

利用基因组编辑技术创制水稻白叶枯病抗性材料

郝巍, 纪志远, 郑凯丽, 孙宏达, 王福军, 唐永超, 张明伟, 赵开军, 王春连

(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:水稻白叶枯病是最重要的水稻细菌性病害, 严重威胁水稻生产和粮食安全。培育和种植抗白叶枯病水稻新品种是控制该病害最经济、有效、环保的技术手段。W6023 是本课题组早期通过普通野生稻与 IR24 杂交创制的抗病基因导入系, 前期转录组测序结果显示, *Pong2-1* (Os02g20780) 和 *Pong11-1* (Os11g14160) 在感病亲本 IR24 中激活表达, 在抗病导入系 W6023 中不表达。*Pong2-1* 和 *Pong11-1* 是水稻中 *Pong* 类转座子最相似的两成员, DNA 同源性超过 90%, 但转录本却存在明显差异。为研究 *Pong2-1* 和 *Pong11-1* 是否与 IR24 的感病性相关, 本研究利用 CRISPR/Cas9 系统定点突变 IR24 的 *Pong2-1* 和 *Pong11-1* 位点, 获得了多个突变株系, 毒力测试结果显示 *Pong2-1* 和 *Pong11-1* 突变后 IR24 的抗性得到一定提高, 创制出 6 个抗白叶枯病水稻材料。

关键词: 水稻; 水稻白叶枯病; 水稻白叶枯病菌; CRISPR/Cas9; 感病基因

Enhancing Rice Resistance to Bacterial Blight by Genome Editing

HAO Wei, JI Zhi-yuan, ZHENG Kai-li, SUN Hong-da, WANG Fu-jun,

TANG Yong-chao, ZHANG Ming-wei, ZHAO Kai-jun, WANG Chun-lian

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

Abstract: Bacterial blight of rice, caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*), is one of the most destructive diseases of rice, which seriously affects the rice production in Asian countries. Deployment of resistance genes in varieties is the most effective, economic and environment-friendly strategy for disease control. Previously, we generated a *Xoo*-resistant introgression line W6023 that derived from a cross between a wild rice accession and susceptible cultivar IR24. The transcriptome analysis detected the expression of two genes *Pong2-1* (Os02g20780) and *Pong11-1* (Os11g14160) in susceptible line IR24, but not in resistant line W6023. Despite of >90% sequence similarity, the genes *Pong2-1* and *Pong11-1* represented different forms of transcripts. To investigate whether these two genes are susceptibility factors to *Xoo*, we knocked out *Pong2-1* and *Pong11-1* in susceptible line IR24 using CRISPR/Cas9 methods and obtained a series of mutant lines. Test for resistance to PX099^A showed enhanced resistance in the double mutant lines, which served as resistant resource potentially being applied in rice breeding.

Key words: rice; bacterial blight; *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*; CRISPR/Cas9; susceptibility factor

水稻白叶枯病菌 (*Xoo*, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) 收录于我国《进境植物检疫性有害生物名录》, 是重要的检疫对象。*Xoo* 从水稻叶片的叶尖或叶缘水孔处侵入, 在细胞间隙增殖, 随后进入维管束

组织并利用维管束在植物体内转移扩散。*Xoo* 在侵染水稻过程中, 通过多种途径将数量众多的毒性因子分泌到胞外或者转运到宿主细胞内, 例如 III 型分泌系统效应蛋白 (T3SS effectors)。这些毒性因子靶

收稿日期: 2018-02-04 修回日期: 2018-02-11 网络出版日期: 2018-04-17

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20180417.1410.034.html>

基金项目: 国家重点研发计划“七大农作物育种” (2017YFD0100100); 国家自然科学基金 (31571640)

第一作者研究方向为水稻抗病基因挖掘, E-mail: haowei0101@foxmail.com。纪志远为共同第一作者

通信作者: 王春连, 研究方向为水稻抗病分子生物学及遗传育种, E-mail: wangchunlian@caas.cn

向多个水稻靶点,通过抑制植物防卫反应或攫取养分,达到利于病原菌增殖和传播的目的。例如,*Xoo* 中类转录激活效应因子 (TALEs, transcription activator-like effectors) 靶向的水稻感病基因主要是 SWEET 糖转运蛋白家族基因 (包括 *OsSWEET11*、*OsSWEET13* 和 *OsSWEET14*)^[1-3]。*Xoo* 引起水稻的白叶枯病 (BB, bacterial blight of rice), 严重威胁到水稻生产和粮食安全。BB 发生时一般会给水稻造成 20%~30% 的减产, 严重情况下可达 50%~60%, 甚至绝产^[4]。

长期的生产实践证明, 培育和利用水稻抗病品种是控制此病害最有效、最经济也是最环保的手段。但是随着病原物的不断进化和生态条件恶化带来的生物多样性减少, 可利用的抗病育种资源愈来愈少。抗病基因挖掘多从已有抗病资源中获得, 如野生稻资源、地方特色品种等, 这些资源应用于育种需要通过不断杂交和回交才能将抗病基因整合到现代水稻品种中, 所需时间长, 且存在遗传累赘等利用困难现象。利用外源基因整合到受体品种基因组中即转基因育种也是一种获得优良性状的手段, 但是外源基因在受体基因组的定点整合问题至今没有解决, 而外源基因在受体基因组的随机插入不仅可能导致外源基因的表达在某些位点受阻, 而且可能导致受体基因组的某些有益基因失活, 因而降低了获得理想转基因个体的效率, 以及目前的转基因植物常常面临生物安全问题等。

基因组编辑技术的问世, 为创制生物资源及育种利用提供了新途径。目前, 基因组编辑技术主要包括锌指核酸酶 (ZFNs, Zinc finger nucleases)、类转录激活效应因子核酸酶 (TALENs, transcription activator-like effector nucleases) 以及 CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) 3 种编辑技术。ZFNs 体系的构建难度较大、成本高, 目前只成功应用于人类干细胞、大鼠、烟草等少数生物体的基因组编辑^[5-7]。在作物改良上, 只有一例利用该技术对玉米性状进行改良的报道^[8]。与 ZFNs 相比, TALENs 载体的构建相对简单、成本也大幅度降低, 此技术迅速被应用起来。例如, 利用该技术对感病水稻效应子结合元件 (EBE, TAL effector binding element) 位点进行突变达到了规避 PthXo1、AvrXa7、Tal5、TalC 等 TALEs 毒力的目的, 使水稻感病品种产生了抗病的效果^[9-11]。继 TALENs 技术后, 国际上又出现了基因组定点编辑的 CRISPR/Cas9 技术, 该技术凭借着成本低廉、操作方便、效率

高等优点, 被迅速应用于人类、动物和植物等的基因组编辑^[12-13]。例如, F. Wang 等^[14] 针对稻瘟病负调控基因进行定点编辑, 获得了稻瘟病抗性明显提高的水稻材料。M. Li 等^[15] 对水稻产量相关基因进行定点修饰, 发现每穗实粒数、粒长都明显增加。Y. Wang 等^[16] 对水稻基因 *DEP1* 进行定点突变, 突变后使水稻材料植株变矮, 籽粒密度、产量增加。Y. Zhang 等^[17] 对小麦 3 个负调控同源基因 *TaEDR1* 进行定点编辑, 提高了小麦对白粉病的抗性。J. Shi 等^[18] 对玉米一个乙烯响应的负调控因子 *ARGOS8* 进行编辑, 在干旱条件下, 突变体的抗旱性显著高于野生型。J. Li 等^[19] 对水稻 *OsEPSPS* 基因定点替换, 获得的突变体对草甘膦具有抗性。目前, CRISPR/Cas9 技术在农作物的各种性状改良上得到了广泛的应用^[20]。

本课题组前期对病原菌诱导下的 IR24 和野生稻基因导入系 W6023 进行了转录组测序分析^[21], 比较基因表达的差异, 发现一个在 W6023 中几乎不表达而在感病供体 IR24 中高表达的基因 *Os02g20780* 和 *Os11g14160*, 推测这 2 个基因可能与感病相关。本研究旨在利用 CRISPR/Cas9 技术对 IR24 开展定点突变, 检测定点编辑后的水稻材料是否产生抗病性。这一研究将对探讨水稻白叶枯病感病机理提供依据, 也为水稻育种提供新的抗病资源。

1 材料与方法

1.1 供试水稻材料

本研究使用的水稻材料: 水稻白叶枯病广谱感病品种 IR24, 野生稻基因导入系 W6023^[21], IR24 的编辑植株。所有材料于 2015 年 12 月至 2017 年 10 月分别种植在海南三亚市南滨农场中国农业科学院作物科学研究所南繁基地和中国农业科学院作物科学研究所网室 (北京), 常规水肥管理。

1.2 供试菌株与接种方式

水稻白叶枯病菌代表菌株 PXO99^A 接种前从 -80 °C 冰箱取出, 在 PPS 培养基 28 °C 培养 48 h^[22], 以无菌水配制接种菌液, 浓度调至 OD₆₀₀ = 1.0。幼苗期水稻材料 (5~6 叶) 采用注射方法接种, 收集样品、提取 RNA 用于基因表达分析。用于表型鉴定分析的水稻材料在成株期采用人工剪叶接种法^[23] 接种鉴定, 分别在接种后 7 d、15 d 进行调查。

1.3 水稻 DNA 提取

采用 S. R. McCouch 等^[24] 报道的酚/氯仿抽提

法提取水稻基因组 DNA。

1.4 水稻 RNA 提取及反转录

水稻材料总 RNA 的提取采用 Trizol 法 (Invitrogen)。取适量 RNA 用 DNase I (2270A, 购自宝生物工程(大连)有限公司) 消化残留的 DNA 后, 使用 RNA 纯化试剂盒 (DP412, 购自天根生化科技(北京)有限公司) 纯化。取 2 μ g 总 RNA 使用反转录试剂盒 (KR106, 购自天根生化科技(北京)有限公司) 合成 cDNA。

1.5 基因克隆

根据日本晴基因组信息设计 *Pong2-1*、*Pong11-1* 克隆引物分别为 *Pong2-1F*: ATGAATCCGACGGAATCGAAGAAGCGTC; *Pong2-1R*: TCAATTATCTTAGCAAACAAAGCCAAT 和 *Pong11-1F*: ATGAATCTGACGGAATCGAAGATGCGTC; *Pong11-1R*: CTATAGTATTGAACCTTCTCTAAGATCA。PCR 反应体系为 20 μ L: 2 \times PCR Master Mix 10 μ L、正反向引物各 1 μ L、cDNA 模板 1 μ L (35 ng)、Nuclease-Free 水补齐到 20 μ L。反应程序为: 95 $^{\circ}$ C 30 s, 95 $^{\circ}$ C 10 s, 52 $^{\circ}$ C 20 s, 72 $^{\circ}$ C 60 s, 40 个循环。基因克隆及载体构建时采用高保真 KOD FX 酶 (Toyobo, 日本) 并测序, 转基因植株阳性检测及基因剪切分析等用普通 Taq 酶扩增。

1.6 水稻突变体的构建和检测

本研究构建 IR24 *Pong* 转座子突变体时, 采用华南农业大学刘耀光实验室提供的 pYLCRISPR/Cas9Pubi-H 载体, 首先将接头引物 (靶点 1F: GGCACCGGCAGCCTGATTGGATT; 靶点 1R: AAACAATCCAATCAGGCTGCCGG; 靶点 2F: GCCGTGCGCTCCACACAACACTAG; 靶点 2R: AAACCTAGTGTGTGGGAGCCGA) 94 $^{\circ}$ C 加热 30 s, 室温自然冷却退火, 然后与对应的 sgRNA 载体连接, 将含有不同靶位点的 sgRNA 通过 PCR 扩增形成含有多个靶位点的 gRNA 表达盒, 详细步骤参见 X. Ma 等^[25]。本试验采用农杆菌介导的水稻遗传转化技术^[26]。

1.7 亚细胞定位

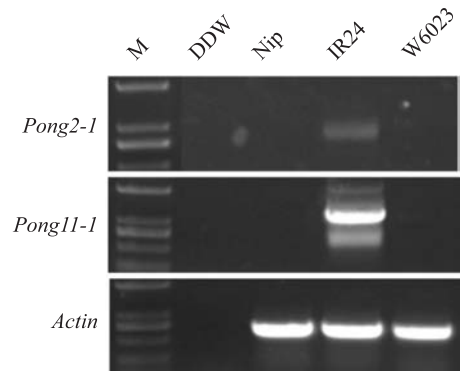
用特异引物扩增基因编码序列, 克隆到 pCAMBIA1205-YFP 上, 电击转入农杆菌 EHA105 中。30 $^{\circ}$ C 培养箱中过夜培养菌液, 4000 r/m 离心收集菌体, 缓冲液重悬菌体浓度调节到 OD₆₀₀ = 1.0, 室温静置 3 h。采用 1 mL 注射器吸取菌液, 注射本氏烟叶片后, 人工气候室培养 2~3 d。将注入菌液部分的叶片用手轻轻撕下, 用荧光染料 DAPI (特异性细胞核染色试剂) 对本氏烟叶片进行染色处理。使用

LSM 7000 激光共聚焦扫描显微镜 (蔡司) 观察蛋白在细胞中表达的位置。

2 结果与分析

2.1 *Pong2-1*、*Pong11-1* 的转录表达分析

W6023 经过多轮回交后在遗传背景上与 IR24 很接近, 为了探究 W6023 与 IR24 水稻白叶枯病抗性差异原因, 本实验室前期通过 RNA-Seq 分析了在 PX099^A 诱导情况下的两个材料转录组之间的差异。结果显示, *Pong* 类转座子成员 Os02g20780 (*Pong2-1*) 和 Os11g14160 (*Pong11-1*) 在 IR24 中均有表达, 但是在 W6023 中几乎没有表达。为了验证转录组测序的结果, 本研究通过 RT-PCR 检测了 *Pong2-1* 和 *Pong11-1* 的表达情况, 结果表明 RT-PCR 和 RNA-Seq 分析结果一致 (图 1)。



M: 分子量标记; DDW: 双蒸水; Nip: 日本晴
M: DNA ladder, DDW: ddH₂O control, Nip: Nipponbare

图 1 *Pong2-1* 和 *Pong11-1* 全长 cDNA 的克隆

Fig. 1 Isolation of full-length coding sequences of genes *Pong2-1* and *Pong11-1*

依据日本晴基因组信息, 水稻携带有超过 100 个 *Pong* 类转座子成员。在 DNA 水平上 *Pong2-1* 和 *Pong11-1* 是最接近的两个成员, 序列同源性超过 90% (结果未显示)。由于 *Pong2-1* 和 *Pong11-1* 间存在单核苷酸多态性, 基因组预测 *Pong2-1* 和 *Pong11-1* 的 RNA 剪接形式存在差异 (<http://rice.plantbiology.msu.edu/>)。为了明确这两个 *Pong* 类转座子成员转录本的真实情况, 尝试克隆日本晴、IR24 和 W6023 的 *Pong2-1* 与 *Pong11-1* 的 cDNA 并测序 (图 1), 结果显示 *Pong2-1*、*Pong11-1* 在日本晴和 W6023 中均未检测到有表达, 但在 IR24 中有表达并表现为不同的两种剪接体形式。

2.2 *Pong11-1* 的序列分析与亚细胞定位

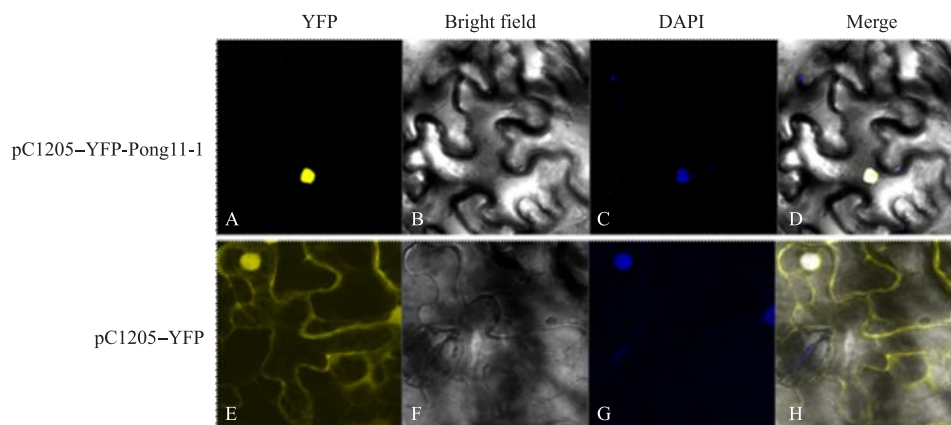
克隆得到 *Pong2-1*、*Pong11-1* 全长 cDNA 后, 测

序分析发现 *Pong2-1* 编码 190 个氨基酸, *Pong11-1* 则编码一个 398 个氨基酸的蛋白。二者与日本晴的序列也存在一定差异, 差异的原因是 SNP 导致两种剪接体形式不同。为了研究 Pong 类转座子蛋白在细胞中的定位, 选取 *Pong11-1* 作为研究对象。克隆 *Pong11-1* 全长 cDNA, 连接到 pCambia1205-YFP 载体后转化农杆菌 GV3101。通过注射烟草, 利用农杆菌瞬时表达系统, 激光共聚焦显微镜观察到融合蛋白在细胞中的位置, 如图 2A ~ D 显示 YFP-Pong11-1 在本氏烟叶片表皮细胞的细胞核中表达。H 为空载体 YFP 的定位结果, 其表达分布在整个下表皮细胞

(图 2E ~ G)。通过烟草瞬时表达系统表明 *Pong11-1* 编码一个核蛋白。

2.3 基因编辑载体构建及遗传转化

由于发现 *Pong2-1*、*Pong11-1* 仅在 IR24 中表达, 为了验证其表达是否对水稻感病起作用, 利用 CRISPR/Cas9 系统对 IR24 中的 *Pong2-1*、*Pong11-1* 进行定点突变。由于 *Pong2-1*、*Pong11-1* DNA 同源性高, 设计了针对这两个基因的共同 gDNA (图 3), 选择了 2 个靶位点 (图 3A)。参照 X. Ma 等^[25]的方法构建含有双靶位点的 CRISPR 表达载体 pCponT12 (图 3B)。



A ~ D: YFP 与 *Pong11-1* 融合蛋白在本氏烟叶片细胞中的亚细胞定位; E ~ H: YFP 蛋白 (对照) 在本氏烟叶片细胞中的亚细胞定位;

A, E 为 YFP 荧光图像; B, F 为明场图像; C, G 为 DAPI 染色图像; D, H 为叠加图像

A-D: Subcellular localization of YFP:*Pong11-1* fusion protein in *N. benthamiana* Domin leaf cells, E-H: Subcellular localization of YFP protein (positive control) in *N. benthamiana* Domin leaf cells, A and E for YFP fluorescence image, B and F for bright field image, C and G for DAPI stained image, D and H for merged image

图 2 *Pong11-1* 在本氏烟叶片细胞中的亚细胞定位

Fig. 2 Subcellular localization of *Pong11-1*:YFP fusion protein in *Nicotiana benthamiana* Domin

A

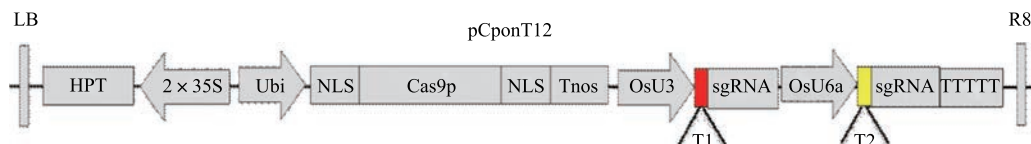
Pong2-1 (1-54) ATGAATCCGACGGAATCGAAGAA GCGTCGATCCAAATCCAATCAGGCTGCCGGT

Pong11-1 (1-54) ATGAATCTGACGGAATCGAAGAT GCGTCGATCCAAATCCAATCAGGCTGCCGGT

Pong2-1 (55-108) GAAACCGACCGCCCTTGATCCAGATGCCGCTAGTGTTGTGGGAGCCGAT GGTGCT

Pong11-1 (55-108) GAAATCGACTGCCCTTGATCCAGATGCCGCTAGTGTTGTGGGAGCCGAC GGTGCT

B



A: sgRNA 在 *Pong2-1* 和 *Pong11-1* 上的结合位点, 下划线指示, PAM 位点序列被加粗;

B: 用于 *Pong2-1* 和 *Pong11-1* 敲除的 pCponT12 载体结构示意图

A: Schematic diagram of the targeted sites (underlined) in *Pong2-1* and *Pong11-1*, The protospacer adjacent motif (PAM) sequences are in bold,

B: Structure of the vector pCponT12 used for *Pong2-1* and *Pong11-1* knock-out

图 3 基因编辑位点与表达载体

Fig. 3 Genome target sites and expression vector

2.4 T₀代转基因植株的 PCR 检测

将上述 CRISPR/Cas9 载体 pCponT12 通过农杆菌介导法转入 IR24 的愈伤组织中,经筛选分化获得 20 个 T₀代植株,种植于海南试验基地。为了验证其是否为真正的转基因植株,根据 Cas9 基因 DNA 的序列,设计了一对基因特异引物 Cas9pF/Cas9pR (Cas9pF:TTCCAGCAGTCCAAGAACCG,Cas9pR:CTTGACCTTGGTGAGCTCGT),对上述 20 株的 DNA 进行 PCR 扩增。20 株转化体都能扩增出 531 bp 的 DNA 特异性条带,而阴性对照 IR24 无扩增条带(图 4)。结果表明 20 株转基因植株全部为阳性植株。

2.5 编辑植株的基因型鉴定及抗性检测

随机选取部分 T₁代进行 *Pong2-1*、*Pong11-1* 位

点基因型鉴定,测序结果显示,在 5 个 T₁代群体中,检测到在 *Pong2-1*、*Pong11-1* 位点发生编辑突变的植株,而且都是双靶点突变,大部分植株的突变位点基因型已纯合,5 个群体中共检测到 6 种编辑类型如图 5。对这 6 种编辑类型的植株进行了白叶枯病抗性测定,选取的测试菌株为 PXO99^A。接种 15d 后调查,每个编辑类型选取 5 株,每株选取 3 个叶片,进行调查统计。6 种编辑类型植株病斑平均长度在 6.94~8.71 cm 之间,而 IR24 发病长度为 14.85 cm (图 6)。结果表明 *Pong2-1*、*Pong11-1* 编辑植株对水稻白叶枯病菌 (PXO99^A) 表现出一定程度的抗性增强。



图 4 T₀代转基因植株分子检测

Fig. 4 PCR amplification of transgenic inserts in T₀ transgenic plants

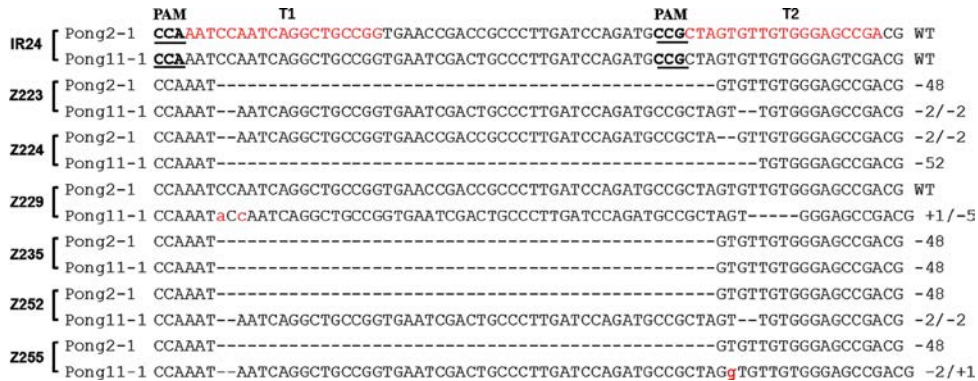


图 5 *Pong2-1*/*Pong11-1* 突变体序列分析

Fig. 5 Sequences of *Pong2-1* and *Pong11-1* mutants in T₁ transgenic lines

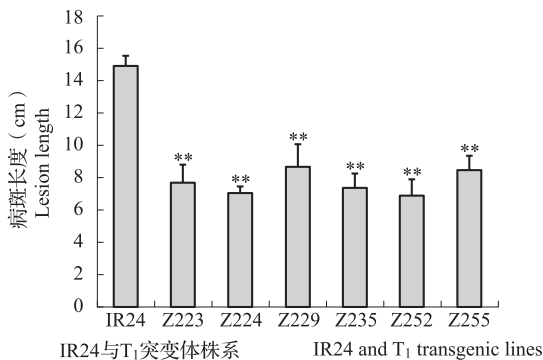
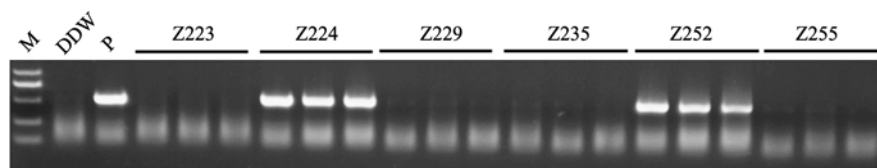
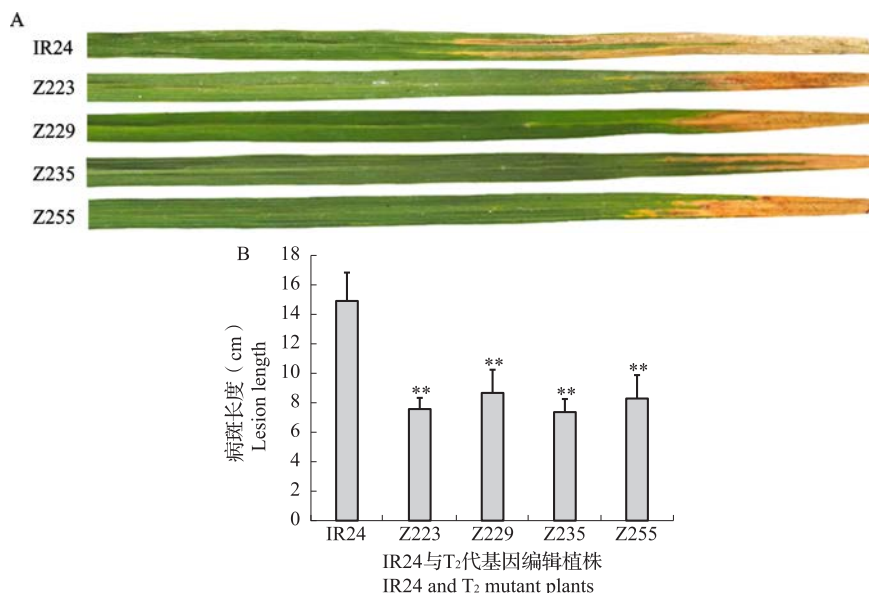


图 6 *Pong2-1*/*Pong11-1* 突变体的抗性表现

Fig. 6 Lesion length caused by PXO99^A in *Pong2-1*/*Pong11-1* mutant lines

2.6 Cas9-free 编辑植株的获得与农艺性状考察

为了获取可利用的 Cas9-free 水稻抗性资源,利用 *Cas9* 基因特异引物 Cas9pF/Cas9pR 检测 6 种编辑类型的 T₂代单株,从中选取 PCR 检测阴性植株作为后续试验研究材料(图 7)。田间再次接种试验显示接种 7 d 后,IR24 平均发病长度为 2.81 cm,而 Z223、Z229、Z235 和 Z255 平均发病长度分别为 0.67 cm、0.88 cm、0.69 cm 和 0.75 cm。接种 15 d 后病斑有扩展,IR24 发病长度为 15 cm,而 Z223、Z229、Z235 和 Z255 平均发病长度分别为 7.51 cm、8.69 cm、7.34 cm 和 8.31 cm (图 8A、B),可见编辑植株病斑长度仍显著小于 IR24 的病斑长度。

图7 T₂代转基因植株 *Cas9* 基因检测Fig. 7 PCR amplification of *Cas9* vector fragment in T₂ transgenic plantsA: T₂代基因编辑植株与 IR24 病斑对比图; B: T₂代基因编辑植株与 IR24 病斑长度统计直方图A: T₂ mutant plants and IR24 exhibited different lesion lengths,B: Histogram of lesion length of T₂ homozygous mutant plants compared with IR24图8 4个 T₂纯合突变株系的抗病反应Fig. 8 Test for disease resistance in transgenic T₂ lines upon inoculation of *Xoo* strain PXO99^A

为了研究编辑植株主要农艺性状是否发生改变,对上述4个 *Cas9*-free T₂纯合株系的主要农艺性状进行了考察。从表1可看出,4个材料的株高、分蘖数、结实率和千粒重与野生型对照 (IR24) 基本一致;4个材料的 *T* 检验分析结果显示上述农艺性状与野生型对照无显著性差异。基因被编辑后对水稻的主要农艺性状无显著影响,最终本研究获得了白叶枯病抗性提高、*Cas9*-free 及农艺性状基本一致的种质材料。

3 讨论

植物——病原物之间的斗争是寄主与病原菌协调进化的过程,植物病原物为自身的生存和发展会利用多种手段侵入寄主并攫取养分,造成植物病害的发生,而寄主植物主要利用自身的先天免疫系统 (innate immunity) 应对不断变化的病原菌。植物的先天免疫系统可以分为两个层次,PTI (PAMP-triggered immunity) 和 ETI (effector-triggered immunity)。PTI 主要是植物模式识别受体 (PRRs, pattern recog-

表1 4个 T₂突变材料的农艺性状分析Table 1 Statistics of agronomic traits in homozygous transgenic T₂ lines

株系 Lines	株高 (cm) Plant height	分蘖数 Tiller number	结实率 (%) Seed setting rate	千粒重 (g) Thousand grain weight
IR24	87.8 ± 3.44 ^a	10.40 ± 3.76 ^a	80.91 ± 5.90 ^a	24.60 ± 1.35 ^a
Z223	87.8 ± 3.16 ^a	12.50 ± 1.20 ^a	83.37 ± 3.46 ^a	24.86 ± 0.41 ^a
Z229	88.7 ± 4.15 ^a	11.10 ± 2.59 ^a	82.55 ± 5.18 ^a	25.30 ± 0.45 ^a
Z235	89.1 ± 3.94 ^a	9.60 ± 2.00 ^a	81.45 ± 4.96 ^a	24.94 ± 0.65 ^a
Z255	86.1 ± 4.08 ^a	12.50 ± 1.4 ^a	82.31 ± 3.04 ^a	25.24 ± 0.79 ^a

结果表示为平均值 ± 标准误差,统计于每个突变株系的5个单株。标有相同字母^a的值之间无显著差异 ($P < 0.05$, *T* 检验)

Results were shown from five mutant plants of each mutant line and were represented as mean ± SE. Values marked with same letter a are non-significantly different ($P < 0.05$, Student's *t*-test)

nition receptors) 识别某些保守的病原物模式分子 (PAMPs, pathogen associated molecular patterns), 例

如 FLS 可以识别细菌鞭毛蛋白的保守短肽^[27],诱导防卫反应产生,限制病原物的入侵。为成功感染寄主,植物病原物会利用各种效应分子来抑制 PTI,例如 *Xoo* 来源的 T3SS 效应分子 XopY 通过抑制 OsCERK1 对 OsRLCK185 的磷酸化阻止了 PTI 的信号转导^[28]。同时寄主植物也会进化出 *R* 基因监控、识别病原菌某些效应蛋白,一旦被识别即会触发强烈的免疫反应 ETI (effector-triggered immunity),例如 *Xa23* 基因通过启动子 EBE 区识别 *Xoo* 的 TALE AvrXa23 蛋白^[29],作物抗病育种利用的也大多是这类 *R* 基因,植物——病原物互作的特点决定了植物抗病育种是一项没有终点的工作。

现阶段挖掘得到的和已被利用的白叶枯病抗病基因有很多,例如 *Xa3*、*Xa4*、*xa5*、*Xa21* 和 *Xa23* 等,但由于 *R* 基因的不合理使用和病原菌的高速进化,一些优秀抗病基因在生产上逐步丧失作用。粳稻大多利用的 *Xa3* 基因,在孟加拉、印度、尼泊尔、印度尼西亚、韩国及中国的南方等地区,含有 *Xa3* 基因的品种遭到病原菌的危害^[30-31]。章琦^[32]研究表明,大面积种植的籼型杂交稻中主要应用了抗白叶枯病基因为 *Xa4*,曾使白叶枯病得到了有效的控制。但到 20 世纪 80 年代中期,在中国南方各稻区及印度、印度尼西亚、韩国、尼泊尔等国也相继发生了携带 *Xa4* 基因的品种抗性逐渐丧失的报道。*Xa21* 基因自鉴定克隆以来,由于各国争相利用在一些国家和地区如韩国、印度尼西亚、印度、中国的广东、云南等地发现能使携带 *Xa21* 基因的宿主致病的菌系^[33-37]。夏立琼等^[38]发现的海南 *Xoo* 菌株优势致病类型对携带 *xa5*、*Xa23* 基因以外的材料都致病。因此育种家对水稻白叶枯病抗性资源的需求越来越迫切,挖掘和创制新抗病资源依旧是水稻白叶枯病防治工作重要的方面。基因组编辑技术的问世为创制基因资源提供了新途径,尤其是 CRISPR/Cas9 系统具有简单、高效、低成本的特点,在人类、动物和植物上得到了广泛的应用。例如,用该技术对水稻、小麦、玉米、柑橘等某些负调控基因进行了基因编辑,这些性状在不同程度上得到了改良,获得了抗病、抗逆性材料^[16-18,20,39]。

为了充分利用 W6023 这一抗病资源和研究其抗病特征,前期研究采用强致病菌 PXO99^A 接种处理 IR24 和 W6023 后,对不同时间点的样品进行转录组测序,分析在不同致病表型下 IR24 和 W6023 材料表达差异。RNA-Seq 发现 Pong 类转座子在感病品种 IR24 中激活表达,但在野生稻导入系 W6023 中不表达。有研究发现玉米 Pong 类转座

子在体外培养或者某种压力下会被激活表达,并且被认为对玉米基因组的进化起到贡献^[40]。我们推测 Pong 类转座子可能与 IR24 的感病性有关联,IR24 是对多种病原物均感病,包括水稻白叶枯病菌、水稻细菌性条斑病菌和水稻稻瘟病菌;与野生稻 03-66 杂交后,导入系 W6023 抗性明显增强,Pong 类转座子的两个成员也不再表达,暗示病原菌胁迫解除后该类转座子转录被抑制,W6023 基因组趋于稳定。由于 *Pong2-1* 和 *Pong11-1* 在 IR24 中高表达,本研究采用 CRISPR/Cas9 技术对 IR24 的 *Pong2-1* 和 *Pong11-1* 进行了敲除,获得了多个纯合株系,田间接种试验显示基因编辑株系的抗性得到不同程度的提高,编辑后的主要农艺性状无显著影响,最终获得了白叶枯病抗性提高、Cas9-free 及农艺性状基本一致的种质材料。但 IR24 抗病性差是否与基因组稳定性有联系,Pong 转座子的表达是否增加了 IR24 的感病性,还需开展更深入的研究。

参考文献

- [1] Yang B, Sugio A, White F F. *Os8N3* is a host disease-susceptibility gene for bacterial blight of rice [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 10503-10508
- [2] Zhou J, Peng Z, Long J, et al. Gene targeting by the TAL effector PthXo2 reveals cryptic resistance gene for bacterial blight of rice [J]. *Plant J*, 2015, 82: 632-643
- [3] Antony G, Zhou J, Huang S, et al. Rice *xa13* recessive resistance to bacterial blight is defeated by induction of the disease susceptibility gene *Os11N3* [J]. *Plant Cell*, 2010, 22: 3864-3876
- [4] Mew T. Current status and future prospects of research on bacterial blight of rice [J]. *Annu Rev Phytopathol*, 1987, 25(1): 359-382
- [5] Hockemeyer D, Soldner F, Beard C, et al. Efficient targeting of expressed and silent genes in human ESCs and iPSCs using zinc-finger nucleases [J]. *Nat Biotechnol*, 2009, 27(9): 851-857
- [6] Remy S, Tesson L, Menoret S, et al. Zinc-finger nucleases: A powerful tool for genetic engineering of animals [J]. *Transgenic Res*, 2010, 19(3): 363-371
- [7] Cai C Q, Doyon Y, Ainley W M, et al. Targeted transgene integration in plant cells using designed zinc finger nucleases [J]. *Plant Mol Biol*, 2009, 69(6): 699-709
- [8] Shukla V K, Doyon Y, Miller J C, et al. Precise genome modification in the crop species *Zea mays* using zinc-finger nucleases [J]. *Nature*, 2009, 459(7245): 437-441
- [9] Li T, Liu B, Spalding M H, et al. High-efficiency TALEN-based gene editing produces disease-resistant rice [J]. *Nat Biotechnol*, 2012, 30(5): 390-392
- [10] Streubel J, Pesce C, Hutin M, et al. Five phylogenetically close rice *SWEET* genes confer TAL effector-mediated susceptibility to *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae* [J]. *New Phytol*, 2013, 200: 808-819
- [11] Blanvillain-Baufume S, Reschke M, Sole M, et al. Targeted promoter editing for rice resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* reveals differential activities for SWEET14-inducing TAL effectors [J]. *Plant Biotechnol J*, 2017, 15(3): 306-317
- [12] Hsu P D, Lander E S, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering [J]. *Cell*, 2014, 157(6): 1262-1278
- [13] Belhaj K, Chaparro-Garcia A, Kamoun S, et al. Editing plant ge-

- nomes with CRISPR/Cas9[J]. Curr Opin Biotech, 2015, 32:76-84
- [14] Wang F, Wang C, Liu P, et al. Enhanced Rice Blast Resistance by CRISPR/Cas9-Targeted Mutagenesis of the ERF Transcription Factor Gene *OsERF922* [J]. PLoS ONE, 2016; 11(4): e0154027. doi:10.1371/journal.pone.0154027
- [15] Li M, Li X, Zhou Z, et al. Reassessment of the four yield-related genes *Gn1a*, *DEP1*, *GS3*, and *IPA1* in rice using a CRISPR/Cas9 system [J]. Front Plant Sci, 2016, 7: 377. doi: 10.3389/fpls.2016.00377.
- [16] Wang Y, Geng L, Yuan M, et al. Deletion of a target gene in *Indica* rice via CRISPR/Cas9 [J]. Plant Cell Rep, 2017, 36(8): 1333-1343
- [17] Zhang Y, Bai Y, Wu G, et al. Simultaneous modification of three homologs of *TaEDR1* by genome editing enhances powdery mildew resistance in wheat [J]. Plant J, 2017, 91, 714-724
- [18] Shi J, Gao H, Wang H, et al. ARGOS8 variants generated by CRISPR-Cas9 improve maize grain yield under field drought stress conditions [J]. Plant Biotechnol J, 2017, 15(2): 207-216
- [19] Li J, Meng X, Zong Y, et al. Gene replacements and insertions in rice by intron targeting using CRISPR-Cas9 [J]. Nat Plants, 2016, 2:16139
- [20] 王福军, 赵开军. 基因组编辑技术应用于作物遗传改良的进展与挑战[J]. 中国农业科学, 2018, 51(1): 1-16
- [21] 张明伟, 徐飞飞, 郝巍, 等. 野生稻基因导入系 W6023 对白叶枯菌的抗谱及转录组差异表达基因分析[J]. 植物遗传资源学报, 2017, 18(2): 290-301
- [22] Wang C, Fan Y, Zheng C, et al. High-resolution genetic mapping of rice bacterial blight resistance gene *Xa23* [J]. Mol Genet Genomics, 2014, 289:745-753
- [23] Kauffman H, Reddy A, Hsieh S, et al. Improved technique for evaluating resistance of rice varieties to *Xanthomonas oryzae* [J]. Plant Disease Reporter, 1973, (57): 537-541
- [24] McCouch S R, Kochert G, Yu Z H, et al. Molecular mapping of rice chromosome [J]. Theor Appl Genet, 1988, 76:815-829
- [25] Ma X, Zhang Q, Zhu Q, et al. A robust CRISPR/Cas9 system for convenient, high-efficiency multiplex genome editing in monocot and dicot plants [J]. Mol Plant, 2015, 8:1274-1284
- [26] Lin Y J, Zhang Q. Optimising the tissue culture conditions for high efficiency transformation of indica rice [J]. Plant Cell Rep, 2005, 23:540-547
- [27] Zipfel C, Robatzek S, Navarro L, et al. Bacterial disease resistance in *Arabidopsis* through flagellin perception [J]. Nature, 2004, 428, 764-767
- [28] Yamaguchi K, Yamada K, Ishikawa K, et al. A receptor-like cytoplasmic kinase targeted by a plant pathogen effector is directly phosphorylated by the chitin receptor and mediates rice immunity [J]. Cell Host Microbe, 2013, 13(3): 347-357
- [29] Wang C, Zhang X, Fan Y, et al. XA23 is an executor R protein and confers broad-spectrum disease resistance in rice [J]. Mol Plant, 2015, 8:290-302
- [30] Noda T, Yamamoto T, Ogawa T, et al. Pathogenic races of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in South and East Asia [J]. Jircas Journal for Scientific Papers, 1996(3): 9-15
- [31] Jeung J U, Heu S G, Shin M S, et al. Dynamics of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* populations in Korea and their relationship to known bacterial blight resistance genes [J]. Phytopathology, 2006, 96(8): 867-875
- [32] 章琦. 中国杂交水稻白叶枯病抗性的遗传改良[J]. 中国水稻科学, 2009, 23(2): 111-119
- [33] Lee S W, Choi S H, Han S S, et al. Distribution of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* strains virulent to *Xa21* in Korea [J]. Phytopathology, 1999, 89:928-933
- [34] Marella L S, George M L C, Vera Cruz C M, et al. Identification of resistance genes effective against rice bacterial blight pathogen in Eastern India [J]. Plant Dis, 2001, 85(5): 506-512
- [35] Muralidharan K, Khush G S, Krishnaveni D, et al. Field performance of genotypes by molecular assisted breeding to bacterial blight in India [J]. Rice Genetics Newsletter, 2004, 21: 29-31
- [36] 曾列先, 朱小源, 杨建源, 等. 广东水稻白叶枯病菌新致病型的发现及致病性测定[J]. 广东农业科学, 2005, 29(2): 58-59
- [37] 姬广海, 张世光, 钱君. 云南水稻白叶枯病菌生理小种初析[J]. 植物保护, 2003, 29(1): 19-21
- [38] 夏立琼, 李明容, 谢仕猛, 等. 海南水稻白叶枯病菌优势生理小种的分离及致病力分析[J]. 分子植物育种, 2016, 14(5): 1336-1340
- [39] Jia H, Zhang Y, Orbovic V, et al. Genome editing of the disease susceptibility gene *CsLOB1* in citrus confers resistance to citrus canker [J]. Plant Biotechnol J, 2017, 15(7): 817-823
- [40] Barret P, Brinkman M, Beckert M. A sequence related to rice *Pong* transposable element displays transcriptional activation by in vitro culture and reveals somaclonal variations in maize [J]. Genome, 2006, 49(11): 1399-1407

(上接第 522 页)

参考文献

- [1] Jacob S R, Tyagi V, Agrawal A, et al. Indian plant germplasm on the global platter: an analysis [J]. PLoS ONE, 2015, 10(5): e0126634
- [2] 沈镡, 李锡香, 冯兰香, 等. 葫芦科蔬菜种质资源对南方根结线虫的抗性评价 [J]. 植物遗传资源学报, 2007, 8(3): 340-342
- [3] 司海平. 农作物种质资源调查信息系统研究 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2011
- [4] 李卫芬, 林立飞, 秦荣, 等. 云南蔬菜地方品种种质资源初步探讨 [J]. 西南农业学报, 2010, 23(6): 2133-2136
- [5] González-Pérez S, Garcés-Claver A, Mallor C, et al. New insights into capsicum spp relatedness and the diversification process of *Capsicum annuum* in Spain [J]. PLoS ONE, 2014, 9(12): e116276
- [6] Lee H Y, Ro N Y, Jeong H J, et al. Genetic diversity and population structure analysis to construct a core collection from a large *Capsicum* germplasm [J]. BMC Genetics, 2016, 17(1): 142
- [7] 郑殿升, 吴伯良. 神农架及三峡地区作物种质资源 [J]. 作物品种资源, 1992(1): 1-3
- [8] 杨敏杰, 龚亚菊, 张丽琴, 等. 云南野生蔬菜资源调查研究 [J]. 西南农业学报, 2004, 17(1): 90-96
- [9] 王艳杰. 滇黔桂民族地区农作物遗传资源农家就地保护与传统文化关系的研究 [D]. 北京: 中央民族大学, 2015
- [10] 李鸿雁, 李俊, 黄帆, 等. 内蒙古 78 份葱属野生种表型遗传多样性分析 [J]. 植物遗传资源学报, 2017, 18(4): 620-628
- [11] 王晴芳, 徐育海, 何秀娟. 湖北大别山区板栗种质资源调查及利用评价 [J]. 中国南方果树, 2011, 40(3): 44-47
- [12] 王富荣, 何华平, 龚林忠, 等. 湖北地方红肉桃种质资源收集、评价及利用 [J]. 湖北农业科学, 2013, 52(15): 3562-3565
- [13] 张忠慧, 王莉, 黄宏文, 等. 神农架主峰南坡猕猴桃种质资源调查及保护策略 [J]. 长江流域资源与环境, 2002, 11(5): 442-445
- [14] 刘富中, 杜武峰. 神农架及三峡地区蔬菜种质资源概况 [J]. 作物品种资源, 1993(1): 17-19
- [15] 郑殿升, 方涛, 阮仁超, 等. 贵州农业生物资源的多样性 [J]. 植物遗传资源学报, 2017, 18(2): 367-371
- [16] 邵海燕, 于震宇, 朱梦矣, 等. 果蔬功能因子及保健食品的发展 [J]. 中国食物与营养, 2005(5): 20-23
- [17] 王小鹤, 徐立伟. 山药系列饮料的加工工艺研究 [J]. 农业技术与装备, 2011(5): 31-32