

哈茨木霉几丁质酶基因提高水稻抗病性研究^{*}

覃宏涛¹ 肖 晗² 孙宗修² 徐 同¹

(1 浙江大学植保系,杭州 310029)

(2 中国水稻研究所农业部水稻生物学重点实验室,杭州 310006)

摘要: 以农杆菌介导法将木霉内切几丁质酶基因 ThEn - 42 导入梗稻台北 - 309 和农虎 6 号中。PCR 检测表示 ThEn - 42 已整合入水稻基因组中。在温室中进行的抗病性检测结果表明: T₀ 代转基因植株对纹枯病菌(*Rhizoctonia solani* Kühn) 的抗性得到了明显的提高。T₀ 代转基因植株的离体叶片也表现出对纹枯病菌的抗性。

关键词: 几丁质酶;哈茨木霉;转基因水稻;水稻纹枯病菌

中图分类号: S 511.035;S 511.034 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004 - 390X(2000)03 - 0212 - 04

自 1991 年 Broglie 等^[1]首次报道转几丁质酶基因的植物对真菌病害抗性提高以来,已有不少转几丁质酶基因植物的报道^[2],所使用的外源几丁质酶基因多源于植物或粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)。尽管多数转基因植物表现出对某些真菌的抗病性有了提高,但其抗性水平并不如育种家所期望的高;而且转几丁质酶基因植物似乎不能同时提高对多种病菌的抗性^[2,3]。近年来,各国学者对如何改进转几丁质酶基因植物的抗性水平并拓宽其抗菌谱进行了广泛探讨。其中至少有两种方法值得进一步探索。其一,几丁质酶基因与其它基因组合共同转化植物,以期获得协同增效作用。已有报道利用这种策略获得了转基因烟草和转基因水稻^[4,5]。其二,利用源于重寄生真菌的具更强拮抗真菌能力的几丁质酶基因作外源基因转化植物。Matteo Lorito 等^[3]将 *Trichoderma harzianum* 的内切几丁质酶基因转入烟草中,获得的转基因烟草表现出对多种真菌的高度抗性。但目前还没有将该基因转化水稻的报道。我们利用农杆菌转化法将 *Trichoderma harzianum* 的内切几丁质酶基因转化入水稻基因组中,并对转基因当代(T₀)植株进行了水稻纹枯病抗性分析。

1 材料与方法

1.1 水稻品种

梗稻(*Oryza sativa* L subsp. *japonica*)品种台北 309,农虎 6 号。

1.2 水稻纹枯病菌

所用水稻纹枯病菌(*Rhizoctonia solani* Kühn)均为取自浙江大学真菌研究室的强致病力菌株 AG - 1 - 2B。

1.3 基因

克隆自哈茨木霉(*Trichoderma harzianum*) P1 菌株的内切几丁质酶基因 ThEn - 42 由美国 Cornell 大学 Gary Harman 教授提供。

1.4 质粒

双元质粒载体 pXXS1 由中国水稻研究所农业部水稻生物学重点实验室构建。该质粒含有由 CaMV35S 启动子驱动的 ThEn - 42,用受另一个 CaMV35S 启动子驱动的潮霉素磷酸转移酶基因(hpt)作为选择标记。系由质粒 pCAMBIA1300 改造而来。质粒结构如图 1 所示。

1.5 水稻转化

将质粒 pXXS1 用电击法分别转入 *Agrobacterium tumefaciens* 菌株 EHA101, LBA4404 中,并用这两个菌株来转化梗稻品种台北 309 和农虎 6

^{*} 收稿日期: 2000 - 04 - 18

基金项目: 国家自然科学基金项目

作者简介: 覃宏涛(1973 -),男,广西上林县人,在读硕士,主要从事植物抗病基因工程研究。

号。转化方法参照 Xiao Han 等^[6]。

1.6 PCR 分析

按照卢扬江和郑康乐报道的方法^[7]提取转化再生苗的 DNA。PCR 引物序列为: 5'-CCCTCTA-GACACTTCACCATGTTGGGCTTCCTC-3' 和 5'-CC-

CGGATCCGATCTCTAGTTGAGACCGCTTCGG-3'。

该引物在质粒上的特异性扩增产物应为约 1.3 kb 大小编码 *Trichoderma harzianum* 内切几丁质酶基因(ThEn-42)的 DNA 片段。

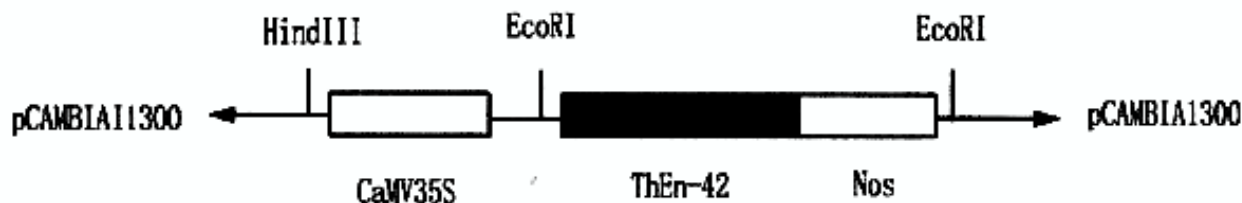


图1 质粒 pXXS1 的部分图谱

Fig. 1 Partial physical map of plasmid pXXS1

1.7 T₀ 代转基因水稻抗病性检测

1.7.1 T₀ 代转基因水稻离体叶片拮抗纹枯病菌的实验

参考彭绍裘等^[8]提供的方法。取生长状态、大小、厚薄程度相近的水稻叶片,剪成约 3 cm 长的小段。无菌水洗净后放入铺有湿润无菌滤纸的平

皿中。每皿中放置取自同一株转基因水稻和非转化水稻各 3 小段叶片,每段叶子中央放一块在 PDA 培养基上培养了 3 d 的纹枯病菌菌丝块。Parafilm 膜封口保湿,26℃,16 h/d 光照培养,3 d 后观察病斑大小和菌丝侵染情况。每株水稻重复两次。

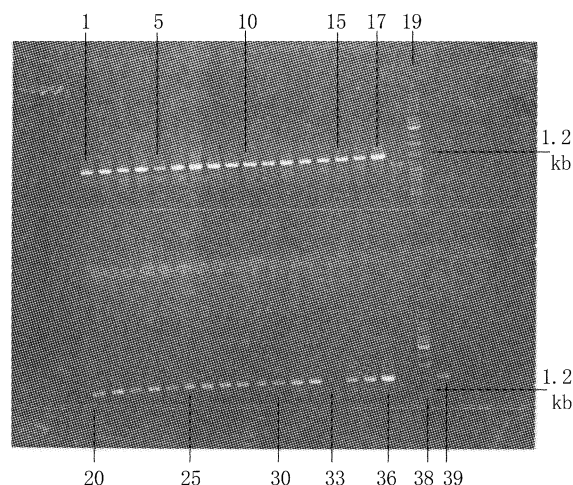


图2 T₀ 代转木霉内切几丁质酶基因水稻 PCR 检测

Fig. 2 PCR analysis of DNA isolated from leaves of T₀ transgenic rice plants

1.7.2 T₀ 代转基因水稻植株对纹枯病的抗性

试验在温室里进行,转基因水稻分蘖后移栽到塑料周转箱中。将火柴棍截成 0.8~1.0 cm 小段,然后切成两半。灭菌后,加少量 PDB 培养基使之刚刚浸没火柴棍。接种纹枯病菌,26℃下培养 3 d。

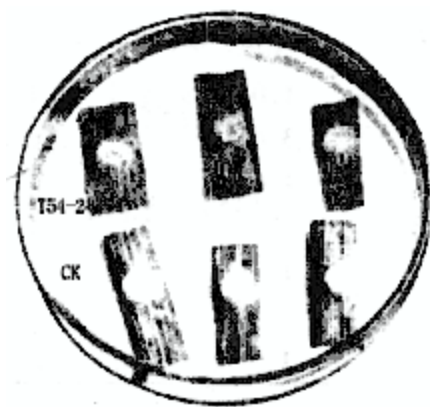


图3 T₀ 代转木霉内切几丁质酶基因水稻离体叶片对水稻纹枯病抗性的离体鉴定

Fig. 3 *In vitro* reaction of leaf of T₀ transgenic rice plants to infection with *Rhizoctonia solani*

然后以此带菌小棍做接种体,在转基因水稻分蘖盛期或孕穗期接种水稻纹枯病菌,接种方法参照潘学彪等的报道^[9]。接种后将周转箱置于铁架中,夜间覆以塑料薄膜保湿。接种后 4 d,14 d 分别调查病情,记录病斑长度。

2 结果

2.1 水稻的转化

本试验分别采用粳稻品种台北 309 和农虎 6 号的幼胚和成熟胚作为外植体诱导愈伤组织。使用 Xiao Han 等^[6]的转化方法,以幼胚为外植体在 4 周之内可以获得抗性愈伤,而以成熟胚为外植体则需要更长的组织培养时间以获得胚性愈伤。台北 309 的抗性愈伤再经约两个月的分化即可成苗。农虎 6 号的分化较慢,需两个半月或更长时间。台北 309 的转化效率(能够再生成苗的抗性愈伤组织数/共培养的愈伤组织数 $\times 100\%$)为 19.6%;农虎 6 号的转化效率为 3.6%。转基因苗长大后移栽入土,由同一抗性愈伤组织再生而来的转基因苗分株种植并逐株编号。

附表 T_0 代植株对水稻纹枯病菌的抗性反应

Tab. Resistance response of T_0 regenerated rice plants to

Rhizoctonia solani

编号	4 d 病斑长度/cm	14 d 病斑长度/cm
CK	2.4	20.5
4-1	0.9	1.7
12-3	1.9	8.6
30-1	1.4	24.7
34-2	0	0.3
35-2	1.0	1.5
40-4	3.6	6.0
38-1	1.6	19.3
41-4	0	0
46-1	1.3	1.3
49-1	0.5	3.8
52-1	3.5	15.0

2.2 PCR 检测

选取从 10 个抗性愈伤组织再生而来的 31 株转基因苗进行 PCR 检测,结果所有转基因植株都扩增出约 1.3 kb 的特征带,这一条带和由质粒 pXXS1 扩增到的条带大小相同,而非转化的对照植株中则未扩增到这一条带(图 2)。这说明完整的外源基因 ThEn-42 可能已经整合到转基因植株的基因组中了。

2.3 T_0 代转基因水稻离体叶片拮抗纹枯病菌

接种离体叶片 3 d 后,未转化对照 CK 的叶片表面变黄,出现黄色或褐色病斑,菌丝在叶片表面生长旺盛。而大部分转基因株系的叶片上也会出

现病斑,菌丝在叶片上亦可蔓延生长;但其病斑面积明显较 CK 的小,且菌丝生长稀疏(图 3)。少数转基因株系的叶片表面仍是绿色的,基本上未见病斑,菌丝的生长也受到更大的限制,同时还观察到一些株系表现得比 CK 对纹枯病菌更敏感,其叶片上的病斑显得更大,菌丝生长的更浓厚。

2.4 T_0 代转基因植株对纹枯病的抗性检测

温室抗病性检测的结果表明,部分转基因植株的纹枯病抗性比未转化的对照有了明显的提高。数据见附表。

3 分析讨论

农杆菌介导的转化方法因其具有操作简单不需要特殊仪器,仅引入 T-DNA 边界内特定的外源 DNA 片段,插入方式多为单位点等优点,因此被广泛应用在植物基因工程中。自从 Hiei 等^[10]成功地证明了农杆菌介导法可以有效的转化单子叶植物水稻以后,这一方法日益受到重视。从我们的实验结果来看,Xiao Han 等^[6]的转化方法不失为一种有效的转化方法。本次实验中台北 309 的转化率 19.6% 与已有的报道相比并不算高。但是在实验过程中有抗性愈伤组织被污染的情况,如能克服这一问题转化率应该会更高。对于台北 309 而言,用幼胚或成熟胚做外植体得到的转化率并无太大区别;分别用两种农杆菌株系,超毒力型菌株 E-HAI05 和普通型菌株 LBA4404 加以转化也能得到相近的转化率。而不同水稻基因型在该体系中的转化率则相差甚远。农虎 6 号的组织培养性能较差也许是导致其转化率偏低的重要原因。看来该转化体系仍待进一步优化,以有效地对某些基因型尤其是籼稻品种进行转化。

本实验对部分 T_0 代转基因植株的纹枯病抗性检测结果表明这些转基因水稻对纹枯病的抗性得到了很大的提高,甚至观察到了接种 14 d 后仍不发病的株系。这是一个鼓舞人心的结果,但这仅是抗病鉴定的初步结果。 T_0 代转基因植株是经过长期组织培养再生而来的,抗病性的提高是否与其长期处于胁迫条件下有关? 这种高度抗性可否遗传至下一代? 我们将进一步对 T_1 代的遗传规律和抗病作用进行研究。另外,在温室接种检测过程中,我们发现转基因植株可被稻叶鞘腐败病菌所侵染。因此,即令转木霉几丁质酶基因植物可获得对多种病菌的抗性,几丁质酶的抗病作用仍应是有选择性

的。进一步探明产生这种选择性的机制将为获得具有广谱抗性转基因水稻指明方向。离体叶片拮抗实验的结果也支持转基因水稻对纹枯病的抗性提高的结论,但是其结果和温室接种检测的结果并不完全一致。对个别株系甚至会得到相反的结论,比如株系 4-1 在温室检测中表现出对纹枯病菌极高的抗性水平,其离体叶片却对纹枯病菌很敏感。其原因正在研究之中。

参 考 文 献

- 1 Broglie K, Chet I. Transgenic plants with enhanced resistance to the fungal pathogen *Rhizoctonia solani* [J]. *Science*, 1991, 254: 1194 - 1197
- 2 高必达. 生物工程进展, 1999, 19(2): 21 ~ 28
- 3 Lorito M, Woo S L. Genes from mycoparasitic fungi as a source for improving plant resistance to fungal pathogens [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 7860 - 7865
- 4 冯道荣, 许新萍. 使用双抗真菌蛋白基因提高水稻抗病性的研究 [J]. *植物学报*, 1999, 41 (11): 1187 ~ 1191
- 5 Smith G, Fornbardt B. Enhanced quantitative resistance against fungal disease by combinatorial expression of different barley antifungal proteins in transgenic tobacco [J]. *Plant J*, 1995, 8: 97 - 109
- 6 Xiao Han, Fu Yaping. Production of large scale transgenic rice plants for transposon tagging via *Agrobacterium* [C]. Sixth International Symposium on Rice Mol Biol, 1998, 75
- 7 卢扬江, 郑康乐. 提取水稻 DNA 的一种简易方法 [J]. *中国水稻科学*, 1992, 6(1): 47 ~ 48
- 8 彭绍裘, 曾昭瑞. 水稻纹枯病及其防治 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1986
- 9 潘学彪, 陈宗祥. 不同接种调查方法对抗水稻纹枯病遗传研究的影响 [J]. *江苏农学院学报*, 1997, 18(3): 27 ~ 32
- 10 Hiei Y, Ohta S. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of boundaries of the T - DNA [J]. *Plant J*, 1994, 6: 271 - 282
- 11 刘巧泉, 张景六. 根癌农杆菌介导的水稻高效转化系统的建立 [J]. *植物生理学报*, 1998, 19(4): 33 ~ 34
- 12 Zhu Q, Maher E A. Enhance protection against fungal attack by constitutive coexpression of chitinase and glucanase genes in transgenic tobacco [J]. *Bio Technology*, 1994, 12: 807 ~ 812

Enhance Disease Resistance of Transgenic Rice Plants with an Endochitinase Gene ThEn - 42 from *Trichoderma harzianum*

Qin Hongtao Xiao Han Sun Zongxiu Xu Tong

(1 Department of Plant Protect, Zhejiang University, Hangzhou 310029)

(2 Rice Biology Lab of Agriculture Department, Rice Research Institute of China, Hangzhou 310006)

Abstract By an *Agrobacterium* - mediated transformation method, ThEn - 42, an endochitinase gene cloned from *Trichoderma harzianum* strain P1, was introduced into the Japonica rice varieties Taibei-309 and Nonghu-6. About 75% of the regenerated transgenic plant (T_0) showed significantly higher resistance against the sheath blight pathogen *Rhizoctonia solani* Kühn in greenhouse. Leaf of most T_0 transgenic plants also showed less susceptibility to *Rhizoctonia solani* Kühn in the *in vitro* testing.

Key words Chitinase; *Trichoderma harzianum*; Transgenic rice; *Rhizoctonia solani*