

水稻体细胞突变体 HX-3 在细胞水平上对白叶枯病的抗性

高东迎¹ 黄雪清¹ 刘永锋² 孙立华¹ 陈志谊² 刘蔼民¹

(¹ 江苏省农业科学院 农业生物遗传生理研究所, 江苏 南京 210014; ² 江苏省农业科学院 植物保护研究所, 江苏 南京 210014)

Resistance to Bacterial Leaf Blight in Somaclonal Mutant HX-3 at Cell Level

GAO Dong-ying¹, HUANG Xue-qing¹, LIU Yong-feng², SUN Li-hua¹, CHEN Zhi-yi², LIU Ai-min¹

(Institute of Agricultural Biological Genetics and Physiology, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China;

² Institute of Plant Protection, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

Abstract: The interaction between rice host and its pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) at cell level was studied using a resistant somaclonal mutant HX-3 and its donor Minghui 63. After inoculation of Xoo strain Zhe 173 (Chinese pathotype IV), the activity of superoxide dismutase (SOD) and peroxidase (POD) in the callus of Minghui 63 was increased dramatically, and the active oxygen (O_2^-) was produced at a higher rate; Meanwhile, the callus grew slowly with the reduction of protein content. However, the activity of SOD and POD, the production rate of O_2^- and the fresh weight in HX-3 callus varied little after inoculation. It could be proposed that there were great differences between the resistance of HX-3 and Minghui 63 at cell level. There was no difference in resistance to bacterial leaf blight in HX-3 between the plant and the callus.

Key words: rice; bacterial leaf blight; somaclonal mutant; active oxygen; resistance to disease; callus

摘 要: 对水稻抗白叶枯病体细胞突变体 HX-3 及其感病供体明恢 63 在细胞水平上对白叶枯病菌的互作进行了研究。结果表明,接种水稻白叶枯病菌浙 173 后,明恢 63 愈伤组织的超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化物酶(POD)活性均急剧大幅升高, O_2^- 产生速率升高,而愈伤组织生长量减小,蛋白质含量下降。HX-3 愈伤组织接菌后 SOD、POD 活性和 O_2^- 产生速率与未接菌愈伤组织相似,愈伤组织生长量减小不明显。说明 HX-3 与明恢 63 的细胞水平抗性存在较大差别, HX-3 细胞水平抗性与植株水平抗性是一致的。

关键词: 水稻; 白叶枯病; 体细胞突变体; 活性氧; 抗病性; 愈伤组织

中图分类号: Q943.1; S432.2; S511.035.3

文献标识码: A

文章编号: 1001-7216(2003)04-0311-04

近 30 年来,细胞突变体离体筛选技术取得了迅速发展,现已成为植物细胞工程一个重要领域而受到广泛重视^[1]。由于该技术可以把植株水平上的选择发展到细胞水平的选择,使有些目标性状从培养后的选择,提早到培养中选择,减少盲目性,提高了选择效率,因而得到广泛应用和发展,尤其在筛选抗病、抗逆等突变体的研究中^[1~5]。

细胞水平抗性和植株水平抗性是植物抗病两个重要方面,目前大多数学者认为植物细胞水平抗性与植株水平抗性是一致的^[3~5],但也有学者持不同观点^[6]。鉴于细胞水平抗性与植株水平抗性相关性是开展植物抗病突变体离体筛选的理论基础之一,有必要对此问题作进一步研究。抗病突变体来自于细胞,并具有植株水平抗性,所以是研究植物细胞抗性和植株抗性的理想试材,但迄今尚未见学者对通过离体筛选技术获得的抗病突变体的细胞水平抗性进行研究的报道。

HX-3 是我们通过细胞突变体离体筛选技术,从我国高感白叶枯病杂交稻恢复系明恢 63 中获得

的抗病突变体,具有一个水稻抗白叶枯病新基因 *Xa-25*^[7]。本文选用 HX-3 及其供体明恢 63 为研究试材,以了解水稻在细胞水平上对白叶枯病的抗性表现,从而丰富抗病细胞突变体离体筛选相关理论,并为在细胞水平上认识 *Xa-25* 的抗性机制打好基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 水稻材料

抗水稻白叶枯病细胞突变体 HX-3,感病材料明恢 63,由江苏省农业科学院农业生物遗传生理研究所水稻生物技术育种实验室提供。

1.1.2 水稻白叶枯病菌

选用江浙稻区水稻白叶枯病代表菌株浙 173

收稿日期: 2003-02-18; 修改稿收到日期: 2003-04-01。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30200172); 江苏省创新人才资助项目(BK2002419)。

第一作者简介: 高东迎 (1971-),男,博士,副研究员。

(IV型),由江苏省农业科学院植物保护研究所稻病组提供。

1.2 方法

1.2.1 水稻愈伤组织的诱导与继代

将 HX-3 和明恢 63 的成熟胚进行诱导产生愈伤组织。诱导和继代培养基均为 $M_8 + 1 \text{ mg/L } 2,4\text{-D} + 2 \text{ mg/L } 6\text{-BA} + 5\% \text{ 蔗糖} + 7 \text{ g/L 琼脂}$ 。4 周后将愈伤组织转移到新鲜培养基上进行继代培养,每个三角瓶内接种 20 块愈伤,并接种水稻白叶枯病菌,以未接菌愈伤组织为对照。分别于接种后 1、3、5、7、9、11 和 13 d 取样,进行相关生化分析。同时在接种前和接种后第 5、9、13 天取样,利用电子天平称量愈伤组织鲜重。

1.2.2 水稻愈伤组织白叶枯病菌的接种

按孙立华等的方法^[4]进行水稻愈伤组织白叶枯病菌培养和接种。

1.2.3 酶液提取

参考 Laval Martin 等的方法^[8]。样品中加入 4 倍体积预冷的提取缓冲液,在冰浴条件下迅速研磨成匀浆,4℃,10 000 r/min 下离心 20 min,取上清液备用。提取液组分为:Tris-HCl 50 mmol/L (pH 7.8),0.5% PVP, PMSF 8.7 mg/L, EDTA 50 mmol/L。

1.2.4 蛋白质含量测定

按考马斯亮蓝法测定愈伤组织蛋白质含量,以牛血清蛋白制作标准曲线。

1.2.5 过氧化物酶(POD)活性测定

按张志良的方法^[9],以每 1 min 增加 0.1 OD 值为 1 个酶活性单位。

1.2.6 超氧化物歧化酶(SOD)活性测定

按 Giannopolitis 等的方法^[10],测定 SOD 对氮蓝四唑(NBT)的光化还原的抑制作用,以抑制 NBT 的 50% 为 1 个酶活性单位。

1.2.7 O_2^- 含量测定

按王爱国等的方法测定^[11]。

1.2.8 稻株抗病性鉴定

按方中达的方法^[12],进行水稻植株水平各生育

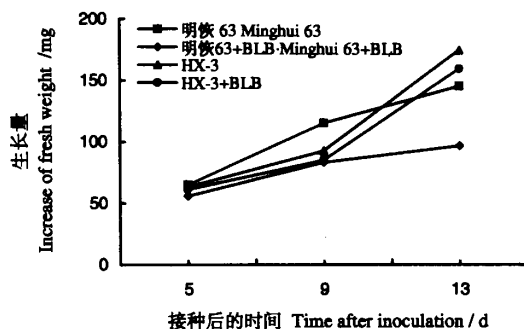


图 1 接种白叶枯病菌后愈伤组织生长量的变化

Fig. 1. Change of the fresh weight of callus after inoculation by bacterial leaf blight.

期的抗性鉴定。

2 结果与分析

2.1 HX-3 和明恢 63 植株水平抗性观察

在植株水平上, HX-3 与其供体明恢 63 对水稻白叶枯病的抗性不同, HX-3 在苗期、最高分蘖期和成株期均抗白叶枯病, 抗性为全生育期抗性, 而明恢 63 在各生育期均表现高度感病(表 1)。

2.2 接种白叶枯病菌对水稻愈伤组织生长的影响

与未接种白叶枯病菌的对照相比, 接菌的明恢 63 愈伤组织生长量小, 说明其愈伤组织生长明显受到抑制, 如第 13 天, 接菌愈伤组织生长量仅为对照的 66%。接菌后对 HX-3 愈伤组织生长量也产生一些影响, 但不明显(图 1)。

2.3 接种白叶枯病菌对水稻愈伤组织蛋白质含量的影响

不接菌 HX-3 和明恢 63 愈伤组织蛋白质含量最初升高, 然后在维持较高水平后逐渐下降。接种白叶枯病菌后, HX-3 和明恢 63 愈伤组织蛋白质含量均随接种时间延长而逐渐下降(图 2)。由于蛋白质是细胞生长繁殖的重要物质, 其含量下降必将导致细胞的生长受到影响, 这与接菌后愈伤组织生长量下降是一致的。但明恢 63 蛋白质含量下降比 HX-3 迅速,

表 1 HX-3 和明恢 63 不同生育期对水稻白叶枯病菌浙 173 的抗性

Table 1. Resistance reactions to bacterial leaf blight (Zhe 173) of HX-3 and Minghui 63 at various growing stages.

材料 Rice material	苗期 Seedling stage		分蘖期 Tillering stage		成株期 Adult stage	
	病斑长度	抗性反应	病斑长度	抗性反应	病斑长度	抗性反应
	Lesion length/mm	Reaction	Lesion length/mm	Reaction	Lesion length/mm	Reaction
明恢 63 Minghui 63	6.8 ± 0.8	感 S	13.8 ± 1.1	感 S	20.6 ± 2.5	感 S
HX-3	1.9 ± 0.3	抗 R	2.5 ± 0.7	抗 R	2.7 ± 0.5	抗 R

R, Resistant; S, Susceptible.

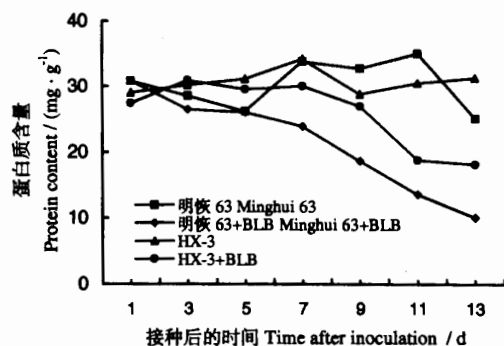


图2 接种白叶枯病菌后愈伤组织蛋白质的变化

Fig. 2. Change of the protein content of callus after inoculation by bacterial leaf blight.

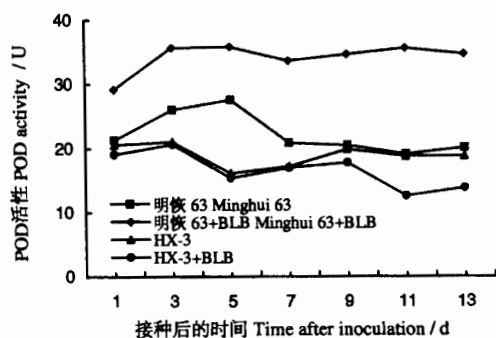


图4 接种白叶枯病菌后愈伤组织 POD 活性的变化

Fig. 4. Change of the POD activity of callus after inoculation by bacterial leaf blight.

说明白叶枯病菌对明恢 63 的愈伤组织的影响要比 HX-3 大。

2.4 接种白叶枯病菌后水稻愈伤组织 SOD 和 POD 活性的变化

接种后明恢 63 愈伤组织 SOD 活性逐渐升高,在第 11 天达到高峰,约为对照的 5 倍。HX-3 的接菌与未接菌的愈伤组织 SOD 活性十分接近,在第 9 天开始逐渐升高,第 13 天达到最大,超过对照 30%(图 3)。未接菌明恢 63 和 HX-3 的 SOD 酶活性在一开始就有较大差异(明恢 63 约为 HX-3 的 2.5 倍),这可能是基因型不同所致。

接种后 1 d 的明恢 63 愈伤组织 POD 活性即迅速升高,为未接菌愈伤组织的 1.4 倍,并一直维持在较高水平,到第 13 天时仍为对照的 1.7 倍。接种后 HX-3 愈伤组织 POD 活性与对照基本相同,第 9 天活性开始下降,第 13 天降到最低,为对照的 75%,说明接种后 HX-3 和明恢 63 愈伤组织的 POD 变化亦不相同(图 4)。

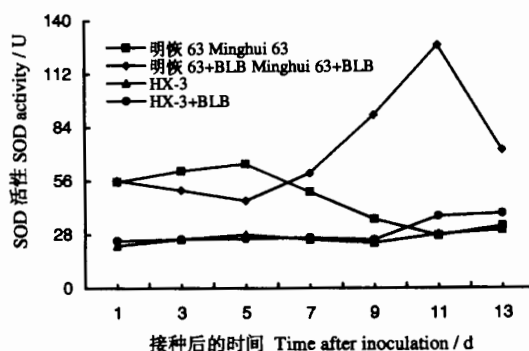


图3 接种白叶枯病菌后愈伤组织 SOD 活性的变化

Fig. 3. Change of the SOD activity of callus after inoculation by bacterial leaf blight.

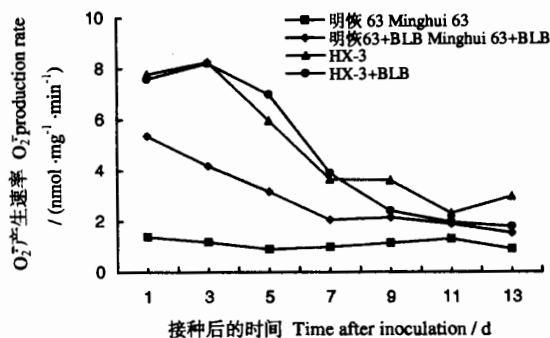


图5 接种白叶枯病菌后愈伤组织的 O₂⁻ 产生速率

Fig. 5. Change of the O_2^- production rate of callus after inoculation by bacterial leaf blight.

2.5 接种白叶枯病菌后水稻愈伤组织 O_2^- 产生速率的变化

未接菌明恢 63 的愈伤组织 O_2^- 产生速率一直维持在较低水平。在接种白叶枯病菌第 1 天,即可见明恢 63 愈伤组织 O_2^- 产生速率急剧升高,大约为对照的 4 倍,以后逐渐下降,但均比对照高,第 13 天时仍高出对照 50%。而接菌和未接菌的 HX-3 愈伤组织的 O_2^- 产生速率具有类似变化趋势,一开始就有很高的 O_2^- 产生速率,以后逐渐下降,第 13 天时接菌愈伤组织反而比对照低 30%(图 5)。

3 讨论

目前,通过细胞突变体离体筛选技术,已从大量感病品种的突变体后代中获得了具植株水平抗性的水稻优良种质^[3~5,13,14],说明该技术对于水稻抗病遗传资源创新具有实用性和有效性。但在理论上对于细胞水平抗性和植株水平抗性的一致性尚有一些争议。有研究表明,水稻愈伤组织对白叶枯病菌侵染

反应与其植株水平一致^[4,13]。而于汉寿等在研究白叶枯病菌与水稻愈伤组织互作时发现,有 4 个水稻品种和病原菌组合在细胞水平抗性与植株水平反应不一致^[6]。本研究发现,接种白叶枯病菌后明恢 63 的愈伤组织蛋白质含量迅速下降,愈伤组织生长量显著减小,而抗病细胞突变体 HX-3 的愈伤组织蛋白质含量也有所下降,但愈伤组织生长量减小不明显,可见 HX-3 的愈伤组织对水稻白叶枯病菌的危害具有较强抗性,这说明 HX-3 在细胞水平上与水稻白叶枯病的互作与植株水平上是一致的,从而进一步证实已建立的抗水稻白叶枯病细胞突变体离体筛选技术的可行性^[4]。

在植株水平上,水稻对白叶枯病的抗性与活性氧有关,在不亲和反应(抗病)中保护酶活性下降,活性氧升高,发生类似于过敏反应(HR)的细胞快速解体崩解,引发系统或局部抗性;而亲和性互作中不生活性氧伤害和 HR 样细胞坏死,局部抗性不能形成,从而发生感病反应^[15,16]。本研究中接菌后明恢 63 愈伤组织 O_2^- 升高,SOD 和 POD 活性也大幅上升,而 HX-3 的接菌和未接菌愈伤组织活性氧代谢十分相似,对白叶枯病菌的应答十分“迟钝”,这与前面植株水平上活性氧反应有较大差异,其原因可能有两点:1)选用水稻材料的基因型和材料类型不同,在细胞水平上水稻对白叶枯病菌的反应机制与植株水平上可能有所不同;2)接种白叶枯病菌强度不同,本研究中水稻愈伤组织白叶枯病菌接种强度要远远高于植株水平上白叶枯病菌的接种强度。我们认为,接种白叶枯病菌后 HX-3 愈伤组织对活性氧反应的“迟钝”,可能正是其细胞水平抗性的表现,这可能与其细胞有较强的抗病菌侵入性有关,也可能是其细胞内能够合成某种物质(如解毒素等)减轻或抑制病原菌毒害,所有这一切都使得其细胞具有较强的抗性。

值得注意的是,在未接菌的情况下细胞突变体 HX-3 与供体亲本明恢 63 的愈伤组织 O_2^- 产生速率就存在显著差异,说明 HX-3 在 O_2^- 产生速率方面发生突变,提高了细胞 O_2^- 产生速率,这是否与其细胞水平抗性有关尚待研究。

参考文献:

- Lutts S, Bouharmont J, Kinet J M. Physiological characterisation of salt-resistant rice (*Oryza sativa*) somaclones. *Austral J Bot*, 1999, 47(6): 835–849.
- Bertin P, Bouharmont J. Use of somaclonal variation and *in vitro* selection for chilling tolerance improvement in rice. *Euphytica*, 1997, 96(1): 135–142.
- Ling D H(凌定厚), Vidhyasaran P, Borrmeo E R, *et al.* *In vitro* screening of rice germplasm for resistance to brown spot disease using phytotoxin. *Acta Genet Sin*(遗传学报), 1986, 13(3): 194–200. (in Chinese with English abstract)
- Sun L H(孙立华), She J M(余建明), Lu X F(吕学锋), *et al.* *In vitro* selection of *Xanthomonas oryzae*-resistant mutants in rice. I. Induction of resistant callus and screening regenerated plants. *Acta Genet Sin*(遗传学报), 1986, 13(3): 188–193. (in Chinese with English abstract)
- Mandal A B, Ansari M M, Sharma R S, *et al.* Somaclonal variation for disease resistance in indica rice. *Rice Biotech Quarterly*, 1995, 23: 8–9.
- Yu H S(于汉寿), Wang J S(王金生), Fang Z D(方中达). Studies on interaction between rice varieties and strains of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* at cell level. II. Interactions between rice callus and suspension cultures and races of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *J Nanjing Agric Univ*(南京农业大学学报), 1994, 17(suppl): 7–12. (in Chinese with English abstract)
- Gao D Y, Xu Z G, Chen Z Y, *et al.* Identification of a new gene for resistance to bacterial blight in a somaclonal mutant HX-3. *Rice Genet Newsl*, 2001, 18: 66–68.
- Laval Martin D L, Carre I A, Barbera S J, *et al.* Rhythmic changes in the activities of NAD kinase and NADP phosphatase in the achlorophyllous ZC mutants of *Euglena gracilis* Klebs(strain Z). *Arch Biochem Biophys*, 1990, 276(2): 433–441.
- Zhang Z L(张志良). The Experimental Manual for Plant Physiology(植物生理学实验指导). Beijing: High Education Press(高等教育出版社), 1990. 154–155. (in Chinese)
- Giannopolitis S, Ries S K. Superoxide dismutase: occurrence in higher plants. *Plant Physiol*, 1977, 59: 309–314.
- Wang A G(王爱国), Luo G H(罗广华). Quantitative relation between the reaction of hydroxylamine and superoxide anion radicals in plants. *Plant Physiol Comm*(植物生理学通讯), 1990, 29(6): 55–57. (in Chinese with English abstract)
- Fang Z D(方中达). Methodology of Plant Pathology(植病研究方法). Beijing: Agricultural Press(农业出版社), 1998. 382–387. (in Chinese)
- Liu C Y(刘成运), Li Z K(李中奎), Quan M Q(权明清), *et al.* A preliminary screening of somaclonal variants of rice (*Oryza sativa* L.) resistant to *Xanthomonas oryzae* downson. *J Wuhan Bot Res*(武汉植物学研究), 1994, 12(1): 1–6. (in Chinese with English abstract)
- Hemalatha R G, Jebaraj S, Raja J A J, *et al.* Employing a crude toxin preparation from *Sarocladium oryzae* as a molecular sieve to select sheath rot-resistant somaclones of rice. *J Plant Biochem & Biotech*, 1999, 8: 75–80.
- Wu Y X(吴岳轩), Zeng F H(曾富华), Wang R C(王荣臣). A preliminary study on the relationship between induced resistance to bacterial blight and defense enzymes in hybrid rice seedling. *Acta Phytopath Sin*(植物病理学报), 1996, 26(2): 127–131. (in Chinese with English abstract)
- Kong F M(孔凡明), Xu Z G(许志刚), Ma C H(马春红). Active oxygen reaction during early stage of interaction between Zhenshan 97 male sterile cytoplasm rice and *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Chinese J Rice Sci*(中国水稻科学), 1998, 12(3): 159–164. (in Chinese with English abstract)