

水稻抗白叶枯病基因 *Xa21* 转基因水稻及其杂交稻研究*

吴家道¹ 杨剑波¹ 许传万¹ 李 莉¹ 向太和¹ 倪大虎¹ 汪秀峰¹
贾士荣² 唐益雄² 张世平³ Claude M Fauquet³

(¹安徽省农业科学院水稻研究所, 农业部水稻遗传育种重点开发实验室, 安徽合肥 230031; ²中国农业科学院生物技术研究所, 北京 100081; ³International Laboratory for Tropical Agricultural Biotechnology The Scripps Research Institute La Jolla CA92037 USA)

提 要 用基因枪转基因技术将高抗白叶枯病的 *Xa21* 基因导入中国三系杂交稻恢复系(明恢 63)和保持系(皖 B)中, 获得转基因水稻系, 其中 4 个株系只含有 *Xa21* 基因, 不含选择标记潮霉素抗性基因 *hph*。筛选抗白叶枯病转基因纯合系, 在田间种植 6 代, 用 PCR 检测证明, *Xa21* 基因能稳定遗传表达。用转基因水稻配制两系杂交稻, 杂交组合 F₁ 含有 *Xa21* 基因, 既抗白叶枯病, 又有较大的增产潜力。

关键词 *Xa21* 基因; 转基因水稻; 杂交稻

Study on Resistance Gene to Bacterial Blight *Xa21* Transgenic Rice and Their Hybrid Combinations

WU Jia-Dao¹ YANG Jian-Bo¹ XU Chuan-Wan¹ LI Li¹ XIANG Tai-He¹ NI Da-Fu¹
WANG Xiu-Feng¹ JIA Shi-Rong² TANG Yi-Xiong² ZHANG Shi-Ping³
Claude M. Fauquet³

(¹Anhui Academy of Agricultural Sciences, Hefei 230031, Anhui, China; ²Institute of Biotechnology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China; ³International Laboratory for Tropical Agricultural Biotechnology, The Scripps Research Institute, La Jolla, CA92037, USA)

Abstract *Xa21* gene and *hph* gene were co-transferred into Chinese 3-line hybrid rice lines Minghui 63(restorer line) and Wan B (maintainence line)by biolistics gene transfer method. A total of 5 transgenic rice lines with enhanced resistance against rice bacterial blight (BB) were obtained. Four of the transgenic lines were found to have only *Xa21* gene integrated into the genome, and the other one have both *Xa21* and *hph* integrated. Molecular analysis to the transgenic plants (up to six generations) showed that *Xa21* gene had been integrated into the plant genome. The offsprings inherited the resistance from *Xa21* stable. The *Xa21* transgenic rice plants have been used as the restorer line for 2-line hybrid combinations. F₁ of some combinations were found to show strong BB resistance and high yield-increasing potentiality.

Key words *Xa21* gene; Transgenic rice; Hybrid rice

我们从 1995 年 12 月起, 用基因枪转基因法将广谱高抗白枯病的 *Xa21* 基因导入水稻恢复系明恢 63 中首次获得成功。通过田间种植 6 代, 选育出高抗白叶枯病、且遗传稳定的材

* 本研究前期工作得到美国 Rogor N Beachy 博士的帮助, 他现在工作单位是 Donald Danforth Plant Science Center (St. Louis, Mo.), 同时也得到洛克菲勒基金(Rockefeller Foundation)的资助, 在此一并致谢。

收稿日期: 2000-02-22, 接受日期: 2000-06-02

Received on: 2000-02-22, Accepted on: 2000-06-02

料。用它作恢复系配制杂交稻,获得了极有潜力的高产、优质、高抗白叶枯病的杂交稻新组合,有希望在生产上推广应用。

1 材料与方 法

1.1 材 料

用作转基因的受体是我国生产上广泛应用的易感白叶枯病的杂交稻汕优 63 的恢复系明恢 63 和 80 优 121 的保持系皖 B。用三系杂交稻的不育系珍汕 97A、协青早 A 及两系杂交稻的不育系 X07S 和 056S 作母本配制杂交组合。

1.2 方 法

从 1995 年 12 月至 1999 年 10 月整个试验在两地进行。

Xa21 基因转化水稻的工作于 1995 年 12 月在美国 Scripps 研究所进行。

1.2.1 愈伤诱导及悬浮细胞系建立 诱导愈伤组织和建立悬浮细胞系按照 Zhang(1995)的程序。消毒灭菌的水稻种子接到 MS 培养基上(Murashige and Skoog,1962)。培养一个月后,选择小颗粒胚性愈伤,置于液体 SZ 培养基(Zhang 等 1998)中建立悬浮细胞系。

1.2.2 质粒构建与转化 质粒 PC822 是由质粒 PTA818 插入 9.6kb 带有 *Xa21* 基因的 DNA 片段构建而成,该带有 *Xa21* 基因的 DNA 片段是从水稻 IRBB21 克隆而来(Song 等 1995)。质粒 PHX4 含有选择标记潮霉素抗性基因 *hph* (CaMV 35S 启动子 *hph* NOS) 由 PUC119

美国 Ohio 州立大学 Dr, J. J. Finer 提供)。PHX4 和 PC822 按 1:4 分子比例混合包埋到金粉上,用 Biolistic PDS-1000 基因枪进行共转化。质粒包埋及转化按照 Zhang 等(1996)Chen 等(1998a, b)的程序。

1.2.3 继代培养与筛选 转化后的悬浮细胞被培养在修改的 CC 固体培养基(Zhang 等 1998)含有 50mg/L 潮霉素上进行筛选 2~3 周。将新鲜愈伤继代到相同筛选培养基上再培养 2~3 周。抗性愈伤被继代到予分化培养基上 2 周(筛选培养基成分无 2,4-D,但加 2mg/L Kinetin, 1mg/L NAA, 5mg/L ABA)。直径 2~3mm 的抗性愈伤继代到再生培养基上(改变予分化培养基激素为 2.5mg/L Kinetin, 0.1mg/L NAA)。暗培养 3 天后转至光照下培养。再生的小苗转至 1/2 MS 培养基以促根生长(1/2MS 盐分,1%蔗糖,50mg/L 潮霉素)。所有培养基 pH 5.8。除再生培养基用 5g/L 琼脂糖固化外,所有固体培养基均用 2.5g/L Phytigel 固化。组培期间的温度为 25℃。将 10cm 高的转化苗移栽于土壤中,在人工气候箱中培养,白昼光照下为 28℃,晚间暗培养于 26℃。6 周之后用菲律宾 *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae* 小种 6 号进行接菌检测抗性。同时进行 PCR 分子检测,部分抗病转化系用作 Southern 分子分析和收获种子继续播种检测后代分离结果。由抗病 T₁ 株上收获的 T₂ 种子分别接到含有潮霉素的无激素培养基上和土壤中。对 T₂ 不抗潮霉素的系,种在土壤中的稻苗再进行接菌及 PCR 分子检测,以确认抗病但又不含 *hph* 基因。这种 T₂ 纯合体种子用来做田间试验。

田间试验、抗白叶枯病鉴定和 PCR 检测、筛选等在中国农科院和安徽省农科院进行。*Xa21* 转基因水稻从 1997 年 10 月至 1999 年 10 月在海南省和安徽省共种植四代,进行筛选鉴定,同时,用不育系配制了大量杂交组合,于 1998 年和 1999 年 5 月在安徽省进行农艺性状和生产力比较、用当地白叶枯病菌系鉴定并进行分子检测。

2 结果

2.1 明恢 63 转基因水稻的表现

稻株在分蘖期于温室接种白叶枯病菌, 在 T_2 代筛选出两类明恢 63 抗病的转化系: 一类 (M22) 具有 *Xa21* 基因和潮霉素抗性 *hph* 基因, 共 31 个株系, 另一类 (M12) 只含有 *Xa21* 基因, 共 10 个株系。田间试验结果表明, 两类转基因系农艺性状基本一致, 但与原亲本明恢 63 (CK) 有明显差异。数据列于表 1、表 2。M22 株系株高 88.4~101.6cm, 比 CK 矮 15.8~29.0cm; 穗长 18.6~21.0cm, 比 CK 短 3.5~5.9cm。M12 株系株高 87.6~100.2cm; 比 CK 矮 2.0~14.6cm; 穗长 18.4~23.0cm, 比 CK 短 4.3~8.9cm。每穗结实粒数, 除 M22 中的 2 个株系外, 其余均比 CK 多 5.1~53.6 粒; 千粒重 M22 平均 16.3g, 比 CK 轻 11.1g; M12 平均 15.8g, 比 CK 轻 14.0g; 单株谷重比 CK 减产 16.3%~66.7%。表明, 中选的明恢 63 转基因株系的株高变矮、穗子变短、种子小、千粒重低, 尽管每穗实粒数有所增加, 但仍造成单株谷重降低。

2.2 皖 B 转基因水稻的表现

获得的皖 B 转基因水稻也有两种类型转化系。第一类具有 *Xa21* 和潮霉素抗性基因, 共

表 1 *Xa21* 转基因明恢 63 M₂₂ 各株系的农艺性状与对照比较

Table 1 Comparison of character regarding Minghui63 line M₂₂ with *Xa21* and original Minghui63 (CK)

株系号 Plant line no.	抽穗期 Earbearing tillers times Month/day	株高 Plant height (cm)	穗长 Panicle length (cm)	单株有效穗数 Productive titters no. per Plant	每穗粒数 Grains no. per panicle	每穗实粒数 Fertile grains no. per panicle	结实率 Fertility (%)	千粒重 1000 grains weight (g)	单株谷重 Total grains weight per plant (g)	比 CK 增 减 % Comparisi- on with CK
M ₂₂ -103	8/21	88.4	19.2	11.9	172.9	89.6	51.8	15.0	18.5	-28.3
M ₂₂ -104	8/25	88.5	18.6	11.3	142.1	75.5	53.2	16.4	14.5	-43.8
M ₂₂ -105	8/25	94.9	19.8	12.4	103.7	44.7	43.1	17.7	10.2	-60.5
M ₂₂ -106	8/14	101.6	20.5	10.1	163.6	84.6	51.7	16.3	14.5	-43.8
M ₂₂ -129	8/25	96.5	20.2	9.8	191.8	124.6	70.2	16.1	21.6	-16.28
M ₂₂ -132	8/15	97.2	19.2	10.3	162.3	111.4	68.6	16.0	18.9	-26.74
M ₂₂ -135	8/14	100.0	21.0	11.3	158.5	100.6	63.5	16.6	19.4	-24.81
CK 明恢 63 Minghui63	8/18	117.4	24.5	11.6	113.5	79.5	70.0	27.4	25.8	

表 2 *Xa21* 转基因明恢 63 M₁₂ 各株系的农艺性状与对照比较

Table 2 Comparison of character regarding Minghui63 line M₁₂ with *Xa21* and original Minghui63 (CK)

株系号 Plant line no.	抽穗期 Earbearing tillers times Month/day	株高 Plant height (cm)	穗长 Panicle length (cm)	单株有效穗数 Productive titters no. per plant	每穗粒数 Grains no. per panicle	每穗实粒数 Fertile grains no. per panicle	结实率 Fertility (%)	千粒重 1000 grains weight (g)	单株谷重 Total grains weight per plant (g)	比 CK 增 减 % Comparisi- on with CK
M ₁₂ -1	8/12	93.8	21.1	8.8	226.4	128.9	56.93	16.5	10.5	-66.67
M ₁₂ -2	8/12	87.6	18.5	8.6	206.8	122.4	59.18	15.0	15.2	-51.75
M ₁₂ -3	8/12	100.2	20.6	9.8	224.2	128.0	57.09	16.2	18.7	-40.64
M ₁₂ -4	8/16	93.2	21.1	11.2	202.8	126.4	62.32	14.4	19.7	-37.46
M ₁₂ -5	8/14	98.8	22.1	11.2	211.7	122.2	57.72	16.2	21.4	-32.06
M ₁₂ -6	8/12	98.1	20.4	7.4	241.0	156.8	65.06	16.1	17.8	-43.49
M ₁₂ -7	8/15	95.4	22.3	10.2	245.7	146.2	59.50	15.6	23.0	-26.98
M ₁₂ -8	8/12	97.3	18.4	8.6	233.6	147.9	63.31	15.8	19.6	-37.78
M ₁₂ -9	8/13	98.8	23.0	8.0	243.6	121.7	49.95	15.7	14.7	-53.33
M ₁₂ -10	8/14	99.8	19.5	6.6	253.0	154.0	60.86	16.0	16.7	-46.98
CK 明恢 63 Minghui63	8/18	102.2	27.3	10.6	130.1	103.2	79.32	29.8	31.5	

15个系。第二类只含 *Xa21* 基因,有3个系。现将其中2个系的田间试验结果列于表3。初步结果表明,抽穗期、株高、穗长、单株有效穗、千粒重等与对照相比,没有明显差异,说明中选的皖B转基因后代系与原亲本变异不大。目前正研究利用它转育皖A不育系和配制高抗白叶枯病的杂交稻。

表3 *Xa21*转基因皖B BJ株系的农艺性状与对照比较Table 3 Comparison of character regarding wan B line BJ with *Xa21* and original Wan B (CK)

株系号 Plant line no.	抽穗期 Earbearing tillers times Month/day	株高 Plant height (cm)	穗长 Panicle length (cm)	单株有效穗数 Productive titters no. per Plant	每穗粒数 Grains no. per panicle	每穗实粒数 Fertile grains no. per panicle	结实率 Fertility (%)	千粒重 1000 grains weight (g)	单株谷重 Total grains weight per plant (g)	比CK增 减% Compari- sion with CK
BJ99001	8/16	99.8	19.6	11.8	96.2	75.5	78.5	29.0	18.9	-25.6
BJ99002	8/16	100.4	21.9	10.2	127.4	112.3	88.2	28.7	30.2	18.9
CK 皖B Wan B	8/15	100.0	21.3	11.6	104.8	90.1	86.0	28.0	25.4	

2.3 与不育系配制杂交组合的表现

用M22与M12的后代株系与三系杂交稻不育系(珍汕97A、协青早A)和两系杂交稻不育系(X07S、056S)配制杂交组合,杂种F₁表现差异很大。与珍汕97A、协青早A配制的杂交组合,均表现配合力差,与CK(汕优63)相比,抽穗期长一个月以上,每穗籽数、结实率、千粒重等均比CK明显降低,单株生产力减产50%以上,不适于生产需要。与两系杂交稻不育系X07S(粳型)及056S(籼型)配制的杂交组合却有很强的杂种优势。表4数据表明,X07S(粳型)与M12-3、M12-7、M12-10配制的组合,抽穗期比CK短3~4天,单株有效穗、每穗总粒数、结实粒数、结实率均比CK明显增加,千粒重低3g,单株谷重增产41.8%~47.9%。说明这三个粳、粳交组合的亲及配合力好,杂种优势明显,有可能应用于生产。056S(籼)与M12-3、M12-8配制的组合,与CK相比也有明显的增产优势,但结实率、千粒重比CK明显偏低,说明这两个籼、粳交组合亲和性、配合力不太好,生产上难以应用。

2.4 水稻白叶枯病抗性和PCR鉴定结果

2.4.1 水稻白叶枯病抗性 抗白叶枯病转基因株系及与它配制的杂交稻组合,分别由中国农科院章琦教授研究组在网室接种中国7个主要白叶枯病菌病原型(C₁~C₇)和安徽省农业科学院植物保护研究所在大田接种安徽优势菌系(Xo-99-2),均表现高度抗病,比对照的抗病性有明显提高。图1为转基因水稻接种白叶枯病的大田表现。

表4 M₁₂转基因株系与粳型(X07S)、籼型(056S)不育系配制的两系杂交稻组合的农艺性状与对照比较Table 4 Comparison of hybrid rice crossed with BBR Minghui63 line M₁₂ and Shanyou63 Control

两系杂交 稻组合 Combination No.	抽穗期 Earbearing tillers times Month/day	株高 Plant height (cm)	穗长 Panicle length (cm)	单株有效穗数 Productive titters no. per Plant	每穗粒数 Grains no. per panicle	每穗实粒数 Fertile grains no. per panicle	结实率 Fertility (%)	千粒重 1000 grains weight (g)	单株谷重 Total grains weight per plant (g)	比CK增 减% Compari- sion with CK
X07S×M ₁₂ -3	8/8	115.5	26.0	13.8	221.3	188.8	85.31	26.1	63.0	47.89
X07S×M ₁₂ -7	8/8	124.0	25.7	13.7	212.6	189.0	88.89	26.4	62.2	46.01
X07S×M ₁₂ -10	8/9	116.0	25.1	12.2	226.8	200.2	88.27	26.3	60.4	41.78
056S×M ₁₂ -8	8/9	129.3	24.7	22.0	299.1	186.4	62.32	23.8	55.0	29.11
056S×M ₁₂ -3	8/14	121.0	23.5	14.8	242.5	154.6	63.75	23.8	52.1	22.30
Shanyou63	8/12	117.0	26.7	10.0	196.4	148.6	75.56	29.6	42.6	



图1 左: 带 *Xa21* 转基因的汕优 63; 右: 对照受体汕优 63

Fig. 1 Left are *Xa21* transgenic Shanyou 63 plants; Right are the CK Shanyou 63.

2.4.2 PCR 检测 PCR 扩增检测结果表明, 转基因系及其所配制的杂交组合均显示出抗白叶枯病基因 *Xa21* 的特异带, 而原受体明恢 63 没有该特异带。这说明 *Xa21* 基因已整合进受体基因组中, 并能稳定地遗传表达, 见图 2。

3 讨论

3.1 基因枪共转化

本研究中同时采用含 *Xa21* 基因和含 *hph* 基因的两种质粒, 用基因枪法进行共转化, 在含潮霉素 50mg/L 的选择培养基上, 转化受体的悬浮细胞系可形成胚性愈伤组织, 进而发育成转基因植株, 其中一部分仅含潮霉素抗性基因, 另一部分则因共转化而同时含有目标基因 *Xa21* 及选择标记基因 *hph*。由于 *Xa21* 及 *hph* 在水稻染色体上的整合是随机的, 若它们分别整合在不同染色体上或在同一染色体的非紧密连锁的两个位点上, 则在后代分离群体中便可选出仅含 *Xa21* 基因而不含抗生素选择标记基因的转基因个体及株系, 因而从转基因植物食品的安全性考虑便不存在任何风险。据作者所知, 目前转 *hph* 基因的水稻虽已在美国批准进入田间试验, 但尚未批准进入商业化生产。因此本试验所获得的仅含 *Xa21* 基因而不含 *hph* 基因的水稻, 对申请商业化应用的安全性风险评估具有自身的优点。

3.2 转基因水稻的遗传变异

在水稻细胞悬浮培养和组织培养中出现无性系变异已为人们所熟知, 以此再生系统为基础进行转基因, 在转基因株系中必然会产生性状变异, 外源基因随机插入染色体的不同位置更增加了性状变异的可能性, 这在马铃薯上已早有报道, 四倍体栽培马铃薯转基因引起的无性系变异甚至比单纯的组织培养更高。我们中选的两类抗白叶枯病水稻转基因材料, 其农艺

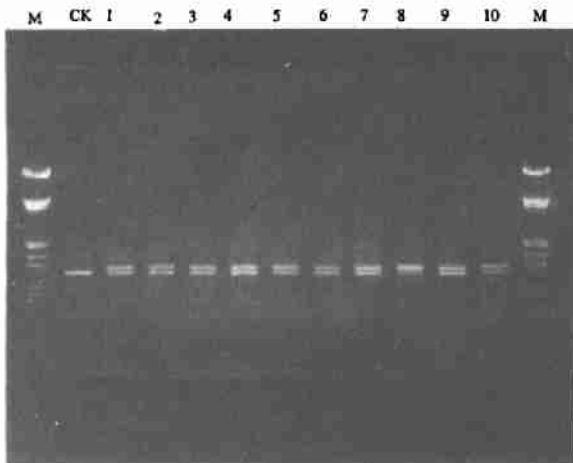


图2 M: 分子量; CK: 受体明恢 63; 1~5, *Xa21* 转基因明恢 63 第 4 代; 6, *Xa21* 转基因明恢 63 第 6 代; 7~10: 籼型和粳型杂交组合 F_1 (均含 *Xa21* 基因)。
Fig. 2 M: standard molecular weight; CK: Minghui 63; 1~5: the fourth generation of *Xa21* transgenic Minghui 63; 6: the sixth generation of *Xa21* transgenic Minghui 63; 7~10: *Indica* and *Japonica* hybrid combinations (*Xa21* transgenic) F_1 .

性状的变异不同。粳型皖 B 转基因后代的植株性状与原亲本比较一致, 没有明显差异; 而籼型明恢 63 转基因后代的植株性状, 与原亲本比较有明显的变异, 如叶片宽而上挺、光叶无毛, 颖花小、花药小、籽粒小、结实率低、千粒重低, 对温度敏感, 与亚热带地区籼稻品种的性状基本相似。这与我们在温室早期筛选阶段首先侧重选择白叶枯病抗性强的材料、且为了减小工作量而使中选的转基因材料数较少有关, 因而未对农艺性状进行重点选择。众所周知, 叶片有毛和大粒性状都是显性性状, 为什么明恢 63 转基因植株会出现隐性性状? 推测一方面与转基因方法有关, 基因枪导入外源基因的整合是随机的, 可能插入基因组中的某个位点, 抑制了有毛和大粒基因的表达。另一方面这些变异可能也与

材料本身的遗传背景有关。因为明恢 63 是多亲本杂交育成的品种, 且有爪哇稻血缘, 遗传背景复杂, 转基因后容易引起变异。而皖 B 是两个亲本杂交的品种, 遗传背景单纯, 性状较为稳定, 不易引起变异。但无论是前者还是后者, 就育种而言都有利用价值。变异小可使优良品种转基因后只改变某一、二个性状, 变异大则可增加遗传多样性和选择机会, 产生新的种质材料。

3.3 转基因水稻的遗传稳定性及杂交稻改良

转基因纯合体经连续种植 6 代, 通过 PCR 检测, 植株中仍含有 *Xa21* 基因, 遗传性非常稳定。用它配制杂交稻 F_1 也含有 *Xa21* 基, 显性遗传明显。对转基因株系及其杂交组合, 人工接种白叶枯病菌, 均表现为高抗, 这表明 *Xa21* 基因能在转基因后代中稳定遗传和表达, 显示了转基因技术的可靠性和实用性。

M12 的 3 个株系 M12-3、M12-7、M12-10 与两系杂交稻的籼型不育系 X07S 配制的 F_1 杂交组合, 比目前广泛栽培的三系杂交稻汕优 63 单株谷重增加 41.8%~47.9%, 且白叶枯病抗性有明显改善。

参 考 文 献

- 1 Chen L, P Marmey, N Taylor *et al.* *Nature Biotechnology*, 1998a, 16: 1060~1064
- 2 Chen L, S Zhang, R N Beachy *et al.* *Plant Cell Reports*, 1998b, 18: 25~31
- 3 Murashige T, F Skoog, *Physio Plant*, 1962, 15: 473~497
- 4 Song W Y, G Wang, L Chen. *Science*, 1995, 270: 1804~1806
- 5 Zhang S. *Plant Cell Reports*, 1995, 15: 68~71
- 6 Zhang S, L Chen, R Qu. *Plant Cell Reports*, 1996, 16: 465~469
- 7 Zhang S, W Y Song, L Chen. *Molecular Breeding*, 1998, 4: 551~558