

不对称体细胞杂交转移疣粒野生稻 对水稻白叶枯病的抗性

朱永生 陈葆棠 余舜武 张端品* 张雪琴 颜秋生

(华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室, 武汉 430070; 中国水稻研究所, 杭州 310006.

* 联系人, E-mail: dpzhang@mail.hzau.edu.cn)

摘要 疣粒野生稻(*O. meyeriana* (Zoll. et Mor. ex Steud.))对水稻白叶枯病具有高度的抗病性, 为转移这种抗病性, 进行了栽培稻+疣粒野生稻不对称体细胞杂交. 以软 X 射线处理过的疣粒野生稻原生质体作供体, 来源于栽培稻品种 02428 的原生质体经碘乙酰胺(IOA)失活后作受体, 采用 PEG 法诱导二者的原生质体融合. 由于代谢功能互补, 融合物经培养后得到 623 块愈伤组织, 最终分化出 72 株再生植株. 这些融合植株形态上与栽培稻接近, 采用微卫星分子标记进行了杂种鉴定. 细胞学分析表明, 融合杂种根尖细胞染色体数目在 27~38 条之间变化. 在成株期对融合植株进行了白叶枯病接种鉴定, 结果显示疣粒野生稻对水稻白叶枯病的抗性成功地转移到栽培稻中.

关键词 体细胞杂交 栽培稻 疣粒野生稻 水稻白叶枯病

在作物遗传改良进程中, 育种工作者常常需要整合不同作物的基因组来增加可遗传的变异, 体细胞杂交为解决这个问题提供了一种有效的方式. 应用该技术可以克服有性杂交不亲和的障碍, 从而促进异源种间遗传物质导入到目标植物中. 其中不对称体细胞杂交已发展为可以转移整条染色体或特定的基因, 产生体细胞核杂种或胞质杂种, 在植物的一些种中已有报道^[1~3]. 水稻(*Oryza sativa* L.)是世界最重要的粮食作物之一, 为了创造新的水稻种质资源, 在极广泛的范围内进行了与之相关的体细胞杂交. 栽培稻与野生稻, 如药用野生稻(*O. officinalis*)、紧穗野生稻(*O. eichingeri*)、短花药野生稻(*O. brachyantha*)、斑点野生稻(*O. punctata*)及*O. perrieri*等进行体细胞杂交, 已经得到种间体细胞杂种^[4~6]; 栽培稻与一些植物的体细胞杂交业已获得属间杂种, 如稗草(*Echinochloa oryzicola* Vasing)、大黍(*Panicum maximum*)、大麦(*Hordeum vulgare* L.)、菰茭白(*Zizania latifolia*)和*Porteresia coarctata*^[7~11].

野生稻是抗病、抗虫和耐盐等一系列有利基因的种质资源库, 由于不同类型基因组间的有性杂交后代高度不育, 限制了野生稻的有利基因向栽培稻的转移^[12]. 白叶枯病是水稻最严重的病害之一, 疣粒野生稻(*O. meyeriana* (Zoll. et Mor. ex Steud.))则对它具有高度抗病性^[12]. 在疣粒野生稻中, 已经克隆了 6 类NBS-LRR抗病基因类似物, 它们与已克隆的抗病基因在氨基酸序

列上具有极低的一致性^[13]. 疣粒野生稻在稻属中隶属于GG基因组, 与AA基因组中的栽培稻亲缘关系极远^[14], 以致很难克服二者之间有性杂交不亲和的障碍. 为了向栽培稻转移疣粒野生稻对水稻白叶枯病的抗性, 在这 2 个种之间进行了不对称体细胞杂交. 本研究获得了栽培稻+疣粒野生稻种间体细胞杂种, 在形态学、细胞学和DNA水平对杂种植株进行了分析, 并对它们进行了水稻白叶枯病接种鉴定.

1 材料与方法

() 植物材料和细胞悬浮培养物. 粳稻 02428 来源于中国水稻研究所, 疣粒野生稻由云南省农业科学院馈赠. 未成熟种子消毒后接种于含 2 mg/L 2,4-D和 0.7%琼脂粉的MS培养基上诱导愈伤组织, 选择脆性较好的胚性愈伤接种于液体AA培养基, 100 r/min振荡培养, 每星期继代 1 次^[15].

() 原生质体的分离、失活、融合和植株再生. 愈伤组织悬浮培养 4 个月左右, 收集悬浮培养物加入酶液, 分离原生质体, 酶液的组成为: 2%(质量体积比)纤维素酶Cellulase Onozuka RS(Yakult Biochemicals, 日本), 0.1%(质量体积比)果胶酶Pectolyase Y-23 (Kikkoman Shoyu, 日本), 5 mmol/L 2-N-吗啉代乙烷磺酸(MES), 13%(质量体积比)甘露醇和CPW盐^[16], pH 5.6. 原生质体-酶液混合物在 27 30 r/min振荡 3~4 h, 用孔径为 35 μ m的尼龙网筛过滤. 滤液 500

r/min低速离心 3 min, 收集原生质体, 用CPW13M溶液(13%(质量体积比)甘露醇+CPW盐)漂洗 3 次. 以CPW13M溶液悬浮疣粒野生稻的原生质体, 调节群体密度为 $1 \times 10^6/\text{mL}$, 置于HY-35 软X射线机(湖南)产生的X射线(0.1167 Gy/s)照射, 照射时间分别为 15, 30, 45, 60 和 75 min. 水稻品种 02428 的原生质体在 2.5 mmol/L 的碘乙酰胺(IOA)中 27^[7] 处理 15 min, 然后CPW13M溶液漂洗. 处理过的 2 个原生质体按 1:1(体积比)的比例混合, 用溶液F(140 mmol/L NaCl, 5 mmol/L KCl, 0.75 mmol/L Na_2HPO_4 , 125 mmol/L CaCl_2 , 111 mmol/L 甘露醇, pH 7.0)调整原生质体群体密度至 $2 \times 10^6/\text{mL}$. 然后向原生质体混合物中加入等体积的PEG溶液(溶液F + 40%(质量体积比)PEG, MW 8000, Sigma公司), 进行原生质体融合. 融合 30 min后, 以溶液F将融合液稀释 10 倍, 500 r/min低速离心 5 min收集融合物, CPW13M溶液漂洗 3 次. 融合物 45^[7] 热激 5 min, 冰水冷处理 10 s后, 包埋于含 0.6% 低熔点琼脂糖的KPR培养基中^[17], 包埋原生质体的密度为 $1 \times 10^6/\text{mL}$, 融合物的培养参照颜秋生等人^[18]的方法. 同时将处理后的亲本原生质体按同样操作设置为对照. 融合物培养 7 周后, 再生肉眼可见的细胞团长到直径 2~3 mm大小, 转接到N6 分化培养基中进行分化, 培养基含 1 mg/L BA, 1 mg/L KT, 0.2 mg/L NAA, 3%蔗糖和 0.9%琼脂. 再生植株茎长 2~3 cm时, 转移到生根培养基(1/2MS+0.5 mg/L NAA)促进根的生长.

() 再生植株的鉴定. 所有再生植株移栽到温室中完全成活, 对它们的一些形态特征与 2 个亲本进行了比较. 利用CTAB法从双亲和再生植株的新鲜叶片中抽提总DNA进行微卫星(SSR)标记分析. SSR标记的选择、PCR扩增以及SSR标记分析参照Temnykh等人^[19]的方法进行. 挑选再生植株的新鲜根尖, 置于 2 mmol/L 8-羟基喹啉中 25^[19] 预处理 3 h, 然后在酒精-冰醋酸(3:1)固定液中 4^[19] 固定 24 h. 固定好的根尖置于柠檬酸缓冲液(4 mmol/L柠檬酸, 6 mmol/L柠檬酸钠, pH 4.2)配制的酶液中(1%纤维素酶Cellulase Onozuka RS, 1%果胶酶Pectolyase Y-23)28^[19] 酶解 3 h. 然后将根尖在载玻片上展片, 1%的醋酸洋红染色、观察. 取体细胞杂种植株的花粉细胞, 1%的醋酸洋红染色后评估花粉的育性.

() 体细胞杂种的抗性检测. 选取黄单孢杆菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*)菲律宾小种第 1 和第 3

群的代表菌株PXO61 和 PXO79(国际水稻所馈赠)作为供试菌株, 检测植株对水稻白叶枯病的抗性, 菌株的准备参照Lin 等人^[20]的方法. 选取体细胞杂种和 2 个亲本每个植株上部的 6 片完全展开叶, 采用剪叶法在成株期接种^[21]. 接种后 14 d测量病斑长度, 菌株感染后植株的反应及病级划分同Lin等人^[20]的方法.

2 结果和讨论

2.1 原生质体融合和再生

首先研究了 X 射线照射剂量对疣粒野生稻原生质体细胞分裂的影响. 当照射时间超过 60 min, 即 X 射线照射剂量大于 420 Gy, 处理后的原生质体不能进行持续细胞分裂, 在培养期间也不会有细胞团生成. 2.5 mmol/L IOA 处理栽培稻原生质体 15 min, 培养 5~8 d 后能够完全抑制细胞分裂, 培养 4 周不会出现再生细胞团. 在此基础上, 用 2.5 mmol/L IOA 处理栽培稻原生质体, 420 Gy X 射线照射的疣粒野生稻原生质体, 然后对二者进行 PEG 融合. 由于双亲的代谢功能互补, 融合物培养 4 周后再生了许多细胞团(图 1(a)). 3 次重复试验一共得到 623 块再生愈伤, 最终分化出 72 株再生植株, 并移栽到温室中成活(图 1(b)).

2.2 体细胞杂种分析

体细胞杂种的表型在分蘖能力上与疣粒野生稻相似, 具有较强的分蘖力, 但也有一些性状发生了明显的变化, 如株高和叶片长度介于 2 个亲本之间. 此外, 杂种的颖壳上长出了短芒, 而 2 个亲本则无芒. 在选取的 26 个SSR标记中, 有 18 个标记在双亲之间表现多态性, 用这些多态性标记进行杂种检测, 其中 13 个SSR标记能够在待检测的 72 个植株中扩增出双亲的特定带型, 证明它们都是真杂种. 图 2 所示是其中 1 个SSR标记RM250 扩增的结果. 其余 5 个表现多态性的SSR标记在杂种植株中仅能扩增出一个亲本的带型. 对 24 个体细胞杂种系的根尖细胞染色体计数, 结果表明, 杂种染色体的数目在 27~38 条之间变化, 它们少于栽培稻($2n = 2X = 24$)加疣粒野生稻($2n = 2X = 24$)染色体数目之和(图 3(a)). 在不对称体细胞杂种形成过程中, 染色体消除是一种普遍现象. Melzer和O'Connell^[22]发现在给定剂量的射线照射下, 染色体消除的程度存在变化; Samoylov和Sink^[23]的研究结果显示, 在 100 Gy剂量照射下, 体细胞杂种的愈伤组织中含有 3.1%~25.8%的供体细胞DNA. 本研

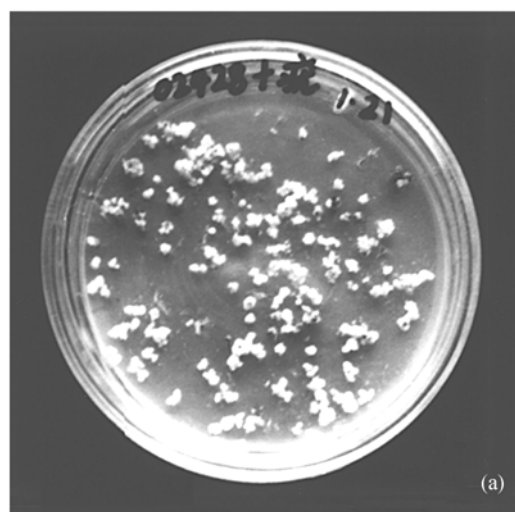


图 1 融合物再生的愈伤组织及体细胞杂种与亲本的比较
(a) 原生质体融合物培养 4 周再生的愈伤组织; (b) 温室中生长的植株
疣粒野生稻(左)、体细胞杂种(中)、栽培稻品种 02428(右)

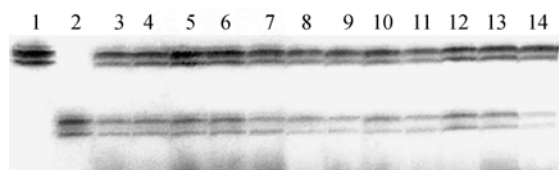


图 2 SSR 标记 RM250 的引物在体细胞杂种及亲本中扩增到的带型

1 示水稻品种 02428; 2 示疣粒野生稻; 3~14 示体细胞杂种

究所用的照射剂量为 420 Gy, 可以清楚地看到在不同杂种细胞中存在 10~21 条染色体的消除, 最终导致 5 个具有多态性的 SSR 标记不能用于杂种鉴定。虽然有 13 个 SSR 标记可以鉴定出杂种, 但它们不能显示出体细胞杂种中各条染色体来源于哪个基因组。在阔叶野生稻(*O. latifolia*)中利用基因组原位杂交(GISH)

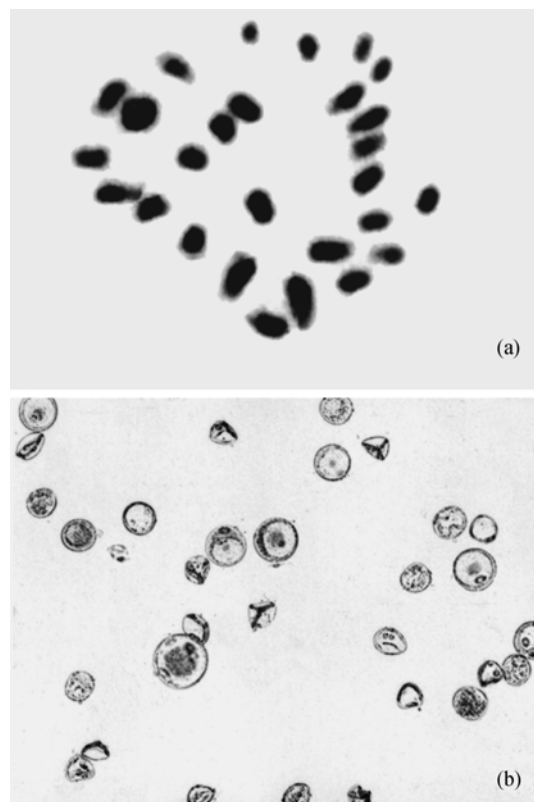


图 3 体细胞杂种的细胞学分析

(a) 栽培稻 + 疣粒野生稻体细胞杂种根尖细胞具有 27 条染色体; (b) 醋酸洋红溶液染色后的体细胞杂种花粉细胞

区分出来源于稻属 DD 基因组的染色体^[24]。利用该技术也可以确认本研究得到的体细胞杂种中的染色体是来源于 GG 基因组还是 AA 基因组。体细胞杂种的花粉细胞用 1% 醋酸洋红溶液染色, 其中大部分不能深染, 表现为败育(图 3(b))。以上的结果可以证明已经成功得获得了栽培稻 + 疣粒野生稻的体细胞杂种。

2.3 水稻白叶枯病抗性鉴定

体细胞杂种系和亲本对接种 2 个菌株后的抗性反应结果列于表 1。在杂种植株中共有 40 个杂种系对接种的菌株表现抗病, 其中 17 个系对 2 个接种的菌株都表现抗病, 这说明在疣粒野生稻中, 控制水稻白叶枯病的抗性基因可能位于基因组的不同染色体上。杂种植株对白叶枯菌株 PXO61 和 PXO79 表现感病则说明疣粒野生稻对白叶枯病的抗性并没有转移到栽培稻中, 可能是由于供体疣粒野生稻细胞经 X 射线照射后, 那些控制抗病基因的染色体区段被消除而产生的结果。体细胞杂种接种后表现中抗或中感的现象, 则说明疣粒野生稻对白叶枯病的抗性还受微效抗性基因的影响, 它们转移到栽培稻中也能提高对水稻

表 1 亲本和体细胞杂种株系对 2 个水稻白叶枯病菌株接种的抗性反应

菌株	接种植株	R ^{a)}		MR		MS		S	
		植株数	病斑长度/cm	植株数	病斑长度/cm	植株数	病斑长度/cm	植株数	病斑长度/cm
PXO61	体细胞杂种系	27	1.25 ± 0.48 ^{b)}	4	4.85 ± 0.95	6	10.05 ± 2.81	35	17.66 ± 2.37
	02428	0	—	0	—	0	—	10	19.14 ± 3.24
	疣粒野生稻	10	0.86 ± 0.51	0	—	0	—	0	—
PXO79	体细胞杂种系	30	0.99 ± 0.46	5	4.36 ± 0.82	4	11.2 ± 2.26	33	17.49 ± 2.84
	02428	0	—	0	—	0	—	10	21.39 ± 4.19
	疣粒野生稻	10	0.72 ± 0.44	0	—	0	—	0	—

a) R 示抗病; MR 示中抗; MS 示中感; S 示感病. b) 平均值±标准误差

白叶枯病的抗性. 同时, 接种鉴定结果也表明疣粒野生稻对白叶枯病的抗性被成功地转移到一些杂种系中.

虽然已经进行了许多与水稻有关的体细胞杂交的试验, 但获得携带有用新目标性状的体细胞杂种极少^[10,11], Gedermann-Knoerck 等人^[25]在 30 个不对称体细胞杂种中也只得到了一个具有供体抗病性的胞质杂种. 本研究得到的 40 个抗病体细胞杂种系中并没有发现高度不对称杂种, 并且它们都表现为不育. 为了向后代遗传体细胞杂种获得的对水稻白叶枯病的抗病性, 利用回交结合胚抢救的方法极有可能得到具有使用价值的育种材料.

致谢 本研究为国家生物技术攻关计划资助项目(批准号: 96-C01-01-01-06).

参 考 文 献

1 Bates G W, Hasenkampf C A, Contolini C L, et al. Asymmetric hybridization in *Nicotiana* by fusion of irradiated protoplasts. *Theor Appl Genet*, 1987, 74: 718~726

2 Gleba Y Y, Hinnisdals S, Sidorov V A, et al. Intergeneric asymmetric hybrids between *Nicotiana plumbaginifolia* and *Atropa belladonna* obtained by “γ-fusion”. *Theor Appl Genet*, 1988, 76: 760~766

3 Akagi H, Taguchi T, Fugimura T. Stable inheritance and expression of the CMS traits introduced by asymmetric protoplast fusion. *Theor Appl Genet*, 1995, 91: 563~567

4 Hayashi Y, Kyozuka J, Shimamoto K. Hybrids of rice (*Oryza sativa* L.) and wild *Oryza* species obtained by cell fusion. *Mol Gen Genet*, 1988, 214: 6~10

5 Brar D S, Khush G S. Alien introgression in rice. *Plant Mol Biol*, 1997, 35: 35~47^[DOI]

6 Shishido R, Apisitwanich S, Ohmido N, et al. Detection of specific chromosome reduction in rice somatic hybrids with A, B and C genome by multi-color genomic *in situ* hybridization. *Theor Appl Genet*, 1998, 97: 1013~1018^[DOI]

7 Terada R, Kyozuka J, Nishibayashi S, et al. Plantlet regeneration from somatic hybrids of rice (*Oryza sativa* L.) and barnyard grass (*Echinochloa oryzicola* Vasing). *Mol Gen Genet*, 1987, 210: 39~43

8 辛化伟, 孙敬三, 颜秋生, 等. 水稻与大黍不对称体细胞杂交再生植株. *植物学报*, 1997, 39: 717~724

9 Kisaka H, Kisaka M, Kanno A, et al. Intergenic somatic hybridization of rice (*Oryza sativa* L.) and barley (*Hordeum vulgare* L.) by

protoplast fusion. *Plant Cell Rep*, 1998, 17: 362~367^[DOI]

10 Jelodar N B, Blackhall N W, Hartman T P V, et al. Intergeneric somatic hybrids of rice [*Oryza sativa* L. (+) *Porteresia coarctata* (Roxb.) Tateok]. *Theor Appl Genet*, 1999, 99: 570~577^[DOI]

11 Liu B, Liu, Z L, Li X W. Production of highly asymmetric somatic hybrid between rice and *Zizania latifolia* (Griseb): evidence for inter-genomic exchange. *Theor Appl Genet*, 1999, 98: 1099~1103^[DOI]

12 彭绍裘, 魏子生, 毛昌祥. 云南疣粒野生稻、药用野生稻和普通野生稻的多抗性鉴定. *植物病理学报*, 1982, 12(4): 58~60

13 刘继梅, 程在全, 杨明攀, 等. 云南三种野生稻中抗病基因同源序列的克隆及序列分析. *中国农业科学*, 2003, 36: 273~280

14 Aggarwal R K, Brar D S, Khush G S. Two new genomes in the *Oryza* complex identified on the basis of molecular divergence analysis using total genomic DNA hybridization. *Mol Gen Genet*, 1997, 254: 1~12^[DOI]

15 Wakasa K, Kobayashi M, Kamada H. Colony formation from protoplast of nitrate reductase different rice cell lines. *J Plant Physiol*, 1984, 117: 223~231

16 Frearson E M, Power J B, Cocking E C. The isolation, culture and regeneration of *Petunia* leaf protoplasts. *Dev Biol*, 1973, 33: 130~137

17 Kao K N. Chromosomal behavior in somatic hybrids of soybean *Nicotiana glauca*. *Mol Gen Genet*, 1975, 150: 225~231

18 颜秋生, 张雪琴, 滕胜, 等. 水稻原生质体培养技术体系的建立. 见: 简玉瑜, 主编, 中国农业集刊(第二辑): 农作物原生质体培养专集. 北京: 中国农业出版社, 1995. 20~26

19 Temnykh S, Park W D, Ayres N, et al. Mapping and genome organization of microsatellite sequences in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor Appl Genet*, 2000, 100: 697~712^[DOI]

20 Lin X H, Zhang D P, Xie Y F, et al. Identifying and mapping a new gene for bacterial blight resistance in rice based on RFLP markers. *Phytopathology*, 1996, 86: 1156~1159

21 Kauffman H E, Reddy A P K, Hsieh S P Y. An improved technique for evaluating resistance of rice varieties to *Xanthomonas oryzae*. *Plant Dis Rep*, 1973, 57: 537~541

22 Melzer J M, O'Connell M A. Effect of radiation dose on the production of and the extent of asymmetry in tomato asymmetric hybrids. *Theor Appl Genet*, 1992, 83: 337~344

23 Samoylov V M, Sink K C. The role of irradiation dose and DNA content of somatic hybrid calli in producing asymmetric plants between an interspecific tomato hybrid and eggplant. *Theor Appl Genet*, 1996, 92: 850~857^[DOI]

24 Fukui K, Shishido R, Kinishita J. Identification of rice D-genome chromosomes by genomic *in situ* hybridization. *Theor Appl Genet*, 1997, 95: 1239~1245^[DOI]

25 Gedermann-Knoerck M, Nielsen S, Tzscheetzch C, et al. Transfer of disease resistance with the genus *Brassica* through asymmetric hybridization. *Euphytica*, 1995, 85: 247~253

(2004-03-17 收稿, 2004-06-19 收修改稿)