相关的活性氧、膜脂过氧化程度及抗氧化酶和基因的变化差异有了新的认识。该研究结果将有助于更好地了解柑橘溃疡病的抗性机制, 找出抗病新方法。

References

- Alvarez M E, Pennell R, Meijer P, Ishikawa A, Dixon R A, Lamb C. 2000. Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. *Cell*, 92: 772 - 784.
- Boutrot F, Zipfel C. 2017. Function, discovery, and exploitation of plant pattern recognition receptors for broad-spectrum disease resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 55 (1): 257 - 286.
- Brunings A M, Gabriel D W. 2003. *Xanthomonas citri*: breaking the surface. *Molecular Plant Pathology*, 4 (3): 141 - 157.
- Brown K. 2001. Florida fights to stop citrus canker. *Science*, 292 (5525): 2275 - 2276.
- Chat H B, Duke N. 1987. Superoxide anion generation: a response of potato leaves to infection with *Phytophthora infestans*. *Phytopathology*, 77: 645 - 648.
- Chen Li-feng, Song Yu-li, Xu Yong-gao, Nie Li, Xu Lang-lai. 1997. Comparison for activities of superoxidedismutase and catalase between scab-resistant and susceptible wheat varieties. *Acta Phypathologica Sinica*, 27 (3): 209 - 212. (in Chinese)
- 陈利锋, 宋玉立, 徐雍皋, 聂理, 徐朗莱. 1997. 抗感赤霉病小麦品种超氧化物歧化酶和过氧化氢酶的活性比较. *植物病理学报*, 27 (3): 209 - 212.
- Chen Shao-yu. 1991. Injury of membrane lipid peroxidation to plant cell. *Plant Physiology Communications*, 27 (2): 84 - 90. (in Chinese)
- 陈少裕. 1991. 膜脂过氧化对植物细胞的伤害. *植物生理学通讯*, 27 (2): 84 - 90.
- Cheng Peng, Xu Peng-fei, Fan Su-jie, Jin Li-mei, Wu Jun-jiang, Wang Jin-sheng, Zhang Shu-zhen. 2013. Changes of POD activity in wild soybean after inoculation with *Phytophthora sojae*. *Soybean Science*, (2): 197 - 201. (in Chinese)
- 程鹏, 徐鹏飞, 范素杰, 靳立梅, 吴俊江, 王金生, 张淑珍. 2013. 野生大豆接种大豆疫霉根腐病菌后过氧化物酶 (POD) 活性变化. *大豆科学*, (2): 197 - 201.
- Fu X Z, Gong X Q, Zhang Y Z, Wang Y, Liu J H. 2012. Different transcriptional response to *Xanthomonas citri* subsp. *citri* between kumquat and sweet orange with contrasting canker tolerance. *PLoS ONE*, 7 (7): e41790.
- Glazebrook J. 2005. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 43 (1): 205 - 227.
- Greenberg J T, Yao N. 2004. The role and regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Cellular Microbiology*, 6 (3): 201 - 211.
- Hammond K E, Jones J D G. 1997. Plant disease resistance genes. *Plant Molecular Biology*, 48: 575 - 607.
- He Xiuling, Yuan Hongxu. 2007. Research advances on the occurrence and resistance of citrus bacterial canker disease. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 23 (8): 409 - 412. (in Chinese)
- 何秀玲, 袁红旭. 2007. 柑桔溃疡病发生与抗性研究进展. *中国农学通报*, 23 (8): 409 - 412.
- Heath M C. 2000. Hyper sensitive response-related death. *Plant Molecular Biology*, 44: 321 - 334.
- Hoerberichts F A, Have A T, Wolterling E J. 2003. A tomato metacaspase gene is upregulated during programmed cell death in *Botrytis cinerea*-infected leaves. *Planta*, 217 (3): 517 - 522.
- Huckelhoven R, Koge K H. 2003. Reactive oxygen intermediates in plant-microbe interactions: who is who in powdery mildew resistance. *Planta*, 216 (6): 891 - 902.
- Khalaf A A, Gmitter F G, Conesa A, Dopazo J, Moore G A. 2011. *Fortunella margarita* transcriptional reprogramming triggered by *Xanthomonas*

- citri* subsp. *citri*. BMC Plant Biology, 11 (1): 159.
- Kim D S, Hwang B K. 2012. The pepper MLO gene, *CaMLO2*, is involved in the susceptibility cell-death response and bacterial and oomycete proliferation. Plant Journal, 72 (5): 843 - 855.
- Kohler A, Schwindling S, Conrath U. 2002. Benzothiadiazole-induced priming for potentiated responses to pathogen infection, wounding, and infiltration of water into leaves requires the NPR1/NIM1 gene in *Arabidopsis*. Plant Physiology, 128 (3): 1046 - 1056.
- Koizumi M. 1982. Resistance of citrus plants to bacterial canker disease: a review. //International Society of Citriculture. 402 - 405.
- Li Hai-ying, Liu Ya-guang, Yang Qing-kai. 2002. A study of the structure and the resistance of resistant soybean II. Oil Crop Science, 24 (2): 58 - 60. (in Chinese)
- 李海英, 刘亚光, 杨庆凯. 2002. 大豆叶片结构与灰斑病抗性的研究 II. 中国油料作物学报, 24 (2): 58 - 60.
- Li Hong-ye. 2011. Color illustration of citrus diseases occurrence and control. Beijing: China Agriculture Press. (in Chinese)
- 李红叶. 2011. 柑橘病害发生与防治彩色图说. 北京: 中国农业出版社.
- Li Miao, Tan Gen-jia, Li Yao, Xue Lian. 2005. Resistance mechanism of kiwifruit cultivars to *Pseudomonas syringae* pv. *actinidae*. Chinese Journal of Plant Protection, 32 (1): 37 - 42. (in Chinese)
- 李 淼, 檀根甲, 李 瑶, 薛 莲. 2005. 猕猴桃品种对细菌性溃疡病的抗性机制. 植物保护学报, 32 (1): 37 - 42.
- Liu P, Shi Y Y, Zhu L W. 2018 Genetic variation in resistance to valsa canker is related to arbutin and gallic acid content in *Pyrus bretschneideri*. Horticultural Plant Journal, 4 (6): 223 - 238.
- Lu Guang-xin. 2002. Relationship between active oxygen species and plant disease resistance. Journal of Qinghai University, 20 (2): 11 - 15. (in Chinese)
- 芦光新. 2002. 活性氧与植物抗病性的关系. 青海大学学报, 20 (2): 11 - 15.
- Ma H, Chen J, Zhang Z. 2017. MAPK kinase 10.2 promotes disease resistance and drought tolerance by activating different MAPKs in rice. Plant Journal for Cell & Molecular Biology, 92 (4): 557 - 570.
- Ma Yan-yan, Zhang Jun, Chen Jiao, Zhang Ling-yun, Zhu Shi-ping, Yan Shu-tang, Zhong Guang-yan. 2014. Isolation, subcellular localization and expression analysis of citrus cysteine protease gene *CsCysP*. Acta Horticulturae Sinica, 41 (4): 621 - 630. (in Chinese)
- 马岩岩, 张 军, 陈 娇, 张凌云, 朱世平, 闫树堂, 钟广炎. 2014. 柑橘半胱氨酸蛋白酶基因 *CsCysP* 的分离、亚细胞定位及表达分析. 园艺学报, 41 (4): 621 - 630.
- Mitsuhara I, Malik K A, Miura M, Ohashi Y. 1999. Animal cell-death suppressors BCL-x(l) and CED-9 inhibit cell death in tobacco plants. Current Biology, 15 (14): 775 - 778.
- Mussell H W. 1973. Endo-polygalacturonase: evidence for involvement in *Verticillium wilt* of cotton. Phytopathology, 61: 62 - 70.
- Naveen Kumar, Robert C E, Pamela D R. 2011a. Antioxidant metabolism of grapefruit infected with *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. Environmental & Experimental Botany, 71 (1): 41 - 49.
- Naveen Kumar, Robert C E, Pamela D R. 2011b. H₂O₂ degradation is suppressed in kumquat leaves infected with *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. Scientia Horticulturae, 130 (1): 241 - 247.
- Naveen Kumar, Robert C E, Pamela D R. 2011c. Superoxide dismutase activity in kumquat leaves infected with *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. The Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 86 (1): 62 - 68.
- Peng A, Xu L, He Y, Lei T, Yao L, Chen S, Zou X. 2015. Efficient production of marker-free transgenic 'Tarocco' blood orange (*Citrus sinensis* Osbeck) with enhanced resistance to citrus canker using a Cre/loxP site recombination system. Plant Cell Tissue & Organ Culture, 123: 1 - 13.
- Qi Le, Qi Chun-jie. 2016. Status quo and development trend of world's citrus industry. Agricultural Outlook, 12 (12): 46 - 52. (in Chinese)
- 齐 乐, 祁春节. 2016. 世界柑橘产业现状及发展趋势. 农业生产展望, 12 (12): 46 - 52.
- Rustérucci C, Aviv D H, Rd H B, Dangl J L, Parker J E. 2001. The disease resistance signaling components EDS1 and PAD4 are essential regulators of the cell death pathway controlled by ISD1 in *Arabidopsis*. Plant Cell, 13 (10): 2211 - 2224.
- Schubert T S, Rizvi S A, Sun X, Gottwald T R, Graham J H, Dixon W N. 2001. Meeting the challenge of eradicating citrus canker in Florida again. Plant Disease, 85 (4): 340 - 356.
- Shen Wan-fang. 2008. Resistance mechanism of leaves structure to and the influence of the stand and climatic factors to *Colletotrichum gloeosporioides* [Ph. D. Dissertation]. Hefei: Anhui Agricultural University. (in Chinese)

- 沈万芳. 2008. 油茶炭疽病发生与林分及气候因素的关系及叶片结构抗病机理的研究[博士论文]. 合肥: 安徽农业大学.
- Shen Zhao-min. 2017. Status quo, development trend and countermeasures of citrus production and marketing in China. *Fruit Growers' Friend*, (9): 1. (in Chinese)
- 沈兆敏. 2017. 我国柑橘产销现状、发展趋势及对策建议. *果农之友*, (9): 1.
- Song Feng-ming, Zheng Zhong, Ge Xiu-chun. 1997. Role of peroxidase in the resistance of cotton seedlings to *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. *Journal of Zhejiang Agricultural University*, (2): 143 - 148. (in Chinese)
- 宋凤鸣, 郑重, 葛秀春. 1997. 过氧化物酶在棉花对枯萎病抗病性中的作用. *浙江农业大学学报*, (2): 143 - 148.
- Song Sheng-ying, Yang Guang-lan, Pan Sheng-yong, Zhao Chun-mu, Shi An-jiu. 2002. Investigation on the resistance of different varieties of citrus to *Xanthomonas citri*. *Forest Pest and Disease*, 21 (2): 34 - 36. (in Chinese)
- 宋盛英, 杨光兰, 潘盛勇, 赵春穆, 石安鸠. 2002. 不同柑橘品种对柑橘溃疡病的抗性调查. *中国森林病虫*, 21 (2): 34 - 36.
- Tian D, Wang J, Zeng X, Gu K, Qiu C, Yang X, Zhou Z, Goh M, Luo Y, Murata-Hori M, White F, Yin Z. 2014. The rice TAL effector-dependent resistance protein XA10 triggers cell death and calcium depletion in the endoplasmic reticulum. *Plant Cell*, 26 (1): 497 - 515.
- Tsunezuka H, Fujiwara M, Kawasaki T, Shimamoto K. 2015. Proteome analysis of programmed cell death and defense signaling using the rice lesion mimic mutant CDR2. *Molecular Plant-microbe Interactions: MPMI*, 18 (1): 52 - 59.
- Wang Jian-ming, Zhang Zuo-gang, Guo Chun-rong, He Yun-chun. 2001. Effects of *Fusarium oxysporum* on content of MDA and protective enzyme activities in different cultivars of watermelon. *Acta Phytopathologica Sinica*, 31 (2): 152 - 156. (in Chinese)
- 王建国, 张作刚, 郭春绒, 贺运春. 2001. 枯萎病菌对西瓜不同抗感品种丙二醛含量及某些保护酶活性的影响. *植物病理学报*, 31 (2): 152 - 156.
- Wang X, Tang C, Zhang H, Xu J R, Liu B, Jie L V, Han D, Huang L, Kang Z. 2011. TaDAD2, a negative regulator of programmed cell death, is important for the interaction between wheat and the stripe rust fungus. *Molecular Plant-microbe Interactions*, 24 (1): 79 - 90.
- Wang X, Wang X, Feng H, Tang C, Bai P, Wei G, Huang L, Kang Z. 2012. *TaMCA4*, a novel wheat metacaspase gene functions in programmed cell death induced by the fungal pathogen *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. *Molecular Plant-microbe Interactions*, 25 (6): 755 - 764.
- Wang Yin. 2010. Citrus canker resistance of different types of physiological differences between comparative and resistance induced by SA [Ph. D. Dissertation]. Wuhan: Huazhong Agricultural University. (in Chinese)
- 王引. 2010. 柑橘溃疡病不同抗性类型生理差异比较及 SA 诱导的抗性研究[博士论文]. 武汉: 华中农业大学.
- Wang Yuan, Liang Jun, Zhang Xing-yao. 2008. The programmed cell death in plant disease resistance. *Scientia Silvae Sinica*, 44: 143 - 149. (in Chinese)
- 王媛, 梁军, 张星耀. 2008. 植物抗病过程中的细胞程序性死亡. *林业科学*, 44: 143 - 149.
- Wei Ying-ying, Wang Feng-long, Qian Yu-mei, Chen De-xin. 2005. Dynamic changes of catalase during the interaction of tobacco and *Cucumber mosaic virus*. *Acta Phytopathologica Sinica*, 35 (4): 359 - 361. (in Chinese)
- 魏颖颖, 王凤龙, 钱玉梅, 陈德鑫. 2005. 烟草和黄瓜花叶病毒互作中过氧化氢酶的动态变化. *植物病理学报*, 35 (4): 359 - 361.
- Wituszynska W, Slesak I, Vanderauwera S, Szechynskahebd M, Kornas A, Kelen K V D, Per M, Barbara K, Sebastian M, Frank V B, Stanislaw K. 2013. LSD1, EDS1 and PAD4 conditionally regulate cellular signaling homeostasis, photosynthesis, water use efficiency and seed yield in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 17 (1): 2553 - 2566.
- Wojtaszek P. 1997. Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochemistry*, 322: 681 - 692.
- Wu G, Shortt B J, Lawrence E B, Levine E B, Fitzsimmons K C, Shah D M. 1995. Disease resistance conferred by expression of a gene encoding H₂O₂-generating glucose oxidase in transgenic potato plants. *Plant Cell*, 7: 1357 - 1368.
- Yao Ting shan, Zhou Yan, Zhou Chang yong. 2015. Research development of the differentiation and control of citrus bacterial canker disease. *Acta Horticulturae Sinica*, 45 (9): 1699 - 1706. (in Chinese)
- 姚廷山, 周彦, 周常勇. 2015. 柑橘溃疡病菌分化及防治研究进展. *园艺学报*, 45 (9): 1699 - 1706.
- Zhang D, Liu D, Lv X, Wang Y, Xun Z, Liu Z, Li F, Lu H. 2014. The cysteine protease CEP1, a key executor involved in tapetal programmed cell death, regulates pollen development in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 26 (7): 29 - 39.
- Zhu Da-hai, Ma Xu-jun. 2003. Functional roles of the plant superoxide dismutase. *Hereditas*, 25 (2): 225 - 231. (in Chinese)
- 朱大海, 马旭俊. 2003. 植物超氧化物歧化酶(SOD)的研究进展. *遗传*, 25 (2): 225 - 231.