

转基因水稻株系的纹枯病抗性分析

李爱宏^{1,3} 许薪萍² 戴正元³ 陈宗祥¹ 李宝健² 张洪熙³ 潘学彪^{1,*}

(¹扬州大学农学院农学系, 江苏扬州 225009; ²中山大学生物工程研究中心, 广东广州 510275; ³江苏省里下河地区农业科学研究所, 江苏扬州 225002; *通讯联系人, E-mail: panxb@pub.yz.jsinfo.net)

Analysis of Resistance to Rice Sheath Blight for Transgenic Lines of Rice

LI Ai-hong^{1,3}, XU Xin-ping², DAI Zheng-yuan³, CHEN Zong-xiang¹, LI Bao-jian², ZHANG Hong-xi³, PAN Xue-biao^{1,*}

(¹Department of Agronomy, Agricultural College, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China; ²Bio-Engineering Center, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China; ³Lixiahe Agricultural Institute of Jiangsu Province, Yangzhou 225002, China; *Corresponding author, E-mail: panxb@pub.yz.jsinfo.net)

Abstract: Forty-one homozygous rice lines transferred with chitinase gene(RC24) and β -1,3-glucanase gene(β -1,3-Glu) were selected to study on their resistance to sheath blight. The resistance of transgenic lines had significant differences, and according to the result of cluster analysis, they could be divided into resistant, moderately resistant, moderately susceptible and susceptible types, but 92.1% of them belonged to the type of moderately resistant or moderately susceptible. For different resistant or susceptible type lines, rice sheath blight resistance was significant correlated with the chitinase activity of transgenic lines except resistant type lines, in which enzyme activity coded by target gene was lower than that of moderately resistant type. The chitinase activity of transgenic lines at different time after inoculation or different parts of the same plant were alike, which suggested that the expression of chitinase gene was constitutive. Check varieties' chitinase activity would change at different time after inoculation and reach a peak at sometime, but it had no differences at different parts of the same plant.

Key words: rice; transgenic lines; sheath blight; resistance to disease; cluster analysis; chitinase activity

摘 要: 对通过基因枪转化获得的 41 个转基因水稻几丁质酶和 β -1,3-葡聚糖酶基因(RC24 和 β -1,3-Glu)的高世代纯合株系进行纹枯病抗性接菌鉴定,结果表明不同转基因系间抗性存在极显著差异,聚类分析可分为抗、中抗、中感、感病四种类型,但其中 92.1% 的株系属中抗或中感类型;选择不同抗性类型的代表性株系,测定其几丁质酶活力,结果显示中抗、中感、感病类型转基因株系表达的几丁质酶活力与其纹枯病抗性表现呈现一致性,而抗病类型表达目标基因编码的酶活力低于中抗类型;接菌诱导后,在不同时间或同一植株的不同部位检测,转基因系的几丁质酶活力因其组成性表达而无明显差异,而未转基因的对照品种在诱导后不同时间其几丁质酶活力表达呈“峰”式曲线分布,同一植株不同空间位置的酶活力却无明显差异。

关键词: 水稻; 转基因系; 纹枯病; 抗病性; 聚类分析; 几丁质酶活力

中图分类号: Q786; S435.111.2; S511

文献标识码: A

文章编号: 1001-7216(2003)04-0302-05

水稻纹枯病(*Rhizoctonia solani* Kühn)由于具有强腐生性和宽寄主范围的特点,一直很难寻找到理想抗源^[1,2],寻求利用基因工程的方法解决纹枯病的抗性育种问题已成为部分学者的共识。前人已有通过转导几丁质酶、葡聚糖酶等外源基因,提高水稻纹枯病抗性的报道^[3~6],但鉴于上述转基因材料的纹枯病鉴定是在抗性早期分离世代(R₀、R₁)的苗期或在离体条件下(植株离体叶片的抑菌培养)得到的结果,其鉴定方法有着一定的局限性和缺陷。本研究拟以转导靶基因的高世代(R₃~R₄)纯合株系为供试材料,通过改进的人工接种调查方法^[7],创造均匀一致的发病条件等,在成株期进行鉴定,进一步确认转导目标基因对提高水稻纹枯病抗性的可靠

性及转基因后代的抗性分布情况。同时对转化后代目标基因的酶活力表达情况也作了初步研究,现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试材料为 41 个独立的高世代(R₃代以上)“七丝软占”转基因纯合株系,转导的目标基因是水

收稿日期: 2002-12-20; 修改稿收到日期: 2003-02-14。

基金项目: 国家自然科学基金重大项目(3989350)。

第一作者简介: 李爱宏(1974—),男,助理研究员,在读博士研究生。

稻碱性几丁质酶基因(RC24)和苜蓿 β -1,3-葡聚糖酶基因(β 1,3-Glu),其质粒的构建图谱与分子检测(PCR、Southern blotting)结果参见文献[3],以经过接种鉴定对纹枯病表现抗病、感病的品种奇妙香和 Lemont 分别用作抗感对照[8]。

1.2 方法

1.2.1 纹枯病抗性鉴定

试验于2000~2001年正季在扬州大学农学院实验田进行,共2次重复,区组内各小区随机排列,每小区3行,每行15株,株行距22.5 cm×12.0 cm,中等施肥水平,保持浅水灌溉不脱水。

孕穗期采用0.8~1.0 cm长的无菌木质短牙签,在PDB液体培养基上接菌培养3 d后,以镊子将其嵌入茎秆自上而下第3叶鞘内侧,使叶鞘包茎状态不变,并在相应叶片上做好标记。菌系RH-9为江苏省农业科学院植物保护研究所提供的强致病性菌株。病级调查分别于各材料始穗后30 d左右进行,调查各小区中间行中间8株。病级抗感类型划分参见文献[9]。

1.2.2 酶活力测定

在2000年抗性鉴定的基础上,选择不同抗感类型的代表性株系,在孕穗期测定目标基因的酶活力,因目标基因RC24和 β 1,3-Glu基因紧密连锁构建,本文仅检测几丁质酶活力。

几丁质酶的提取参照胡健等的方法[10]:称取相同部位水稻叶片2 g,经液氮处理,加预冷的0.1 mol/L pH 5.6的HOAc-NaOAc缓冲液10 mL,并加少许石英砂,冰浴研磨成匀浆,15 000×g下离心15 min(4℃),得上清液。以改进的还原糖法[11]进行酶活力测定,以4%的胶状几丁质为底物,K₃[Fe(CN)₆]为显色液,在420 nm波长下测定光密度值,以N-乙酰氨基葡萄糖作标准曲线。1个酶活力单位(U)定义为:37℃下,每1 h水解胶状几丁质产生1 μmol/L还原糖所需的酶量。

1.2.3 统计方法

用SAS6.12程序进行常规方差分析和动态聚

类分析。

2 结果与分析

2.1 转基因株系间的抗性差异

2.1.1 抗性的方差分析

方差分析表明(表1),不同转基因株系间在纹枯病的抗性上存在极显著差异。需要说明的是抗感对照奇妙香和 Lemont,两年的发病程度与往年调查结果基本吻合,表明了本试验结果的可靠性。

2.1.2 抗性的聚类分析

由于病级的多重比较不能给出抗性水平的明确分类,因而尝试用动态聚类的方法对转基因株系的抗感类型作进一步分析,结果如表2所示。从中可以看出,供试材料被分为4组:第一组,2.03~3.75级,为抗病类型;第二组,4.15~5.63级,为中度抗病;第三组,5.86~6.97为中度感病;第四组,7.52~8.44级,为感病类型。

表2提供的更为重要的信息是:转基因的41个株系中,有38个株系纹枯病抗性较未转化对照有了明显提高,只有3个株系与未转化对照同属感病类型。说明通过转导目标基因可以提高或部分提高纹枯病抗性。当然,抗性提高的38个株系中,92.1%为中抗或中感类型,仅有3个株系F-1-11-2-3-C、F-1-15-1-2-C-1、F-1-18-4-C达到抗病水平,是否是转导外源基因的效应还是转基因过程中的组培变异或插入突变,尚待进一步验证。另外3个株系分子检测为阳性,但病级与未转化对照相似,可能是基因沉默的结果。

2.2 转基因株系的几丁质酶活力

2.2.1 转基因株系纹枯病抗性与几丁质酶活力的关系

为了进一步验证是否是由于转导外源基因的表达,而增强受体品种的纹枯病抗性,我们选择抗、中抗、中感、感等不同类型的代表性株系,加上未转化及抗、感对照,测定其几丁质酶活力,研究几丁质酶活力表达与纹枯病抗性的关系。结果表明(图1):

表1 不同转基因株系纹枯病病级的方差分析
Table 1. Variance analysis on rice resistance to sheath blight among different lines.

变异来源	自由度	平方和	均方	F 值	P r
Source of variance	Df	SS	MS	F value	
株系间 Among lines	43	165.7081	3.8537	42.63**	0.0001
年际间 Among years	1	0.0005	0.0005	0.01	0.9410
误差 Error	43	3.8871	0.0904		
总和 Total	87	169.5957			

表 2 转基因株系的纹枯病抗性的聚类分析

Table 2. Cluster analysis on rice resistance to sheath blight among different transgenic rice lines.

组别	序号	株系号	2000 年病级	2001 年病级	平均值
Group	Sequence No.	Code of line	Disease rating in 2000	Disease rating in 2001	Average
1	4	F-1-11-2-3-C	2.00	2.06	2.03
1	5	F-1-15-1-2-C-1	2.63	2.06	2.35
1	44	奇妙香 Qimiaoxiang(CK)	3.50	4.00	2.53
1	7	F-1-18-4-C	2.69	2.38	3.75
2	38	QI-2-5	4.25	4.06	4.15
2	6	F-1-15-1-2-C	4.30	5.06	4.66
2	30	F-22-1-1-A	4.67	4.94	4.81
2	29	F-22-1-1-C	5.38	5.00	5.19
2	22	F-18-1-6-C	5.13	5.63	5.38
2	9	F-2-1-3-C-1	5.40	5.43	5.42
2	1	F-1-1-1-A	5.30	5.58	5.44
2	41	QI-3-2-D	5.25	5.56	5.44
2	36	QI-1-9-1-1	5.43	5.63	5.53
2	13	F-4-9-34-C	6.06	5.19	5.63
3	37	QI-2-3	5.50	6.21	5.86
3	17	F-12-16-1	5.81	6.14	5.98
3	2	F-1-1-2-A	6.14	5.93	6.02
3	16	F-4-9-1-3-B	5.80	6.25	6.03
3	21	F-12-1-2-C	6.19	6.00	6.09
3	14	F-4-9-3-A	6.13	6.06	6.10
3	19	F-12-37-2-C	5.94	6.31	6.13
3	31	F-22-2-1-A	6.18	6.07	6.13
3	18	F-12-28-10-C	6.13	6.21	6.17
3	10	F-2-1-3-C-2	6.29	6.13	6.21
3	15	F-4-9-2-7-C	6.56	6.00	6.28
3	23	F-18-2-1-C	6.19	6.56	6.37
3	32	F-22-5-1-C	6.56	6.19	6.38
3	33	F-22-5-8-C	6.31	6.50	6.40
3	20	F-12-1-1-D	6.63	6.31	6.47
3	26	F-18-1-C-10	6.88	6.36	6.62
3	34	F-22-5-1-D	6.44	6.81	6.62
3	28	F-18-3-1-C	6.69	6.56	6.63
3	24	F-18-2-4-C	6.56	6.75	6.65
3	8	F-1-22-1-D	6.63	6.75	6.69
3	12	F-2-22-1-B	6.88	6.57	6.73
3	27	F-18-2-1-D	6.81	6.75	6.78
3	25	F-18-1-10-C-1	6.44	7.35	6.88
3	35	QI-1-1-5-A	6.81	7.13	6.97
3	40	QI-4-9-2	6.94	7.00	6.97
4	3	F-1-5-2-A	7.78	7.25	7.52
4	43	Lemont	8.19	7.25	7.97
4	11	F-2-1-1-C	8.43	7.69	8.06
4	39	QI-4-7-1	8.31	8.38	8.35
4	42	七丝软占 Qisiruanzhan(CK)	8.50	8.38	8.44

(1)感病品种七丝软占及抗感对照奇妙香和 Lemont 的植株体内存在内源几丁质酶,其活力在没有外界条件诱导的情况下,均处于较低水平;受体亲本七丝软占转导目标基因后,外源基因的表达显著提高了其几丁质酶活力。(2)表现中抗、中感、感病类型的

转基因株系的几丁质酶活力与其纹枯病抗性基本呈现一致性,表达的几丁质酶活力越高,抗性越强。但抗病类型除外,其表达的几丁质酶活力与中抗类型相比较,还低 30 个左右酶活力单位,说明其表现较高的抗性水平,除了转导的目标基因的表达效应外,

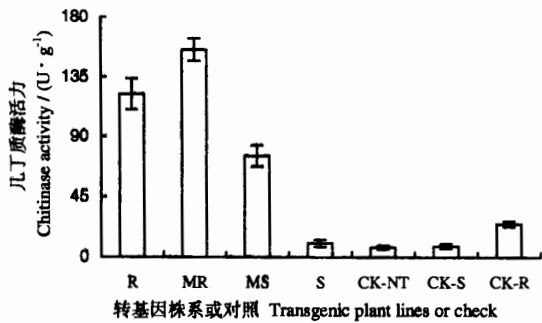


图1 不同抗感类型转基因株系的几丁质酶活力
Fig. 1. Chitinase activity of different type transgenic lines.

R—抗病株系; MR—中抗株系; MS—中感株系; S—感病株系; CK-NT—未转化对照; CK-S—感病对照; CK-R—抗病对照。下同。

R, Resistant lines; MR, Moderately resistant lines; MS, Moderately susceptible lines; S, Susceptible lines; CK-NT, No transgenic check variety; CK-S, Susceptible check variety; CK-R, Resistant check variety. The same as in figures below.

还有其他原因。

2.2.2 转基因株系的几丁质酶活力动态

许多研究表明,病原菌侵染、水杨酸、乙烯、植物生长素、机械刺激等物理或化学因素可诱导植物体内产生几丁质酶^[10,12,13]。通过对转基因株系进行纹枯病接菌,诱导植株体内的几丁质酶活力的产生,每隔 24 h,考察接种点所在叶片几丁质酶活力(图 2),可见:(1)表现抗、中抗、中感的转基因株系在不同时间内检测,其几丁质酶活力因目标基因的组成性表达而基本上呈平行分布,无明显变化;(2)未转基因的常规品种,无论是感病的七丝软占对照和 Lemont,还是抗病的奇妙香,其几丁质酶活力在诱导后均呈“峰式”曲线分布。感病的品种上升幅度较小;而抗病品种上升幅度较大,相对达到一个较高的

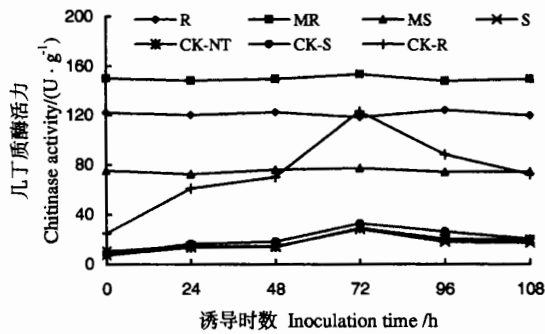


图2 接菌诱导后不同时间转基因株系的几丁质酶活力
Fig. 2. Chitinase activity of transgenic lines after inoculation at different time.

水平。且不同抗感类型品种均在接种诱导后约 3 d 左右,其内源几丁质酶活力的表达达到高峰。(3)感病的转基因株系表现与未转化对照相似,进一步验证其基因沉默的结论的可靠性。

不同株系接菌后 72 h,对剑叶、倒 2 叶、叶鞘的几丁质酶活力检测表明(图 3),无论是转基因株系,还是不同抗感类型的未转基因常规品种,其不同空间位置的几丁质酶活力均不存在明显差异。转基因株系不同空间位置几丁质酶活力的无差异性应该是靶基因组成性表达的结果,常规品种的无差异性则说明了水稻植株体内诱导信号传导的迅速性。

3 讨论

长期以来,水稻的纹枯病抗性育种由于病原菌的致病特点、理想抗源缺乏等多方面的原因而一直进展不快^[2,14,15],前人已有许多通过转导不同来源的几丁质酶基因,获得抗真菌性病害的作物种质的报道^[16],但其抗性鉴定仅仅停留在初期获得的少数转化单株或实验室阶段,很难对高世代的群体的

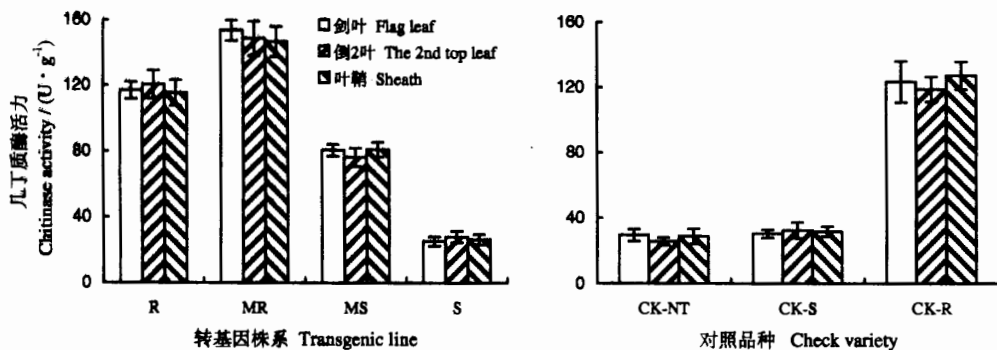


图3 不同空间位置转基因株系的几丁质酶活力
Fig. 3 Chitinase activity of different parts of the same rice plant for transgenic lines.

抗性作出客观评价。本研究发现对感病品种七丝软占转导外源 *RC24* 基因和 β -1, 3-*Glu* 基因, 不同转化事件形成的转基因株系间, 其纹枯病抗性存在极显著差异, 聚类分析可分为抗、中抗、中感、感病四种类型。但 92.1% 的株系表现为中抗或中感, 进一步测定目标基因的酶活力, 发现中抗类型的株系表达的几丁质酶活力最强, 而极少数表现抗病的株系, 表达目标基因编码的酶活力并不最高, 比中抗类型表达的酶活力还低约 30 U。近期我们还发现这 3 个抗病株系对不同生理小种的稻瘟病菌也有较好抗性, 并且其基本的农艺性状也发生了显著变化, 如表现为生育期延长、株高和千粒重增加等(数据未列), 而在本研究中, 所有基本农艺性状未发生变化的株系中, 均不能找到抗病类型。曾有文献报道通过原生质体培养的方法获得了抗纹枯病的水稻种质^[17], 因而, 推测这 3 个株系表现较高水平抗性, 可能与基因枪转化过程中丰富的组培变异或者靶基因的插入突变, 激活植物体的防卫系统有关。而通过转导 *RC24* 基因和 β -1, 3-*Glu* 基因, 可能仅起到部分提高抗性的作用, 并不能达到抗的水平。

本研究还发现, 不同抗感类型的水稻品种植株体内存在内源几丁质酶。在不诱导的情况下, 其几丁质酶的活力均处于较低水平, 感病品种接菌诱导后, 几丁质酶活力上升幅度较小; 而抗病品种接菌诱导后, 几丁质酶活力可相对达到一个较高水平。本研究用于转化的受体亲本七丝软占, 是一个对纹枯病和稻瘟病都高度感病的类型, 转导 *RC24* 基因和 β -1, 3-*Glu* 基因后, 接菌诱导的情况下, 靶基因的组成性表达掩盖或抑制了内源几丁质酶的表达, 使其诱导后不同时间检测的酶活力动态呈平行分布。这就带来两个问题, 一是本研究用于转化的质粒包含的是一个来自于水稻品种 IR36 的碱性几丁质酶基因, 是否是因为同是水稻来源的几丁质酶基因而产生了掩盖或抑制效应, 而假如用一个不同来源的几丁质酶基因(如来自于粘质沙雷氏菌的几丁质酶基因), 是否还会产生这种抑制效应? 二是对于一个有较高几丁质酶活力诱导效应的品种, 转导水稻碱性几丁质酶基因的话, 是否会由于这种抑制效应而进一步限制了该目标基因用于提高抗性的可能性? 所有的这些, 都还将值得进一步探索与思考。

参考文献:

- Bateman D F. *Rhizoctonia salani*: Biology and Pathology. Berkeley: University of Calif Press, 1970. 161—171.
- Pan X B(潘学彪), Chen Z X(陈宗祥), Zhang Y F(张亚芳), *et al.* Preliminary evaluation for breeding advancement of resistance to rice sheath blight. *Chinese J Rice Sci* (中国水稻科学), 2001, 15(3): 218—220. (in Chinese with English abstract)
- Feng D R(冯道荣), Xu X P(许新萍), Wei J W(卫剑文), *et al.* Enhancement of rice disease resistance by two antifungal protein genes. *Acta Bot Sin* (植物学报), 1999, 41(11): 581—597. (in Chinese with English abstract)
- Qin H T(覃宏涛), Xiao H(肖 晗), Sun Z X(孙宗修), *et al.* Enhance disease resistance of transgenic rice plants with an endochitinase gene *ThEn42* from *Trichoderma harzianum*. *J Yunnan Agric Univ* (云南农业大学学报), 2000, 15(3): 212—215. (in Chinese with English abstract)
- Broglie K, Chet I, Holliday M, *et al.* Transgenic plants with enhanced resistance to the fungal pathogen *Rhizoctonia salani*. *Science*, 1991, 254: 1194—1197.
- Lin W, Aunratha C S, Datta K, *et al.* Genetic engineering of rice for resistance to sheath blight. *Bio/Technology*, 1995, 13: 686—691.
- Pan X B(潘学彪), Chen Z X(陈宗祥), Xu J Y(徐敬友), *et al.* The effects of different methods of inoculation and investigation on genetic research of resistance to rice sheath blight. *J Jiangsu Agric College* (江苏农学院学报), 1997, 18(3): 27—32. (in Chinese with English abstract)
- Chen Z X(陈宗祥), Zou J H(邹军煌), Xu J Y(徐敬友), *et al.* A preliminary study on resources of resistance to rice sheath blight. *Chinese J Rice Sci* (中国水稻科学), 2000, 14(1): 15—18. (in Chinese with English abstract)
- Rush M C, Hoff B J, McIlrath W O. A uniform disease rating system for rice disease in the United States. Proc 16th Rice Tech Working Group. Lake Charles; [s. n.], 1976. 64.
- Hu J(胡 健), Zhou G J(周国俊), Jiang Y M(姜涌明), *et al.* Depolymerization of chitosan by γ ray. *J Yangzhou Univ* (扬州大学学报), 1999, 2(2): 51—54. (in Chinese with English abstract)
- Hu J(胡 健), Chen Y(陈 云), Chen Z X(陈宗祥), *et al.* Chitinase induction with chitosan oligosaccharides on several rice varieties with different resistant ability to sheath blight. *Jiangsu Agric Res* (江苏农业研究), 2000, 21(4): 37—40 (in Chinese with English abstract)
- Zen Y(曾 艳), Zhao N M(赵南明), Liu J Y(刘进元). Chitinases and plant defence reactions. *Progress in Biotech* (生物工程进展), 1997, 17(4): 31—34. (in Chinese with English abstract)
- Chen S F(陈三凤), Liu D H(刘德虎), Li J L(李季伦). Primary structure of plant chitinases and genes encoding plant chitinases. *Progress in Biotech* (生物工程进展), 1998, 18(2): 33—36. (in Chinese with English abstract)
- Zhang H S(张红生), Zhu L H(朱立宏). Status and review on the research of resistance to rice sheath blight. *Rice Review and Abstracts* (水稻文摘), 1990, 9(6): 1—3. (in Chinese)
- Pan X B(潘学彪), Rush M C. Study in the U. S. on genetics and breeding of resistance to rice sheath blight. *J Jiangsu Agric College* (江苏农学院学报), 1997, 18(1): 57—63. (in Chinese with English abstract)
- Zhou M P(周森平), Lu W Z(陆卫忠). Plant chitinases and its application in anti-fungal gene engineering. *Jiangsu J Agric Sci* (江苏农业学报), 1998, 14(3): 183—187. (in Chinese with English abstract)
- Xie Q J, Linscombe S D, Rush M C, *et al.* Registration of LSBR-33 and LSBR-5 sheath blight-resistant germplasm lines of rice. *Crop Science*, 1992, 32: 507.