

# 利用基因沉默技术创造抗稻瘟病水稻资源

方先文 张云辉 张所兵 林 静 汪迎节

(江苏省农业科学院 粮食作物研究所,江苏 南京 210014)

**摘要:** 水稻稻瘟病是最具毁灭性的病害之一,严重地影响水稻的高产和稳产。在病原菌侵染水稻时,附着胞的形成对稻瘟病菌的致病性起着关键作用。研究证实一种P型ATP酶(P-ATPase)参与了附着胞的形成。在病原菌与寄主的互作过程中,寄主的一些小分子物质可以进入病原菌中,达到抗病原菌侵染的目的。以稻瘟菌致病关键的P-ATPase基因 *MgAPT2* 第一外显子上特异性好的232 bp的区域作为干扰片段,正反向插入干扰载体中,通过农杆菌介导,转化到感稻瘟病水稻品种日本晴中,通过苗期稻瘟病接种鉴定和 *MgAPT2* 基因的表达检测,结果表明:转基因植株稻瘟病抗性得到增强且稻瘟病菌 *MgAPT2* 基因的表达量下降,为水稻抗稻瘟病种质资源的创新提供了新思路。

**关键词:** 水稻; 抗稻瘟病; 基因沉默

中图分类号: Q78; S511.01 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2013)05-0106-04

## Using Gene Silencing Technology to Create Blast Resistance Rice Resources

FANG Xian-wen, ZHANG Yun-hui, ZHANG Suo-bing, LIN Jing, WANG Ying-jie

(Institute of Food Crops, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

**Abstract:** Rice blast disease is the severest disease in rice production. The formation of appressorium plays a key role on disease extending when pathogenic fungi intrudes into rice. The formation of appressorium needs a P-type ATPase. Small molecules from the host are able to enter into the pathogen during the interactions between pathogen and host, to reach the purpose of anti-pathogen infection. In this study, a 232 bp DNA sequence from the first exon of the P-ATPase gene *MgAPT2* was used as interfering fragment and inserted into interfering vector positively and negatively. The interfering vector was then transformed into rice variety Nipponbare susceptible to rice blast. Rice blast resistance of transgenic plants and gene expression were checked. The results showed that the expression level of the P-ATPase gene *MgAPT2* from *Magnaporthe grisea* in transgenic rice decreased and blast-disease resistance of transgenic rice increased. This study provided a new way for innovation of rice blast-disease resistance germplasm.

**Key words:** Rice; Blast resistance; Gene silencing

由稻瘟病菌(*Magnaporthe grisea*)引起的稻瘟病是水稻生产上最具毁灭性的三大病害之一,每年都造成水稻严重减产。我国自20世纪90年代以来,年发病面积都在380万 $\text{hm}^2$ 以上,每年损失水稻产量达数十万吨。通过筛选抗性水稻资源,培育抗稻瘟病水稻新品种是阻止稻瘟病危害发生的有力途径。但稻瘟病菌的遗传复杂、致病性多样,抗病新品种往往在推广几年后就丧失抗性,造成水稻大面积减产<sup>[1-4]</sup>。目前,国内外学者致力于发掘抗病基因并通过分子标记辅助选择,创造抗稻瘟病新材

料<sup>[4-5]</sup>,但稻瘟病菌的生理小种变异较快<sup>[6-7]</sup>,所以抗病育种进展缓慢。而通过化学防治会造成环境污染和种植成本的增加,探索稻瘟病抗性持久的品种(系)创新和治理策略是世界性的难题。

目前,已经明确稻瘟病的致病机制。稻瘟病菌分生孢子由3个细胞组成,其顶端在寄主表面萌发,形成一个狭窄的萌发管,萌发管随后分化成圆顶状的附着胞,其基部产生一个狭窄的侵入钉,附着胞内的膨压转化成机械力迫使侵入钉穿透寄主表皮进入叶肉细胞。呈球根状的菌丝再通过胞间连丝扩散到

收稿日期: 2013-05-17

基金项目: 江苏省国际合作项目(BZ2011039); 江苏省农业自主创新项目(CX(11)1020)

作者简介: 方先文(1967-),男,江苏高邮人,研究员,博士,主要从事水稻品种资源研究。

临近细胞中。侵染 72 ~ 96 h 即产生病斑<sup>[8]</sup>。这一系列错综复杂的过程每一个环节都是由特定基因控制的。其中附着胞的形成对稻瘟病菌的致病性起着关键作用。稻瘟病菌成功侵染水稻依靠的就是附着胞内产生的膨压穿透寄主表面的角质层<sup>[9-10]</sup>。有研究表明<sup>[11]</sup>, 一种 P 型 ATP 酶参与了附着胞的形成, 没有这种酶的参与, 病菌的致病力极显著地下降。随着水稻与稻瘟菌全基因组测序的完成, 水稻-稻瘟病菌互作机制研究取得很大进展, 目前已成为研究植物与病原菌互作的模式系统<sup>[9]</sup>。双链 RNA 基因沉默技术是一项高效基因敲除技术, 在研究基因功能中得到广泛应用<sup>[12]</sup>。在病原菌与植物的互作过程中, 植物体内的双链干涉序列是可以进入到病原菌体内, 尽管进入的机制还不十分清楚<sup>[13]</sup>。

本研究运用基因沉默技术, 将 P-ATPase 的干扰载体转化水稻, 通过病原菌与水稻的互作, 进入病原菌中, 抑制 P-ATPase 的产生, 从而达到控制水稻稻瘟病发生的目的。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

供试品种: 用于致病性测定的水稻品种日本晴、日本晴的 P-ATPase 干扰载体转基因植株, 感病对照

品种丽江黑谷和苏御糯。

供试菌株: 稻瘟病野生小种 Guy 11, 由江苏省农业科学院植物保护研究所提供。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 P-ATPase 干扰载体的构建** 用 CTAB/NaCl 微量法制备稻瘟病菌基因组 DNA, 方法参见文献[14]。选取稻瘟菌 P-ATPase 基因 *MgAPT2*<sup>[11]</sup> 第一外显子上特异性好的 232 bp 的区域作为干扰片段 (23 ~ 254 bp), 以引物 MGCH7- $\alpha$ -F: 5'-TTCTGCACTAGGTACCAGGCCTGTGAAGCGGCTGTCGCTGCTC-3' 和 MGCH7- $\alpha$ -R: 5'-CTGACGTAGGGGCGATAGAGCTCTCGACGAGCTCACCCTTGTC-3' 扩增正义干扰片段, 引物 MGCH7- $\gamma$ -F: 5'-CGGGGATCCGTCGACTACTGAAGCGGCTGTCGCTGCTC-3' 和 MGCH7- $\gamma$ -R: 5'-AGGTGCAAGCTGCAGTACTCGACGAGCTCACCCTTGTC-3' 扩增反义干扰片段 (下划线为酶切位点)。利用重组定向克隆的方法将候选基因正义和反义干扰片段分别克隆到 RNAi 载体的左右多克隆位点上 (In-Fusion® HD Cloning Kit 重组试剂盒, Takara 公司) (图 1) 转化后挑选阳性克隆测序验证。所用载体为 LH-FAD2-1390RNAi (FAD2 作为茎环结构, 由 pCambia 1390 经过改造获得)。

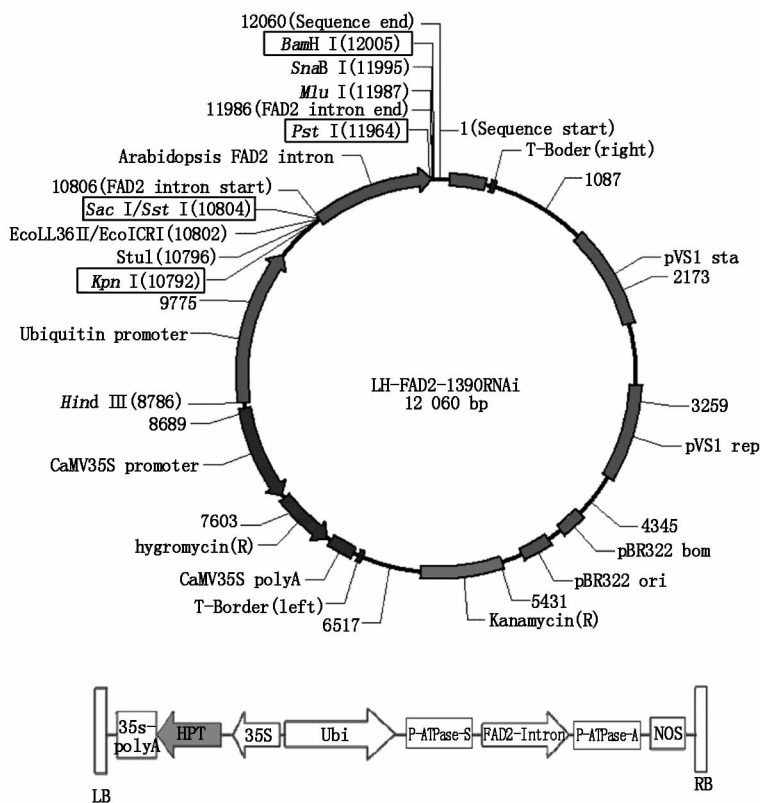


图 1 P-ATPase 干扰载体示意图

Fig. 1 P-ATPase interference vector

**1.2.2 致病性测定方法** 用单孢菌株在产孢培养基上培育 7 d, 黑光灯光照处理 3 d 后, 用无菌水冲洗

培养基表面的孢子 配成  $5 \times 10^5$  个/mL 的孢子悬浮液。将 3~4 叶期的水稻幼苗置于接种箱内(70 cm × 45 cm × 33 cm),用真空泵进行喷雾接种,每箱用悬浮液量为 30 mL。试验设置 3 次重复,每次重复用苗量为 20 株。接种后在接种箱内 28 °C 黑暗培养 24 h 后移入遮荫棚内,白天每隔 2 h 喷水 10 min 保湿,晚上加盖薄膜保温,7~10 d 后调查发病情况。

1.2.3 发病期水稻中稻瘟病菌 RNA 的提取 在发病期取日本晴和转基因阳性植株的叶片,保存在 -80 °C 超低温冰箱。使用 RNeasy pure Plant Kit (北京天根生化科技有限公司)提取总 RNA。用 DU800 分光光度计(Bechman Instrument Inc. USA),检测 RNA 的浓度及质量,电泳检测 RNA 的完整性。取 2 µg RNA 作为模板,使用 PrimeScript 1st Strand cDNA Synthesis Kit(Takara 公司),反转录合成第一链 cDNA。

1.2.4 P-ATPase 基因的 qRT-PCR 分析 为避免转基因植株中稻瘟病基因片段的干扰,将 qRT-PCR 定量引物选在 P-ATPase 基因 *MgAPT2* 干扰片段的下游。前引物 ATPase qRT-F: 5'-ATTCCACAACATCGCCAACA-3' 位于第一外显子 330 bp 处,后引物 ATPase qRT-R: 5'-CTGTGCAGCCTTCTCCCTTC-3' 位于第二外显子。稻瘟菌特异的 *Actin* 基因内参引物为,FL4362ACTIN-F: 5'-CCATGTACCCTGGTCTTTCG-3',FL4363ACTIN-R: 5'-TTCGAGATCCACATCTGCTG-3'。

使用 SYBR premix Ex Taq™(TaKaRa 公司)试剂盒在 ABI PRISM 7900HT 荧光定量 PCR 仪上扩增。程序为:95 °C 30 s;95 °C 5 s 60 °C 30 s 95 °C 15 s 60 °C 1 min 95 °C 15 s 40 个循环。待扩增反应结束后,使用 7900HT Real-Time PCR 仪(Applied Biosystems)自带的软件分析 CT 值,用稻瘟菌 *Actin* 基因的表达量作为内参,计算出目的基因的相对表达量。

## 2 结果与分析

### 2.1 RNAi 转基因植株的 PCR 鉴定

使用 LH-FAD2-4390RNAi 载体上的引物 1390-F: 5'-TGCCTTCATACGCTATTTATTTGC-3' 和 FAD2-R: 5'-GAAGCGACGGACCTGGAGAT-3' 扩增干扰片段,加上载体上的部分序列共 373 bp。有目的片段扩增的即为转基因阳性植株。2012 年 4 月共得到 T<sub>0</sub>转基因植株 26 株,其中转基因阳性苗 21 株(图 2)。将 T<sub>0</sub>转基因苗种植在钵中置于塑料大棚,正常水肥管理,收取 T<sub>1</sub>种子。在致病性测定时,转基因 T<sub>1</sub>植株经 PCR 单株鉴定保证每次重复不少于 20

株阳性苗。

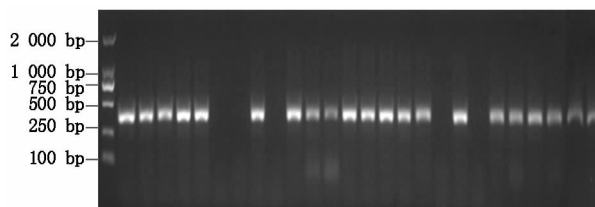
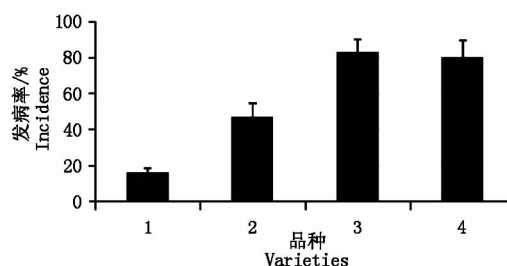


图 2 RNAi 转基因 T<sub>0</sub> 植株的 PCR 检测

Fig.2 PCR identification of RNAi transgenic T<sub>0</sub> plants

### 2.2 P-ATPase RNA 干扰转基因植株的稻瘟菌致病性调查

通过对供试水稻材料苗期稻瘟病喷雾接种试验,发现感病对照品种丽江黑谷和苏御糯的发病率稳定在 80% 左右,表明此次接种是成功的。日本晴的发病率为 46.7%,而 T<sub>1</sub>转基因阳性植株的发病率降到了 15.7%(图 3),表明将 P-ATPase 基因 *MgAPT2* 构建干扰载体转化水稻后,增强了水稻对稻瘟病的抗性。与此同时,转基因阳性植株的平均病斑数相对于野生型日本晴也明显下降(图 4)。



1. RNAi T<sub>1</sub> 阳性植株; 2. 日本晴; 3. 丽江黑谷; 4. 苏御糯。图 4 同。

1. Transgenic positive T<sub>1</sub> plants; 2. Nipponbare; 3. Lijiangheigu; 4. Suyunuo. The same as Fig. 4.

图 3 供试材料稻瘟病的发病率调查

Fig.3 Investigation on incidence of rice blast of the tested materials

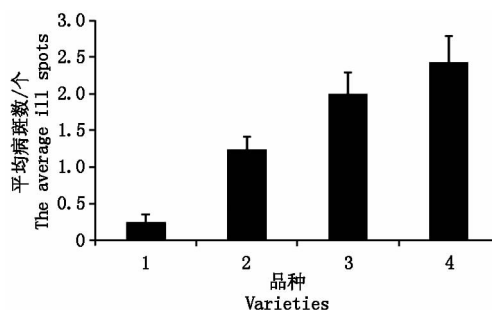


图 4 供试材料稻瘟病平均病斑数调查

Fig.4 Identification on average ill spots of the tested materials

### 2.3 发病期水稻叶片中稻瘟菌 P-ATPase 基因的表达分析

为了分析转 RNA 干扰载体水稻的稻瘟病抗性增强是否由侵染水稻的稻瘟菌中 P-ATPase 基因 *MgAPT2* 的表达受到干扰引起,我们提取了发病期野生型日本晴(CK)和 3 个转基因阳性植株(A1-3、

A1-11、A1-38) 叶片总 RNA, 并通过 qRT-PCR 对 *MgAPT2* 的转录量进行了分析。结果显示, 与野生型相比, *MgAPT2* 基因在 3 个转基因植株中表达量下调(图 5)。表明将稻瘟菌 P-ATPase 基因构建干扰载体转化水稻后, 可以通过影响稻瘟菌本身基因的表达从而使得水稻的抗病性得到增强。

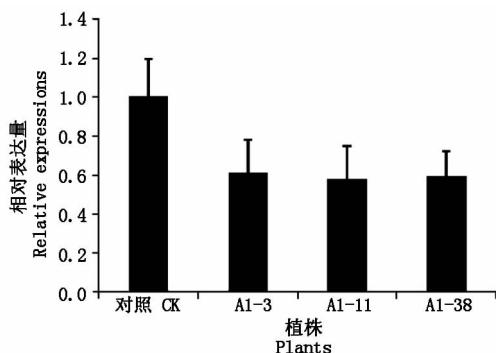


图 5 水稻叶片中稻瘟菌 P-ATPase 基因 *MgAPT2* 的表达

Fig. 5 Expression levels of the P-ATPase gene *MgAPT2* in rice leafs

### 3 讨论

针对病原菌的致病关键基因构建干扰载体, 并转化到寄主细胞中, 通过病原菌与寄主的互作, RNAi 产物能够进入到病原菌体内, 从而抑制了致病关键基因的表达, 使病原菌缺乏致病力。这种方法在动物抗病育种中已经得到了应用<sup>[15]</sup>, 在植物界虽有成功的报道, 并且已经申报了发明专利, 但为数不多。本研究针对稻瘟病菌致病关键的 P-ATPase 基因 *MgAPT2*, 以该基因第一外显子上特异性好的区域作为干扰片段构建干扰载体, 并通过农杆菌介导, 转化到感稻瘟病水稻品种日本晴中, 通过稻瘟病接种鉴定和稻瘟病菌中 P-ATPase 基因 *MgAPT2* 表达的定量检测, 证明转基因植株上稻瘟病菌 *MgAPT2* 基因的表达量下降, 稻瘟病抗性得到增强, 为水稻稻瘟病防治提供了新思路。

水稻与稻瘟病菌的互作过程十分复杂, 涉及到许多调控因子的共同作用<sup>[16-18]</sup>。全面深入地了解此过程还有待于现有理论与技术的发展。但随着生物技术的不断发展, 水稻-稻瘟病菌互作机制必将得到全面解析, 在此基础上对于其中的某些过程采取更有针对性的防治策略对推动水稻抗病育种体系的发展具有积极的意义。

致谢: 水稻愈伤组织的遗传转化得到北京大学生命科学院蛋白质工程及植物基因工程国家重点实验室瞿礼嘉教授、秦跟基副教授的大力支持; 水稻稻瘟病接种鉴定工作得到江苏省农业科学院植物保护研究所程兆榜研究员的大力支持, 在此表示感谢!

### 参考文献:

- [1] 刘 鹏, 魏毅东, 陈由强, 等. 水稻稻瘟病抗性基因的归类分析及其功能研究进展 [J]. 分子植物育种, 2011 9(2): 128-135.
- [2] 李 瑶, 聂元元, 蔡耀辉, 等. 水稻稻瘟病抗性基因及其分子标记辅助选择育种研究进展 [J]. 江西农业学报, 2011 23(9): 72-75.
- [3] 谢 培, 邓其明, 王世全, 等. 水稻稻瘟病抗性基因研究进展 [J]. 湖南农业科学, 2011(5): 79-81.
- [4] 李 江, 黄东益. 水稻抗稻瘟病分子育种研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2007 35(35): 11413-11415.
- [5] 姚 姝, 张锦文, 罗 琼, 等. 抗稻瘟病分子标记辅助选择的研究进展 [J]. 江苏农业科学, 2008(4): 8-12.
- [6] 任野胜, 肖陪村, 陈 勇, 等. 水稻稻瘟病菌研究进展 [J]. 现代农业科学, 2008 15(1): 19-23.
- [7] 赵正洪, 张岳平, 瞿华香. 水稻稻瘟病菌及其抗性遗传研究进展 [J]. 湖南农业科学, 2008(5): 1-4.
- [8] Wilson R A, Talbot N J. Under pressure: investigating the biology of plant infection by *Magnaportheorhyzae* [J]. Nature Reviews Microbiology, 2009 7(3): 185-195.
- [9] 张红生, 吴云雨, 鲍永美. 水稻与稻瘟病菌互作机制研究进展 [J]. 南京农业大学学报, 2012 35(5): 1-8.
- [10] 乐美旺, 陈 实, 潘庆华, 等. 水稻稻瘟病菌侵染途径研究综述 [J]. 江西农业学报, 2006 18(2): 101-105.
- [11] Gilbert M J, Thornton C R, Wakley G E, et al. A P-type ATPase required for rice blast disease and induction of host resistance [J]. Nature, 2006 440(23): 535-539.
- [12] Wesley S V, Helliwell C A, Smith N A, et al. Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants [J]. The Plant Journal, 2001 27(6): 581-590.
- [13] Niu J H, Jian H, Xu J M, et al. RNAi technology extends its reach: Engineering plant resistance against harmful eukaryotes [J]. African Journal of Biotechnology, 2010 9(45): 7573-7582.
- [14] 周益军. 稻瘟病菌遗传多样性和致病性诱变研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2000.
- [15] Saleh M C, van Rij R P, Hekele A, et al. The endocytic pathway mediates cell entry of dsRNA to induce RNAi silencing [J]. Nature Cell Biology, 2006 8(8): 793-802.
- [16] 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 36(12): 40-43.
- [17] 王 军, 杨 杰, 杨金欢, 等. *Pi-ta*、*Pi-b* 基因在江苏粳稻穗颈瘟抗性育种中的价值分析 [J]. 华北农学报, 2012 27(6): 141-145.
- [18] 靳春鹏, 孙 庚, 刘金亮, 等. 吉林省水稻品种对稻瘟病的抗性分析 [J]. 华北农学报, 2011 26(3): 214-218.