

水稻白叶枯病广谱抗性基因 Xa21 导入两用不育系培矮 64S

赵 彬^{1,2} 王文明¹ 郑先武¹ 王春莲³ 马伯军¹ 薛庆中² 朱立煌¹ 翟文学^{1*}

¹(中国科学院遗传研究所,北京 100101)

²(浙江大学农学系,杭州 310029)

³(中国农业科学院作物育种栽培研究所,北京 100080)

摘 要 以克隆的 Xa21 基因为外源基因,成熟胚愈伤组织为转化受体,应用农杆菌介导法对水稻两用型核不育系培矮 64S 进行转化,获 46 株转基因植株。PCR 和 Southern 分析结果表明,Xa21 已整合到受体基因组。用稻白叶枯病菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*)菲律宾小种 6 号接种鉴定,结果表明大多数转基因植株获得了抗病性。已整合的 Xa21 基因能够稳定地遗传,在所检测转基因株系的 T₁ 代中,Xa21 基因显示 3:1 的分离。

关键词 水稻,农杆菌介导法转化,Xa21 基因,培矮 64S,白叶枯病

中图分类号 Q78 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2000)02-0137-05

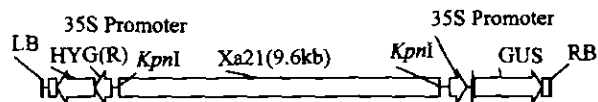
稻白叶枯病(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*)是水稻主要的病害之一,水稻受害后,一般减产 20%~30%,严重的达 50%,甚至绝收^[1]。选育和种植抗病品种是防治该病害最经济有效的措施^[2]。我国水稻栽培品种中只有部分抗性品种,而且这些抗性品种利用的抗病基因几乎都是 Xa4(籼稻)或 Xa3(粳稻)。Xa4 和 Xa3 的抗谱较窄,随着病原菌群体中优势小种的变化,这些抗源对病原菌的抗性在不断地下降。改善水稻品种对白叶枯病抗性的有效策略之一,是导入新的抗病基因。来源于长药野生稻(*Oryza longistaminata*)的显性广谱抗性基因 Xa21 的克隆^[3],使得直接对水稻优良品种进行基因工程操作,改善其对白叶枯病的抗性成为可能。

培矮 64S 是实用型两用核不育系,它具有制种安全,配组自由,杂种优势强等特点^[4]。目前培矮 64S 与特青、288、9311、E32 等品种配组的两系杂交稻已在生产上广泛试种和种植,其产量明显优于三系杂交稻,表现出了强大的增产潜力。其中培矮 64S 与 E32 配制的 65396 从播种至成熟较汕优 63 少 7d 左右,每天每公顷产稻谷 100kg 以上,达到了“超级杂交稻”的育种目标^[5]。将 Xa21 基因导入培矮 64S,改善其对白叶枯病的抗性,更有利于培矮 64S 优良种质资源的利用和推广,以及丰富我国杂交稻中白叶枯病的抗源。

1 材料与方 法

1.1 农杆菌菌株和质粒

农杆菌菌株为 EHA105 和 AGL-1,载体质粒为 pCAMBIA1301(澳大利亚 CAMBIA 中心的 RA Jefferson 教授惠赠)。将 Xa21 基因插入 pCAMBIA 1301 构建成重组质粒 pCXK1301^[6],再利用电激法将质粒 pCXK1301 转移到农杆菌菌株中。质粒 pCXK1301 中 T-DNA 区域的图谱如图 1。



Note: Xa21 has its own promoter and terminator

图 1 质粒 pCXK1301 中的 T-DNA 区域

Fig. 1 T-DNA region of the transformation vector pCXK1301

1.2 转化受体

培矮 64S 新鲜成熟脱壳的种子,用 70% 酒精浸泡 1min,然后在 0.1% 升汞溶液中灭菌 20min,再用无菌水冲洗 3 次,吸干水后接种在 N₆ 培养基(表 1)上进行诱导培养。培养温度 26±1℃,3 周后当愈伤组织长到 2~3mm 时,取生长旺盛的胚性愈伤进行转化。

1.3 转化

转化基于 Hiei 等人的方法^[7],略作修改。具体

收稿日期:1999-05-05,修回日期:1999-12-24。

基金项目:国家高技术发展与计划资助项目(101-01-02-01)。

* 联系人。

程序是:将农杆菌菌株挑取到含有 50mg/L kanamycin 和 50mg/L hygromycin 的 YEP 液体培养基中,28℃ 振荡培养 24h 左右,使其 OD 值在 0.8 附近。侵染时,将上述菌液置于 50mL 离心管中,3000r/min 离心 10min,去除上清,加入同原菌液等量的 AAM 培养基(表 1),重悬浮;将愈伤组织在农杆菌液中浸泡 3~10min;然后将愈伤组织移至干燥

的灭菌滤纸上,吸去多余的菌液;最后,将愈伤置于共培养培养基 NAS(表 1)上。共培养的时间根据愈伤组织上农杆菌生长的情况决定,一般 2~3d,农杆菌菌落明显可见时,使用抗菌素抑制农杆菌。抑制农杆菌时,用 500mg/L 的 cefotaxime 溶液充分漂洗共培养后的愈伤组织 3 次,然后置于选择培养基 N₆H(表 1)上。

表 1 用于组织培养和转化的培养基

Table 1 Media used for tissue culture and transformation

Medium	Composition
N ₆	N ₆ salts and vitamins, 1g/L casamino acids, 30g/L sucrose, 2mg/L 2,4-D, 3.2g/L gelrite, pH 5.8
AMM	AA salts and amino acids, 500mg/L casamino acids, 68.5g/L sucrose, 36g/L glucose, 100μmol/L acetosyringone, pH 5.2
NAS	N ₆ Medium plus 10g/L glucose and 100μmol/L acetosyringone, pH 5.2
N ₆ H	N ₆ Medium plus 300mg/L cefotaxime and 50mg/L hygromycin
MS	MS salts and vitamins, 30g/L sucrose, 2mg/L kinetin, 0.5mg/L NAA, 3.2g/L Gelrite, pH 5.8

1.4 转化子的筛选和植株再生

愈伤组织在选择培养基上选择 3 次,每次 2 周;然后,将选择培养基上的抗性愈伤转移到分化培养基 MS(表 1)上,直至绿芽出现;再将幼芽转移到无激素的 1/2 MS 培养基上生根,当幼苗根生长正常并长至 8cm 以上时,移入温室种植。

1.5 GUS 检验

按 Jefferson^[8]方法进行。

1.6 水稻总 DNA 的提取、酶切、Southern 转移、杂交

按 McCouch(1988)^[9]方法进行。

1.7 PCR 检测

PCR 扩增的引物序列为, Xa 21

Z₂ 5'-ATTGAATAATTCCTGCGGTATTGG;

Z₃ 5'-GTCTTGCCCTGCACTTCTGCACGA,

可扩增出 1.4kb 的产物。PCR 反应在 Perkin Elmer

Cetus 480 型 DNA 扩增仪上进行,反应条件为 94℃ 变性 5min,再以 94℃ 1min,58℃ 1min,72℃ 2min 进行 35 个循环,最后于 72℃ 保温 10min。

1.8 抗病性鉴定

用剪叶法接种稻白叶枯病菲律宾小种 6 号,各植株在成株期接种 3~5 片叶,接种液的浓度为 10⁸~10⁹/mL(OD₆₀₀≈0.5),接种后 15d,测量病斑长度,病斑长度大于 5cm 为感病^[10]。

2 结 果

2.1 转化

用含有质粒 pCXK1301 的农杆菌菌株 EHA105 和 AGL-1 侵染培矮 64S 胚性愈伤组织,经过选择共再生出 88 株植株,其中转 GUS 和潮霉素抗性基因植株 46 株,其分布情况如表 2。

表 2 培矮 64S 的转化结果

Table 2 Transformation results of Pei'ai 64S

<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Experiment batch	No. of calli infected	GUS & HYG transgenic plant	Percentage* /%
EHA105	1st batch	134	9	6.72
	2nd batch	123	16	13.08
Total		257	25	9.73
AGL-1	1st batch	161	11	6.83
	2nd batch	95	10	10.05
Total		256	21	8.23

* Equal to the percentage of the number of calli infected in GUS positive plants

从表 2 中可以看出 EHA105 的转化频率 9.73% 和 AGL-1 的转化频率 8.23% 相差不多(t 测

验差异不显著),而同种菌株不同批次之间的转化频率却存在较大的差异,其原因可能与受体愈伤组织

的生长状况有关。

2.2 转基因植株的鉴定

2.2.1 Xa21 分子检测: 提取转基因植株 DNA, 以质粒 pCXK1301 DNA 为阳性对照, 未转化植株为阴性对照, 进行 Xa21 基因片段的特异 PCR 扩增, 其结果如图 2。转基因植株 DNA 经引物扩增后产生 1.4kb 的 Xa21 特异扩增带, 而非转基因对照植株中没有相应的扩增带。

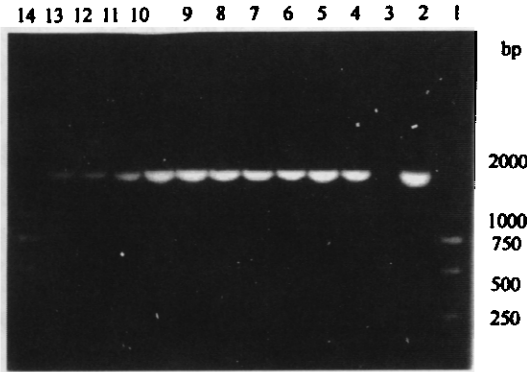


图 2 培矮 64S 转基因植株的 Xa21 PCR 分析
Fig. 2 PCR analysis of Pei'ai 64S transgenic plants

用内切酶 *Kpn*I 酶切转基因植株 DNA、质粒 pCXK1301 DNA 和未转化植株 DNA, 与 1.4kb Xa21 特异探针进行 Southern 杂交, 其结果如图 3。转基因植株显示一条 9.6kb 的 Xa21 基因特异杂交带, 杂交带的大小与阳性对照相同, 而非转基因对照植株没有相应的杂交带。

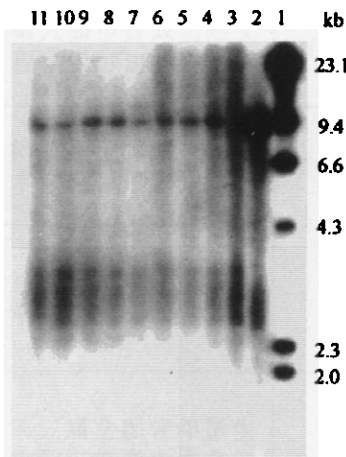


图 3 培矮 64S 转基因植株 Southern 分析
Fig. 3 Southern analysis of Pei'ai 64S transgenic plants

基因对照植株的病斑在 20cm 左右。在对转基因植株 GUS 检测、Xa21 分子检测和表型抗性检测的基础上, 对转基因植株进行综合分析, 统计结果见表 3。

由表 3 中可以看到, 已鉴定的 30 株转基因植株中 24 株表现出了抗病性, 而其中 PA08、PA09、PA19 整合了 Xa21 基因而没有表现出抗病性, PA26、PA28 和 PA29 为 GUS 阳性而没有整合进 Xa21 基因。

表 3 培矮 64S 转基因植株的综合鉴定结果
Table 3 Molecular analysis and resistance evaluation of Pei'ai 64S transgenic plants

No. of plants	GUS phenotype	Xa21 PCR	Xa21 Southern blot	Lesion length/cm	Reaction to race 6
CK1	—	—	—	22.7 ± 2.1	S
CK2	—	—	—	18.5 ± 3.9	S
CK3	—	—	—	19.8 ± 1.9	S
PA01	+	+	+	0.8 ± 0.3	R
PA02	+	+	+	0.3 ± 0.1	R
PA03	+	+	+	0.9 ± 0.5	R
PA04	+	+	+	0.6 ± 0.2	R
PA05	+	+	+	0.6 ± 0.2	R
PA06	+	+	+	0.4 ± 0.2	R
PA07	+	+	+	0.8 ± 0.2	R
PA08	+	+	+	13.0 ± 2.6	S
PA09	+	+	+	8.0 ± 5.2	MS
PA10	+	+	+	3.0 ± 1.3	R
PA11	+	+	+	2.7 ± 0.3	R
PA12	+	+	+	0.6 ± 0.2	R
PA13	+	+	+	1.0 ± 0.1	R
PA14	+	+	+	0.6 ± 0.2	R
PA15	+	+	+	0.5 ± 0.3	R
PA16	+	+	+	2.0 ± 0.7	R
PA17	+	+	+	0.0 ± 0.1	R
PA18	+	+	+	0.4 ± 0.2	R
PA19	+	+	+	18.0 ± 4.2	S
PA20	+	+	+	0.6 ± 0.4	R
PA21	+	+	+	0.7 ± 0.4	R
PA22	+	+	+	1.2 ± 0.6	R
PA23	+	+	+	0.4 ± 0.2	R
PA24	+	+	+	1.0 ± 0.9	R
PA25	+	+	+	1.3 ± 1.1	R
PA26	+	—	—	19.0 ± 4.2	S
PA27	+	+	+	2.3 ± 0.4	R
PA28	+	—	—	13.0 ± 2.8	S
PA29	+	—	—	15.0 ± 1.6	S
PA30	+	+	+	2.0 ± 0.8	R

Note: + Positive; - Negative; R. Resistant; S. Sensitive; The other 16 plants has not been tested thoroughly.

2.2.2 抗病性检测: 对转基因植株和非转基因对照植株接种白叶枯病原菌菲律宾小种 P6, 结果表明, 抗性转基因植株的病斑长度均小于 3cm, 而非转

2.3 转基因植株后代(T_1 植株)的遗传分析

培矮 64S 在北京地区种植,通常为不育,虽然采取遮光、冷水灌溉措施,也只有几株结实。种植结实转基因植株 PA01、PA02、PA11 和 PA14 的 T_1 植株,对其进行 Xa21 的 PCR 分析和接种白叶枯病菲律宾小种 P6,PCR 分析和抗病性鉴定的结果完全一致,其结果列于表 4。

表 4 T_1 植株 Xa21 基因的分离

Table 4 Xa21 gene segregation in T_1 transgenic plants

T_1 Plants	Xa21 PCR positive	Xa21 PCR negative	Ratio	χ^2 Value and probability
PA01	42	15	2.80:1	$\chi^2=0.05; P=0.82$
PA02	42	13	3.23:1	$\chi^2=0.06; P=0.81$
PA11	44	14	3.14:1	$\chi^2=0.02; P=0.89$
PA14	46	16	2.88:1	$\chi^2=0.02; P=0.89$

从表 4 中可以看出,在所检测转基因株系中, Xa21 的分离都符合 3:1 的比例。

3 讨论

选择适当的受体材料是获得理想转化结果的关键。农杆菌转化分子机制的研究^[11]表明,受体材料的细胞分裂与这些细胞被农杆菌转化的能力密切相关,DNA 的大量合成和细胞分裂的有关过程对于外源 DNA 整合到受体基因组中是必要的。因此受体材料的选择应使其在共培养时处于旺盛分裂状态之中。

建立良好的再生系统是获得转基因植株的前提。在用 Xa21 基因转化培矮 64S 的同时,我们也用相同方法转化了珍汕 97B,虽然也得到了珍汕 97B 的转化植株^[6],但转化频率比培矮 64S 低得多。转化频率低的原因主要不是产生抗性愈伤的频率低,而是抗性愈伤在分化过程中大部分褐化死亡,只有极少部分再生出转基因植株。

众所周知,植物组织细胞的分化能力有很强的基因型依赖性,不同的基因型往往要求不同的培养基,很难找出对所有品种都适用的培养条件。因此,对未进行过组织培养的品种进行转化时,必须对其培养条件进行优化,使其在没有经过选择的情况下具有较高的再生频率(不低于 20%)。如果受体材料在没有进行选择的情况下再生能力就很差,那么经过较长时间筛选和培养,愈伤组织的再生能力会继续下降,即使选择到抗性愈伤也难以再生。因此,对侵染品种培养条件的优化是转化成功的重要因素。

J. H. Oard 等人^[12] 1996 年研究了基因枪法转 *Bar* 基因对水稻农艺性状的影响。结果表明,不同转基因株系间在除草剂抗性和农艺性状上存在显著的差异,因此, J. H. Oard 等人认为有必要使每一转基因受体品种产生几个独立的株系,然后应用常规育种选择程序,筛选出既具有高水平抗性又具有优良农艺性状的类型。我们应用农杆菌介导法转化产生的培矮 64S 转基因植株的农艺性状和光温敏特性变化如何,正在研究之中。

参 考 文 献

- [1] 熊振民,蔡洪法,闵绍楷等. 中国水稻,北京:中国农业科技出版社,1992,pp. 118~121
- [2] Khush G S, Mackill D J, Sidhu G S. *IRRI Manila Philippines*, 1989, pp. 207~217
- [3] Song W Y, Wang G L, Chen L et al. *Science*, 1995, 270: 1804~1806
- [4] 罗孝和,袁隆平. 杂交水稻, 1989, 4(2): 35~38
- [5] 袁隆平. 杂交水稻, 1997, 12(6): 1~3
- [6] 翟文学,李晓兵,田文忠等. 中国科学(C辑), 2000, 43(2).
- [7] Hiei Y, Ohta S, Komari T, Kumashiro T. *Plant Journal*, 1994, 6(2): 271~282
- [8] Jefferson R A. *Plant Mol Biol Rep*, 1987, 5: 387~405
- [9] McCouch S R, Kochert G, Yu Z H et al. *Theor Appl Genet*, 1988, 76: 815
- [10] 章琦,杨文才,施爱农等. 中国农业科学, 1996, 29(4): 85~92
- [11] Gheysen G, VanMontagu M, Zambryski P. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, 84: 6169~6173
- [12] Oard J H, Linscombe S D, Braverman M P et al. *Molecular Breeding*, 1996, 2: 359~368

Introduction of Wide Spectrum Rice Bacterial Blight Resistance Gene Xa21 into Two-line Genic Male Sterile Rice Variety Pei'ai 64S

ZHAO Bin^{1,2} WANG Wen-Min¹ ZHENG Xian-Wu¹ WANG Chun-Lian³ MA Bo-Jun¹

XUE Qing-Zhong² ZHU Li-Huang¹ ZHAI Wen-Xue¹

¹(Institute of Genetics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101)

²(Department of Agronomy, Zhejiang University, Hangzhou 310029)

³(Institute of Crop Breeding and Cultivation, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100080)

Abstract *Agrobacterium*-mediated transformation of two-line genic male sterile Indica rice variety Pei'ai 64S was conducted using a cloned gene, Xa21, as the foreign gene and mature embryo calli as the recipients. A total of 46 transgenic plants had been obtained. The PCR analysis and Southern blotting showed the integration of Xa21 gene into the genome the transgenic plants. Results of inoculation with philippine race 6 of *Xanthomonas oryzae pv. oryzae* indicated that most of transgenic plants obtained high resistance to rice bacterial blight disease (Xoo). Analyses of T₁ plants of the tested transgenic lines showed that integrated Xa21 gene could be steadily inherited and segregated in a 3:1 ratio.

Key words Rice, *Agrobacterium*-mediated transformation, Xa21 gene, Pei'ai 64S, rice bacterial blight disease(Xoo)

2000 年中国微生物学会召开的学术会议计划

序号	会议名称	时间	地点	人数	筹办单位	联系人(电话)
1	中国微生物学会“迎接 21 世纪微生物学研讨会”	7.24~28	烟台	300	中国微生物学会	薛春华 010-62554677
2	中美国际微生物学学术研讨会	10 月上旬	北京	50	中国微生物学会	薛春华 010-62554677
3	第六届中日双边酶工程学术讨论会	10.15~18	日本京都	100	日本酶工程学会和中国微生物学会酶工程专业委员会共同主办	黎高翔 010-62550183 010-62554677
4	第三届全国酶工程学术讨论会	7 月~8 月	成都	120	中国微生物学会酶工程专业委员会	黎高翔 010-62550183 010-62554677
5	第七届中国微生物学学术讨论会	8 月	上海	100	中国微生物学	薛春华 010-62554677 戚中田 021-25070265
6	第三届全国青年微生物学工作者学术会议	5 月	无锡	100	中国微生物学会基础微生物专业委员会、无锡轻工大学、江苏微生物研究	李华中 0510-5876906 陈 坚 0510-5888301
7	全国第三届分析生物学暨第八届分析微生物学学术讨论会	8 月下旬	兰州	150	分析微生物学专业委员会	周 方 010-66948605 杨瑞馥 010-66968562