

玉米细菌性条斑病非寄主抗性基因 *Rxo1* 转化水稻的研究 Introduction of a Non-host Gene *Rxo1* Cloned from Maize Resistant to Rice Bacterial Leaf Streak into Rice Varieties

谢学文, 于 晶, 徐建龙, 周永力*, 黎志康

XIE Xue-Wen, YU Jing, XU Jian-Long, ZHOU Yong-Li* and LI Zhi-Kang

中国农业科学院作物科学研究所 农作物基因资源与基因改良国家重大科学工程 北京 100081

Institute of Crop Sciences/National Key Facility for Crop Gene Resources and Genetic Improvement, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China

摘 要 水稻细菌性条斑病是我国重要的水稻病害之一,但是在水稻种质资源中尚未发现抗细菌性条斑病单个主效基因。利用农杆菌介导的转化系统将从玉米中克隆的细菌性条斑病非寄主抗性基因 *Rxo1* 转入我国 2 个杂交稻恢复系和 2 个常规水稻品种。转基因植株的 PCR 和 Southern 分析结果表明 *Rxo1* 基因已整合到受体基因组中,*Rxo1* 基因单拷贝整合的转化体在自交 T₁ 代呈现抗感 3:1 分离。人工接种实验和病菌的生长曲线表明携带 *Rxo1* 的转基因植株对水稻细条病菌可以产生过敏性抗病反应。上述结果为利用非寄主抗性基因防治该病害提供了有用的信息。

关键词 非寄主抗性, *Rxo1*, 水稻, 细菌性条斑病

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)04-0607-05

Abstract Rice bacterial leaf streak caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* is a destructive bacterial disease in China. Single-gene resistance to *X. oryzae* pv. *oryzicola* has not been found in rice germplasm. A cloned non-host gene from maize with resistance to bacterial leaf streak, *Rxo1*, was transferred into four Chinese rice varieties through an *Agrobacterium*-mediated system including Zhonghua11, 9804, C418 and Minghui86. PCR and Southern analysis of the transgenic plants revealed the integration of the *Rxo1* gene into the rice genomes. The integrated *Rxo1* was stably inherited, and segregated in a 3:1 (Resistance:Susceptible) ratio in the selfed T₁ generations derived from some T₀ plants, indicating that *Rxo1* inherited as a dominate gene in rice. Transgenic T₀ plants and PCR-positive T₁ plants were resistant to *X. oryzae* pv. *oryzicola* on the basis of artificial inoculation.

Key words non-host resistance, *Rxo1*, rice, bacterial leaf streak

细菌性条斑病(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*) 是我国水稻生产中危害严重的检疫性病害,也是当前我国南方稻区造成损失最重的细菌病害之一。20 世纪 90 年代以来,在华南、西南、长江流域稻区以及海南岛南繁基地频繁爆发成灾,杂交稻受害尤其严重。目前尚无防治细条病的高效药剂,种植抗病品

种是控制作物病害最经济有效的措施。然而生产中大多数主栽杂交稻组合和常规品种都对细条病感病、甚至高度感病^[2],改良细菌性条斑病抗性是我国水稻育种中亟待解决的问题。

近二十年中,我国一直在进行水稻抗细条病基因发掘和抗性遗传研究,但是迄今水稻对细条病抗

Received: November 30, 2006; Accepted: December 31, 2006.

This work was supported by the grant from the National Natural Science Foundation of China (No. 30571200).

* Corresponding author. Tel: +86-10-62138053, Fax: +86-10-68918559, E-mail: zhouyl@caas.net.cn

国家自然科学基金(No. 30571200)资助。

性改良尚无进展,主要原因在于国内外鉴定的大量水稻资源中尚未发现抗细条病主效基因。在植物与病原菌协同进化过程中,病原菌为适应不同植物种通常以近缘种或致病型复合体存在,非寄主植物则可能存在一些基因,其产物能够特异性识别该种植物非典型病原菌的激发子而启动与防御反应有关的信号级联反应。生产实践表明任何一个物种中可直接利用的主效抗病基因都是有限的,并且有效性随病菌种群变化易于丧失。随着异种无毒基因 *avr* 与非寄主 R 基因互作产生 HR 实例的不断发现^[6,8,10,11,14,15],非寄主抗性基因的克隆及其在作物抗性改良中的作用备受关注。来自玉米的 *Rxo1* 基因可以与细条病菌的 *avrRxo1* 基因互作激活防御反应,导致玉米叶片对 *Xoo* 产生典型的过敏反应^[14,15]。Zhao 等将 *Rxo1* 导入了日本粳稻品种 Kitaake,初步的功能分析结果表明转基因植株接种 *Xoo* 菌液后,接种点周围的叶片细胞迅速坏死^[16]。本研究采用农杆菌介导的遗传转化系统,将 *Rxo1* 基因转到我国不同遗传背景的水稻品种中,分析了该基因的抗性表达和遗传,上述结果将为促进 *Rxo1* 在水稻抗细条病育种中的应用提供信息。

1 材料与方法

1.1 质粒和水稻品种

含有 9kb *Rxo1* 基因的 pCAMBIA1305-1 *Rxo1* 质粒由美国堪萨斯州立大学 Scot H. Hulbert 博士提供。pCAMBIA1305-1 质粒是由澳大利亚 CAMBIA 研究中心构建的含有 35S 启动子和细菌卡那霉素抗性基因的双元载体。采用的农杆菌菌株为 EHA105。

转化的受体水稻品种包括常规品种 9804、中花 11 粳型恢复系 C418 和籼型恢复系明恢 86。

1.2 转化

采用 Zhai 等^[13]的方法,对 4 个水稻品种的成熟胚愈伤组织进行转化。将去壳的水稻种子用 70% 乙醇灭菌 1min,再用 0.1% 升汞溶液灭菌 10min,无菌水冲洗 3 次,接种于含有 2.0mg/L A-D 的 MS 和 NB 培养基上,于 26℃ 暗培养,诱导愈伤组织。2~4 周后切下胚盾片处产生的愈伤组织,转到继代培养基 MS 或 NB 继代培养一次,选直径 0.2~0.4 cm 的愈伤组织用于转化。带 *Rxo1* 基因的农杆菌菌株在含 50mg/L 卡那霉素和 50mg/L 潮霉素的 YEP 培养基中培养 12~16h 至 A_{595} 为 0.8,离心收集农杆菌细胞用 AAM 培养基洗涤 1 次,再悬浮于 AAM 中至 A_{595} 为 0.5。将待转化的愈伤组织于 AAM 农杆菌菌悬液中侵染 10~30min,经无菌水洗涤后转移到共培

培养基上于 25℃ 暗培养 3d。然后将愈伤组织经含有 500mg/L 噻孢霉素的无菌水漂洗后,转移到选择培养基上培养 3 周,经 2~3 次选择培养后,将新长出的抗性愈伤组织转移到预分化培养基上培养 2~3 周,再转移到分化培养基上持续光照下 26℃ 继续培养至分化出苗,当幼苗生长至 10cm 左右高时转移至土壤中,在人工气候室中缓苗后移到温室中。

1.3 DNA 提取与 PCR 分析

水稻基因组的 DNA 提取参照 McCouch 等人的方法,采用 TIANGEN 公司 TIANprep Mini 提取试剂盒提取质粒 DNA。根据 *Rxo1* 序列设计了特异性引物 R_1 和 R_2 : R_1 5'-ACTCGGTA AAA CCTACGGACTGA-3', R_2 5'-CTTCCTGCAGGTATACCAC TCC-3',扩增片段长度为 1.45kb。PCR 反应体系为 25 μ L,含有 50ng 模板 DNA,10 \times PCR 反应缓冲液 2.5 μ L,dNTPs (10mmol/L) 2 μ L,引物 (8 μ mol/L) 2 μ L,Taq DNA 聚合酶 (3u/ μ L) 0.2 μ L, Mg^{2+} (25mmol/L) 2 μ L。以未转化的受体水稻品种的 DNA 作阴性对照,以携带 *Rxo1* 的 pCAMBIA1305-1 质粒 DNA 为阳性对照。

采用两对引物分析目的基因在 T_1 代转基因植株中的分离情况,一对是扩增潮霉素基因的引物 HgyF 5'-ACTATCGGCGAGTACTTCTACACAG-3'和 HgyR 5'-GAGTTTACGAGAGCCTGACCTAT -3',扩增片段长度为 718bp,另一对是扩增 *Rox1* 的引物 Rox F: 5'-GATCAAAGTAGAACCTCTGGGTGTC-3'和 Rox R 5'-CACTAACTCCCCATTCTCAAGACTC-3',扩增片段 938bp。扩增反应在 PTC-100™ Programmable Thermal Controller (MJ Research Inc.) 进行。扩增反应程序为 95℃ 5min (95℃ 30s,58℃ 45s,72℃ 1.5min) 30 个循环,最后 72℃ 保温 10min。PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶上于 1 \times TAE 缓冲液中电泳检测。

1.4 Southern 杂交

5 μ g 基因组 DNA 用 *Eco*R I 和 *Hin*d III 酶切,然后在 1% 琼脂糖凝胶上电泳。Southern 杂交按文献 [7] 方法进行,所用探针是 P³² 标记的 1.45kb 的 *Rxo1* PCR 扩增片段。

1.5 抗性鉴定

接种试验在隔离的网室中进行。选用广东和福建的细条病菌强毒力菌株 GD04 和 FJ-Z,在水稻分蘖期采用针刺法接种转基因 T_0 和 T_1 植株。接种前先将保存于 -80℃ 的菌株纯化,然后在 PSA 培养基上于 28℃ 培养 48h,接种后 2~3 周,病斑趋于稳定时,调查各植株的抗性反应。

1.6 病原菌的生长曲线

参考 Song 等的方法^[9],在水稻分蘖盛期,采用

针刺法将细菌性条斑病菌 GD04 接种于 PCR 检测阳性的明恢 86 转基因植株和未经转化的明恢 86 植株,每片叶接种 20 点。接种后 0、3、6、9、12d 分别取样(接种的整张叶片),每次取 3 张叶片,取样后立即保存于 -20℃ 备用。将叶片用灭菌的剪刀剪碎,置于灭菌的研钵中,加入少量灭菌的石英砂和 1mL 灭菌水,将叶片研碎,将系列稀释的菌液涂板,培养基为含有 200μmol/L 5-氮胞苷和 50μg/mL 放线菌酮的 PSA 平板上,将平板置于 30℃ 培养 48h,记数。

2 结果

2.1 水稻的转化

采用农杆菌介导的转化方法将 *Rxo1* 转化到我国 4 个水稻品种中,其中两个受体品种为常规粳稻中花 11 和 9804,另外两个品系为生产中具有重要应

用价值的杂交稻恢复系明恢 86 和 C418。对于不同的水稻受体品种,转化过程中培养基中潮霉素的浓度不同,转化明恢 86 和 C418 时,培养基中潮霉素的浓度为 30 ~ 35mg/L;转化中花 11 和 9804 时潮霉素的浓度为 50mg/L。经 PCR 检测和初步抗性鉴定共获得 132 株阳性转基因植株(表 1),由于不同水稻基因型的分化能力和潮霉素的筛选浓度存在差异,不同转化受体品种获得的 PCR 检测阳性植株百分率不同。

2.2 分子鉴定

PCR 分析结果表明,转基因植株 DNA 经引物 R1 和 R2 扩增后都产生 1.45kb 的 *Rxo1* 特异扩增带(图 1),与质粒阳性对照扩增结果相同,而非转基因对照植株中没有相应的扩增带。

表 1 利用农杆菌转化系统获得的 4 个水稻品种 *Rxo1* 转基因植株
Table 1 Rice varieties transformed with *Rxo1* by *Agrobacterium*-mediated system

| Varieties | Numbers of transgenic plants obtained | Numbers of positive plants by PCR analysis | Transformation efficiency/% ^a |
|------------|---------------------------------------|--|--|
| Minghui86 | 7 | 5 | 71.4 |
| C418 | 28 | 6 | 35.4 |
| Zhonghua11 | 83 | 59 | 71.1 |
| 9804 | 91 | 62 | 68.1 |

a: Transformation efficiency = numbers of positive plants by PCR analysis / numbers of transgenic plants obtained × 100% .

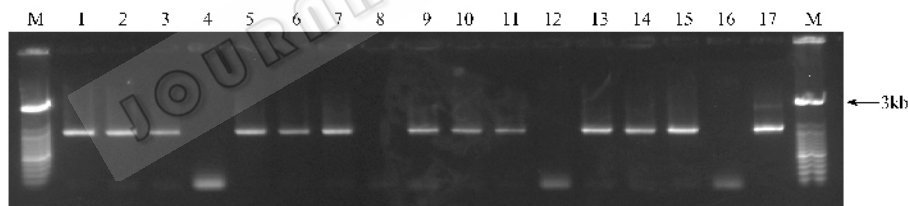


图 1 不同水稻受体品种转基因 T₀ 植株的 PCR 分析

Fig.1 PCR analysis of *Rxo1* transgenic T₀ plants

M: 100bp maker (Dingguo); 1 ~ 3: Minghui 86 transgenic plants; 4: Minghui86 nontransgenic control plant; 5 ~ 7: C418 transgenic plants; 8: C418 nontransgenic control plant; 9 ~ 11: Zhonghua11 transgenic plants; 12: Zhonghua11 nontransgenic control plant; 13 ~ 15: 9804 transgenic plants; 16: 9804 nontransgenic control plant; 17: plasmid with *Rxo1* control.

采用 Southern 杂交初步分析了 *Rxo1* 基因在 PCR 检测为阳性的转基因 T₀ 代植株中的整合情况, PCR 检测阳性的转基因植株基因组 DNA 可以与 1.45kb 的 *Rxo1* 特异探针杂交,出现大约 9.0kb *EcoR* I 片段,表明这些转基因植株包括了完整的 *Rxo1* 基因(图 2),而非转基因植株则不含有这一段来自玉米的核酸序列。

2.3 转基因植株的抗性反应

在分蘖盛期,对 4 个受体水稻品种的 T₀ 和 T₁ 转基因植株接种广东和福建的细条病菌强毒力菌株,结果表明不同遗传背景的转基因植株对接种的

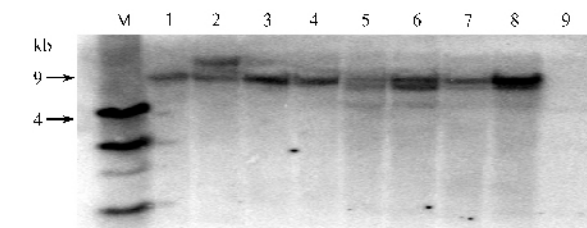


图 2 转基因 T₀ 植株的 Southern 分析

Fig.2 Southern analysis of *Rxo1* transgenic T₀ plants

M: marker; 1 ~ 4: Zhonghua11 transgenic plants; 5 ~ 8: Minghui86 transgenic plants; 9: Minghui86 nongtransgenic control plants.

两个毒力菌株都表现出典型的过敏性抗病反应,一周后病斑趋于稳定,病健交界处明显,而受体品种接

种初期病斑扩展快,呈水浸状感病型,病斑处伴随大量的菌脓产生,稳定后病斑面积明显大于转基因植株。图3为明恢86转化体自交 T_1 代转基因植株接种3d时的反应。图4为病菌在中花11转化体自交 T_1 代转基因植株中的生长曲线,初步表明接种后*X. oryzae* pv. *oryzicola*在携带目的基因转基因植株内的生长速度明显受到抑制。

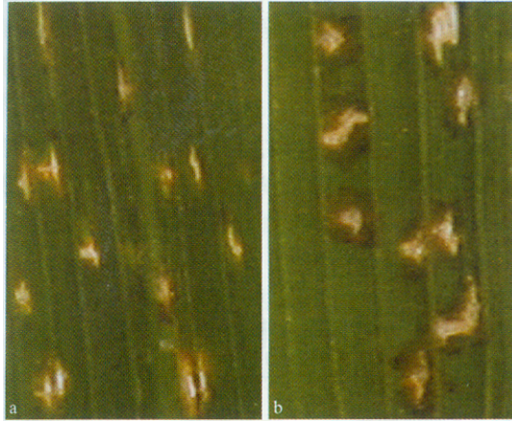


图3 转基因明恢86自交 T_1 代植株对细菌性条斑病菌菌株GD04的抗性反应
Fig.3 Resistance reaction of *Rxo1* Minghui 86 transgenic plant to *X. oryzae* pv. *oryzicola* GD04
a: Transgenic plant with *Rxo1*; b: Nontransgenic plant.

2.4 *Rxo1* 在转基因植株中的遗传

为了研究目的基因在转基因植株中的遗传,采用PCR扩增和人工接种分析了7个不同遗传背景独立转化体在自交 T_1 代的分离情况。PCR检测结果表明,同一植株以*Rxo1*基因和潮霉素基因特异性引物扩增的结果基本一致。其中4个转化体的自交 T_1 代中阳性与阴性植株的比例为3:1(表2),符合孟德尔的显性单基因的遗传规律,表明上述转基因株系的 T_0 代中*Rxo1*基因单拷贝插入;在其他3

个转化体的自交 T_1 代中,目的基因的分离比不符合单基因遗传规律(结果未显示),推测*Rxo1*在这些转化体中可能为多拷贝插入。

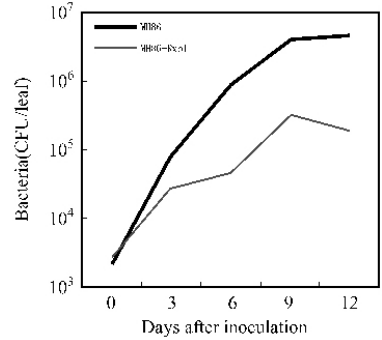


图4 *X. oryzae* pv. *oryzicola*在中花11和携带*Rxo1*的中花11自交 T_1 代转基因植株中的生长
Fig.4 Growth rates of *X. oryzae* pv. *oryzicola* GD04 on the Zhonghua T_1 transgenic plant with *Rxo1* and the control Zhonghua 11

图5为1个明恢86独立转化体在自交 T_1 代中40个单株的PCR检测结果,经*Rxo1*基因和潮霉素基因特异性引物扩增后阳性植株与阴性植株的比例分别为3.44和3.0。

3 讨论

目前,在国内外已鉴定的大量水稻资源中尚未发现细条病的单抗病基因,具有水平抗性的材料也不多,并且抗性较好的材料大都是来自热带地区的古老地方品种,农艺性状较差,采用传统的育种方法难以利用^[3]。目前有关水稻抗细条病QTL鉴定标记研究很少^[11],因此利用水稻中的抗源在短期内还难以育成抗病品种。1964年最早发现植物病原细菌在非寄主植物上可产生过敏性反应。1988年从胡椒细菌斑点病菌中克隆了第一个异种*avr*基因*avrRxcv*,可激发菜豆产生HR,并且这种抗性表型呈孟

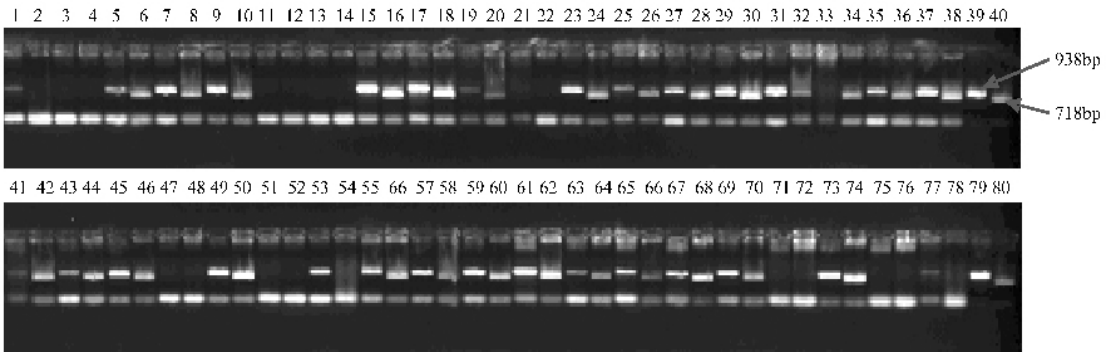


图5 携带*Rxo1*的明恢86 T_1 代转基因植株的PCR分析
Fig.5 PCR analysis of Minghui86 transgenic plants from T_1 generation

The codes of neighboring odd number and dual number were the same sample; the odd numbers were amplified by primers *RoxF* and *RoxR*; the dual number were amplified by primers *HgyF* and *HgyR*.

表 2 不同品种转基因自交 T₁ 代植株的分离Table 2 Segregation of transgenic T₁ plants derived from different genetic backgrounds

| Transfor mant | Analysis of <i>Rxo1</i> PCR | | | | | Resistance | | | | |
|---------------|-----------------------------|----|----|-------------|-------------------|------------------|----|----|-----------|-------------------|
| | Number of plants | | | + / - ratio | χ^2 (3:1) | Number of plants | | | R/S ratio | χ^2 (3:1) |
| | total | + | - | | | total | R | S | | |
| MH86 | 40 | 31 | 9 | 3.44 | 0.133 | 26 | 21 | 5 | 4.2 | 0.461 |
| C418 | 65 | 47 | 18 | 2.61 | 0.251 | NT | | | | |
| ZH11 | 58 | 46 | 12 | 3.83 | 0.575 | NT | | | | |
| 9804 | 81 | 60 | 21 | 2.86 | 0.037 | 43 | 31 | 12 | 2.58 | 0.194 |

$\chi^2_{0.05, 1} = 3.84$.

德尔单一位点遗传^[12]。目前已从拟南芥克隆了 *Rac4* 和 *NHO1* 两个非寄主抗性基因^[4, 5]。与寄主抗性相比,非寄主抗性更广谱稳定,因此非寄主抗性基因在作物抗性改良中的作用倍受关注。但是,以往由于植物种间生殖隔离的限制,非寄主抗性基因难以利用。

Rxo1 是国际上克隆的第一个对细条病菌产生 HR 的基因,也是从禾本科作物(玉米)中克隆的第一个非寄主抗性基因。本研究的结果表明非寄主抗性基因 *Rxo1* 在粳、籼背景的水稻品种中都可以对细条病菌产生过敏性坏死反应,并且在单拷贝的纯合系中均呈单基因显性遗传,因此该基因具有重要的应用价值,是改良水稻、特别是杂交稻细条病抗性的优良抗源。

已有研究表明,采用农杆菌转化系统获得的转基因植株后代具有农艺性状变异小,目的基因遗传稳定的优点。本研究的初步观察结果也表明转基因植株后代与受体品种差异不明显,因此随着基因克隆和植物遗传转化技术的迅速发展,利用非寄主抗性基因改良作物的抗病性将成为可能。然而,随着人们对基因工程产品的日益关注,迫切需要解决目的基因之外所带来的安全性问题。针对这一热点问题,我们正在采用可以去除标记基因的载体,培育无选择标记的抗细菌性条斑病的转基因水稻品系;同时正在采用已经获得的转基因纯合系,通过 Real time PCR 和芯片技术分析来自玉米的 *Rxo1* 基因在水稻中的增殖过程以及水稻的非寄主抗病分子机理。

REFERENCES (参考文献)

[1] Chen ZW (陈志伟), Wu WR (吴为人), Zhou YC (周元昌), et al. Screening of microsatellite markers for resistance to bacterial leaf streak and their application to marker-assisted selection in rice. *Journal of Fujian Agriculture and Forestry University (Nat Sci Ed)* (福建农林大学学报(自然科学版)) 2004, **33**(2): 202 - 205.

[2] Ji GH (姬广海), Xu ZG (许志刚). Evaluation of resistance of rice cultivars to bacterial leaf streak. *Journal of Southwest Agricultural University* (西南农业大学学报) 2001, **23**(2): 164 - 166.

[3] Zeng JM (曾建敏), Lin WX (林文雄). Research progress on rice bacterial leaf streak and its resistance. *Molecular Plant Breeding* (分子植物育种) 2003, **1**(2): 257 - 263.

[4] Holub EB. Arabidopsis to Crop Pathogen. In: Disease Resistance in Plant Pathology. 6th Conference of the European Foundation for Plant Pathology, Prague, P32.

[5] Kang L, Tang X, Mysore KS. *Pseudomonas* Type III effector AvrPto suppresses the programmed cell death induced by two nonhost pathogens in *Nicotiana benthamiana* and tomato. *Mol Plant Microbe Interact* 2004, **17**(12): 1328 - 1336.

[6] Keen N, Kobayashi D, Tamaki S, et al. Avirulence gene D from *Pseudomonas syringae* pv *tomato* and its interaction with resistance gene *Rpg4* in soybean. *Adv Mol Genet Plant-Microbe Interact*, 1991, **1**: 37 - 44.

[7] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 2nd ed. New York: Cold Spring Laboratory Press, 1989.

[8] Simonich MT, Innes RW. A disease resistance gene in *Arabidopsis* with specificity for the *avrPph3* gene of *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*. *Mol Plant-Microbe Interact*, 1995, **8**: 637 - 640.

[9] Song WY, Wang GL, Chen L, et al. A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, *Xa21*. *Science*, 1995, **270**: 1804 - 1806.

[10] Swarup S, Yang Y, Kingsley MT, et al. A *Xanthomonas citri* pathogenicity gene, *pthA*, pleiotropically encodes gratuitous avirulence on nonhosts. *Mol Plant-Microbe Interact*, 1992, **5**: 204 - 213.

[11] Warren RF, Merritt PM, Holub E, et al. Identification of three putative signal transduction genes involved in R gene-specified disease resistance in *Arabidopsis*. *Genetics*, 1999, **152**: 401 - 412.

[12] Whalen Maureen C, Robert E Stall, Brian J Staskawicz. Characterization of a gene from a tomato pathogen determining hypersensitive resistance in non-host species and genetic analysis of this resistance in Bean. *PNAS*, 1988, **85**(18): 6743 - 6747.

[13] Zhai W, Li X, Tian W, et al. Introduction of a blight resistance gene, *Xa21*, into Chinese rice varieties through an *Agrobacterium*-mediated system. *Science in China (Series C)* 2000, **43**(4): 361 - 368.

[14] Zhao Bingyu, Edna Y Ardales, Asuncion Raymundo, et al. The *avrRxo1* gene from the rice pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* confers a nonhost defense reaction on maize with resistance gene *Rxo1*. *MPMI* 2004a, **17**(7): 771 - 779.

[15] Zhao BY, Ardales E, Brassett E, et al. The *Rxo1/Rba1* locus of maize controls resistance reactions to pathogenic and non-host bacteria. *Theor Appl Genet* 2004b, **109**: 71 - 79.

[16] Zhao BY, Lin XH, Poland J, et al. A maize resistance gene functions against bacterial streak disease in rice. *PNAS* 2005, **102**(25): 15383 - 15388.