

# 转溶菌酶基因水稻回交转育籼型杂交稻亲本

易自力<sup>1,\*</sup> 王紫萱<sup>1</sup> 覃静萍<sup>1</sup> 蒋建雄<sup>1</sup> 谭炎宁<sup>1</sup> 周清明<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> 湖南农业大学 细胞工程重点实验室, 湖南 长沙 410128; <sup>2</sup> 湖南农业大学 农学院, 湖南 长沙 410128; \* 通讯联系人, E-mail: yizili889@163.com)

## Transfer of Lysozyme Gene into indica Parents of Hybrid Rice by Backcrossing

YI Zili<sup>1,\*</sup>, WANG Zixuan<sup>1</sup>, QIN Jingping<sup>1</sup>, JIANG Jianxiong<sup>1</sup>, TAN Yanning<sup>1</sup>, ZHOU Qingming<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> Key Laboratory of Cell Engineering, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; <sup>2</sup> Agronomy College, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; \* Corresponding author, E-mail: yizili889@163.com)

Abstract: A lysozyme gene resistant to rice blast from the donor D2-1-2, a transgenic japonica rice line of Zhonghua 9, was transferred into the sterile line Pei ai 64S (PA64S) and restorer line 9311 of the hybrid Liangyoupeijiu, and the restorer line Minghui 63 (MH63) of Shanyou 63 by successive backcrossing. PCR analysis confirmed that foreign lysozyme gene was segregated with the ratio of 1:1 in backcross generations of B<sub>3</sub>9311, B<sub>3</sub>MH63 and B<sub>2</sub>PA64S, and with the ratio of 3:1 in inbred generations of B<sub>2</sub>F<sub>2</sub>9311, B<sub>2</sub>F<sub>2</sub>MH63 and B<sub>1</sub>F<sub>2</sub>PA64S, indicating the foreign gene was stably inherited over successive generations as a dominant single copy gene. The resistance to rice blast of the backcross or inbred generations and corresponding testcross combinations were investigated in the years of 2003 and 2004, and the results showed that their resistance to rice blast had a greater improvement than that of the corresponding recurrent parents or the corresponding hybrid combinations, respectively. The resistance to rice blast became stronger with the generations of the transferred rice progressed. This confirmed that transferring the lysozyme gene into hybrid parents by backcrossing was a simple and effective approach to develop new hybrid combinations resistant to rice blast.

Key words: hybrid rice; lysozyme gene; rice blast; resistance; backcrossing; breeding

摘要: 以抗稻瘟病的粳稻中花9号转溶菌酶基因材料D2-1-2与籼型杂交稻两优培九的恢复系9311及不育系培矮64S、汕优63的恢复系明恢63分别杂交和多代回交,进行外源溶菌酶基因的转育。对获得的转育回交后代B<sub>3</sub>9311、B<sub>3</sub>MH63、B<sub>2</sub>PA64S和回交自交后代B<sub>2</sub>F<sub>2</sub>9311、B<sub>2</sub>F<sub>2</sub>MH63、B<sub>1</sub>F<sub>2</sub>PA64S进行了PCR分析,表明外源基因在回交后代中呈1:1分离,而在回交的自交后代中呈3:1分离,证明外源溶菌酶基因是以单拷贝稳定传递给后代的。2003年和2004年对转育后代和测交组合进行了稻瘟病抗性调查,结果表明,转育后代抗性与轮回亲本相比、测交组合抗性与对应杂交稻组合相比都有了较大提高。随着转育回交世代的增加,抗性增强得越明显。研究表明通过回交转育方法将外源溶菌酶基因导入杂交稻亲本是选育抗稻瘟病杂交稻新组合的一条简便有效的途径。

关键词: 杂交稻; 溶菌酶基因; 稻瘟病; 抗性; 回交; 育种

中图分类号: Q943.1; S332.2; S511.034

文献标识码: A

文章编号: 1001-7216(2006)02-0147-06

稻瘟病 (*Pyricularia oryzae* Cavara) 由子囊菌 *Magnaporthe grisea* (Hebert) Barr [其无性世代为 *Pyricularia grisea* (Cooke) Sacc.] 引起, 是水稻最主要的真菌病害之一, 广泛分布于世界各个水稻产区<sup>[1]</sup>。据统计, 1975 - 1990年由稻瘟病菌引起的全球粮食损失高达1.57亿t, 年平均超过1000万t<sup>[2]</sup>。日本1953 - 1960年间, 因稻瘟病造成水稻年产量损失占总产量的1.4% ~ 7.3%<sup>[3]</sup>, 2001年又有报道, 日本因稻瘟病年产量损失占总产量的0.5% ~ 5.6%<sup>[4]</sup>。20世纪90年代以来, 中国稻瘟病年平均发生面积在380万hm<sup>2</sup>以上, 年损失稻谷达数亿kg<sup>[5]</sup>。因此, 稻瘟病分布的广泛性、危害的严重性是显而易见的。

生物技术的发展为水稻抗稻瘟病育种开辟了一条新的途径。自1988年首次获得转基因水稻以来<sup>[6]</sup>, 水稻转基因技术已获得突飞猛进的发展, 目

前已成功获得了籼稻、粳稻、爪哇稻的转基因品系。D2-1-2是中国科学院遗传与发育生物学研究所采用基因枪法将外源溶菌酶基因(由德国Bayer公司Hain博士提供)转化到粳稻中花9号中, 并经过连续5年田间选育和抗病试验获得的T<sub>7</sub>代转基因纯合新品系<sup>[7]</sup>。但由于中花9号是生产上很少使用的粳稻品种, 因此制约了这一材料在生产上的直接应用。

针对目前部分优良杂交稻在生产上抗稻瘟病能力差的问题, 本研究以上述转溶菌酶基因的D2-1-2为外源基因供体, 分别与几个籼型杂交稻亲本进行

收稿日期: 2005-04-05; 修改稿收到日期: 2005-10-13。

基金项目: 湖南省教育厅科学研究重点资助项目(03A016); 教育部科学研究重点资助项目(204016); 湖南省农大科技专项子项目(04NK1002)。

第一作者简介: 易自力(1959-), 男, 博士, 教授。

杂交和多代回交转育,并对转育后代和测交组合进行了稻瘟病抗性鉴定,旨在为最终选育出新的高抗稻瘟病转基因籼型杂交稻亲本及其组合提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 水稻材料

粳稻中花 9 号[ZH9(CK)]及其转溶菌酶基因品系 D2-12[ZH9(R)],由中国科学院遗传与发育生物学研究所储成才研究员提供。籼型杂交稻组合汕优 63 的恢复系明恢 63(MH63) 籼型杂交稻组合两优培九的恢复系 9311 和不育系培矮 64S (PA64S),由湖南农业大学水稻研究所陈立云研究员提供。

#### 1.1.2 供试稻瘟病菌菌株

供试稻瘟病菌菌株为湖南省代表性菌株的混合菌种,由湖南农业大学生物安全科技学院黎定军教授、罗宽教授提供。

#### 1.1.3 分子生物学试剂

用于 PCR 的试剂:10 mmol/L dNTP Mix 购自 Bebeco 公司;10 × PCR buffer、25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 和 Taq DNA Polymerase 均购自 Fermentase 公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 杂交及回交转育

以 MH63、9311、PA64S 等杂交稻亲本为母本分别与 ZH9(R)杂交获得 F<sub>1</sub> 代,再以杂交稻亲本为轮回亲本连续与 F<sub>1</sub> 回交获得 BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> 代、BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> 代……,依次类推。为防止外源溶菌酶基因在回交过程中丢失,开花前对每一回交世代的分离群体进行 PCR 检测,结合田间筛选,从中选择与亲本外观形状相似的转基因阳性株再与轮回亲本连续回交;或连续自交纯合;或进行测交配组。

### 1.2.2 转育后代植株的 PCR 分析

微量 DNA 提取方法采用 SDS 法<sup>[8]</sup>。根据溶菌酶基因序列设计一对特异 PCR 引物,分别为 L1: 5- ATACGCGTCCCAAGTGTCAGTTCT-3 和 L2: 5- CGTATAGATGAACGTCTTAGAG-3,其 PCR 产物长度为 462 bp,引物由北京奥科生物技术有限责任公司合成。PCR 反应条件为:94 °C 下预变性 2 min,94 °C 下 100 s,53 °C 下 2 min,72 °C 下 2 min,40 个循环;72 °C 下延伸 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离和 EB 染色后在紫外透射仪下观察。

### 1.2.3 稻瘟病的抗性鉴定

2003 年和 2004 年将回交转育后代和测交组合植株分别栽种于湖南省浏阳市道吾山自然发病病圃和湖南省桃江县高桥镇梅水洞村谭家湾病圃中,病圃所设地常年多雨寡照、雾浓露重,适合于稻瘟病菌繁殖。每个待鉴定株系由 80 株(8 行 × 10 株)组成一个小病圃,由 5 ~ 8 个小病圃组成一厢,株行距为 13.3 cm × 20.0 cm,单本种植。大田周围及厢间走道旁种植培两优 288 和湘早籼 7 号作为诱发品种,厢间走道宽 40 cm。其田间管理按当地丰产田标准防虫、除草,但不使用任何杀菌剂。全生育期不断水,不晒田,根据具体情况增施氮肥,以便创造更好的发病条件。

采用自然诱发和人工喷雾接种稻瘟病菌相结合的方法进行抗病性鉴定。2003 年鉴定的转育后代是 9311/ZH9 (R) 的 BC<sub>3</sub>F<sub>1</sub> (B<sub>3</sub>9311)、BC<sub>2</sub>F<sub>2</sub> (B<sub>2</sub>F<sub>2</sub>9311),MH63/ZH9(R)的 BC<sub>3</sub>F<sub>1</sub> (B<sub>3</sub>MH63)、BC<sub>2</sub>F<sub>2</sub> (B<sub>2</sub>F<sub>2</sub>MH63),PA64S/ZH9 (R) 的 BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> (B<sub>2</sub>PA64S)、BC<sub>1</sub>F<sub>2</sub> (B<sub>1</sub>F<sub>2</sub>PA64S),以及珍汕 97A/B<sub>2</sub>MH63、B<sub>2</sub>PA64S/B<sub>2</sub>9311 两个测交组合;2004 年鉴定的是 2003 年的进一步回交和自交的后代,即 9311/ZH9 (R) 的 B<sub>4</sub>9311、B<sub>3</sub>F<sub>2</sub>9311、B<sub>2</sub>F<sub>3</sub>9311, MH63/ZH9 (R) 的后代 B<sub>4</sub>MH63、B<sub>3</sub>F<sub>2</sub>MH63、B<sub>2</sub>F<sub>3</sub>MH63, PA64S/ZH9 (R) 的后代 B<sub>3</sub>PA64S、B<sub>1</sub>F<sub>3</sub>PA64S,以及测交组合珍汕 97A/B<sub>3</sub>MH63、B<sub>2</sub>PA64S/B<sub>3</sub>9311。

使用燕麦片培养基对湖南省主要稻瘟病致病菌株混合菌种进行培养,配方为寿牌燕麦片[恩麦食品(深圳)有限公司销售]20 g/L,琼脂 15 g/L。将燕麦片 20 g 加适量蒸馏水放于微波炉中煮成粘粥状,用两层干净纱布过滤,将滤汁加入到已溶解的琼脂中,用蒸馏水定容至 1 L 后高温高压(温度 121 ~ 126 °C,压力 0.10 ~ 0.15 MPa)灭菌。将灭菌后的培养基冷却至约 60 °C 在超净工作台上倒平板,待平板冷却后立即接种菌株。之后,将平板倒置在 26 °C、黑暗条件下培养 10 d,待菌丝基本长满整个培养皿时,再在相同的温度条件下将平板正置放于光照培养箱中培养 4 d,使其充分产孢。接种时菌液浓度为 10 × 10<sup>6</sup> 倍显微镜视野下 30 个孢子以上。在水稻破口期至齐穗期使用喷雾器喷雾接种,接种量以所有叶片上布满孢子液为限,之后每天喷水 1 ~ 2 次,持续 1 周。

### 1.2.4 调查方法与数据处理

稻瘟病主要有苗瘟、叶瘟、穗瘟等类型,其中以

穗瘟的危害最大。因为转育后代植株的苗瘟和叶瘟发病较轻,80%以上植株病级都在0~3级,故本研究主要作了抗穗瘟的鉴定和统计。在水稻黄熟期调查各株系穗颈瘟发生情况,对每个品种在每个世代随机抽取株穗进行调查,采取5点取样法,每点调查5丛,设5个重复,病情按国际统一的穗颈瘟标准记载病级,计算病情指数和发病率,一般以发病0~3级穗数占考察总穗数的比例评价抗感类型<sup>[9]</sup>。发病0~3级穗数占鉴定总穗数的80%以上表示抗(R),60%~79%表示中抗(MR),40%~59%表示中感(MS),40%以下表示感(S)。病情指数 =  $100 \times \frac{\sum(\text{各级代表值} \times \text{各级发病穗数})}{\text{调查总穗数} \times \text{最高级代表值}}$ ; 发病率 =  $100 \times \frac{\sum(\text{各级发病率} \times \text{各级发病穗数})}{\text{调查总穗数} \times \text{最高级发病率}}$ 。

1.2.5 数据分析

采用 SPSS 10.0 进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 转育后代的 PCR 分析

提取转育回交后代植株 B<sub>3</sub>9311、B<sub>3</sub>MH63、B<sub>2</sub>PA64S和转育回交自交后代植株 B<sub>2</sub>F<sub>2</sub>9311、B<sub>2</sub>F<sub>2</sub>MH63、B<sub>1</sub>F<sub>2</sub>PA64S的DNA,以溶菌酶基因重组质粒、ZH9(R)、9311/ZH9(R)、MH63/ZH9(R)、PA64S/ZH9(R) F<sub>1</sub>代杂合体为阳性对照,ZH9(CK)和对应的轮回亲本为阴性对照进行外源溶菌酶基因的PCR检测。

检测结果如图1和表1所示。经<sup>2</sup>测验,各转育后代的回交群体(BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub>和BC<sub>3</sub>F<sub>1</sub>)中阳性株与非阳性株的分离比为1:1,而回交后自交群体(BC<sub>1</sub>F<sub>2</sub>和BC<sub>2</sub>F<sub>2</sub>)中分离比为3:1,均符合1对等位基因的孟德尔分离规律,表明外源溶菌酶基因是作为单拷贝的显性基因稳定传递给后代的。

2.2 稻瘟病抗性鉴定

2.2.1 2003年和2004年ZH9(R)转育后代的抗稻瘟病鉴定

在2003年和2004年对ZH9(R)的转育后代进行了抗稻瘟病鉴定,为了准确鉴定这些转育品种的抗稻瘟病能力,这两年分别将病圃设在了不同的地方,再加上不同年份两地的气候也有一些差异,所以发病状况也不一样,因此每年在每个病圃都种了亲本、ZH9(CK)和ZH9(R)作为对照。2003年,ZH9(CK)发病率为78.35%,病情指数为87.12,调查1236穗,发病0~3级穗数仅占6.88%,明显感病(S);ZH9(R)的发病率为1.15,病情指数为2.96,调查1182穗,病级都在0~3级,明显抗病(R)。9311、MH63和PA64S各转育世代都有不同程度的发病,病级都在0~7级。B<sub>3</sub>9311和B<sub>2</sub>F<sub>2</sub>9311的0~3级穗数分别占调查总穗数的69.72%和69.78%;B<sub>3</sub>MH63和B<sub>2</sub>F<sub>2</sub>MH63的0~3级穗数分别占调查总穗数的65.11%和64.73%,抗性都在中抗(MR)水平。B<sub>2</sub>PA64S和B<sub>1</sub>F<sub>2</sub>PA64S的0~3级穗数分别占调查总穗数的50.08%和49.30%,属

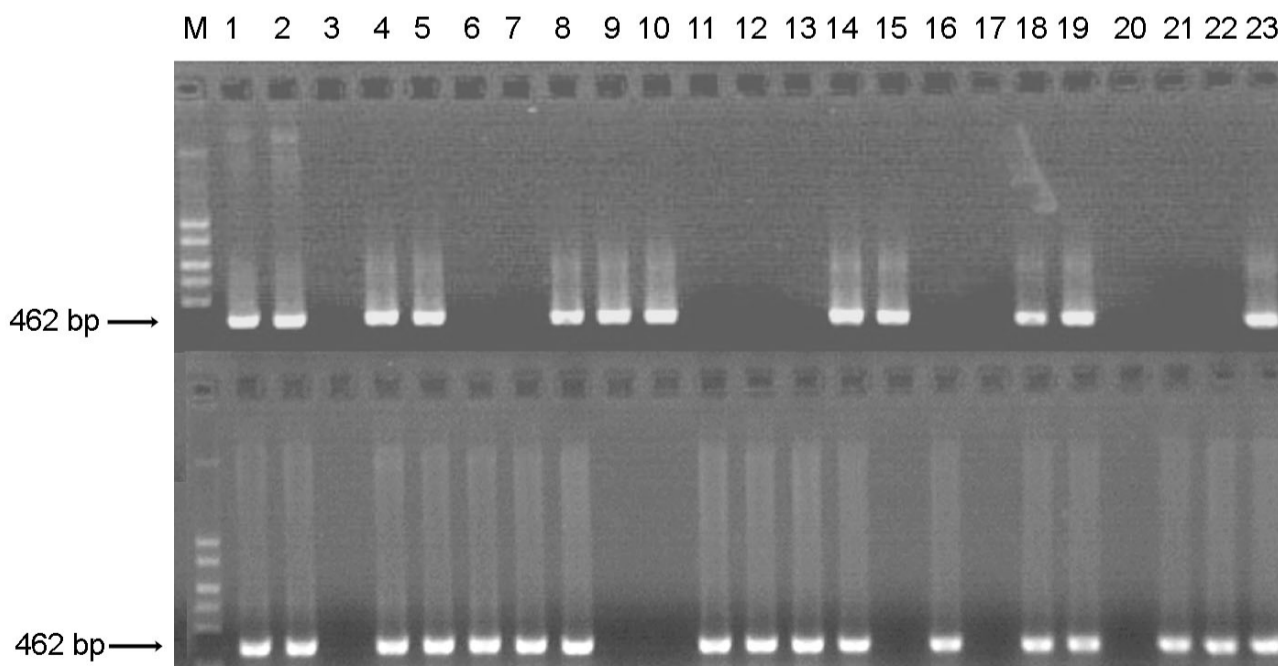


图1 部分转育后代溶菌酶基因PCR检测结果

Fig.1 . PCR identification of foreign lysozyme gene in transferred progenies .

上:回交转育后代。1 - 质粒DNA;2 - ZH9(R);3 - ZH9(CK);4 - 9311/ZH9(R);5 - MH63/ZH9(R);6 - 9311;7 - MH63;8~21 - 回交转育后代植株;22 - PA64S;23 - PA64S/ZH9(R)。

下:转育回交后自交后代。1 - 质粒DNA;2 - ZH9(R);3 - 9311;4~23 - 回交后自交转育后代植株。

Above: Backcross progenies. Lane 1, Plasmid; Lane 2, ZH9(R); Lane 3, ZH9(CK); Lane 4, 9311/ZH9(R); Lane 5, MH63/ZH9(R); Lane 6, 9311; Lane 7, MH63; Lanes 8 to 21, Backcross progenies; Lane 22, PA64S; Lane 23, PA64S/ZH9(R).

Below: Inbred progenies after backcross. Lane 1, Plasmid; Lane 2, ZH9(R); Lane 3, 9311; Lane 4 to 23, Inbred progenies after backcross.

表 1 回交及自交后代植株中溶菌酶基因的分离

Table 1 Segregation of foreign lysozyme gene in backcross and inbred generations after backcross .

转育世代 Generation	检测株数 No . of tested plants	阳性株数 No . of positive plants	阴性株数 No . of negative plants	<sup>2</sup>	P 值 P value
B <sub>3</sub> 9311	166	80	86	0 .151 (1 1)	0 .50 ~ 0 .75
B <sub>3</sub> MH63	254	129	125	0 .035 (1 1)	0 .75 ~ 0 .90
B <sub>2</sub> PA64S	125	65	60	0 .128 (1 1)	0 .50 ~ 0 .75
B <sub>2</sub> F <sub>2</sub> 9311	381	284	97	0 .022 (3 1)	0 .75 ~ 0 .90
B <sub>2</sub> F <sub>2</sub> MH63	241	183	58	0 .068 (3 1)	0 .75 ~ 0 .90
B <sub>1</sub> F <sub>2</sub> PA64S	169	129	40	0 .097 (3 1)	0 .75 ~ 0 .90
合计 Total	1336	870	466		

表 2 2003 年和 2004 年 ZH9(R) 转育后代稻瘟病病情状况

Table 2 Occurrence of rice blast disease on backcross or inbred generations transferred from ZH9(R) in 2003 and 2004 .

品种世代 Variety or generation	调查穗数 No . of panicles	0 ~ 3 级穗数 No . of panicles with disease grades 0 to 3	发病率 Disease ( $\bar{x} \pm SD$ ) / %	t 值 t value	病情指数 Disease index ( $\bar{x} \pm SD$ )	t 值 t value
2003						
9311(CK)	1168	736	15 .50 ± 0 .72	-	31 .35 ± 1 .55	-
B <sub>3</sub> 9311	1070	746	14 .11 ± 0 .96	1 .940	29 .44 ± 1 .75	1 .374
B <sub>2</sub> F <sub>2</sub> 9311	1264	882	13 .89 ± 0 .57	3 .230*	28 .05 ± 0 .95	3 .238*
MH63(CK)	1293	818	16 .17 ± 0 .87	-	33 .48 ± 1 .49	-
B <sub>3</sub> MH63	1281	834	14 .23 ± 0 .79	4 .355*	29 .42 ± 1 .36	4 .880**
B <sub>2</sub> F <sub>2</sub> MH63	1293	837	14 .62 ± 0 .70	2 .370	30 .00 ± 1 .39	2 .891*
PA64S(CK)	1306	630	22 .26 ± 0 .90	-	43 .73 ± 1 .14	-
B <sub>2</sub> PA64S	1228	615	21 .34 ± 1 .37	1 .135	42 .16 ± 1 .84	1 .390
B <sub>1</sub> F <sub>2</sub> PA64S	1207	595	21 .80 ± 1 .12	0 .604	42 .81 ± 1 .67	0 .905
2004						
9311(CK)	1329	390	33 .41 ± 3 .58	-	57 .38 ± 2 .29	-
B <sub>4</sub> 9311	1232	678	19 .49 ± 2 .13	8 .689**	45 .81 ± 2 .32	9 .928**
B <sub>3</sub> F <sub>2</sub> 9311	1379	394	20 .53 ± 1 .96	7 .125**	48 .43 ± 2 .82	5 .201**
B <sub>2</sub> F <sub>3</sub> 9311	1325	508	23 .76 ± 6 .98	2 .641	48 .96 ± 7 .69	2 .336
MH63(CK)	1299	715	21 .47 ± 1 .49	-	41 .72 ± 1 .15	-
B <sub>4</sub> MH63	1276	1026	10 .37 ± 0 .62	13 .719**	26 .89 ± 1 .27	14 .579**
B <sub>3</sub> F <sub>2</sub> MH63	1403	1071	13 .18 ± 1 .45	9 .163**	29 .28 ± 2 .10	13 .867**
B <sub>2</sub> F <sub>3</sub> MH63	1305	901	19 .36 ± 0 .87	2 .079	34 .06 ± 1 .61	6 .849**
PA64S(CK)	1171	233	45 .31 ± 3 .69	-	67 .58 ± 2 .89	-
B <sub>3</sub> PA64S	1208	428	37 .18 ± 4 .14	2 .563	56 .81 ± 2 .38	5 .191**
B <sub>1</sub> F <sub>3</sub> PA64S	1163	390	44 .29 ± 2 .93	0 .386	60 .65 ± 1 .82	3 .617**

\* , \*\* 表示与 CK 的差异分别达  $P < 0 .05$  和  $P < 0 .01$  显著水平。

\* , \*\* indicate significant difference comparing with CK at  $P < 0 .05$  and  $P < 0 .01$  levels .

于中感 (MS)。从表 2 可看出 , 虽然 B<sub>3</sub>9311 和 B<sub>2</sub> F<sub>2</sub> 9311 的发病率和病情指数都要比轮回亲本 9311 低 , 但  $t$  测验表明 , 只有 B<sub>2</sub> F<sub>2</sub> 9311 的发病率和病情指数与 9311(CK) 有显著差异。同样从发病率和病情指数来看 , MH63 和 PA64S 的转育后代在抗病能力上都比对应的亲本有所提高 , 统计分析结果表明 , B<sub>3</sub> MH63 的发病率与亲本有显著差异 , 病情指数与亲本有极显著差异 , B<sub>2</sub> F<sub>2</sub> MH63 的发病率与亲本没有显著差异 , 但病情指数与亲本有显著差异。B<sub>2</sub> PA64S 和 B<sub>1</sub> F<sub>2</sub> PA64S 的发病率和病情指数与亲本都没有显著差异。

2004 年 , ZH9(CK) 的发病率为 86.15 , 病情指数为 91.96 , 调查 1165 穗 , 发病 0 ~ 3 级穗数仅占 3.35% , 明显感病 (S) ; ZH9(R) 的发病率为 1.22 , 病

情指数为 3.19 , 调查 1207 穗 , 病情都在 0 ~ 3 级 , 明显抗病 (R) 。9311、MH63 和 PA64S 各转育世代都有较大程度的发病。从调查情况来看 , B<sub>4</sub>9311 的发病病级都在 3 ~ 7 级 , 其中 0 ~ 3 级病穗占调查总穗数的 55.03% , 属于中感 (MS) ; B<sub>3</sub> F<sub>2</sub> 9311 虽然有部分未发病 , 但 3 ~ 7 级病穗数占调查总穗数的 98.19% , 其中 0 ~ 3 级病穗数占调查总穗数的 28.57% , B<sub>2</sub> F<sub>3</sub> 9311 除极个别穗子未发病之外 , 它的发病病级广泛分布于 1 ~ 9 级 , 0 ~ 3 级病穗数占调查总穗数的 38.34% , 后两者明显感病 (S) 。B<sub>3</sub> MH63、B<sub>3</sub> F<sub>2</sub> MH63 和 B<sub>2</sub> F<sub>3</sub> MH63 的未发病穗比 9311 的转育后代明显多 , B<sub>4</sub> MH63 没有 7 ~ 9 级病穗 , 其中 0 ~ 3 级病穗数占调查总穗数的 80.41% , 明显达到抗 (R) 水平 ; B<sub>3</sub> F<sub>2</sub> MH63 没有 9 级病穗 , 其

表3 2003年和2004年测交组合与对应杂交组合的稻瘟病病情调查

Table 3. Rice blast disease survey of testcross combinations and their corresponding hybrid combinations in the year of 2003 and 2004.

组合 Combination	调查穗数	发病0~3级穗数	发病率	t值 tvalue	病情指数	t值 tvalue
	No. of panicles surveyed	No. of panicles with disease grades 0 to 3	Disease (平均+SD) /%		Disease index (平均+SD)	
两优培九 Liangyoupeijiu (PA64S/9311)	1263	653	22.97±1.07	-	37.25±1.05	-
B <sub>2</sub> PA64S/B <sub>2</sub> 9311	1260	716	21.75±0.93	1.381	34.86±1.31	2.316
汕优63 Shanyou 63 (Zhenshan 97A/MH63)	1196	637	21.39±1.37	-	36.23±2.19	-
珍汕97A/B <sub>2</sub> MH63 Zhenshan 97A/B <sub>2</sub> MH63	1237	709	19.89±0.80	1.983	34.13±1.28	1.495
两优培九 Liangyoupeijiu (PA64S/9311)	1297	570	26.60±1.89	-	45.19±2.09	-
B <sub>2</sub> PA64S/B <sub>3</sub> 9311	1261	643	24.35±2.38	2.391	38.61±1.80	5.713**
汕优63 Shanyou 63 (Zhenshan 97A/MH63)	1326	609	26.13±0.92	-	41.89±1.81	-
珍汕97A/B <sub>3</sub> MH63 Zhenshan 97A/B <sub>3</sub> MH63	1381	736	21.61±2.67	3.189*	37.53±3.12	2.483

\* , \*\* 表示与CK的差异分别达  $P < 0.05$  和  $P < 0.01$  显著水平。

\* , \*\* indicate significant difference comparing with CK at  $P < 0.05$  and  $P < 0.01$  levels.

中0~3级病穗数占调查总穗数的76.34%,中抗(MR);B<sub>2</sub>F<sub>3</sub>MH63的病级在0~9级,其中0~3级病穗数占调查总穗数的数的69.04%,也在中抗(MR)水平;B<sub>3</sub>PA64S和B<sub>1</sub>F<sub>3</sub>PA64S的发病0~3级穗数分别占调查总穗数的35.43%和33.53%,属于感病(S)水平。从表2可看出,虽然9311各转育后代都属于中感或感病水平,但与亲本相比抗性仍有明显增强,MH63和PA64S各转育世代抗病能力也都比亲本强。 $t$ 测验表明:除B<sub>2</sub>F<sub>3</sub>9311的发病率和病情指数与9311没有显著差异外,B<sub>4</sub>9311和B<sub>3</sub>F<sub>2</sub>9311的发病率和病情指数都与亲本有极显著差异。对于MH63的转育后代,除B<sub>2</sub>F<sub>3</sub>MH63的发病率与MH63没有显著差异外,B<sub>4</sub>MH63和B<sub>3</sub>F<sub>2</sub>MH63的发病率和病情指数、B<sub>2</sub>F<sub>3</sub>MH63的病情指数都与亲本有极显著差异。与上述两种品种相比,PA64S的转育后代的抗病能力要弱一点。B<sub>3</sub>PA64S和B<sub>3</sub>F<sub>1</sub>PA64S的病情指数与PA64S分别有显著差异和极显著差异,但发病率都与亲本没有显著差异。

从总体上看,2004年的病情比2003年严重,这主要是由于天气状况造成的,因为2003年8月上旬水稻破口期时高温不断,直到将近齐穗期时才出现连绵不断的阴雨天,所以部分植株没有充分感病,病情比2004年轻。ZH9(R)的抗病效果十分明显,两年所有植株发病都在0~3级,很明显高抗稻瘟病。2003年0级(未发病)穗数占调查总穗数的81.13%,2004年0级(未发病)穗数占调查总穗数的80.20%,且两年发病率都在2%以下,病情指数在3.5以下。从表2可知,2003年,当回交和自交世代相对较低时,与对应亲本相比较,发病率和病情指数的差异比较小,到2004年,当回交世代增加时,抗病能力的提高表现得较为明显。

## 2.2.2 测交组合抗病性鉴定

2003年和2004年调查的各组合及测交组合的

发病病级都在0~9级,由表3可知,2004年的病情明显比2003年严重,但发病0~3级穗数占调查总穗数的百分比都在40%~59%,属于中感(MS)水平。具体来说,2003年,B<sub>2</sub>PA64S/B<sub>2</sub>9311和珍汕97A/B<sub>2</sub>MH63的发病率和病情指数与对照组合都没有显著差异;发病0~3级穗数分别占调查总穗数的56.83%和57.32%。2004年,B<sub>2</sub>PA64S/B<sub>3</sub>9311的0~3级病穗数占调查总穗数的50.99%,其病情指数与两优培九有极显著差异;珍汕97A/B<sub>3</sub>MH63的0~3级病穗数占调查总穗数的53.29%,其发病率与汕优63有显著差异。

## 3 讨论

### 3.1 溶菌酶基因的回交转育

抗源是稻瘟病抗性育种的物质基础,由于稻瘟病菌小种变化复杂及抗源缺乏等因素,因此通过常规育种途径选育具有广谱高抗的新品种比较困难。而植物基因工程为解决稻瘟病抗源缺乏问题提供了一个较好的平台。

溶菌酶是一个广泛分布的酶家族,并且具有几丁质酶的活力,能够分解细菌或真菌细胞壁组分中多糖的-1,4糖苷键,从而抵制病原菌的侵染。D ring等<sup>[10]</sup>将来自T4噬菌体的溶菌酶基因导入马铃薯,可以增强马铃薯抵抗胡萝卜欧氏杆菌(*Erwinia carotovora*)引起的病害。Nakajima等<sup>[11]</sup>、Trudel等<sup>[12]</sup>分别将鸡蛋清溶菌酶基因和人溶菌酶基因导入烟草,其转基因植株对病原细菌和真菌都表现出抗性。许明辉等<sup>[13]</sup>将T4噬菌体的溶菌酶基因导入水稻品种南29,稻瘟病菌初步接种和大田选育试验表明,转基因材料较受体对照具有明显的抗性。本研究以转基因水稻中花9号为溶菌酶基因的供体,恢复系9311和明恢63、不育系培矮64S为轮回亲本,通过回交转育将溶菌酶基因转移到超级稻亲本中。经分子检测证实部分转育后代中已导入



了外源溶菌酶基因。这一结果表明,对于一些已经获得外源目的基因的转基因材料,通过回交将目标基因转育到其他优良水稻品种中,不失为培育具有转基因目标性状的水稻新品种的一条有效途径。因此,将基因工程技术与常规育种技术相结合,可大大加快转基因目标性状水稻新品种的选育,最大限度地发挥转基因水稻在育种上的利用价值。

### 3.2 影响稻瘟病抗性鉴定效果的因素

稻瘟病在水稻各生育期危害地上各部分,受环境条件、病菌致病性、品种布局等诸多因素影响。不同地区之间稻瘟菌的群体差异非常明显<sup>[14]</sup>,病情复杂多变,准确鉴定即将大面积推广种植的水稻新品种,必须经 2~3 年不同生育期、不同生态环境条件下的系统鉴定,才能做出较切合实际的抗性评价。因此,菌种接种时间、接种方法、水稻的生长阶段、农田小气候以及水稻的基因型(纯合或杂合)等对鉴定结果都有很大的影响。湖南省稻瘟病流行主要在夏季的 6~8 月,长时间的高温突遇低温(5~7 d)加高湿条件,常常导致稻瘟病爆发成灾。毛建辉等<sup>[15]</sup>研究发现持续低温(20℃)处理 3~5 d 对稻瘟病的发生最为有利。本研究在 2003 年和 2004 年将转育后代分别种植于不同的病圃中,2003 年 8 月中旬抽穗后期才出现气温较低且阴雨连绵天气,因此穗颈瘟发病较迟。2004 年水稻破口期至齐穗期天气温度低、湿度大,所以发病非常明显。

在进行抗病鉴定时,特别是在大量地鉴定育种亲本或早代材料时,用单一菌株逐一接种工作量太大。何月秋等<sup>[16]</sup>研究表明在抗病鉴定中用混合菌株接种是可取的。本研究中采用湖南省致病力较强的主要菌种混合接种,效果明显,各鉴定株系基本都发病,转育后代和测交组合病情明显比对照亲本和组合轻,说明抗病基因已导入部分单株。但不同品种之间抗病效果不一样,虽然 2003 年部分转育后代表现出一定的抗性,但因为感病不完全,所以两年都设了亲本作对照,结果表明 2004 年各转育后代抗性比 2003 年的强。2003 年和 2004 年 9311 和 MH63 的转育后代抗病能力都比 PA64S 的转育后代强,这可能是 9311 和 MH63 的回交世代抗病能力比 PA64S 高的原因,但 2004 年 MH63 的转育后代抗病能力明显比 9311 的转育后代强,所以这可能又与亲本之间本身的抗病能力存在差异有关,因为亲本的发病率和病情指数以 PA64S 最高,9311 次之, MH63 最低。同一品种不同世代的抗病性也有一定的差异,如 9311 的转育后代,2003 年 B<sub>2</sub>F<sub>2</sub> 代比 B<sub>3</sub> 代稍强,2004 年 B<sub>4</sub>、B<sub>3</sub>F<sub>2</sub> 代比 B<sub>2</sub>F<sub>3</sub> 代强;MH63

和 PA64S 的转育后代在 2003 年差异不太明显,但 2004 年 B<sub>4</sub>、B<sub>3</sub>F<sub>2</sub> 代的抗病能力明显比 B<sub>2</sub>F<sub>3</sub> 代强;2004 年的 B<sub>3</sub>F<sub>1</sub>PA64S 抗病能力比 B<sub>1</sub>F<sub>3</sub>PA64S 稍强,很明显总趋势是回交世代高的抗病越强。不同回交世代 F<sub>3</sub> 抗性比 F<sub>2</sub> 和 F<sub>1</sub> 弱,那么相同回交世代条件下是否会有不同的结果还有待研究。本试验只将回交代作了测交,虽然测交组合与对照杂交组合相比抗病性有很大提高,但回交自交代所配测交组合是否会有更强的抗病性还有待进一步研究。

谢辞: 特别感谢中国科学院遗传与发育生物学研究所储成才研究员、湖南农业大学水稻研究所陈立云研究员和湖南农业大学生物安全科技学院黎定军教授、罗宽教授为本研究提供了部分试验材料。

### 参考文献:

- [1] Ou S H. Rice Disease. Farnham Royal, UK: Commonwealth Agricultural Bureaux, 1985.
- [2] Baker B, Zambryski P, Staskawicz B, et al. Signaling in plant-microbe interactions. *Crop Sci*, 1997, 27(6): 726-733.
- [3] 周光召. 面向 21 世纪的科技与社会经济发展. 北京: 中国科技出版社, 1999: 522.
- [4] Koizumi S. Rice blast control with multilines in Japan // Mew T W, Borromeo E, Hardy B. Exploiting Biodiversity for Sustainable Pest Management. Manila: International Rice Research Institute, 2001: 143-157.
- [5] 孙国昌, 杜新法, 陶荣祥, 等. 水稻稻瘟病防治策略和 21 世纪研究展望. 植物病理学报, 1998, 28(4): 289-292.
- [6] Toriyama K, Arimoto Y, Uchimiya H, et al. Transgenic rice plants after direct gene transfer into protoplasts. *Bio/Technology*, 1988, 6: 1072-1074.
- [7] 许明辉, 唐祚舜, 赵丰萍, 等. 抗生素 G418 胁迫条件下转基因水稻种子发芽特性及应用. 遗传, 2003, 25(1): 45-48.
- [8] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 2003: 134-178.
- [9] 周文通. 水稻品种稻瘟病鉴定抗性综合评价. 闽东农业科技, 1997(3): 27-28.
- [10] D ring K, Porsch P, Fladung M, et al. Transgenic potato plants resistant to the phytopathogenic bacterium *Erwinia carotovora*. *Plant J*, 1993, 4(3): 587-598.
- [11] Nakajima H, Muranaka T, Ishige F, et al. Fungal and bacterial disease resistance in transgenic plants expressing human lysozyme. *Plant Cell Rep*, 1997, 16: 674-679.
- [12] Trudel J, Potvin C, Asselin A. Secreted hen lysozyme in transgenic tobacco: recovery of bound enzyme and *in vitro* growth inhibition of plant pathogens. *Plant Sci*, 1995, 106: 55-62.
- [13] 许明辉, 李成云, 李进斌, 等. 转溶菌酶基因水稻稻瘟病抗谱分析. 中国农业科学, 2003, 36(4): 387-392.
- [14] 周益军, 白娟, 程兆榜, 等. 我国稻瘟病菌群体多样性研究. 中国水稻科学, 2004, 18(3): 277-280.
- [15] 毛建辉, 卢代华, 何明, 等. 持续低温对水稻稻瘟病抗性的影响. 植物保护学报, 1999, 26(2): 1-6.
- [16] 何月秋, Leung H, Robert S, 等. 水稻抗稻瘟病鉴定中几个相关问题的探讨. 云南农业大学学报, 2003, 18(3): 234-238.