

水稻抗稻瘟病基因资源与分子育种策略

郝 鲲,马 建,程治军,王 帅,赵沙沙,王久林,王 洁,赵志超,雷财林

(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)

摘要: 稻瘟病是水稻主要病害之一,利用抗病品种是防治稻瘟病最经济、有效和安全的措施。近年来,随着植物先天免疫机制、抗病分子生物学以及水稻和稻瘟菌基因组学研究的不断深入,一系列参与病原菌识别和防卫信号传导与应答,以及外源抗菌蛋白、病原菌激发子等抗病相关基因陆续被鉴定和克隆,为提高水稻抗稻瘟病能力提供了一些新的基因资源、育种策略和技术。本文概述了国内外近年来克隆的主要抗稻瘟病基因资源及其在分子育种研究中的进展,提出了通过转基因手段整合不同防卫反应关键调控基因的抗稻瘟病聚合育种策略。

关键词: 水稻;稻瘟病;分子育种;基因资源;防卫信号传导

Potential Gene Resources and Molecular Strategies for Improving Rice Blast Resistance

HAO Kun, MA Jian, CHENG Zhi-jun, WANG Shuai, ZHAO Sha-sha, WANG Jiu-lin,
WANG Jie, ZHAO Zhi-chao, LEI Cai-lin

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

Abstract: Rice blast is one of the most devastating diseases of rice. Utilization of resistant cultivars is the most effective, economical, and environment-friendly approach to control the blast disease. In the past decade, with the progress in plant innate immunity, molecular biology of plant resistances, and genomics of rice and *Magnaporthe oryzae*, a range of plant defense-related genes which are implicated in host recognition of pathogens, host defense signaling, antifungal proteins, and elicitors of the pathogens, have been identified and cloned, providing some novel gene resources, breeding strategies and techniques for enhancing rice blast resistance. In this review, we summarized the main blast defense-related genes for their enhancement in blast resistance and application in rice molecular breeding programs, and put forward a molecular breeding strategy which was to stack some key genes regulating different defense pathways through co-integration transformation and over-expressing of the target genes by means of transgenic techniques.

Key words: Rice; rice blast; molecular breeding; gene resources; defense signal transduction

稻瘟病是一种世界性稻作病害,全球每年因稻瘟病造成的稻谷产量损失达 10% ~ 30%,足以以为 6000 万人提供 1 年的口粮^[1]。近年来,稻瘟病在我国西南、长江中游和东北等稻区持续大流行,年发病面积达 330 万 ~ 570 万 hm^2 ,直接威胁到国家粮食安全^[2]。

在生产上,一般采用化学防治和种植抗病品种来控制稻瘟病害。长期的实践证明,选育和利用抗

病品种是防治稻瘟病最经济、有效和安全的措施。然而,由于稻瘟菌具有高度的异质性,其致病性极易发生变异产生新的致病小种,一个抗病品种往往推广应用 3 ~ 5 年就丧失抗性,给水稻生产造成新的损失^[2-3]。近年来,随着植物先天免疫机制、抗病分子生物学以及水稻和稻瘟菌基因组学研究的不断深入,一系列参与病原菌识别和防卫信号传导与应答,

收稿日期:2013-01-06 修回日期:2013-02-07 网络出版日期:2013-04-02

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20130402.1733.003.html>

基金项目:国家转基因生物新品种培育科技重大专项(2011ZX08001-002);国家自然科学基金项目(30871606)

作者简介:郝鲲,硕士,从事水稻抗稻瘟病分子育种研究。E-mail: zhonghuadaohuang@ yahoo.com.cn

通信作者:雷财林,博士,研究员,主要从事水稻抗稻瘟病遗传育种研究。E-mail: leicailin@ caas.cn

以及外源抗菌蛋白、病原菌激发子等抗病相关基因陆续被鉴定和克隆。本文概述了国内外近年来克隆和报道的主要抗稻瘟病基因资源及其在分子育种研究中应用的进展,旨在为我国的水稻抗稻瘟病分子育种提供借鉴。

1 识别受体类基因

植物在与病原微生物共同进化过程中形成了复杂的先天免疫系统。该免疫系统可大致分为 2 个层面:第 1 层面基于寄主细胞表面的模式识别受体 (PRR, pattern recognition receptor) 对病原菌相关分子模式 (PAMP, pathogen-associated molecular pattern) 的识别,该免疫过程被称为病原菌相关分子模式激发的免疫 (PTI, PAMP-triggered immunity)^[4-5]。第 2 层面始于细胞内部,主要依靠抗性基因 (*R* gene, resistance gene) 编码的蛋白直接或间接识别病原菌效应子 (effector) 中的无毒基因 (*avr* gene, avirulence gene) 编码蛋白,在侵染点激发防卫反应,这一过程被称为效应子触发的免疫 (ETI, effector-triggered immunity)^[6]。PTI 导致植物产生非特异性的防卫反应,ETI 则使植物产生特异性的防卫反应。在 PTI 和 ETI 两个层面深入植物先天免疫分子机制,有望在作物抗病基础理论和基因资源等研究方面取得突破。

1.1 模式识别受体 (PRR)

植物的 PTI 属于基础抗性,相当于传统病理学中的水平抗性^[7]。PRR 的存在使得植物能抵抗大部分病原微生物的侵染,具有广谱持久抗性的特点。在水稻中,目前已鉴定了 10 个 PRR 基因,包括 *LYP4* 和 *LYP6*、*OsWAK1*、*OsSERK1*、*OsBRR1*、*OsBISERK1*、*CEBiP*、*OsCERK1*、*XA21* 和 *OsFLS2* 等^[8-15]。其中, *LYP4*、*LYP6*、*OsWAK1*、*OsSERK1* 和 *OsBRR1* 等 5 个基因,已经经转基因验证被确认参与稻瘟病抗性。将这些基因在感病品种中过表达,均能显著增强稻瘟病抗性。与受体品种相比,转 *LYP4* 或 *LYP6* 基因水稻的叶病斑面积降低 81%,叶病斑数下降 50%,同时还增强了对白叶枯病和细菌性条斑病的抗性^[8];转 *OsWAK1* 基因水稻的叶病斑面积降低约 80%^[12];转 *OsSERK1* 基因水稻的叶病斑数下降 75%^[13];转 *OsBRR1* 基因水稻对 3 个稻瘟病菌株的病情指数下降 80%^[14]。值得注意的是, *XA21* 原为一个水稻白叶枯病质量抗性基因,因对应的无毒蛋白 Ax21 是一个 PAMP 而被重归入 PRR,在水稻中过表达该基因可提供对白叶枯病的广谱抗

性^[15]。上述研究结果表明可利用转 PRR 基因手段培育出广谱或持久抗病的水稻品种。

1.2 抗性基因 (*R* 基因)

在植物病害系统中,病原菌往往通过产生效应子克服寄主植物 PTI,而植物进化出相应的识别受体 (*R* 蛋白) 来识别和防御这些效应子而启动 ETI,这种由 *R* 基因介导的 ETI 抗性,也称为植物的 *R* - 基因抗性^[4,7]。ETI 通常赋予植物高度抗性,表现为被侵染点细胞过敏性坏死,从而限制病原菌的生长。尽管 *R* 基因会因病原菌群体遗传结构的变化 (*Avr* 基因的突变或丢失) 而失效,但因其表现高度抗性,迄今一直被作为植物抗病分子育种的首选目的基因。

在水稻中,利用分子标记技术已鉴定和定位了 80 多个稻瘟病 *R* 基因,其中 *Pib*、*Pita*、*Pi9*、*Piz-t*、*Pi2*、*Pid2*、*Pi36*、*Pi37*、*Pik-m*、*Pit*、*Pi5*、*Pid3/Pi25*、*Pish*、*Pik*、*pi21*、*Pb1*、*Pia*、*Pik-h/Pi54*、*Pik-p* 和 *Pil* 等 20 个基因被相继克隆出来 (http://www.ricedata.cn/gene/gene_pi.htm)。除 *Pid2* 编码 1 个受体蛋白激酶, *pi21* 编码 1 个富含脯氨酸的蛋白外,其余的 18 个 *R* 基因均编码 NBS-LRR 类蛋白。通过分子标记辅助选择 (MAS, marker-assisted selection) 技术,一些 *R* 基因已被导入或聚合到一些水稻主栽品种或杂交稻亲本中^[16-22],例如,文婷等^[17]利用功能性分子标记 *Pi9-a* 将广谱 *R* 基因 *Pi9* 导入到丰源 B、II 32B、天龙香 103、明恢 63、轮回 422、R747、25H003 等水稻材料中,各组合均已筛选到稻瘟病抗性明显改良的 BC₃ F₁ 材料。S. Hittalmani 等^[18]、Y. Koide 等^[19]通过 MAS 手段,分别将 *Pil*、*Pi2* 和 *Pita* 及 *Pish* 和 *Pib* 聚合于水稻品种 CO39;陈学伟等^[20]将 *Pid1*、*Pib* 和 *Pita* 聚合于杂交稻保持系 G46B;S. Liu 等^[21]等分别将 *Pil* 和 *Pi2* 聚合于保持系珍汕 97B 中;C. Fu 等^[22]将 *Pil*、*Pi2* 和 *Xa21* 聚合于保持系 Rongfeng B。上述抗性基因的导入均显著提高了受体的抗性水平,拓宽了抗谱。

通过转基因手段导入 *R* 基因,可以克服常规和 MAS 育种中连锁累赘障碍,是改良水稻品种抗病性的最有效措施之一。S. Qu 等^[23]将自身启动子驱动的 *Pi9* 基因转入感病品种 TP309,在其 T₂ 选育出转基因纯合株系,且保持了 *Pi9* 原有的广谱高抗特性。另外,通过转基因手段可以打破等位基因的局限,聚合同一 *Pi9/2* 位点的广谱抗性基因 *Pi9*、*Pi2*、*Piz-t* 等^[24]或 *Pk* 位点的 *R* 基因 *Pil*、*Pik*、*Pikp*、*Pikm* 等^[25]。通过转基因实施 *R* 基因的聚合,最好是选择

那些不需要借助配体蛋白(partner protein)即可识别无毒基因产物的 *R* 基因,以期快速、高效地培育广谱抗病新品种。近年来,伴随我国转基因生物新品种培育重大专项的实施,一些重要的 *R* 基因,如 *Pi9*、*Pi2*、*Piz-t*、*Pigm*、*Pid2*、*Pid3*、*Pil*、*Pik-p* 等已开始应用于转基因抗稻瘟病育种。

2 防卫信号传导与应答基因

寄主 *PRR* 基因和 *R* 基因介导防卫反应的原初信号,随后由信号传导分子活性氧类、蛋白激酶级联、转录因子等逐级传递和放大,诱导各种病程相关基因(*PR* 基因)表达而产生抗性。已有研究证实,活性氧(ROS, reactive oxygen species)氧化迸发(oxidative burst)、丝裂原活化蛋白激酶(MAPK, mitogen-activated protein kinase)级联(cascades)、WRKY 家族转录因子、激素及 PR 蛋白等对防卫信号传导和应答起重要的调控作用。这些调控基因由于其编码产物不与病原物直接互作,位于抗病信号传达路径的关键节点,因而有可能提供广谱和持久抗性。

2.1 ROS 氧化迸发相关基因

ROS 氧化迸发是寄主识别病原菌后早期的生理反应之一,也是防卫信号传导的关键一步。在水稻中,小分子 GTP 酶家族的 *OsRac1* 蛋白参与 ROS 氧化迸发,其激活后诱导 ROS 的产生和细胞死亡。将激活的 *OsRac1* 基因在水稻中过表达,转基因株系的抗性由受体品种的感病(S)级提高到抗病(R)或高度抗病(HR)级,伴随产生一些类似过敏反应的坏死斑^[26]。另一个参与 ROS 氧化迸发的是类草酸氧化酶基因,又称类朊蛋白(GLP, germin-like protein),具有超氧化物歧化酶(SOD, super oxygen dehydrogenases)活性,催化超氧化物转变为过氧化氢。在水稻品种 SHZ2 第 8 染色体上有 1 个持久抗稻瘟病的主效 QTL,所在区间包含 12 个 *OsGLP*,通过 RNAi 沉默部分成员明显减弱对稻瘟病和纹枯病的抗性,预示着这些 *GLPs* 也是抗稻瘟病和纹枯病的基因^[27]。

2.2 MAPK 类基因

MAPK 是一类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,与 MAPKK(MAPK kinase)、MAPKKK(MAPKK kinase)构成 MAPK 级联系统,在传递激素和环境胁迫等多种信号的过程中起作用。在水稻中,已经发现 17 个 MAPK 基因,其中至少 9 个基因在水稻感染稻瘟病菌后诱导表达^[28]。已有研究证实,*OsMPK5* 是稻瘟病抗性的负调控因子,通过 RNAi 干扰沉默 *OsMPK5* 可以显著增强稻瘟病抗性,使叶片病斑数较野生型

减少 90%,病害严重度降低 80%,但也削弱了稻胡麻斑病及非生物逆境(旱、盐及寒)抗性^[28-29]。类似的,*OsMPK6* 负调控稻白叶枯病抗性,其 RNAi 干扰株系的白叶枯病抗性增强,但却降低了对鞘质类真菌的抗性^[30-31]。鉴于 MAPK 激酶类基因的抗病作用依赖特定水稻-病原菌的互作,在抗稻瘟病分子育种中应谨慎利用。

2.3 转录因子类基因

转录因子是一类能与真核基因启动子的顺式作用元件发生特异性互作、对转录具有激活或抑制作用的 DNA 结合蛋白,通过调控植物应答环境信号的传递在防卫反应中起作用。WRKY 家族是植物转录因子的一个大类,在水稻中至少包含 103 个 WRKY 基因^[32]。其中 *OsWRKY13*、*OsWRKY31*、*OsWRKY45*、*OsWRKY53* 和 *OsWRKY89* 已被证实参与稻瘟病抗性,在感病品种中过表达这些基因,能显著增强稻瘟病抗性^[33-39]。与受体品种相比,转 *OsWRKY13* 和 *OsWRKY31* 基因的株系,其稻瘟病病斑均明显变小,抗性均由 S 级提高到 R 级,同时也都增强了白叶枯病抗性,但转 *OsWRKY13* 基因削弱了耐冷性和耐盐性^[33-35];转 *OsWRKY31* 基因株系的病斑长度减少约 50%,病斑数减少约 67%^[36];转 *OsWRKY45* 基因株系的抗性由 S 级提高到 R 或 HR 级,病斑数减少 90% 以上^[37];转 *OsWRKY53* 基因株系抗性由 S 级提高到 R 或 MR(中抗)级^[38];转 *OsWRKY89* 基因株系的病斑数下降 90%,但引起植株早期生长延迟、节间缩短^[39]。其他家族的转录因子,如 *OsNAC6* 在水稻中过表达,其转基因株系的病斑长度与受体品种类似,但宽度变窄约 30%,表明其有抑制真菌菌丝侵入叶脉的作用^[40]。

2.4 激素相关基因

植物受病原菌侵染后通常激发一些植物激素(水杨酸、茉莉酸、乙烯、脱落酸和吲哚乙酸等)的生物合成和信号传导。已有研究证实,SA 信号传导的关键调节基因 *NPR1*(Non-expressor of *PRI*)、JA 生物合成的关键酶—丙二烯氧合酶 AOS2 及吲哚-3-乙酸-氨基合成酶 GH3.1 参与水稻稻瘟病抗性,将这些基因在水稻感病品种中过表达,均能显著增强稻瘟病抗性^[41-45]。与受体品种相比,转 *OsNPR1* 基因的株系病斑明显变小,病情指数下降 50%^[41];转 *AtNPR1* 基因的株系抑制稻瘟菌生长,致使叶片病斑减小 86%,感病叶片病原菌孢子量下降 85%,同时也都增强了对稻恶苗病、根腐病和白叶枯病的抗性,但减弱了稻黄斑病及非生物逆境(盐和干旱)的抗

性,并伴随产生类坏死斑^[42-43];转 *OsAOS2* 基因株系的抗性级别提高 50%,病菌生长量下降 83%^[44];转 *OsGH3.1* 基因株系的病斑减小 50%,病斑数下降 66%,但引起植株矮化^[45]。另外,将 *NPR1* 的抑制基因 *OsSSI2* (编码一个脂肪酸脱氢酶)沉默能显著增强稻瘟病抗性,使叶片病斑数较野生型减少 95%,同时也显著增强稻白叶枯病抗性,使叶片病斑长度较野生型减少 90%,但伴随产生一些类似过敏反应的坏死斑^[46]。

2.5 PR 基因

PR 基因是一类受病原菌诱导的寄主防卫相关基因,包括 17 个基因家族,编码的蛋白(*PR* 蛋白)通常具有直接抗菌作用^[47]。将不同来源 *PR* 基因 *Rir1b*、*RBB12-3* 和 *Gns1* (水稻)及 *PRms* (玉米)、*Dm-AMPI* (大丽菊)和 *Rs-AFP2* (萝卜)在水稻中过表达,均能显著增强稻瘟病抗性^[48-53]。其中转 *Rir1b* 基因株系的病斑较受体品种明显变小,病斑数下降 48%^[48];转 *RBB12-3* 基因株系对不同来源的 6 个稻瘟病菌株的抗性均能由受体品种的 S 级达到免疫或 HR 级^[49];转 *Gns1* 基因株系的抗性由受体品种的 S 级提高到 R 或 HR 级,其病情指数由受体品种的 40%降为 0.4%,伴随有类似过敏反应的坏死斑^[50];转 *PRms* 基因株系对稻瘟病的抗性由受体品种的 S 级提高到了免疫或 HR 级,对恶苗病、根腐病和胡麻斑病的抗性也显著增强^[51];转 *Dm-AMPI* 和 *Rs-AFP2* 基因株系稻瘟病叶病斑面积分别下降 84% 和 77%,同时也增强了稻纹枯病抗性,其纹枯病株率分别下降 72% 和 45%^[52-53]。这些结果显示:在 *PR* 类基因中存在优异的抗稻瘟病基因资源。

3 非植物来源的抗菌蛋白

抗菌蛋白(肽)是动物和植物的先天免疫系统的重要成分,能提供植物广谱抗病性。在水稻中,过表达巨型蚕蛾 (*Hyalophora cecropia*) 的抗菌肽 cecropin A、巨大曲霉菌 (*Aspergillus giganteus*) 的抗真菌蛋白 AFP 和木霉菌 (*Trichoderma viride*) 的几丁质 Chitinas C 等基因,均能显著提高稻瘟病抗性^[54-56]。与受体品种相比,转 cecropin A 基因株系的抗性由受体品种的 S 级提高到 R 或 HR 级,但育性有所下降^[54];转 AFP 基因株系的病原菌生长量下降 55%^[55];转 *ChiC* 基因株系的叶病斑面积下降 85%^[56]。

4 病原菌的激发子

病原菌激发子是一类能与寄主某些相关基因识

别,激发寄主植物产生防卫反应的病原菌分子,包括 *Avr* 基因产物(*Avr* 蛋白)、病原菌表面信号分子等。在稻瘟病菌中,目前已分离出多种激发子,包括 9 个 *Avr* 基因^[25]。M. J. Orbach 等^[57]将无毒基因 *Avr-Pita* 导入含有 *R* 基因 *Pita* 但对特定菌株感病的水稻品种中,发现转基因植株对该毒性菌株产生抗性;D. Qiu 等^[58]将稻瘟菌激发子 *pemG1* 在水稻中过表达,发现转基因植株叶片病斑数和病斑面积明显降低,病害严重度下降 38%。M. Shao 等^[59]、邵敏等^[60]将稻白叶枯病菌的广谱抗性激发子基因 *hrf1* 在水稻中过表达,获得了对 6 个稻瘟病菌株抗病的材料,其病害严重度下降 56% 以上。Y. Takakura 等^[61]将燕麦嗜酸菌激发子鞭毛蛋白 *flagellin* 基因在水稻中过表达,发现一些转基因株系病斑数明显减少,抗性由受体品种的 S 级上升为 R 或 HR 级,伴随有类似过敏反应的坏死斑。

5 分子育种策略

目前已报道参与水稻-病原菌识别、防卫信号传导与应答,以及外源抗菌蛋白、病原菌激发子等主要抗稻瘟病相关基因至少有 53 个(未克隆的 *R* 基因不计在内),包括 20 个 *R* 基因,5 个 *PRR* 基因,2 个 ROS 相关基因,1 个 MAPK 类基因,7 个转录因子类基因,5 个激素相关基因、6 个 *PR* 基因,3 个抗菌蛋白基因,4 个病原菌激发子基因。

5.1 基于 *R* 基因的分子育种策略

在水稻稻瘟病 *R* 基因中,除已克隆的 20 个基因外,尚有 60 多个基因被鉴定和定位,其中仅有 1 个隐性基因 *pi21*,其余均为显性基因(http://www.ricedata.cn/gene/gene_pi.htm)。目前,*R* 基因的转移和利用仍主要局限于常规杂交、回交或 MAS 手段^[16-23]。很多 *R* 基因成簇分布,包括一些公认的广谱抗性基因 *Pi9*、*Pi2*、*Piz-t*、*Pigm*、*Pi50(t)* 等,均为 *Pi9/2* 位点上的等位基因^[24, 62-63]; *Pi1*、*Pik*、*Pikp*、*Pikm* 等均为 *Pik* 位点的等位基因^[25]。对于等位或紧密连锁的 *R* 基因的聚合,常规杂交和 MAS 手段都无能为力,唯有采用转基因手段,其中最有效的策略是通过构建多基因共整合载体同时转化多基因,当然也可以分基因多次转化或者分基因逐个转化而后再杂交聚合,只是后 2 种方式的聚合周期较长。对于非紧密连锁的 *R* 基因的聚合,可以采用 MAS 手段与转基因手段相结合的策略。另外,对于隐性基因 *pi21*,由于其与一个不良食味品质基因紧密连锁,利用 MAS 手段转移该基因会导致水稻食味品质变

差^[64],最佳策略是利用 RNAi 技术沉默显性的 *Pi21* 基因以获得稻瘟病抗性和优良食味品质。

5.2 基于抗病相关基因(非 *R* 基因)的分子育种策略

在 33 个抗稻瘟病相关基因中,有 31 个属于正向调控基因,通过基因过表达增强了受体品种的稻瘟病抗性,其中 30 个基因的过表达受组成型启动子驱动,1 个基因 *OsNAC6* 的过表达受诱导型启动子驱动(目的是克服生长延迟等副作用);有 2 个负调控基因 *OsMPK5* 和 *OsSSI2*,其抗性增强是通过人为的 RNAi 沉默实现的。除 *OsNPRI* 的转基因受体为籼稻品种 Gui99, *Dm-AMP1* 和 *Rs-AFP2* 的转基因受体为籼稻品种 Pusa Basmati1 外,其余 30 个基因的转基因受体涉及到 14 个粳稻品种,主要是日本晴(10 例)和 Senia(4 例),其次是 TP309、中花 11 和秀水 11(各 2 例)。由于这些受体品种不是当前生产上的主栽品种,其转基因后代的实用性受到限制。在育种实践中,应根据育种目标选择主栽品种或应用潜力高代品系作受体进行基因过表达或 RNAi,以便快速、高效地改良稻瘟病抗性。

11 个抗稻瘟病相关基因转基因后增强了对 2 个或多个病害的抗性,包括有: *LYP4* 和 *LYP6* (抗稻瘟病、稻白叶枯病和稻细菌性条斑病)、*OsRac1* (抗稻瘟病和稻白叶枯病)、*OsGLP* (抗稻瘟病和稻纹枯病)、*OsWRKY13* 和 *OsiWRKY* (抗稻瘟病和稻白叶枯病)、*AtNPRI* (抗稻瘟病、稻白叶枯病、恶苗病和根腐病)、*OsNPRI/NHI* (抗稻瘟病和稻白叶枯病)、*OsSSI2* (抗稻瘟病和稻白叶枯病)、*PRms* (抗稻瘟病、恶苗病、根腐病和胡麻斑病)、*Dm-AMP1* 和 *Rs-AFP2* (抗稻瘟病和稻纹枯病)。以上涉及到 *PRR*、*ROS*、转录因子、激素和 *PR* 等相关基因,暗示着从抗病基因调控的信号传导路径上发掘广谱或持久抗病基因资源是可行的。

10 个抗稻瘟病相关基因转基因后产生了明显的副作用,包括有: *OsRac1* (类坏死斑)、*MAPK5* (对稻胡麻斑病及非生物逆境敏感)、*OsWRKY13* (对非生物逆境敏感)、*OsWRKY89* (植株早期生长延迟、节间缩短)、*AtNPRI* (类坏死斑稻,对稻黄斑病及非生物逆境敏感)、*OsSSI2* (类坏死斑)、*OsGH3.1* (植株矮化)、*Gns1* (类坏死斑)、*Ceropin A* (育性下降)和 *flagellin* (类坏死斑)。这些基因涉及到本文提及的除受体基因以外的所有类型的抗病相关基因。其中, *OsRac1*、*AtNPRI*、*OsSSI2*、*Gns1* 和 *flagellin* 等基因引起的类过敏反应的坏死斑,很可能与其持续或过度激活植株系统防卫反应而引发细胞死亡有关,需

要通过更换组成型启动子为病原菌诱导型启动子以消除该副作用。

在 23 个无明显副作用的抗稻瘟病相关基因中,有 4 个基因转基因后呈现高水平抗性(抗性级别达 *R* 或病害严重度下降 90% 以上),包括有: *PRms*、*RBB12-3*、*OsWRKY45* 和 *Avr-Pita* (需 *Pita* 基因参与)。因此,应用上述 33 个基因进行抗稻瘟病转基因育种时,首选目标基因应该是 *PRms*;其次是 *RBB12-3* 和 *OsWRPK45*;再次是 *OsRac1*、*OsSSI2*、*Gns1* 和 *flagellin* (高水平抗性,但需病原菌诱导型启动子驱动以消除类坏死斑)。至于其他抗病相关基因,最好与 *R* 基因联合使用或因时空和被改良品种谨慎选用。

5.3 基于 *R* 基因和抗病相关基因结合的分子育种策略

尽管 *R* 基因的聚合可以扩宽水稻品种的抗谱,延长其使用年限,但迟早会因稻瘟病菌群体 *Avr* 基因结构发生变化而失效;而 *PRR* 基因、抗病信号传导路径的关键基因,以及外源抗菌蛋白、病原菌效应子等往往诱导植物产生非特异性的防卫反应,其抗性水平虽然相对较低,但通常相对广谱、持久。理论上,通过转基因手段实施不同 *R* 基因与不同 *PRR*、转录因子、*PR* 或激发子等基因的多基因共转化,将调控不同防卫反应路径的多个基因集于同一品种,应该是目前培育广谱持久抗病水稻品种的最理想策略。

6 结语与展望

尽管国内外已鉴定和定位了 80 多个稻瘟病 *R* 基因,但多数基因由于抗谱狭窄而未能在育种计划中得到广泛应用^[65]。目前在分子育种中应用的主要是几个广抗谱基因,如 *Pil*、*Pita*、*Pi2* (*Piz5*)、*Pi9*、*Pigm* (*t*)、*Pi40* 等^[16-22,24,62,66],然而由于 *Pi2*、*Pi9*、*Pigm* 是等位基因,而 *Pi40* 又与这三者极端紧密连锁(相距仅 80 kb)^[24,66],这使得能用于 MAS 聚合的基因更加有限。已报道的 33 个抗稻瘟病相关基因尽管均被证实能增强稻瘟病抗性,但评价其抗性的稻瘟病菌株数目有限,除 3 个基因 *OsBRR1*、*hrl1* 和 *RBB12-3* 分别用了 3、6 和 6 个菌株外,其余 30 个基因各用了 1 个菌株^[8-14,26-61];也就是说,这 33 个基因对稻瘟病菌的广谱抗性尚待进一步确认。其中 3 个基因 *PRms*、*RBB12-3* 和 *OsWRPK45*,由于其转基因后呈现高水平的抗性且副作用很小,可优先选作稻瘟病抗源供育种应用。在未来分子育种计划中,可以尝试不同 *R* 基因和 *PR*、*WRKY* 基因的多基因共转化及进一步的基因聚合,以期获得相对广谱持久的稻

瘟病抗性。另外,需要开发和采用原菌诱导型启动子和无选择标记基因转化系统,以减免转基因对植物正常生长发育、生物环境和食品安全等的负面影响。

随着植物先天免疫机制及水稻-稻瘟菌互作机制研究的深入,将会鉴定和克隆出更多的 *PRR*、*R* 基因、防卫信号传导路径关键基因、抗菌蛋白基因、病原菌激发子基因,以及防卫素基因和感病基因等,也将会开发出更多的转基因新策略和新技术,如基于对病原物(致病因子)小 RNA 干扰的策略及 *R* 基因修饰技术、转基因修饰技术等。未来利用这些基因资源和技术,人们将可能培育出更高效、广谱、持久抗稻瘟病的水稻新品种。

参考文献

- [1] Skamnioti P, Gurr S J. Against the grain: safeguarding rice from blast disease[J]. Trends Biotechnol, 2009, 27: 141-150
- [2] 刘占领, 雷财林, 程治军, 等. 水稻稻瘟病抗性基因定位与克隆研究进展[J]. 作物杂志, 2007(3): 16-19
- [3] Zeigler R S, Tohme J, Nelson R, et al. Lineage exclusion: a proposal for linking blast population analysis to resistance breeding [M]// Zeigler R S, Leong S A, Teng P S. Rice blast disease. Wallingford: CAB international, 1994: 267-292
- [4] Jones J D G, Dang J L. The plant immune system[J]. Nature, 2006, 444(7117): 323-329
- [5] Boller T, He S Y. Innate immunity in plants: an arms race between pattern recognition receptors in plants and effectors in microbial pathogens[J]. Science, 2009, 324(5928): 742-743, 744
- [6] Takken F L W, Tameling W I L. To nibble at plant resistance proteins[J]. Science, 2009, 324(5928): 744-746
- [7] 赵开军, 李岩强, 王春连, 等. 植物天然免疫性研究进展及其对作物抗病育种的可能影响[J]. 作物学报, 2011, 37(6): 935-942
- [8] Liu B, Li J, Ao Y, et al. Lysin motif-containing proteins LYP4 and LYP6 play dual roles in peptidoglycan and chitin perception in rice innate immunity[J]. Plant Cell, 2012, 24: 3406-3419
- [9] Li H, Zhou S, Zhao W, et al. A novel wall-associated receptor-like kinase gene, *OsWAKI*, plays important roles in rice blast disease resistance[J]. Plant Mol Biol, 2009, 69: 337-346
- [10] Hu H, Xiong L, Yang Y. Rice *SERK1* gene positively regulates somatic embryogenesis of cultured cell and host defense response against fungal infection[J]. Planta, 2005, 222: 107-117
- [11] Peng H, Zhang Z, Li Y, et al. A putative leucine-rich repeat receptor kinase, *OsBRR1*, is involved in rice blast resistance[J]. Planta, 2009, 230: 377-385
- [12] Song D, Li G, Song F, et al. Molecular characterization and expression analysis of *OsBISERK1*, a gene encoding a leucine-rich repeat receptor-like kinase, during disease resistance responses in rice[J]. Mol Biol Rep, 2008, 35: 275-283
- [13] Kaku H, Nishizawa Y, Ishii-Minami N, et al. Plant cells recognize chitin fragments for defense signaling through a plasma membrane receptor[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103: 11086-11091
- [14] Shimizu T, Nakano T, Takamizawa D, et al. Two LysM receptor molecules, CEBiP and OsCERK1, cooperatively regulate chitin elicitor signaling in rice[J]. Plant J, 2010, 64: 204-214
- [15] Lee S W, Han S W, Sriyanyum M, et al. A type-I secreted, sulfated peptide triggers *XA21*-mediated innate immunity[J]. Science, 2009, 326: 850-853
- [16] Miah G, Rafii M Y, Ismail M R, et al. Blast resistance in rice: a review of conventional breeding to molecular approaches[J]. Mol Biol Rep, 2012, (published on line)
- [17] 文婷, 梁毅, 江南, 等. 利用 *Pi9* 基因序列标记辅助选择改良粳稻稻瘟病抗性[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2012, 38(3): 262-266
- [18] Hittalmani S, Parco A, Mew T V, et al. Fine mapping and DNA marker-assisted pyramiding of the three major genes for blast resistance in rice[J]. Theor Appl Genet, 2000, 100(7): 1121-1128
- [19] Koide Y, Kawasaki A, Telebanco-Yanoria M J, et al. Development of pyramided lines with two resistance genes, *Pish* and *Pib*, for blast disease (*Magnaporthe oryzae* B. Couch) in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Plant Breeding, 2010, 129: 670-675
- [20] 陈学伟, 李仕贵, 马玉清, 等. 水稻抗稻瘟病基因 *Pi-d(t)1*、*Pi-b*、*Pi-ta2* 的聚合及分子标记选择[J]. 生物工程学报, 2004, 20(5): 708-714
- [21] Liu S, Li X, Wang C, et al. Improvement of resistance to rice blast in Zhenshan 97 by molecular marker-aided selection[J]. Acta Bot Sin, 2003, 45(11): 1346-1350
- [22] Fu C, Wu T, Liu W, et al. Genetic improvement of resistance to blast and bacterial blight of the elite maintainer line Rongfeng B in hybrid rice (*Oryza sativa* L.) by using marker-assisted selection[J]. Afr J Biotechnol, 2012, 11(67): 13104-13124
- [23] Qu S, Liu G, Zhou B, et al. The broad-spectrum blast resistance gene *Pi9* encodes a nucleotide-binding site-leucine-rich repeat protein and is a member of a multigene family in rice[J]. Genetics, 2006, 172(3): 1901-1914
- [24] Liu J, Wang X, Mitchell T, et al. Recent progress and understanding of the molecular mechanisms of the rice-*Magnaporthe oryzae* interaction[J]. Mol Plant Pathol, 2010, 11(3): 419-427
- [25] Hua L, Wu J, Chen C, et al. The isolation of *Pi1*, an allele at the Pik locus which confers broad spectrum resistance to rice blast[J]. Theor Appl Genet, 2012, 125(5): 1047-1055
- [26] Ono E, Wong H L, Kawasaki T, et al. Essential role of the small GTPase Rac in disease resistance of rice[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98: 759-764
- [27] Manosalva P M, Davidson R M, Liu B, et al. A germin-like protein gene family functions as a complex quantitative trait locus conferring broad-spectrum disease resistance in rice[J]. Plant Physiol, 2009, 149: 286-296
- [28] Vleeschauwer D, Yang Y, Vera Cruz C, et al. Abscise acid-induced resistance against the brown spot pathogen *Cochliobolus miyabeanus* in rice involves MAP kinase-mediated repression of ethylene signaling[J]. Plant Physiol, 2010, 152: 2036-2052
- [29] Xiong L, Yang Y. Disease resistance and abiotic stress tolerance in rice are inversely modulated by an abscise acid-inducible mitogen-activated protein kinase[J]. Plant Cell, 2003, 15: 745-759
- [30] Yuan B, Shen X, Li X, et al. Mitogen-activated protein kinase *OsMPK6* negatively regulates rice disease resistance to bacterial pathogens[J]. Planta, 2007, 226: 953-960
- [31] Kishi-Kaboshi M, Okada K, Kurimoto L, et al. A rice fungal MAMP responsive MAPK cascade regulates metabolic flow to antimicrobial metabolite synthesis[J]. Plant J, 2010, 63: 599-612
- [32] 宋钰, 荆邵娟, 余迪求. 水稻 *WRKY* 转录调控因子基因功能研究进展[J]. 中国水稻科学, 2009, 23(5): 447-455
- [33] Qiu D, Xiao J, Ding X, et al. *OsWRKY13* mediates rice disease resistance by regulating defense related genes in salicylate and jasmonate-dependent signaling[J]. Mol Plant Microbe In, 2007, 20: 492-499
- [34] Guo Z, Kan Y, Chen X, et al. Characterization of a rice *WRKY* gene whose expression is induced upon pathogen attack and mechanical wounding[J]. Acta Bot Sin, 2004, 7: 955-964
- [35] 李南羿, 柴荣耀, 傅立 Ran, 等. *OsiWRKY* 基因的水稻转化和转基因水稻抗病性分析[J]. 浙江大学学报: 农业与生命科学版, 2005, 31(6): 697-700

- [36] Zhang J, Peng Y L, Guo Z J. Constitutive expression of pathogen inducible *OsWRKY31* enhances disease resistance and affects root growth and auxin response in transgenic rice plants[J]. Cell Res, 2008, 18(4): 508-521
- [37] Shimono M, Sugano S, Nakayama A, et al. Rice *WRKY45* plays a crucial role in benzothiadiazole-inducible blast resistance[J]. Plant Cell, 2007, 19: 2064-2076
- [38] Chujo T, Takai R, Akimoto-Tomiya C, et al. Involvement of the elicitor-induced gene *OsWRKY53* in the expression of defense-related genes in rice[J]. BBA-Gene Struct Expr, 2007, 1769(7-8): 497-505
- [39] Wang H, Hao J, Chen X, et al. Overexpression of rice *WRKY89* enhances ultraviolet B tolerance and disease resistance in rice plants[J]. Plant Mol Biol, 2007, 65: 799-815
- [40] Nakashima K, Tran L-S P, Nguyen D V, et al. Functional analysis of a NAC-type transcription factor *OsNAC6* involved in abiotic and biotic stress-responsive gene expression in rice[J]. Plant J, 2007, 51: 617-630
- [41] Feng J, Cao L, Li J, et al. Involvement of *OsNPRI/NHI* in rice basal resistance to blast fungus *Magnaporthe oryzae* [J]. Eur J Plant Pathol, 2011, 131: 221-235
- [42] Quilis J, Penas G, Messeguer J, et al. The *Arabidopsis AtNPRI* inversely modulates defense responses against fungal, bacterial, or viral pathogens while conferring hypersensitivity to abiotic stresses in transgenic rice[J]. Mol Plant Microbe In, 2008, 21(9): 1215-1231
- [43] Fitzgerald H A, Chern M S, Navarre R, et al. Overexpression of (*At*)*NPRI* in rice leads to a BTH- and environment-induced lesion-mimic/cell death phenotype [J]. Mol Plant-Microbe In, 2004, 17(2): 140-151
- [44] Mei C S, Qi M, Sheng G Y, et al. Inducible overexpression of a rice allene oxide synthase gene increases the endogenous jasmonic acid level, *PR* gene expression, and host resistance to fungal infection[J]. Mol Plant-Microbe In, 2006, 19(10): 1127-1137
- [45] Domingo C, Andres F, Tharreau D, et al. Constitutive expression of *OsGH3.1* reduces auxin content and enhances defense response and resistance to a fungal pathogen in rice[J]. Mol Plant-Microbe In, 2009, 22(2): 201-210
- [46] Jiang C, Shimono M, Maeda S, et al. Suppression of the rice fatty-acid desaturase gene *OsSSI2* enhances resistance to blast and leaf blight diseases in rice[J]. Mol Plant Microbe In, 2009, 22(7): 820-829
- [47] van Loon L C, Rep M, Pieterse C M J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants[J]. Ann Rev Phytopathol, 2006, 44: 135-162
- [48] Schaffrath U, Mauch F, Freydl E, et al. Constitutive expression of the defense-related *Rir1b* gene in transgenic rice plants confers enhanced resistance to the rice blast fungus *Magnaporthe grisea* [J]. Plant Mol Biol, 2000, 43: 59-66
- [49] Qu L, Chen J, Liu M, et al. Molecular cloning and functional analysis of a novel type of Bowman-Birk inhibitor gene family in rice[J]. Plant Physiol, 2003, 133(2): 560-570
- [50] Nishizawa Y, Saruta M, Nakazono K, et al. Characterization of transgenic rice plants over-expressing the stress-inducible β -glucanase gene *GnsI*[J]. Plant Mol Biol, 2003, 51(1): 143-152
- [51] Gomez-Ariza J, Campo S, Rufat M, et al. Sucrose-mediated priming of plant defense responses and broad-spectrum disease resistance of the maize pathogenesis-related PRms protein in rice plants [J]. Mol Plant-Microbe In, 2007, 20: 832-842
- [52] Jha S, Tank H, Prasad B, et al. Expression of Dm-AMP1 in rice confers resistance to *Magnaporthe oryzae* and *Rhizoctonia solani* [J]. Transgenic Res, 2009, 18(1): 59-69
- [53] Jha S, Chattoo B B. Expression of a plant defensin in rice confers resistance to fungal phytopathogens[J]. Transgenic Res, 2010, 19(3): 373-384
- [54] Coca M, Peñas G, Gómez J, et al. Enhanced resistance to the rice blast fungus *Magnaporthe grisea* conferred by expression of a cecropin A gene in transgenic rice[J]. Planta, 2006, 223(3): 392-406
- [55] Coca M, Bortolotti C, Rufat M, et al. Transgenic rice plants expressing the antifungal AFP protein from *Aspergillus giganteus* show enhanced resistance to the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*[J]. Plant Mol Biol, 2004, 54(2): 245-259
- [56] Itoh Y, Takahashi K, Takizawa H, et al. Family 19 chitinase of *Streptomyces griseus* HUT6037 increases plant resistance to the fungal disease[J]. Biosci Biotechnol Bioch, 2003, 67(4): 847-855
- [57] Orbach M J, Farral L, Sweigard J A. A telomeric avirulence gene determines efficiency for the rice blast resistance gene *Pita*[J]. Plant Cell, 2000, 46: 2019-2032
- [58] Qiu D, Mao J, Yang X, et al. Expression of an elicitor-encoding gene from *Magnaporthe grisea* enhances resistance against blast disease in transgenic rice[J]. Plant Cell Rep, 2009, 28: 925-933
- [59] Shao M, Wang J, Dean R A, et al. Expression of a harpin-encoding gene in rice confers durable non-specific resistance to *Magnaporthe grisea*[J]. Plant Biotechnol J, 2008, 6: 73-81
- [60] 邵敏, 肖姗姗, 李林, 等. 转 *hgf1* 基因水稻对稻瘟病多小种非专化的稳定抗性[J]. 中国水稻科学, 2008, 22(5): 459-464
- [61] Takakura Y, Che F, Ishida Y, et al. Expression of a bacterial flagellin gene triggers plant immune responses and confers disease resistance in transgenic rice plants[J]. Mol Plant Pathol, 2008, 9(4): 525-529
- [62] Deng Y, Zhu X, Shen Y, et al. Genetic characterization and fine mapping of the blast resistance locus *Pigm(t)* tightly linked to *Pi2* and *Pi9* in a broad-spectrum resistant Chinese variety [J]. Theor App Genet, 2006, 113(4): 705-713
- [63] Zhu X, Chen S, Yang J, et al. The identification of *Pi50(t)*, a new member of the rice blast resistance *Pi2/Pi9* multigene family [J]. Theor App Genet, 2012-01-24, DOI: 10. 1007/s00122-012-1787-9
- [64] Fukuoka S, Saka N, Koga H, et al. Loss of function of a proline-containing protein confers durable disease resistance in rice[J]. Science, 2009, 325: 998-1001
- [65] Huang H, Huang L, Feng G, et al. Molecular mapping of the new blast resistance genes *Pi47* and *Pi48* in the durably resistant local rice cultivar Xiangzi 3150 [J]. Phytopathology, 2011, 101(5): 620-626
- [66] Suh J, Roh J, Cho Y, et al. The *Pi40* gene for durable resistance to rice blast and molecular analysis of *Pi40*-advanced backcross breeding lines[J]. Phytopathology, 2009, 99(3): 243-250