

DOI: 10.11766/trxb20230220074

沈敏, 蔡创, 宋练, 张继双, 陶冶, 王东明, 杨雄, 韦薇, 朱春梧. 大气 CO₂ 浓度升高和温升对水稻纹枯病侵染后的相关蛋白和防御酶的影响[J]. 土壤学报, 2023,

SHEN Min, CAI Chuang, SONG Lian, ZHANG Jishuang, TAO Ye, WANG Dongming, YANG Xiong, WEI Wei, ZHU Chunwu. Effects of Free-air CO₂ Enrichment and Temperature Increase on Related Proteins and Defense Enzymes in Plants Infected with Rice Sheath Blight[J]. Acta Pedologica Sinica, 2023,

大气 CO₂ 浓度升高和温升对水稻纹枯病侵染后的相关蛋白和防御酶的影响*

沈敏^{1,2}, 蔡创¹, 宋练¹, 张继双^{1,2}, 陶冶^{1,2}, 王东明^{1,2},
杨雄^{1,2}, 韦薇^{1,2}, 朱春梧^{1†}

(1. 土壤与农业可持续发展国家重点实验室 (中国科学院南京土壤研究所), 南京 210008; 2. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 纹枯病 (sheath blight) 作为一种土传病害, 其发生和发展严重威胁到水稻 (*Oryza sativa* L.) 的生产。目前, 大气 CO₂ 浓度 ([CO₂]) 和温度升高如何影响感病植株内病程相关蛋白 (pathogenesis related proteins, PR 蛋白) 和防御酶尚不清楚。本研究以纹枯病易感品种 (Lemont) 和抗性品种 (YSBR1) 为实验材料, 利用田间开放式自由大气 [CO₂] 和温度升高 (T-FACE) 平台设置四个处理: 对照、[CO₂] 升高 ([CO₂] 升高至 590 μmol·mol⁻¹)、温升 (冠层温度升高 2 °C) 及 [CO₂] 升高和温升交互, 通过人工接种 *R. solani*, 探究不同抗性品种叶片和茎鞘 PR 蛋白与防御酶活性, 以及土壤基本理化性状的响应。研究结果表明: 高 [CO₂] 和温升下耕作土制成的土壤浸提液培养基中 *R. solani* 生长速率无显著差异, 接种 *R. solani* 后病斑发展速率与土壤基本理化性状无关。水稻植株感病后, 两个品种叶片和茎鞘中 PR 蛋白和相关防御酶表现出明显差异, 且在高 [CO₂] 和温升条件下, 该差异进一步增大。对于茎鞘中的 PR 蛋白和防御酶, 高 [CO₂] 和温升交互处理明显增加 Lemont 和 YSBR1 茎鞘中过氧化氢酶 (CAT)、苯丙氨酸解氨酶 (PAL)、β-1,3-葡聚糖酶 (GLU) 和超氧化物歧化酶 (SOD) 活性。对于两个水稻品种, 当 *R. solani* 入侵后, 在各处理下, YSBR1 叶片中 PR 蛋白和相关防御酶以及茎鞘中 SOD 和 CAT 活性均显著高于 Lemont, 且 YSBR1 病斑发展速率显著低于 Lemont。在整个发病过程中, 温升处理及其与高 [CO₂] 交互处理均显著增加易感品种 Lemont 的病斑发展速率 (增加了 21% ~ 45%), 而对抗性品种 YSBR1 的病斑发展速率无显著影响。相关性分析结果表明, 各处理下 Lemont 和 YSBR1 植株纹枯病病斑的发展速率均与其茎鞘中 GLU 活性存在显著正相关。因而, 在 *R. solani* 侵染后, 抗病品种中较高的 PR 蛋白和防御酶活性形成的防卫反应, 能够有效减轻未来高 [CO₂] 和温升条件对纹枯病病斑发展速度的影响。研究结果对选育纹枯病抗性品种来适应未来气候变化背景下的水稻生产提供重要的借鉴意义。

关键词: 水稻纹枯病; 病程相关蛋白; 防御酶; 大气 CO₂ 浓度升高; 温升

中图分类号: S435.111 **文献标志码:** A

* 国家自然科学基金项目 (31870423)、广东省科技厅重点项目 (2020B0202010006) 和南京市科技局碳中和碳达峰科技专项 (20221103) 共同资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 31870423), the Key-Area Research and Development Program of Guangdong Province, China (No. 2020B0202010006), and the Carbon Peaking and Carbon Neutrality Special Fund for Science and Technology from Nanjing Science and Technology Bureau (No. 20221103)

† 通讯作者 Corresponding author, E-mail: cwzhu@issas.ac.cn

作者简介: 沈敏 (1993—), 女, 江苏泰州人, 博士研究生, 主要研究气候变化对作物病害的影响。E-mail: shenmin@issas.ac.cn
收稿日期: 2023-02-22; 收到修改稿日期: 2023-05-19; 网络首发日期 (www.cnki.net):

Effects of Free-air CO₂ Enrichment and Temperature Increase on Related Proteins and Defense Enzymes in Plants Infected with Rice Sheath Blight

SHEN Min^{1,2}, CAI Chuang¹, SONG Lian¹, ZHANG Jishuang^{1,2}, TAO Ye^{1,2}, WANG Dongming^{1,2}, YANG Xiong^{1,2}, WEI Wei^{1,2}, ZHU Chunwu^{1†}

(1. State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: 【Objective】 Sheath blight (ShB) is a soil-borne disease, whose occurrence and development seriously threatens rice (*Oryza sativa* L.) production. However, it is still unclear how elevated CO₂ concentration ([CO₂]) and temperature affect pathogenesis-related proteins (PR proteins) and defense enzymes in plants infected with *Rhizoctonia solani*. 【Method】 In this study, temperature by free-air CO₂ enrichment (T-FACE) system was used with four treatments: ambient condition; elevated [CO₂] ([CO₂] up to 590 μmol·mol⁻¹); elevated temperature (temperature increased 2 °C); the combination of elevated [CO₂] and elevated temperature. Two cultivars (a susceptible variety, Lemont and a resistant variety, YSBR1) were planted to explore the response of PR proteins and defense enzymes activities in leaves and stems for two cultivars by artificial inoculation of *R. solani*, as well as basic physical and chemical properties of soil. 【Result】 Results indicated that there was no significant difference in the growth rate of *R. solani* on soil extract medium, which was made by bulk soil under elevated [CO₂] and temperature. After inoculation with *R. solani*, the development rate of the ShB lesion was not related to the basic physical and chemical properties of soil. The combination of elevated [CO₂] and elevated temperature induced different effects on PR proteins and defense enzymes activities in the leaves of two cultivars. For the PR proteins and defense enzymes in stems, the combination of elevated [CO₂] and elevated temperature obviously increased the catalase (CAT), phenylalanine ammonia-lyase (PAL), β-1, 3-glucanase (GLU) or superoxide dismutase (SOD) activities for both Lemont and YSBR1. For different cultivars, after being infected with *R. solani*, the activities of PR proteins and defense enzymes in the leaves and SOD and CAT in the stems for YSBR1 were significantly higher than those for Lemont under different treatments, and the development rate of ShB lesion for YSBR1 was significantly lower than that for Lemont. During the whole disease infection, elevated [CO₂] and the combination of elevated [CO₂] and elevated temperature both significantly increased the development rate of rice ShB for Lemont by 21%-45%, but not for YSBR1. The correlation analysis showed that under different [CO₂] and temperature treatments, the development rate of ShB was significantly positively correlated with GLU activity in stems for Lemont and YSBR1. 【Conclusion】 After inoculated *R. solani*, the defense reaction formed by PR proteins and defense enzymes in resistant cultivar can effectively reduce the effect of elevated [CO₂] and temperature on the development rate of ShB in the future. This study can provide applications for breeding ShB-resistant cultivars to ensure global rice production under future climate change.

Keywords: Rice sheath blight; PR proteins; Defense enzymes; Elevated [CO₂]; Elevated temperature

水稻 (*Oryza sativa* L.) 是人类最重要的口粮作物之一^[1]。水稻纹枯病属于土传性真菌病害, 由立枯丝核菌 (*Rhizoctonia solani*) 引起, 该病害的发生和危害程度日益严重, 一般可造成水稻减产 10%~30%, 严重时可达 50%^[2-4]。土壤环境因素 (如 pH、营养物质等) 会影响寄主和病原菌, 既可能促进寄主的生长发育提高抵抗力也可能加剧病害的发生^[5]。几丁质和 β-1,3-葡聚糖是大多数真菌细胞壁的主要骨架成分^[6]。几丁质酶 (chitinase, CHT) 可以通过破坏菌丝尖端合成的几丁质来抑制病原菌的生长, 也可协同 β-1,3-葡聚糖酶 (β-1,3-glucanase, GLU) 等充分发挥抑菌活性^[6-7]。因此, CHT 和 GLU 是植物防卫真菌病害途径中重要的病程相关蛋白 (pathogenesis related proteins, PR 蛋白)^[7]。一般而言纹枯病

菌侵染植株后,可诱导 PR 蛋白的增加^[6]。左示敏等^[4]认为超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)是防御系统中最先表达的一个重要防御酶,其在抗病品种的活性远大于感病品种。当感染纹枯病菌后,寄主还会启动另一个防御体系,即产生过氧化氢酶(catalase, CAT)来阻止病原菌进一步的侵染和破坏^[7]。此外,多酚氧化酶(polyphenol oxidase, PPO)与苯丙氨酸解氨酶(phenylalanine ammonia-lyase, PAL)均可参与植物体内木质素等的合成,以此来抑制病害的发展^[3, 8]。

作为全球气候变化的主要特征,大气 CO₂ 浓度([CO₂])和空气温度已经并将持续增加。预计到 21 世纪末,[CO₂]可达 500 ~ 1000 μmol·mol⁻¹,相应的气温将增加 1.0 ~ 3.7 °C^[9]。已有研究表明,高[CO₂]和温升会增加纹枯病的病情发展风险^[10]。当 *R. solani* 侵染后,高[CO₂]和温升对植株叶片和茎鞘 PR 蛋白与相关防御酶的影响,及其与纹枯病发生程度的作用机制尚不清楚。

因此,本研究选用水稻纹枯病易感品种 Lemont (*Oryza sativa* L. *japonica*) 和抗性品种 YSBR1 (*Oryza sativa* L. *indica*) 为试验对象,利用开放式自由大气[CO₂]升高和温升(T-FACE)平台,模拟未来气候变化下[CO₂]升高和温升情景,通过人工接种 *R. solani* 探究水稻纹枯病抗性和易感品种病斑发展速率,探究叶片和茎鞘中 PR 蛋白和相关防御酶、土壤基本理化性状对[CO₂]和温度升高的响应及其与纹枯病病斑发展速率的内在相关性。

1 材料与方法

1.1 试验地点和 T-FACE 平台信息

T-FACE 平台位于江苏省常熟市古里镇康博村(31°30'N, 120°33'E),该试验地点属于典型的亚热带季风气候^[11-12]。该平台由 12 个正八边形的小区组成;每个小区直径 8 m,覆盖面积约 50 m²;各小区具有相似的土壤性质与农艺历史。该平台共设有 4 个处理:正常田间环境条件作为对照(CT)、大气[CO₂]升高至 590 μmol·mol⁻¹(C+T)、冠层温度较对照升高 2 °C(CT+)以及高[CO₂]与温升互作(C+T+)处理,每个处理设 3 个重复。有关该 T-FACE 平台的详细描述和设计原理等可见 Cai 等^[11]。

1.2 试验栽培管理

供试水稻品种为 Lemont(粳稻亚种)和 YSBR1(籼稻亚种),于 2020 年和 2021 年的水稻试验季种植。其中, Lemont 为水稻纹枯病易感品种,YSBR1 为高抗性品种^[4, 13]。Lemont 和 YSBR1 的生育期相近,2020 年分别为 142 d 和 146 d,2021 年均为 143 d。将两品种置于相同的大气环境下及水分管理下育秧,分别于 2020 年 6 月 22 日和 2021 年 6 月 26 日移栽。每穴移栽 2 颗苗,株行距为 16.7 cm × 25 cm (即种植密度 24 穴·m⁻²)。在 2020 和 2021 年的水稻生长季 6—10 月,T-FACE 运行期间[CO₂]平均增幅在 183 ~ 205 μmol·mol⁻¹,温度平均增幅在 1.6 ~ 2.2 °C。两年的氮肥基肥、分蘖肥和穗肥的量均为 6.9、6.0 和 5.2 g·m⁻²,并进行统一的田间管理措施^[10]。在完成接种调查试验后会进行正常田间病害防治管理,避免影响试验小区其他植株。

1.3 田间人工接种 *R. solani* 及病斑发展速率调查试验

研究使用中等强度的纹枯病致病菌株(*R. solani*, YN-7 isolate),由扬州大学病理教研室提供,有关该病株的详细信息见左示敏等^[4, 14]。接种时,首先将扁平的薄木签截成长 1.0 cm、宽 2 mm,平铺于空白培养皿中进行高压灭菌。然后加入灭菌后的马铃薯葡萄糖培养液(potato dextrose broth, PDB),并在培养皿中央接入相同大小的 *R. solani* 菌丝块,置于 28 °C 黑暗环境中培养至菌丝铺满培养基。将定殖 *R. solani* 的木签作为接种物,分别于 2020 年和 2021 年 8 月 17 日接种到田间对照和处理下生长的水稻植株。每个小区, Lemont 和 YSBR1

均接种 12 穴，每穴接种 3 个主茎。具体为将定殖 *R. solani* 的木签嵌入到倒 3 叶鞘中约 1 cm 深，并在接种后保持叶鞘抱茎的状态不变^[4, 10, 13]。于 2020 年和 2021 年的 8 月 17 日接种 *R. solani*，9 月 4 日进行病斑调查，侵染试验持续 19 d。计算整个侵染试验期间病斑的发展速率：

$$V = L/D \quad (1)$$

式中， V 为病斑垂直方向发展速率 ($\text{mm} \cdot \text{d}^{-1}$)； L 为感病植株上病斑垂直方向的总长 (mm)，用尺测量从病斑垂直方向上最低点到最高点的长度； D 为发病发展的天数 (d)，即侵染试验总天数 19。

1.4 土壤样品分析及 *R. solani* 培养试验

于 2020 年 9 月 5 日田间采集不同处理下 Lemont 和 YSBR1 的耕作土，根据样品分析标准将土壤样品部分自然风干。风干土过 20 目筛，用 Mettler-Toledo pH 计测土壤 pH，土水比 1:2.5 (w/w)。称取 5 g 过 100 目筛的风干土， $\text{H}_2\text{SO}_4\text{-H}_2\text{O}_2$ 消煮冷却后定容至 50 mL，用火焰光度法测定全钾 (total potassium, TK)，用元素分析仪 (Perkin Elmer 2400, Series II CHNS/O analyzer, Perkin Elmer Inc., Waltham, MA, 美国) 测定土壤全氮 (total nitrogen, TN) 和全磷 (total phosphorus, TP)。根据重铬酸钾外加热法测定土壤总有机碳 (total organic carbon, TOC) ^[15]。

利用上述各处理下 Lemont 和 YSBR1 过 20 目筛风干后的耕作土，制作土壤浸液培养基。分别称取 100 g 土壤样品并加入 200 mL 超纯水，在摇床 $180 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 转速下，震荡 60 min 充分混匀。将液体过滤至空白烧杯锥形瓶中，定容至 500 mL，按照每 100 mL 煎汁：1 g 琼脂比进行添加。121 °C 高压灭菌后转移至灭菌过的超净工作台中，在直径为 90 mm 的新培养皿中加入相同体积培养基，冷却、凝固后备用。最后，将准备好的 *R. solani* 菌丝块接种至新制作的各处理下的土壤浸提液培养基中间，28 °C 的黑暗条件下培养，每个温度梯度中不同培养基设置 5 个重复。36 h 后十字交叉法测量菌落生长直径，计算 *R. solani* 菌丝生长速率 ($\text{mm} \cdot \text{h}^{-1}$) ^[16]。

1.5 PR 蛋白和防御酶活性测定

于 2020 年 9 月 4 日进行田间取样。每个小区每个品种取 3 个侵染的单茎，每个单茎分样为接种 *R. solani* 的茎秆所对应的剑叶，以及病健交界处的茎鞘（包含茎秆和叶鞘）。取样后，立刻用液氮速冻，-80 °C 保存备用。关于定量蛋白浓度的测定，分别称取一定量样品置入离心管中，后按质量 (g) 与 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH 7.4 磷酸盐缓冲液 (mL) 1:9 的比例在冰水浴下进行匀浆，取上清液用生理盐水按 1:9 稀释成 1% 组织匀浆待测。根据 BCA 微板法（货号：P0012S，碧云天生物技术公司），在碱性条件下，蛋白将 Cu^{2+} 还原为 Cu^+ ， Cu^+ 与 BCA 试剂形成紫色的络合物，在 562 nm (Thermo Evolution 201, 美国) 处测得吸光度，最终计算蛋白浓度^[9]。关于 PR 蛋白和防御酶活性的测定，分别称取 0.5 g 样品加入一定量的 PBS (pH=7.4)，充分匀浆，离心收集上清液待测。PR 蛋白 (GLU 和 CHT) 和防御酶 (SOD、CAT、PPO 和 PAL) 活性分别用对应的酶联免疫法试剂盒 (货号：JL22712、JL13589、JL22719、JL22741、JL22725、JL22714；上海江莱生物科技有限公司) 进行测定，具体操作参照试剂盒详细步骤，最终反应液通过酶标仪 (Thermo Multiskan Sky, 美国) 测定在 450 nm 下的吸光度，酶活性表示为每克蛋白质的活性单位 ($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ pro}$) ^[10]。

1.6 数据处理

使用 IBM SPSS 26 对数据进行统计分析，采用单变量方差分析 (univariate analysis of variance, ANOVA) 来检验品种、 $[\text{CO}_2]$ 和温度对 PR 蛋白和相关防御酶活性及纹枯病病斑发展速率的影响，显著水平为 $P < 0.05$ 。利用 Origin pro 2023 进行绘图。

2 结果

2.1 [CO₂]升高和温升对土壤基本理化性状的影响

就品种而言, Lemont 的耕作土的 pH 显著低于 YSBR1(表 1)。就处理影响而言, 高[CO₂] (C+T) 显著降低了 Lemont 和 YSBR1 耕作土的 pH, 但显著增加了 Lemont 和 YSBR1 耕作土的 TN 含量和 TOC 含量。温升 (CT+) 显著增加了 Lemont 和 YSBR1 耕作土的 pH、TOC 含量, 以及 YSBR1 耕作土的 TN 含量, 但是显著降低了 Lemont 耕作土的 TP 含量。此外, [CO₂]和温度对 Lemont 耕作土的 pH 与 YSBR1 耕作土的 TN 含量具有显著交互作用。

表 1 土壤基本理化性状及[CO₂]、温度和品种对理化性质影响的方差分析

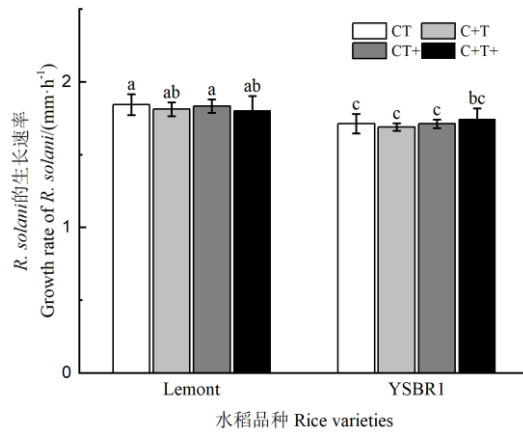
Table 1 The basic physical and chemical properties of soil, and summary of the analysis of variance (ANOVA) for the influence of [CO₂], temperature, and variety on physical and chemical properties of soil

品种 Variety	处理 Treatment	pH	总有机碳 TOC/(g·kg ⁻¹)	全氮 TN/(g·kg ⁻¹)	全磷 TP/(g·kg ⁻¹)	全钾 TK/(g·kg ⁻¹)
Lemont	CT	6.75±0.05	13.09±0.47	0.43±0.07	0.97±0.04	12.70±0.07
	C+T	6.73±0.08	16.81±2.22	0.62±0.21	1.04±0.21	12.73±2.66
	CT+	6.96±0.03	15.20±0.77	0.49±0.12	0.78±0.06	12.32±1.18
	C+T+	6.73±0.01	19.41±1.30	0.84±0.18	0.84±0.02	12.55±0.24
YSBR1	CT	6.85±0.04	13.95±3.20	0.52±0.03	0.95±0.09	12.61±1.42
	C+T	6.80±0.06	17.45±3.01	0.66±0.14	0.98±0.12	12.97±1.51
	CT+	6.99±0.06	16.51±2.21	0.48±0.06	0.91±0.06	14.36±1.02
	C+T+	6.82±0.07	21.61±0.85	0.95±0.11	0.89±0.05	12.40±0.59
方差分析 Analysis of variance						
Lemont	C	0.002*	0.001*	0.018*	0.317	0.879
	T	0.005*	0.017*	0.160	0.016*	0.755
	C × T	0.007*	0.761	0.390	0.992	0.911
YSBR1	C	0.009*	0.017*	<.001*	0.858	0.280
	T	0.039*	0.048*	0.046*	0.219	0.417
	C × T	0.111	0.594	0.014*	0.590	0.133
	V	0.005*	0.341	0.296	0.525	0.344

注: CT, 对照处理; C+T, [CO₂]升高处理; CT+, 温升处理; C+T+, [CO₂]升高和温升互作处理。V、C 和 T 分别代表品种、[CO₂]和温度。平均值±标准偏差。*则表示差异达到显著水平 ($P < 0.05$)。下同。Note: CT, ambient condition; C+T, elevated [CO₂]; CT+, elevated temperature; C+T+, the combination of elevated [CO₂] and elevated temperature. V, C, and T represent variety, [CO₂] and temperature, respectively. Means±standard deviation. * indicates a significant difference ($P < 0.05$). The same below.

2.2 不同土壤浸提液培养基对 *R. solani* 生长速率的影响

就品种而言, Lemont 对应的土壤浸提液培养基中 *R. solani* 菌丝生长速率整体上显著高于 YSBR1, 增幅为 3.48%~7.64% (图 1)。就处理影响而言, 与对照相比, 高[CO₂]、温升以及两者交互作用下 Lemont 和 YSBR1 对应的土壤浸提液培养基中 *R. solani* 的生长速率均无显著差异 (图 1)。



注：不同小写字母表示处理间差异达 $P < 0.05$ 显著水平，下同。Note: Different lowercase letters indicate significant differences between different treatments, $P < 0.05$, the same below.

图 1 各处理下 Lemont 和 YSBR1 对应土壤浸提液培养基中 *R. solani* 生长速率

Fig. 1 Growth rate of *R. solani* cultured on soil extract medium by cvs Lemont and YSBR1 under different treatments

2.3 [CO₂]升高和温升对感病水稻植株叶片中 PR 蛋白和相关防御酶活性的影响

就品种而言，在对照以及高[CO₂]和温升的处理下，YSBR1 感病植株叶片中测定的 PR 蛋白和相关防御酶活性均显著高于 Lemont。就处理影响而言，高[CO₂]和温升对两个品种叶片的 PR 蛋白和相关防御酶活性均无显著影响（图 2，表 2）。高[CO₂]和温度对 Lemont 植株叶片的 GLU、SOD 和 POD，及 YSBR1 植株叶片的 GLU 和 CHT 有显著的交互作用（表 2）。与对照相比，[CO₂]和温度同时升高会降低 Lemont 和 YSBR1 叶片中的 GLU 活性（分别降低 6.03%和 3.72%），但增加了 Lemont 叶片中的 SOD 和 PPO 活性（分别增加 4.47%和 23.52%）以及 YSBR1 叶片中 CHT 的活性（增加 6.75%，图 2，表 2）。

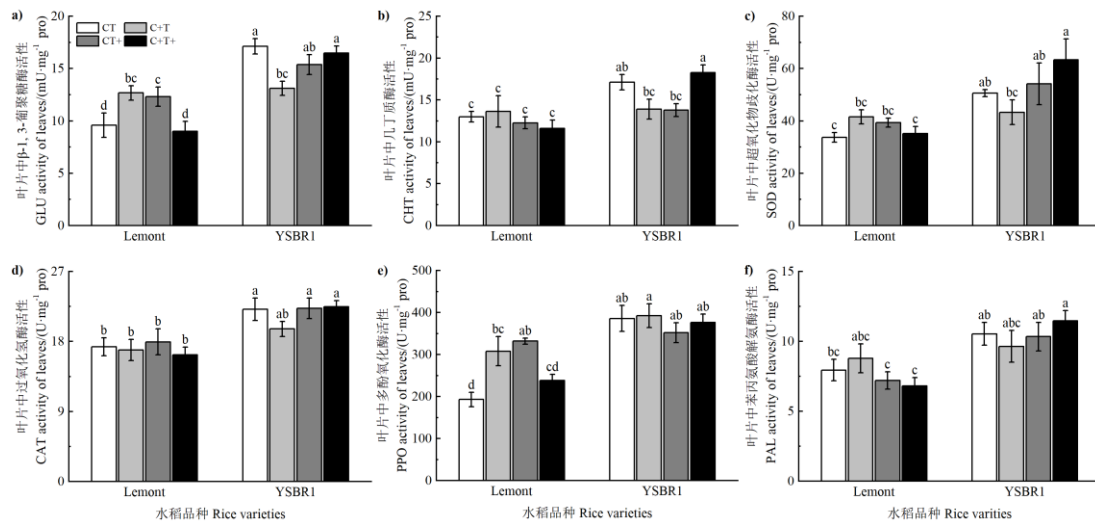


图 2 不同[CO₂]和温度处理对感病后的 Lemont 和 YSBR1 叶片中 β -1,3-葡聚糖酶 (a)、几丁质酶 (b)、超氧化物歧化酶 (c)、过氧化氢酶 (d)、多酚氧化酶 (e) 和苯丙氨酸解氨酶 (f) 活性的影响

Fig. 2 Effects of different [CO₂] and temperature treatments on GLU (a), CHT (b), SOD (c), CAT (d), PPO (e) and PAL (f) activities in leaves in infected plants with *R. solani* for cvs Lemont and YSBR1

表 2 不同[CO₂]、温度和品种间感病植株叶片中 PR 蛋白与相关防御酶活性差异的方差分析

Table 2 Summary of analysis of variance (ANOVA) for the influence of [CO₂], temperature and variety on the PR proteins and defense enzymes activities in leaves in infected plants with *R. solani*

品种	处理	β -1,3-葡聚糖酶	几丁质酶	超氧化物歧化酶	过氧化氢酶	多酚氧化酶	苯丙氨酸解氨酶
Variety	Treatment	GLU	CHT	SOD	CAT	PPO	PAL
Lemont	C	0.909	0.998	0.430	0.455	0.623	0.775
	T	0.635	0.272	0.874	0.993	0.137	0.117
	C $\times$ T	0.010*	0.595	0.029*	0.645	0.001*	0.448
YSBR1	C	0.095	0.530	0.880	0.348	0.565	0.906
	T	0.319	0.601	0.091	0.236	0.370	0.415
	C $\times$ T	0.010*	0.004*	0.213	0.277	0.748	0.315
	V	<.001*	0.001*	<.001*	<.001*	<.001*	<.001*

注：表中 V、C 和 T 分别代表品种、[CO₂]和温度。*则表示差异达到显著水平 ($P < 0.05$)。下同。Note: V, C, and T represent variety, [CO₂] and temperature, respectively. * indicates a significant difference ($P < 0.05$). The same below.

2.4 [CO₂]升高和温升对感病植株茎鞘中 PR 蛋白和相关防御酶活性的影响

就品种而言, YSBR1 感病茎鞘中部分防御酶 (SOD 和 CAT) 活显著高于 Lemont (图 3, 表 3)。就处理影响而言, 高[CO₂]会显著降低 Lemont 茎鞘中 CHT 活性; 温升会显著增加 Lemont 茎鞘中 GLU, CHT, PPO 和 CAT 活性以及 YSBR1 茎鞘中 CHT 活性 (图 3, 表 3)。此外, [CO₂]和温度对 Lemont 茎鞘的 CAT 和 PAL 以及 YSBR1 茎鞘的 GLU 和 SOD 有显著交互作用 (表 3)。与对照相比, [CO₂]和温度同时升高会增加 Lemont 茎鞘中 CAT 和 PAL 活性 (36.72%和 10.18%) 以及 YSBR1 茎鞘中 GLU 和 SOD 活性 (12.98%和 16.20%, 图 3, 表 3)。

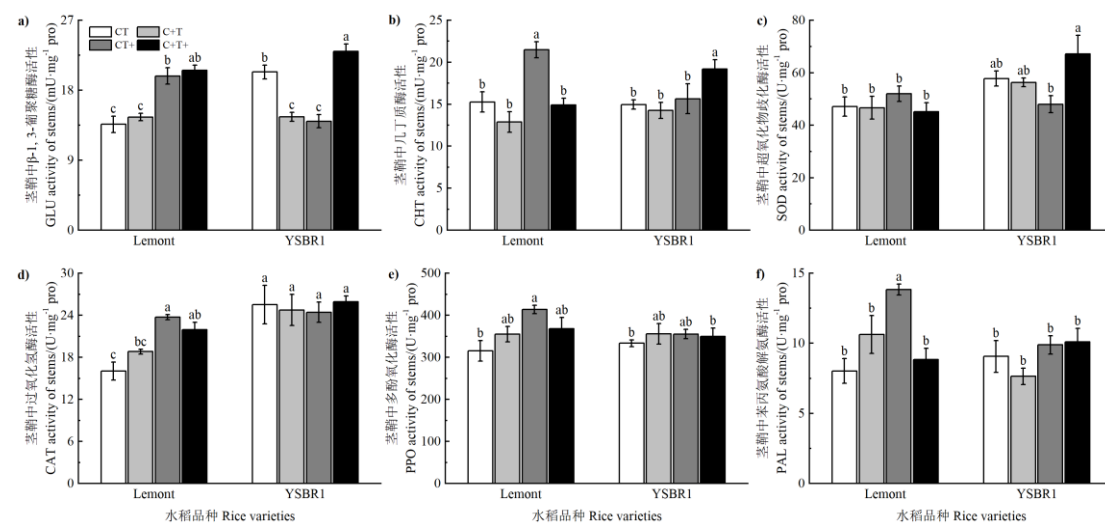


图 3 不同[CO₂]和温度处理对感病后的 Lemont 和 YSBR1 茎鞘中 β -1,3-葡聚糖酶 (a)、几丁质酶 (b)、超氧化物歧化酶 (c)、过氧化氢酶 (d)、多酚氧化酶 (e) 和苯丙氨酸解氨酶 (f) 活性的影响

Fig. 3 Effects of different [CO₂] and temperature treatments on GLU (a), CHT (b), SOD (c), CAT (d), PPO (e) and PAL (f) activities in stems in infected plants with *R. solani* for cvs Lemont and YSBR1

表 3 不同[CO₂]、温度和品种间感病植株茎鞘中 PR 蛋白与相关防御酶活性差异的方差分析

Table 3 Summary of analysis of variance (ANOVA) for the influence of [CO₂], temperature and variety on the PR proteins and defense enzymes activities in stems in infected plants with *R. solani*

品种	处理	β -1,3-葡聚糖酶	几丁质酶	超氧化物歧化酶	过氧化氢酶	多酚氧化酶	苯丙氨酸解氨酶
Variety	Treatment	GLU	CHT	SOD	CAT	PPO	PAL
Lemont	C	0.350	0.003*	0.343	0.586	0.890	0.231
	T	<.001*	0.005*	0.654	<.001*	0.028*	0.061

	C × T	0.914	0.083	0.404	0.030*	0.074	0.003*
YSBR1	C	0.091	0.268	0.072	0.856	0.651	0.506
	T	0.244	0.046*	0.906	0.982	0.665	0.094
	C × T	<.001*	0.113	0.042*	0.582	0.442	0.372
	V	0.178	0.873	0.003*	<.001*	0.294	0.086

2.5 [CO₂]升高和温升对水稻纹枯病发展速率的影响

2020 年和 2021 年结果均显示纹枯病易感品种 Lemont 的病斑发展速率显著高于抗纹枯病品种 YSBR1（表 4）。年际间[CO₂]升高和温升对水稻植株纹枯病病斑发展速率的影响也是一致的。具体表现为，[CO₂]升高对 2020 年和 2021 年两个品种纹枯病病斑发展速率均无显著影响；而温升显著增加 2020 年和 2021 年两个品种纹枯病病斑发展速率（表 4）。此外，本研究结果还发现，温升对 2020 年水稻植株纹枯病病斑发展速率的影响表现出明显的品种差异。相关数据表明，温升对 2020 年 Lemont 植株的纹枯病病斑发展速率的促进作用要明显高于 YSBR1 植株。[CO₂]和温度对 2020 年水稻植株纹枯病病斑发展速率有显著的交互作用（表 4）。与对照相比，2020 年和 2021 年温升及其与高[CO₂]互作会增加 Lemont 植株纹枯病病斑发展速率（约为 21% ~ 45%）以及 YSBR1 植株纹枯病病斑发展速率（约为-4% ~ 28%，表 4）。

表 4 Lemont 和 YSBR1 在 CT、C+T、CT+和 C+T+处理下纹枯病病斑垂直扩展速率

Table 4 Development rate of the vertical length of ShB lesions for cvs Lemont and YSBR1 under ambient condition, elevated [CO₂], elevated temperature, and the combination of elevated [CO₂] and elevated temperature treatments

品种 Variety	处理 Treatment	纹枯病垂直病斑扩展速率 Development rate of vertical length of ShB lesions/(mm·d ⁻¹)	
		2020 年	2021 年
Lemont	CT	3.18±0.16c	4.11±0.67bc
	C+T	3.01±0.27c	3.90±0.72c
	CT+	4.04±0.24b	5.94±0.82a
	C+T+	4.41±0.31a	4.95±0.06b
YSBR1	CT	2.10±0.01d	2.28±0.35d
	C+T	1.80±0.17d	2.31±0.28d
	CT+	2.02±0.16d	2.91±0.27d
	C+T+	2.08±0.06d	2.42±0.14d
方差分析 Analysis of variance			
	V	<.001*	<.001*
	C	0.912	0.054
	T	<.001*	<.001*
	V × C	0.198	0.378
	V × T	<.001*	0.017*
	C × T	0.012*	0.124
	V × C × T	0.573	0.755

2.6 纹枯病病斑发展速率与感病植株内 PR 蛋白和相关防御酶的关系

对叶片的 PR 蛋白和相关防御酶活性与纹枯病病斑发展速率的相关性分析表明，Lemont 植株纹枯病病斑发展速率仅与叶片的 PAL 呈显著的负相关（表 5）。对茎鞘的 PR 蛋白和相关防御酶活性与纹枯病病斑发展速率的相关性分析表明，Lemont 植株纹枯病病斑发展速率与茎鞘的 GLU 和 CAT 呈显著的正相关；YSBR1 植株纹枯病病斑发展速率与茎鞘的 GLU 和 PAL 呈显著的正相关（表 5）。

表 5 Lemont 和 YSBR1 纹枯病病斑垂直发展速率与叶片和茎鞘中 PR 蛋白和相关防御酶活性的相关性
Table 5 Correlation between development rate of vertical length of ShB lesions for cvs Lemont and YSBR1 and PR proteins and defense enzymes activities in leaves and stems

植株部位 Plant parts	相关指标 Related indicators	纹枯病垂直发展速率 Development rate of vertical length of ShB lesions			
		Lemont		YSBR1	
		<i>r</i>	<i>P</i> -value	<i>r</i>	<i>P</i> -value
叶片 Leaf	β-1,3-葡聚糖酶 GLU	-0.30	ns	0.43	ns
	几丁质酶 CHT	-0.26	ns	0.27	ns
	超氧化物歧化酶 SOD	-0.17	ns	0.35	ns
	过氧化氢酶 CAT	0.02	ns	0.12	ns
	多酚氧化酶 PPO	0.17	ns	-0.47	ns
	苯丙氨酸解氨酶 PAL	-0.63	*	0.21	ns
茎鞘 Stem	β-1,3-葡聚糖酶 GLU	0.88	***	0.59	*
	几丁质酶 CHT	0.39	ns	0.28	ns
	超氧化物歧化酶 SOD	0.10	ns	0.18	ns
	过氧化氢酶 CAT	0.72	***	0.36	ns
	多酚氧化酶 PPO	0.44	ns	-0.04	ns
	苯丙氨酸解氨酶 PAL	0.17	ns	0.61	*

注：*、**、***分别表示 $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ 、 $P < 0.001$ 水平影响显著，ns 表示无显著影响 ($P > 0.05$)。Note: *, **, and *** indicate significant levels of $P < 0.05$, $P < 0.01$, and $P < 0.001$, respectively, while ns indicates no significant impact ($P > 0.05$).

3 讨论

本研究中，Lemont 的耕作土的 pH 显著低于 YSBR1（表 1）。高[CO₂]和温升对不同水稻品种耕作土基本理化性质的影响可能会间接影响植株的生长发育。已有研究表明，*R. solani* 喜偏酸性的土壤，田间增施钾肥等有利于降低病害严重程度^[1, 5, 17]。这可能与 Lemont 耕作土中的生长环境或营养物质更有利于 *R. solani* 的生长有关，从而解释了研究结果中 Lemont 土壤浸提液培养基中 *R. solani* 菌丝生长速率较 YSBR1 明显增加了 3.48%~7.64%（图 1）。[CO₂]升高显著降低了两水稻品种耕作土的 pH，增加了两水稻品种耕作土 TN 和 TOC 含量；温升显著增加了两水稻品种耕作土的 pH 和 TOC 含量以及 YSBR1 耕作土的 TN 含量，但是显著降低了 Lemont 耕作土的 TP 含量（表 1）。不同抗性品种的土壤基本理化性状的变化不完全一致，这可能因为不同水稻品种根际养分吸收对高[CO₂]和温升的响应不同。相关研究显示，生长环境会直接影响病原菌，而病害的严重程度与寄主防御机制或营养状态相互作用^[18]。但是，对于不同纹枯病抗性品种而言，高[CO₂]和温升下耕作土制成的土壤浸提液培养基中 *R. solani* 菌丝生长速率均无显著影响（图 1）。这说明接种 *R. solani* 后，在温升及其与高[CO₂]互作处理下，病斑发展速率的加剧与土壤基本理化性质无关。

张国良等^[6]研究显示，*R. solani* 的入侵会诱导水稻叶片和叶鞘 PR 蛋白的增加。水稻接种 *R. solani* 后，植株体内 SOD、CAT、PPO 和 PAL 等与抗病反应密切相关的防御酶活性会产生显著变化^[6-7, 14]。由此可见，病原入侵后，PR 蛋白和相关防御酶在寄主的防卫系统中起重要作用。本试验中选育的 YSBR1 是经过多年抗性研究筛选出的抗性高且表现稳定的水稻品种，而 Lemont 则为对纹枯病高度易感的水稻品种^[4, 13-14, 19]。研究结果显示，当 *R. solani* 入侵后，各处理下 YSBR1 叶片中 PR 蛋白和相关防御酶以及茎鞘中 SOD 和 CAT 活性均显著高于 Lemont（图 2 和图 3；表 2 和表 3）。这表明 YSBR1 植株的整体防御系统更强，可

进一步阻止病原入侵,有力地支持了前人的研究结果^[13-14]。同时进一步说明,品种间对纹枯病抗性的差异及其表现出的 PR 蛋白和防御酶活性的差异在未来[CO₂]升高和温升情景下依然持续。

为厘清 PR 蛋白和防御酶活性在抗性机制中的作用,本研究探究了相关指标与纹枯病病斑发展速率的相关性。研究结果表明,温升及其与高[CO₂]互作显著增加两个品种纹枯病病斑发展速率,而且这种促进效应在年际间是一致的(表 4)。与对照相比,2020 年和 2021 年温升(CT+)及其与[CO₂]升高互作(C+T+)显著增加了 Lemont 的纹枯病发展速率约 21%~45%,增加 YSBR1 纹枯病发展速率约 4%~28%(表 4)。前人的研究结果表明,水稻纹枯病喜高温高湿,而且温度本身也会直接影响 *R. solani* 生长^[20-22]。[CO₂]升高也会增加纹枯病在田间的自然发病率^[23]。进一步分析表明,对两个品种而言,各处理下纹枯病病斑的发展速率均与茎鞘中的 GLU 呈显著正相关,而与叶片中 PR 蛋白和防御酶活性无一致性的相关性(表 5)。因此,本研究表明,未来[CO₂]升高和温升对水稻植株纹枯病病斑发展速率的影响会诱导茎鞘中 GLU 的相应响应变化。

本研究结果显示,[CO₂]升高对 2020 年两个品种植株茎鞘中的 GLU 均无显著性的影响,而温升仅会显著增加 2020 年 Lemont 植株茎鞘中的 GLU(表 3)。这与[CO₂]升高对 2020 年两个品种植株纹枯病病斑发展速率均无显著性的影响,而温升会明显增加 2020 年 Lemont 植株纹枯病病斑发展速率有关(表 3)。上述结果表明,两个不同抗性品种的纹枯病病斑发展速率对温升及其与[CO₂]升高互作的响应差异会诱导茎鞘中的 GLU 作出相应的响应差异。因此,在 *R. solani* 侵染后,YSBR1 中较强的防卫反应,应该是其在高[CO₂]和温升条件下病情发展速率相对稳定的重要因素。因此,在考虑未来纹枯病抗性品种的选育过程中,可以重点关注 PR 蛋白与防御酶(尤其是茎鞘中的 GLU)相关基因的筛选,这有利于进一步保障未来气候变化下的粮食安全。

4 结 论

在 *R. solani* 侵染水稻植株后,纹枯病抗性品种 YSBR1 植株中 PR 蛋白和相关防御酶形成的防卫反应整体显著高于易感品种 Lemont,这种品种间的差异表现在当前及未来[CO₂]升高和温升情景下同样存在。从而表现出在当前及未来[CO₂]升高和温升情景下,YSBR1 植株中纹枯病病斑发展速率明显低于 Lemont 植株。温升及其与[CO₂]升高的互作会显著增加 Lemont 植株的纹枯病发展速率。YSBR1 和 Lemont 植株纹枯病病斑的发展速率与其茎鞘的 β -1,3-葡聚糖酶(GLU)显著性正相关。因此,不同水稻品种间纹枯病抗性差异及其对未来[CO₂]升高和温升的响应差异可以通过相关的 PR 蛋白和防御酶(尤其是茎鞘中的 GLU)的变化来指征。

致 谢 特别感谢南京农业大学刘晓雨和潘根兴老师自 2011 年以来为常熟 T-FACE 平台建立与顺利运行提供的帮助和支持;特别感谢扬州大学左思敏老师及其团队为本试验提供的 Lemont 和 YSBR1 的水稻种子、纹枯病致病菌株(*R. solani*, YN-7 isolate),以及对田间纹枯病接种工作的指导和帮助。

参考文献(References)

- [1] Senapati M, Tiwari A, Sharma N, et al. *Rhizoctonia solani* Kühn pathophysiology: Status and prospects of sheath blight disease management in rice[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13: 881116.
- [2] Mishra D, Rajput R S, Zaidi N W, et al. Sheath blight and drought stress management in rice (*Oryza sativa*) through *Trichoderma* spp[J]. *Indian Phytopathology*, 2020, 73(1): 71-77.

- [3] Wu Y S, Chen Y Z, Meng X M, et al. Change of defence enzyme activity during resistant reaction to rice sheath blight[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2008, 24(5): 327-330. [吴样孙, 陈一壮, 蒙信满, 等. 水稻纹枯病抗性反应中主要防御酶的活性变化[J]. 中国农学通报, 2008, 24(5): 327-330.]
- [4] Zuo S M, Zhang Y M, Xue X, et al. Preliminary study on resistance mechanism of the new rice line YSBR1 to sheath blight[J]. Chinese Journal of Rice Science, 2014, 28(2): 132-140. [左示敏, 张玉梅, 薛芴, 等. 水稻新种质 YSBR1 抗纹枯病机制的初步研究[J]. 中国水稻科学, 2014, 28(2): 132-140.]
- [5] Zhou E X, Yang M, Chen Y L. The effects of soil environmental factors on the saprophytic colonization of *Rhizoctonia solani*[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2002, 32(3): 214-218. [周而勋, 杨媚, 陈友林. 土壤环境因素对水稻纹枯病菌腐生定殖能力的影响[J]. 植物病理学报, 2002, 32(3): 214-218.]
- [6] Zhang G L, Ding Y, Wang Q Q, et al. Effects of silicon on chitinase and β -1, 3-glucanase activities of rice infected by *Rhizoctonia solani* and its relation to resistance[J]. Plant Nutrition and Fertilizer Science, 2010, 16(3): 598-604. [张国良, 丁原, 王清清, 等. 硅对水稻几丁质酶和 β -1, 3-葡聚糖酶活性的影响及其与抗纹枯病的关系[J]. 植物营养与肥料学报, 2010, 16(3): 598-604.]
- [7] Liu W G, Yuan H X, Tan S E, et al. Temporal changes of both chitinase and β -1, 3-glucanase activities in transgenic rice with extra anti-fungal genes[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2012, 28(27): 5-9. [刘晚苟, 袁红旭, 谭书恩, 等. 转抗真菌基因水稻几丁质酶和 β -1, 3-葡聚糖酶活性的时间变化[J]. 中国农学通报, 2012, 28(27): 5-9.]
- [8] Wang H H, Lin Q Y, Xie L H, et al. The effects of three cucumber mosaic virus isolates on the defendant enzymes and cell membrane permeability in tobacco cells[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2001, 31(1): 43-49. [王海河, 林奇英, 谢联辉, 等. 黄瓜花叶病毒三个毒株对烟草细胞内防御酶系统及细胞膜通透性的影响[J]. 植物病理学报, 2001, 31(1): 43-49.]
- [9] IPCC. Summary for policymakers//Climate change 2021: The physical science basis. Contribution of Working Group I to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on climate change[M]. Cambridge: Cambridge University Press, 2021.
- [10] Shen M, Cai C, Song L, et al. Elevated CO₂ and temperature under future climate change increase severity of rice sheath blight[J]. Frontiers in Plant Science, 2023, 14: 1115614.
- [11] Cai C, Yin X Y, He S Q, et al. Responses of wheat and rice to factorial combinations of ambient and elevated CO₂ and temperature in FACE experiments[J]. Global Change Biology, 2016, 22(2): 856-874.
- [12] Tao Y, Cai C, Wei W, et al. Effects of elevated atmospheric CO₂ concentration on root growth of “strong” and “weak” response rice varieties: A FACE study[J]. Soils, 2022, 54(4): 763-768. [陶冶, 蔡创, 韦薇, 等. 大气 CO₂ 浓度升高对高、低响应水稻品种根系生长的影响——FACE 研究[J]. 土壤, 2022, 54(4): 763-768.]
- [13] Xue X, Cao Z X, Zhang X T, et al. Overexpression of *OsOSM1* enhances resistance to rice sheath blight[J]. Plant Disease, 2016, 100(8): 1634-1642.
- [14] Zuo S M, Chen X J, Chen H Q, et al. Defense response and physiological difference of rice cultivars with different sheath blight resistance levels to the toxins produced by *Rhizoctonia solani*[J]. Chinese Journal of Rice Science, 2014, 28(5): 551-558. [左示敏, 陈夕军, 陈红旗, 等. 不同抗性水平水稻品种对纹枯病菌毒素的防卫反应与生理差异[J]. 中国水稻科学, 2014, 28(5): 551-558.]
- [15] Lu R K. Analytical methods for soil and agro-chemistry[M]. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 2000. [鲁如坤. 土壤农业化学分析方法[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 2000.]
- [16] He X X, Cao Q Q, Peng Z K, et al. Comparison of differences in biological characteristics of *Rhizoctonia* spp. isolated from three kinds of crops[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2012, 31(1): 55-61. [贺晓霞, 曹琦琦, 彭正凯, 等. 3 种作物纹枯病菌生物学特性差异的比较[J]. 华中农业大学学报, 2012, 31(1): 55-61.]
- [17] Prasad D, Singh R, Singh A. Management of sheath blight of rice with integrated nutrients[J]. Indian Phytopathology, 2010, 63(1): 11-15.
- [18] Bousset L, Ermel M, Soglonou B, et al. A method to measure redox potential (Eh) and pH in agar media and plants shows that fungal growth is affected by and affects pH and Eh[J]. Fungal Biology, 2019, 123(2): 117-124.

- [19] Zuo S M, Wang Z B, Chen X J, et al. Evaluation of resistance of a novel rice germplasm YSBR1 to sheath blight[J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2009, 35(4): 608-614. [左示敏, 王子斌, 陈夕军, 等. 水稻纹枯病改良新抗源 YSBR1 的抗性评价[J]. *作物学报*, 2009, 35(4): 608-614.]
- [20] Biswas B, Dhaliwal L, Chahal S K, et al. Effect of meteorological factors on rice sheath blight and exploratory development of a predictive model[J]. *Indian Journal of Agricultural Sciences*, 2011, 81(3): 256-260.
- [21] Castilla N P, Leñaño R M, Elazhour F A, et al. Effects of plant contact, inoculation pattern, leaf wetness regime, and nitrogen supply on inoculum efficiency in rice sheath blight[J]. *Journal of Phytopathology*, 1996, 144(4): 187-192.
- [22] Lee F N, Rush M C. Rice sheath blight: A major rice disease[J]. *Plant Disease*, 1983, 67(7): 829-832.
- [23] Kobayashi T, Ishiguro K, Nakajima T, et al. Effects of elevated atmospheric CO₂ concentration on the infection of rice blast and sheath blight[J]. *Phytopathology*®, 2006, 96(4): 425-431.

(责任编辑: 卢 萍)