

水稻类受体激酶 OsBRR1 对稻瘟病抗性分析

李亚栋^{1,2}, 何近刚^{1,3}

(1. 河北农业大学, 河北 保定 071001; 2. 中国农业科学院 作物科学研究所, 北京 100081;

3. 河北省农林科学院 遗传生理研究所, 河北 石家庄 050051)

摘要: 基因 *OsBRR1* 是 LRR-RLKs 基因家族中的一员, LRR-RLKs 的成员大多参与调控植物的生长发育以及防卫反应。本研究分别对 *OsBRR1* 的转基因干涉株系和超表达株系进行了稻瘟病抗病鉴定。结果显示, 转基因干涉株系比转空载体和野生型对照株系对具有中等毒性的稻瘟病菌株研 54-04 显示更强的感病性; 而超表达株系对三种不同的强致病力菌株 97-27-2、99-31-1 与中 10-8-14 具有显著的抗性。结果表明, *OsBRR1* 的表达与水稻对稻瘟病的抗性密切相关, 参与调控水稻对稻瘟病的抗性。

关键词: 类受体激酶; 稻瘟病抗性; RNA 干涉; 超表达

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2011)04-0027-05

The Diseases Resistance Analysis of OsBRR1, A Putative Rice Receptor Like Kinase

LI Ya-dong, HE Jin-gang

(1. Hebei Agricultural University, Baoding 071001, China; 2. Institute of Crops, Chinese Academy of

Agricultural Sciences, Beijing 100081, China; 3. Institute of Genetics and Physiology, Hebei

Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Shijiazhuang 050051, China)

Abstract: *OsBRR1* is a novel member of leucine-rich repeat receptor-like kinases family, most of which regulate a wide variety of developmental and defense-related processes. In this study, evaluation of disease resistance was performed separately to the lines of *OsBRR1*-suppression plants as well as overexpressing plants. Wild-type plants showed intermediate resistance to weakly virulent isolate of *Magnaporthe oryzae*, Ken 54-04, while *OsBRR1*-suppression plants were susceptible to Ken 54-04. Furthermore, *OsBRR1*-overexpressing plants exhibited enhanced resistance to some virulent isolates (97-27-2, 99-31-1 and Zhong 10-8-14). These results indicate that *OsBRR1* is involved in rice resistance responses to blast fungus and mediates resistance to rice blast.

Key words: Receptor-like kinase; Rice blast resistance; RNA interference; Overexpression

稻瘟病是水稻生产上的主要病害, 在世界水稻种植地区广泛分布, 尤以亚洲和非洲稻区发病较重, 流行年份一般可使产量损失 10% ~ 20%, 严重者可达到 50% 以上^[1]。近年来, 我国稻瘟病的年发生面积均在 380 万公顷以上, 年损失稻谷达数亿公斤^[2]。多年来, 许多科学家对稻瘟病的防治方法进行了探索。大量实践证明, 培育和利用对稻瘟病具有高度抗性水稻栽培品种是控制稻瘟病害最经济、有效和安全的根本途径^[3,4], 而利用基因工程手段挖掘抗病基因是目前培育抗病品种的最好方法。*Pib* 是通过图位克隆分离的第一个稻瘟病抗性基因, 受多种

环境因素的诱导表达^[5,6]。目前至少已鉴定了 84 个稻瘟病抗性基因, 其中, *pi21*、*Pi34*、*Pi35*、*Pb1*、*Pif*、*Pikur1*、*Pikur2*、*Pi-se1* 属于单基因控制的部分抗性基因, 其余的 76 个均为主效抗性基因^[7]。这些基因在生产上的逐步应用将对降低稻瘟病的危害与实现水稻的稳产增产做出巨大的贡献。

植物类受体激酶 (Receptor like kinase, RLKs) 是植物基因组中一类非常重要的基因家族, 参与植物生长、发育、繁殖和防御等几乎所有生命活动, 发挥着重要的信号转导和调节作用。富含亮氨酸重复序列 (Leucine-rich repeats, LRR) 型 RLKs 是 RLKs 家

族中最大的一个亚家族。众多的 LRR-RLKs 不仅在植物生长发育过程中发挥重要的调控作用,而且通常还参与植物对外界的防御反应。目前在水稻预测的 1 100 多个类受体激酶基因中,有超过 700 个属于 LRR-RLKs 家族^[8]。本实验室通过反向遗传学手段筛选并克隆了与稻瘟病抗性相关的候选基因 *OsBRR1*。本研究对该基因的干涉株系和超表达株系进行了抗病性鉴定,初步探索其抗病机制,并为取得抗病性水稻品种提供基础材料和理论依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料

野生型水稻为粳稻品种日本晴 (*Nipponbare*)。日本晴为国际水稻基因组测序计划 (International Rice Genome Sequencing Project, IRGSP) 与日本全长 cDNA 测序计划 (Rice Full-Length cDNA Project) 所用材料,是公共数据库中绝大部分的水稻序列信息的来源。稻瘟病菌株研 54-04、97-27-2、99-31-1 与中 10-8-14 均由中国农科院作物所提供。其中研 54-04 对日本晴具有中度致病性,97-27-2、99-31-1 与中 10-8-14 对日本晴具有高度致病性。

1.2 试验方法

1.2.1 半定量 PCR 与定量 PCR 反转录:取 1 μg RNA 进行反转录。根据 TOYOBO 公司提供的反应程序,样品 65℃ 变性,立即放入冰盒,依次加入反转录 Buffer、dNTP、Oligd (T)、RNA 酶抑制剂、反转录酶,共 20 μL 体积。将以上药品混匀进行 PCR,反应程序为:30℃ 10 min,42℃ 1 h,99℃ 5 min,4℃ 5 min。得到的 cDNA -20℃ 保存。

半定量 PCR:以反转录得到的 cDNA 为模板,用所检测基因对应的引物进行 20 μL 体系 PCR (用 actin 引物扩增内参)。cDNA 模板在 PCR 反应体系中的最高浓度不超过 1/10。采用不同 cDNA 稀释倍数或者不同 PCR 扩增循环数进行重复扩增,以验证结果的准确性。20 μL PCR 反应体系中包括:1 μL cDNA 原液或 2 μL 1/10 cDNA 稀释液或 2 μL 1/20 cDNA 稀释液。扩增片段 400 ~ 600 bp 之间最好包

含一段内含子以检测是否存在 DNA 污染。PCR 程序为:94℃ 5 min,94℃ 30 s、退火 30 s、72℃ 延伸 30 s、25 ~ 35 个循环,72℃ 10 min。用 1% ~ 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测结果。

实时定量 PCR:根据所要检测的基因设计引物,退火温度为 60℃,扩增片段长度为 120 ~ 200 bp。反应体系为 20 μL :引物 1 (10 $\mu\text{mol/L}$ 0.4 μL)、引物 2 (10 $\mu\text{mol/L}$ 0.4 μL)、样品稀释液 9.2 μL (cDNA 含量 100 ng 以下)、10 μL MIX (TOYOBO 公司提供的 SYBR Green Realtime PCR Master Mix)。PCR 反应程序为:95℃ 10 s,95℃ 10 s、58℃ 20 s、72℃ 20 s、40 cycles,72℃ 10 min,16℃ 5 min。每个反应重复 3 次。产物用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测带型。

1.2.2 稻瘟菌的侵染和抗病性鉴定 首先,将转化有 *OsBRR1* RNAi 载体、*OsBRR1* 超表达载体和空的 RNAi 载体的 T_0 小苗种入间距为 5 cm 的育秧盘的泥土中,在温室培养两周,高度大约为 20 cm,以备感染。将 T_1 植物和野生型的小苗按照同样的条件在温室培养。

采用对日本晴有高度致病作用的菌株 97-27-2、99-31-1、中 10-8-14,分别对 50 个 *OsBRR1* 超表达转基因植株系和空载体转基因植株对照系进行稻瘟病抗性鉴定。采用对日本晴具有中等毒性的菌株研 54-04 对 RNA 干涉株系及野生型对照株系进行接菌试验,并对比抗病性与基因表达进行分析。在植株四至五叶期时喷洒菌液对植株进行菌株感染,转基因植株系菌液为每毫升孢子培养液中含有 1×10^5 个孢子,并且含有 0.2% 体积的 Tween-20,对照组喷洒的为含有 0.2% 体积的 Tween-20。侵染后将这些小苗在湿度为 95% ~ 100% 的环境中 25℃ 暗培养 24 h,之后在相对湿度为 80% 的温室中 28℃ 培养数日。水稻稻瘟病的敏感程度的分级,沿用国际水稻所 (IRRI) 的基本标准,即根据水稻叶片上稻瘟病斑的大小和数目,将水稻对稻瘟病的敏感程度划分为 6 个级别^[9,10] (表 1,图 1)。

表 1 水稻对稻瘟病感病程度分级
Tab. 1 Disease rating scale for rice blast

等级 Level	描述 Description	感病程度 Disease rating
1	无症状	不感病或低感病
2	褐色小点	不感病或低感病
3	长径 1.0 ~ 2.0 mm 的褐色损伤	不感病或低感病
4	长径 2.0 ~ 3.0 mm 的损伤。中心灰色或白色,边缘褐色	中度感病
5	长径 3.0 ~ 5.0 mm 的损伤。中心灰色或白色,边缘褐色	高度感病
6	损伤长径超过 5 mm,并有大面积融合损伤	高度感病

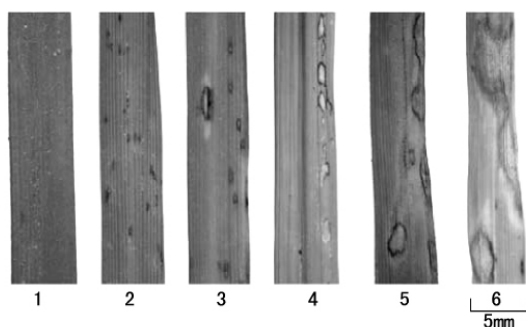


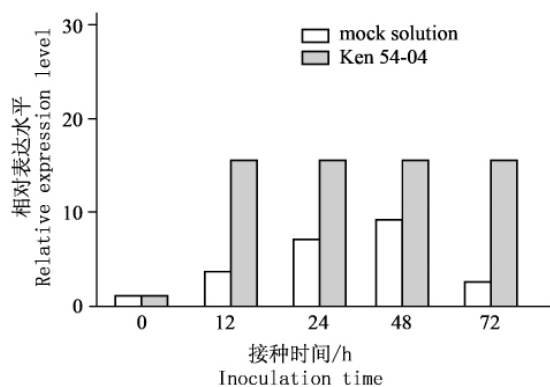
图1 水稻稻瘟病感病程度分级示意图

Fig. 1 Disease rating scale for rice blast

2 结果与分析

2.1 *OsBRR1* 受稻瘟病菌的诱导表达

OsBRR1 是水稻栽培品种日本晴的内源基因,为了研究其是否收到稻瘟病菌的诱导,我们采用对日本晴具有中度致病性的稻瘟病菌株研 54-04 喷洒叶片,每隔 12 h 取材料对 *OsBRR1* 的表达进行检测,直至 72 h。与对照相比,病菌侵染试验后的 12 h, *OsBRR1* 的表达量就有明显的升高,并持续至 72 h 或以上(图 2)。结果表明, *OsBRR1* 受到了病原菌侵染的诱导,并且参与水稻对稻瘟病菌的早期应答。

图2 对接种研 54-04 后 *OsBRR1* 表达量进行

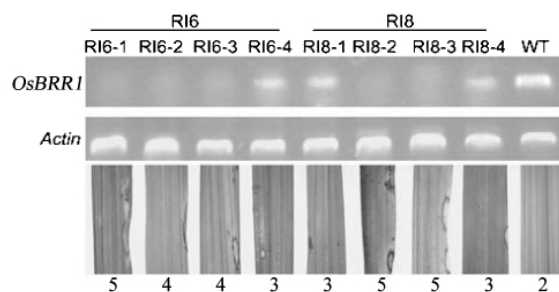
Real-time PCR 分析

Fig. 2 Real-time PCR analysis of *OsBRR1* expression after inoculation with Ken 54-04

2.2 *T₁* *OsBRR1* 干扰植株抗病性分析

RI6 和 RI8 是两个干扰效果明显且为 T-DNA 单

拷贝插入的 *T₀* 转基因株系。本试验对该 *T₀* 转基因株系的 *T₁* 植株进行进一步的抗病性分析。采用对日本晴具有中等毒性的研 54-04 侵染 RI6 和 RI8 两个株系的后代, 7 d 后观察表型发现干涉植株的感病情况均比野生型严重, 其中:野生型对照出现褐色斑点鉴定为 2 级;而 RI6-4、RI8-1 和 RI8-4 出现比野生型略微大些的褐色损伤, 鉴定为 3 级;RI6-2 和 RI6-3 植株出现圆形或椭圆形中心发白边缘成褐色的损伤, 鉴定为 4 级;而 RI6-1 和 RI8-2、RI8-3 的植株叶片上出现细长形较大的损伤和一些融合的损伤, 达到 5 级。同步 RT-PCR 检测结果显示, *T₁* 干涉植株中 *OsBRR1* 表达量均比野生型对照低。结果表明, *OsBRR1* 的表达量与植株的抗病性密切相关, *OsBRR1* 表达越低的植株表现为感病性越高(图 3)。

图3 RNA 干扰 *T₁* 植株喷菌试验和

RT-PCR 检测结果

Fig. 3 RT-PCR analysis of *OsBRR1* transcripts in *OsBRR1* RNAi transgenic progeny

2.3 *T₀* *OsBRR1* 超表达植株抗病性分析

为了进一步验证 *OsBRR1* 在水稻防御稻瘟病过程中所起的作用,我们采用稻瘟病致病菌株 97-27-2 99-31-1 和中 10-8-14 对 *OsBRR1* 超表达植株分组进行接菌, 7 d 后统计每组植株感病状况,按照 Notteghem 等^[9,10] 感病分级法对植株感病状况进行综合分析。结果表明,对于 97-27-2 侵染组,多达 90% 的对照系植株属于高感病类型,而在 *OsBRR1* 超表达转基因植株中高感病株率降低为 16%,而 84% 的超表达植株属于抗性或中度抗性植株。在 99-31-1 侵染组中有 82% 的 *OsBRR1* 超表达植株对 99-31-1 具

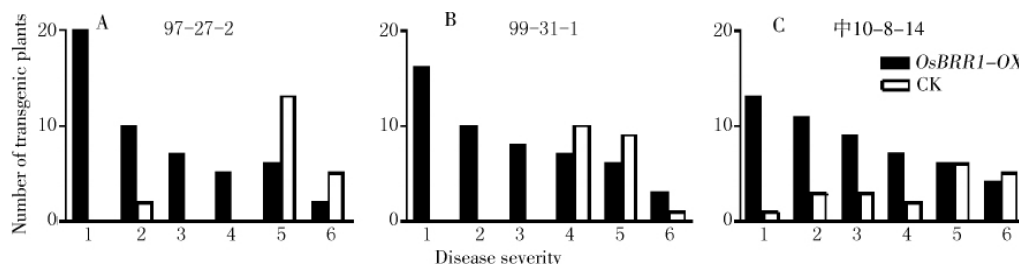


图4 97-27-2 99-31-1 和中 10-8-14 对超表达系的侵染试验结果

Fig. 4 Blast resistance of *OsBRR1*-overexpressing plants with 12 97-27-2 99-31-1 and Zhong 10-8-14

有抗性,而在空载体转基因植株对照组中只有 50% 具有抗性。而对于中 10-8-14 侵染组,空载体转化的植株中只有 45% 对其具有抗性,而超表达系的抗性植株占总数的 80% (图 4)。综合看来,*OsBRR1* 的超表达能够显著提高水稻对稻瘟病的抗性,并且可能参与一个非特异的抗病防御模式。

3 讨论

3.1 *OsBRR1* 参与水稻对稻瘟病的应答

野生型日本晴对稻瘟病菌菌株研 54-04 具有中度抗性。我们对野生型日本晴侵染研 54-04 后,*OsBRR1* 的表达进行了分析。实时定量 PCR 的结果显示,*OsBRR1* 在植株被侵染 12 h 后被明显诱导并持续到 72 h。由此可见,*OsBRR1* 受稻瘟病菌侵染的诱导,参与水稻对稻瘟病的早期应答。与此同时我们对对照组中 *OsBRR1* 的表达也进行了检测,结果显示 *OsBRR1* 的表达在对照组中也有所诱导但明显低于处理组。对照组是用不含有菌的空白侵染液对野生型日本晴进行处理。我们推测 *OsBRR1* 在对照组中被诱导的原因,可能是处理过程中高湿度的环境。有文献报道,稻瘟病的侵染需要在高湿度环境下进行,而有些基因在某种程度上受高湿度的诱导^[6]。

3.2 *OsBRR1* 参与调控水稻对稻瘟病的抗性

在采用对日本晴具有中度毒性的稻瘟病菌株研 54-0 侵染 *T₁* *OsBRR1* RNA 干扰植株的试验中,RT-PCR 检测结果显示 *OsBRR1* 干扰植株呈高感表型,而分离出的表达株系鉴定为感病 3 级,与野生型对照具有相似的抗性。量化结果表明,*OsBRR1* 表达量与植株抗病性成一定的正相关。

为了进一步证明 *OsBRR1* 参与调控水稻对稻瘟病的抗性,我们用 3 个毒性菌株 97-27-2、99-31-1 和中 10-8-14 对 *OsBRR1* 超表达系和空载体转化的对照系进行侵染试验。结果显示 *OsBRR1* 的超表达能够显著提高水稻对稻瘟病的抗性。这两个结果相互印证了 *OsBRR1* 的表达水平与水稻对稻瘟病的抗性密切相关,*OsBRR1* 参与调控水稻对稻瘟病的抗性。*OsBRR1* 表达降低会降低水稻对稻瘟病的抗性,*OsBRR1* 超表达可以提高水稻对多个稻瘟病菌种的抗性。这进一步说明,其预期表达的膜定位蛋白可能处于此类机制的上游位置,其多寡与信号通路下游抗性机制的形成密切相关。同时 *OsBRR1* 干涉和超表达并不影响水稻的正常生长发育,不产生明显可见的形态变化表型。这对于该基因的应用和培养资源,无疑是一个有益的条件。

3.3 推测 *OsBRR1* 参与调控水稻稻瘟病的抗性作用机制

植物对病害的防御主要分为两个阶段。一个是抵御病害的入侵,另一个是抵御病害入侵后的毒性。在第一个阶段时候,植物除了一些形态学上的机制外,还有就是针对病原物的刺激的反应。例如从拟南芥中发现的抗病性类受体激酶 FLS2。它是通过特异的识别病菌鞭毛蛋白中第一段保守序列 flg22 将病原物的刺激传递给下游基因的^[11]。而在抵御病害入侵后毒性上面,目前最具说服力的假说就是“基因对基因”假说。它指出对于病原菌中存在的显性无毒基因(Avirulence, Avr),寄主中就会出现一个显性抗性基因,病原菌无毒基因编码的产物为激发子(Elicitor),而寄主中的抗性基因则编码受体蛋白(Receptor),激发子与受体蛋白特异性结合,诱发寄主防卫反应的表达,从而产生抗性。缺乏其中 *R* 基因和 *avr* 基因中的任何一个基因,都无法启动抗病反应,从而导致植物感病^[12-15]。对于 *OsBRR1*,尚未发现对应的无毒基因,*OsBRR1* 超表达植株表现对多个稻瘟病菌种的抗性提高,由此我们推测 *OsBRR1* 的作用机制可能不是“基因对基因”模式。因此 *OsBRR1* 的抗病模式还有待于进一步深入研究。

参考文献:

- [1] 凌忠专,王久林. 稻瘟病菌小种抗病基因分析及抗病育种[J]. 世界农业, 1993 (3): 37-39.
- [2] 孙国昌,杜新法,陶荣祥,等. 水稻稻瘟病防治策略和 21 世纪研究展望[J]. 植物病理学报, 1998 28(4): 289-298.
- [3] Zeigler R S, Tohme J, Nelson J, et al. Linking blast population analysis to resistance breeding: A proposed strategy for durable resistance [M]// Zeigler R S, Leong S A, Teng P S. Rice Blast Disease. CAB International and IRRI, Wallingford, United Kindom, 1994: 16-26.
- [4] Fomba S N, Taylor D R. Rice blast in West Africa: its nature and control [M]// Zeigler R S, Leong S A, Teng P S. Rice Blast Disease. CAB International and IRRI, Wallingford, UK, 1994: 343-355.
- [5] Wang Z X, Yano M, Yamanouchi U, et al. The *Pib* gene for rice blast resistance belongs to the nucleotide binding and leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes [J]. Plant J, 1999, 19: 55-64.
- [6] Wang Z X, Yamanouchi U, Katayose Y, et al. Expression of the *Pib* rice-blast-resistance gene family is up-regulated by environmental conditions favouring infection and by chemical signals that trigger secondary plant defences [J]. Plant Mol Biol, 2001 47: 653-661.

- [7] 杨勤忠, 林 菲, 冯淑杰, 等. 水稻稻瘟病抗性基因的分子定位及克隆研究进展 [J]. 中国农业科学, 2009, 42(5): 1601 - 1615.
- [8] 孙学辉, 路铁刚, 贾士荣, 等. 基因组水平上水稻类受体激酶基因的生物信息学分析 [J]. 中国农业科学, 2004, 37: 322 - 327.
- [9] Notteghem J L. Analysis of results of inoculating 67 varieties of rice with 15 strains of *Pyricularia oryzae*. In: Proceedings of the symposium on rice resistance to blast [M]. IRAT/GERDAT: Montpellier, France, 1981: 73 - 96.
- [10] Silue D, Notteghem J L, Tharreau D. Evidence of gene for gene relationship in *Oryza sativa*-*Magnaporthe grisea* pathosystem [J]. Phytopathology, 1992, 82: 577 - 580.
- [11] Gomez-Gomez L, Bauer Z, Boller T. Both the extracellular leucine-rich repeat domain and the kinase activity of *FLS2* are required for flagellin binding and signaling in *Arabidopsis* [J]. Plant Cell, 2001, 13: 1155 - 1163.
- [12] 刘华招, 陈温福, 刘 延. 水稻 Pi 基因分子标记的物理图谱锚定 [J]. 华北农学报, 2009, 24(S2): 11 - 14.
- [13] 陈增建, 刘水芳, 刘亦学. 水稻品种(系)对稻瘟病菌生理小种抗性谱测定的研究 [J]. 华北农学报, 1992, 7(2): 84 - 88.
- [14] 陈增建, 刘水芳, 刘亦学. 稻瘟病菌生理小种消长动态及其变异的研究 [J]. 华北农学报, 1992, 7(4): 106 - 113.
- [15] 崔 勇, 刘自旭. 水稻稻瘟病抗性基因的研究 [J]. 山西农业科学, 2008(12): 41 - 44.

《华北农学报》征订启事

《华北农学报》1986 年创刊, 由河北、北京、天津、河南、山西、内蒙古自治区等六省市农科院及农学会联合主办, 为全国首家跨省、市、区多单位联办的农业学术刊物。本刊立足华北, 面向全国和全世界。主要刊载农业各学科的学术论文、研究报告以及科研简报, 报道农业学术动态。主要服务于农业高等院校师生和农业科研机构的研究人员。

《华北农学报》为中国科学引文数据库核心期刊 (CSCD 核心库)、中国科技核心期刊、中国中文核心期刊、RCCSE 中国核心学术期刊和中国农业核心期刊。2010 年《华北农学报》影响因子达到 1.410, 被引频次 5659 次, 基金论文比 96%, 学科排名全国第 2 位, 成为全国有代表性的农业学术刊物。同时, 《华北农学报》多次荣获国家级及省级奖励: 全国优秀科技期刊评比三等奖、全国优秀农业期刊学术类一等奖、首届“北方十佳期刊奖”、河北省“十佳期刊奖”及河北省优秀期刊奖等奖项。

《华北农学报》国内外公开发行, 国内统一刊号: CN13-1101/S, 国际刊号 ISSN1000-7091。双月刊, 双月 28 日出版, 国际标准大 16 开本, 240 页, 每期定价 12 元, 全年 72.00 元。邮发代号: 18-10, 国外发行代号: 5918。全国各地邮局均可订阅。可随时汇款到编辑部订阅, 请写清刊名、份数、收刊人姓名、地址、邮编, 以免误投或无法投递。

欢迎订阅、欢迎投稿!

通信地址: 石家庄市和平西路 598 号《华北农学报》编辑部

邮 编: 050051

电 话: 0311-87652166

E-mail: hbnxb@163.com

网 址: <http://www.hbnxb.net/>