

无抗性选择标记转 *API* 基因抗病水稻新品系的选育

于恒秀¹, 刘巧泉¹, 王玲^{1,2}, 赵志鹏¹, 徐丽¹, 黄奔立³, 龚志云¹, 汤述翥¹, 顾铭洪¹

(¹扬州大学教育部植物功能基因组学重点实验室, 扬州 225009; ²中国水稻研究所, 杭州 310006; ³扬州大学农学院植保系, 扬州 225009)

摘要: 为获得无任何抗生素抗性基因的抗病转基因水稻新品系, 将克隆自甜椒的两亲性蛋白 *API* 基因与潮霉素抗性选择标记基因 (*HPT*) 分别构建位于同一农杆菌二元载体上的两个独立的 T-DNA 区中, 并经农杆菌介导, 将其导入江苏省推广的两个粳稻品种广陵香粳和武香粳 9 号中, 获得了一批转基因水稻植株。PCR 和 Southern 杂交分析表明, *API* 基因和 *HPT* 基因已同时导入受体基因组中, 并从共转化植株的自交后代中筛选到了无 *HPT* 基因的转 *API* 基因水稻植株。结合田间农艺性状考察, 选育了多个无抗性选择标记基因的纯合转 *API* 基因水稻新品系; 抗病性鉴定结果表明, 转 *API* 基因水稻对稻白叶枯病的抗性与未转化对照相比有显著提高, 部分转基因水稻对纹枯病的抗性与未转化对照相比也有一定程度的提高。

关键词: 水稻; 抗病; *API* 基因; 无抗性选择标记; 白叶枯病; 纹枯病

Breeding of Selectable Marker-Free Transgenic Rice Lines Containing *API* Gene with Enhanced Disease Resistance

YU Heng-xiu¹, LIU Qiao-quan¹, WANG Ling^{1,2}, ZHAO Zhi-peng¹, XU Li¹, Huang Ben-li³,
GONG Zhi-yun¹, TANG Shu-zhu¹, GU Ming-hong¹

(¹ State Key Laboratory of Plant Functional Genomics of the Ministry of Education, Yangzhou University, Yangzhou 225009;

² China National Rice Research Institute, Hangzhou 310006; ³ Department of Plant Protection, Agricultural College, Yangzhou University, Yangzhou 225009)

Abstract: In order to obtain marker-free transgenic rice with improved disease resistance, the *API* gene of *Capsicum annuum* and hygromycin-resistance gene (*HPT*) were cloned into the two separate T-DNA regions of the binary vector pSB130, respectively, and introduced into the calli derived from immature seeds of two elite *Japonica* rice varieties, Guanglingxiangjing and Wuxiangjing 9, mediated by *Agrobacterium*-mediated transformation. Many co-transgenic rice lines, containing both the *API* gene and the marker gene, were regenerated, and the integration of both transgenes in the transgenic rice plants was confirmed by either PCR or Southern blotting technique. Several selectable-marker free transgenic rice plants were subsequently obtained from the progeny of the co-transformants, and confirmed by both PCR and Southern blotting analysis. These transgenic rice lines were tested in the field and their resistance to disease was carefully investigated, the results showed that after inoculation the resistance to either bacterial blight or sheath blight of the selected transgenic lines was improved when compared with those of wild type.

Key words: Rice (*Oryza sativa* L.); Disease resistance; *API* gene; Selectable marker-free; Bacterial leaf blight; Sheath blight

病害每年都给水稻生产带来较大的损失, 使用化学药剂虽然可以减轻病害造成的损失, 但是过多使用会带来病原物的抗性问题和严重的环境污染。因此, 合理有效地治理植物病害, 是农业可持续发展中必须

解决的重要问题之一。植物抗病分子生物学及遗传转化技术体系的不断发展和成熟, 为通过分子育种技术来提高水稻抗病性奠定了基础。已有多个水稻抗病性基因被克隆, 如抗稻瘟病 (*Magnaporthe grisea*) 的

收稿日期: 2005-05-20

基金项目: 国家植物转基因专项 (JY03-B-10)、国家自然科学基金项目 (30170567)、江苏省高新技术项目 (BG2002301) 和江苏省教委基金项目 (01KJB210003) 资助

作者简介: 于恒秀 (1966-), 女, 江苏灌南人, 副教授, 主要从事植物遗传育种研究。Tel: 0514-7979304; E-mail: hxyu@yzu.edu.cn。顾铭洪为通讯作者, Tel: 0514-7979304; E-mail: gumh@yzu.edu.cn

Pib^[1]与 *Pi-ta*^[2]基因和抗白叶枯病的 *Xa21*^[3]和 *Xa1*^[4]基因。但是,上述的抗性基因和其病原无毒基因的互作表现为品种对小种的专化性抗性,因此会因病原物小种的改变而易于丧失抗性。所以,基于抗性基因的抗病基因工程研究应着眼于创建非小种特异性(non-race specific)的抗性,以避免植物抗病性因病原菌群体生理小种的变化而被克服。克隆自甜椒 (*Capsicum annuum*)的编码两亲性蛋白基因(amphipathic protein, *API*),属植物抗病防卫基因,其编码的 *API* 蛋白为铁氧还蛋白(ferredoxin)类似物,可以延迟丁香假单胞菌(*Pseudomonas syringae* pv. *Syringae*)在非寄主植物上过敏反应的发生而使植物具有广谱的抗病性,对植物细菌性和真菌性病害都有一定的防治效果^[5]。

随着商业化种植转基因作物的不断增加,转基因作物潜在的环境与食用安全等问题,尤其是具有抗生素或除草剂抗性的标记基因在转基因作物中的存在已引起人们的广泛关注^[6]。因此,无任何抗性选择标记基因是目前培育转基因作物的重要前提之一。本研究利用农杆菌双 T-DNA 载体介导的共转化技术,将 *API* 基因与潮霉素抗性选择标记基因共转化入优良的粳稻品种广陵香粳和武香粳 9 号中,通过自交分离,在共转化水稻植株的自交后代中选育获得了无潮霉素抗性选择标记基因的转 *API* 基因水稻新品系。抗病性检测结果表明,转 *API* 基因水稻植株对白叶枯病的抗性与未转化对照相比有明显提高,部分转基因水稻对纹枯病的抗性也有一定程度提高。

1 材料与方法

1.1 水稻受体品种或亲本

本试验所用的水稻 (*Oryza sativa* L.) 受体品种为江苏省推广的粳稻品种广陵香粳和武香粳 9 号。

1.2 农杆菌菌株及质粒

携带有 *API* 基因的质粒 pBISAP1 由台湾省冯腾永教授提供,其中的 *API* cDNA 克隆自甜椒,全长

435 bp, 分别由 *CaMV* 35S 启动子和 *NOS* 终止子组成嵌合基因^[5]。含有两个 T-DNA 区的农杆菌双元载体 pSB130 由本室构建,其中一个 T-DNA 区含有由 *CaMV* 35S 启动子控制的潮霉素抗性基因 (*HPT*), 另一个 T-DNA 区含有一个质粒 pUC18 来源的多克隆位点 (Liu 等,待发表)。根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) 菌株 EHA105 由澳大利亚 Jefferson 教授提供。

1.3 含 *API* 基因的双 T-DNA 双元载体的构建

将质粒 pBISAP1 中 *Bam*HI 和 *Eco*RI 之间的 *API*-*NOS* 片段经双酶切切下并回收后,克隆入 pSB130 中一个 T-DNA 的相应酶切位点中,再在 *API* 编码区上游的 *Hind*III 和 *Bam*HI 酶切位点间克隆入玉米泛素 (*Ubiquitin*) 基因 2.0 kb 长的 5'上游调控区序列(包括启动子区及其第 1 内含子区序列,简称 *Ubi* 启动子),即构建成含有 *Ubi*-*API*-*NOS* 嵌合基因的双 T-DNA 区双元载体 pSBAP1,其中两个 T-DNA 区的结构见图 1。双元载体 pSBAP1 经冻融法^[7]导入根癌农杆菌菌株 EHA105 感受态细胞中。

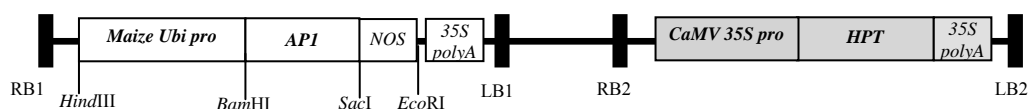
1.4 农杆菌介导的水稻转化

取开花后 12 d 左右的水稻未成熟胚诱导愈伤组织,并用于随后的转化。水稻愈伤组织的诱导培养及其与农杆菌的浸染、抗性愈伤组织的筛选及其再生等同刘巧泉等^[8]和于恒秀等^[9]的方法进行。

1.5 PCR 分析

1.5.1 潮霉素抗性基因 DNA 片段的 PCR 扩增 PCR 引物分别为 HP1 (5'-GCT GTT ATG CGG CCA TTG TC -3') 与 HP2 (5'-GAC GTC TGT CGA GAA GTT TC-3'), 可从潮霉素抗性基因编码区扩增出 614 bp 的 DNA 片段。反应条件: 94°C, 3 min; 94°C, 50 s; 55°C, 50 s; 72°C, 50 s; 30 个循环; 72°C, 10 min。

1.5.2 *API* 基因 DNA 片段的 PCR 扩增 PCR 引物分别为 *API*-1 (5'-ATGGCTAGTTGTCTCAGCTAC-3') 与 *API*-2 (5'-TTAGCCCACGAGTTCTGCCT-3'), 可扩增出 435 bp 的 DNA 片段。反应条件: 94°C, 3 min;



Ubi. 玉米泛素基因启动子和它的第一内含子; *NOS*. 胭脂碱合成酶基因的终止子; *HPT*. 潮霉素抗性基因; RB 和 LB. T-DNA 区的左边界和右边界
Ubi. maize Ubiquitin promoter and its first intron; *NOS*. terminator of *NOS* synthase gene; *HPT*. hygromycin resistant gene. RB and LB. the right and left border of T-DNA region

图 1 含 *API* 嵌合基因的双 T-DNA 双元载体 pSBAP1 的 T-DNA 区结构

Fig.1 The structure of T-DNAs' region in twin T-DNAs binary vector pSBAP1

94℃, 1 min; 58℃, 55 s; 72℃, 50 s; 30 个循环; 72℃, 10 min。

1.6 转基因水稻植株总 DNA 的 Southern 杂交分析

水稻植株叶片中总 DNA 的提取参考 Murray 等^[10]的方法。Southern 杂交分析时, 取 10 μg 水稻叶片总 DNA 经限制性内切酶消化, 0.8% 凝胶电泳分离; 用毛细管法将 DNA 转移至尼龙膜上, 分别以 α-³²P 标记的 *API* 基因编码区序列或 *HPT* 基因编码区序列作为探针进行杂交, 杂交后在 65℃ 条件下, 分别在加有 1% SDS 的 2×SSC 和加有 0.1% SDS 的 0.1×SSC 中洗 10 min, 然后放射自显影。

1.7 白叶枯病抗性鉴定

水稻植株对白叶枯病的抗性检测采用成株期剪叶接种法。首先将白叶枯病菌 Ks-1-20 (由扬州大学植物保护系提供) 移植在协本氏培养基 (马铃薯 300 g, NaH₂PO₄ 2 g, Ca(NO₃)₂ 0.5 g, 蛋白胨 5 g, 蔗糖 15 g, 琼脂 20 g) 上, 于 28℃ 下培养 48 h 后用无菌水洗下菌液, 配置成 3×10⁸ cfu/ml 的细胞悬浮液, 剪叶接种水稻剑叶, 21 d 后按白叶枯病病情分级标准调查发病情况, 并分级记载。白叶枯病病情分级标准为, 0 级: 剪口下无病斑 (高抗); 1 级: 剪口下有很小病斑, 很少向下延伸, 长度不超过 2~3 cm (抗病); 3 级: 病斑向下扩展 3 cm 以上, 病斑占剩余面积的 1/4 以下 (中抗); 5 级: 病斑占剩余面积的 1/2 左右 (中感); 7 级: 病斑占剩余面积的 3/4 左右 (感病); 9 级: 全叶发病, 有时叶鞘也有病斑 (高感)。每个品系接种检测 20 株, 取平均值。

1.8 纹枯病抗性鉴定

将供试纹枯病菌株 (由扬州大学植物保护系提供) 移至浸有牙签的 PSA 液体培养基上, 25~28℃ 下培养 96 h, 待菌丝长满整个培养皿时, 将长有菌丝的火柴梗插入孕穗期水稻基部倒 2 叶或倒 3 叶叶鞘内, 25 d 后调查发病情况。先测出接菌稻株的病斑扩展长度和该稻株本身的高度, 然后计算两者的比值 (病斑的扩展长度/接种稻株高度), 根据比值对照分级标准并记载。纹枯病分级标准的分级标准为, 抗病: 比值 ≤ 0.10; 中感: 0.10 < 比值 < 0.30; 高感: 比值 ≥ 0.30。每个品系中随机检测 5 株, 取平均值。

2 结果与分析

2.1 含 *API* 基因与 *HPT* 基因的共转化水稻植株的获得

以粳稻品种广陵香粳和武香粳 9 号的未成熟胚为起始培养材料, 诱导初生愈伤组织并用农杆菌 EHA

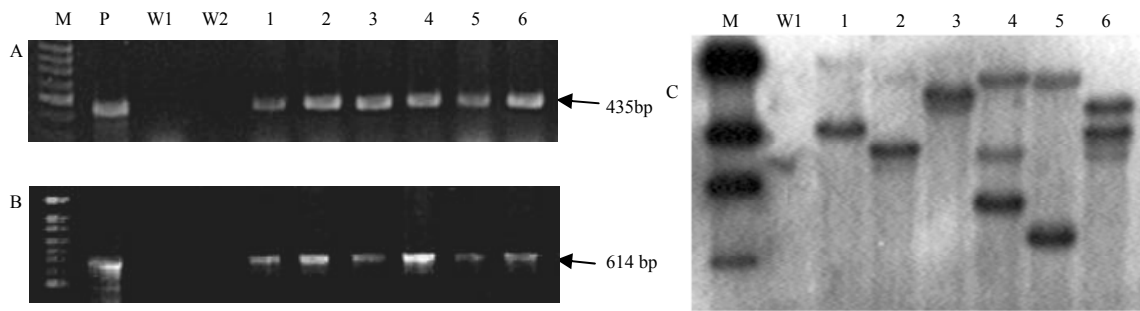
105/pSBAP1 侵染, 经侵染后的愈伤组织在共培养培养基上培养 3 d 后移至含潮霉素的筛选培养基中进行筛选培养, 经过 3 代约 6 周的选择培养, 即可获得生长良好的抗性愈伤组织, 将其转至分化培养基上分化成苗。最后在两个品种中分别获得了 56 和 14 个独立的转基因系, 两类转基因水稻植株分别以 A 和 B 标注。

为检测双 T-DNA 双元载体介导的 *API* 基因与 *HPT* 基因的共转化效率, 对获得的共转化植株分别进行 PCR 分析。从两个水稻品种来源的所有转化系中各选择 1 株提取叶片总 DNA, 用于 PCR 分析。结果在所有被检测的转基因水稻植株总 DNA 中均能特异地扩增出 *HPT* 基因片段, 与阳性对照 (以 pSBAP1 质粒 DNA 为模板) 相同, 而在未转化植株总 DNA 中没有扩增出相应的片段 (图 2-B)。进一步对各个转基因植株总 DNA 进行 *API* 基因的 PCR 分析。结果显示, 只在部分转化子中检测到 *API* 基因的存在 (图 2-A 中的 1-6 为 *API* 基因 PCR 均阳性的单株)。在水稻品种广陵香粳来源的 56 个转化子中, 有 15 个显示有 *API* 基因的整合, 即含有 *API* 基因的共转化频率为 26.8%; 而在武香粳 9 号的 14 个转化子中, 有 4 个表现为 *API* 基因的 PCR 阳性, 共转化率为 28.6%。

选取以上经 PCR 鉴定为含有 *API* 基因的转基因植株, 用 *EcoRI* 酶切其总 DNA, 以 α-³²P 标记的 *API* 基因编码区序列作探针进行 Southern 杂交分析, 结果见图 2-C。由图可知, 在 PCR 检测为 *API* 基因阳性的转基因水稻植株中, 均有特异的杂交条带出现, 而在未转化对照中未发现杂交信号, 说明 *API* 基因确已整合进了转基因水稻植株的基因组中。因在 *API* 基因及其与 T-DNA 左右边界序列之间没有 *EcoRI* 酶切位点, 所以杂交条带的数目可用于估计外源基因的插入拷贝数及其整合位点。从图 2-C 分析, 不同转基因水稻植株中的杂交条带的大小不同, 显示外源基因的整合位点是不同的; 另外, 不同转基因水稻植株中的杂交条带的数目也有所不同, 但都为 1~3 条, 据此可推测转基因水稻植株中可能整合有 1~3 个外源基因。

2.2 无抗性选择标记转 *API* 基因水稻的选育

让以上获得的同时含有 *API* 基因和 *HPT* 基因的共转化植株自交, 对其后代植株总 DNA 进行 PCR 分析, 调查潮霉素抗性选择标记基因与 *API* 基因的分离情况。如图 3 所示, 在武香粳 9 号一个转化子的自交后代中, 两个转基因发生遗传分离, 其中第 3 号植株为有 *API* 基因而无 *HPT* 基因的转基因植株, 即为目的植株。同时, 对上述转化子后代的不同单株总 DNA



A. *API* 基因的 PCR 扩增结果; B. *HPT* 基因的 PCR 扩增结果; C. 用 *EcoRI* 消化基因组 DNA 并用 [α - 32 P] 标记 *API* 编码序列的 Southern blot 分析。泳道 M. DNA 分子量标记; P. pSBAP1 质粒 DNA; W1、W2. 野生型的广陵香粳和武香粳 9 号; 1~3. 共转化的广陵香粳; 4~6. 共转化的武香粳 9 号
A. PCR amplification of the *API* gene; B. PCR amplification of the *HPT* gene; C. Southern blot analysis, genomic DNA were digested with *EcoRI* and hybridized with [α - 32 P] labeled *API* coding sequence. M. DNA molecular marker; P. pSBAP1 plasmid DNA; W1 and W2. Wild type of Guanglingxiangjing and Wuxiangjing 9; 1-3. Co-transformants of Guanglingxiangjing; 4-6. Co-transformants of Wuxiangjing 9

图 2 *API* 与 *HPT* 基因 T_0 代共转化水稻植株总 DNA 的 PCR (A, B) 和 Southern 杂交分析 (C)

Fig. 2 PCR (A, B) and Southern blot (C) analysis of the total DNA extracted from some primary co-transformants containing both *API* gene and *HPT* gene

也进行了 Southern 杂交分析, 如图 3-C 和 D 所示。其中第 3 号株为 *API* 基因为阳性、*HPT* 基因为阴性, 即为无选择标记基因的目标转基因植株, 其结果与图 3-A 和 B 中的 PCR 分析结果一致。

按上述鉴定方法, 在广陵香粳来源的 15 个共转化子中, 在其中 5 个的自交后代中筛选到了无抗性选择标记基因、而仍含有 *API* 基因的转基因植株。按此计算, *API* 基因与 *HPT* 基因在转基因植株后代中发生遗传分离的比例为 33% 左右。在另一水稻品种武香粳 9 来源的 4 个共转化子中, 从其中的一个转化子的自交后代中筛选到了无抗性选择标记基因、但仍含有 *API* 基因的转基因植株, 即 *API* 基因与 *HPT* 基因在转基因后代植株可分离的比例为 25%。另外, 在不同转化子来源的自交后代中, 无抗性选择标记转基因植株的

出现频率也不一样, 从表 1 的结果可以看出, 最高的频率可以达到 15%, 低的只有 5%。

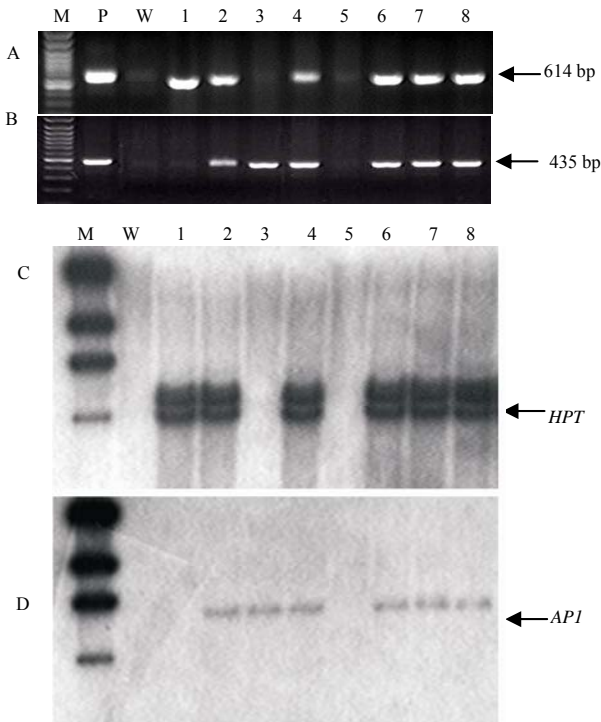
2.3 无抗性选择标记转 *API* 基因纯合系的选育

对上述获得的无抗性选择标记转基因水稻进一步进行遗传分析与田间选育, 最终在 T_3 代中筛选获得了 6 个转基因水稻纯合系, 其中 5 个来自广陵香粳 (A10、A16、A19、A22 和 A24), 另 1 个来自武香粳 9 号 (B15)。在 T_4 代时, 对选育的 6 个无抗性选择标记的转基因纯系分别调查其主要的农艺性状, 结果列于表 2。从表中结果可以看出, T_4 代转基因植株的育性正常, 抽穗期、株高、穗长、单株有效穗数、每穗粒数、每穗实粒数、结实率和千粒重与未转化对照相比, 均未有显著性差异。

表 1 共转化植株自交后代 (T_1) 中 *API* 基因和 *HPT* 基因的遗传分离

Table 1 Segregation of *API* gene and *HPT* gene in the T_1 progeny of the primary co-transformants

T_0 共转化植株 T_0 co-transformant	T_1 代植株数 Number of T_1 plants			无选择标记转 <i>API</i> 基因植株出现频率 Frequency of marker-free transgenic plant (%)
	总数 Total	<i>API</i> 阳性 <i>API</i> positive	<i>API</i> 阳性+ <i>HPT</i> 阴性 <i>API</i> positive, <i>HPT</i> negative	
A10	40	13	6	15.0
A16	40	12	6	15.0
A19	40	15	2	7.5
A22	40	11	3	7.5
A24	40	18	2	5.0
B15	40	19	2	5.0



A. *HPT* 基因的 PCR 扩增结果; B. *API* 基因的 PCR 扩增结果; C、D. 用 *EcoRI* 消化基因组 DNA 并用 [α - 32 P] 标记 *HPT* (C) 和 *API* (D) 编码序列的 Southern blot 分析。M. 100 bp DNA 分子量标记; P. pSBAP1 质粒 DNA; W. 野生型植株; 1~8. 来自含 *API* 和 *HPT* 双基因共转化体的 8 个 T_1 代单株

A. PCR amplification of the *HPT* gene; B. PCR amplification of the *API* gene. C, D. Southern blot analysis, genomic DNA were digested with *EcoRI* and hybridized with [α - 32 P] labeled *HPT* (C) and *API* (D) coding sequence, respectively. M. 100 bp DNA ladder plus; P. pSBAP1 plasmid DNA; W. wild type plant, 1-8. 8 individual plants in T_1 generation of one T_0 co-transformant containing both *API* gene and *HPT* gene

图 3 *API* 与 *HPT* 基因共转化水稻植株自交 T_1 代各单株总 DNA 的 PCR (A, B) 和 Southern 杂交分析 (C, D) 分析

Fig. 3 PCR (A, B) and Southern blot (C, D) analysis of the total DNA extracted from some individual plants in T_1 generation of one co-transformant containing both *API* gene and *HPT* gene

表 2 无抗性选择标记转 *API* 基因水稻新品系 (T_4 代) 主要农艺性状调查

Table 2 Agronomic characters of marker-free *API* transgenic rice lines in T_4 generation in field test

品种 Variety	转基因品系 Transgenic lines	株高 Plant height (cm)	穗长 Panicle length (cm)	单株有效穗 Productive tillers 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-grain weight (g)
广陵香粳	WT	74.19	16.52	7.27	117.41	109.12	93.67	28.19
Guanglingxiangjing	A10	76.76	16.46	7.80	121.93	114.43	93.96	27.23
	A16	75.95	15.94	7.54	116.23	102.21	88.48	26.33
	A19	76.84	17.12	7.45	116.45	108.92	93.50	26.67
	A22	75.81	16.24	7.25	122.11	113.63	93.21	26.42
	A24	73.25	16.08	7.95	116.50	107.13	91.66	31.17
武香粳 9 号	WT	77.70	15.62	7.47	92.07	84.73	92.16	29.77
Wuxiangjing 9	B15	74.33	15.58	8.57	92.07	84.42	86.14	30.03

2.4 转基因水稻新品系的抗病性鉴定

2.4.1 白叶枯病抗性的鉴定

采用成株期剪叶接种法, 在水稻抽穗后, 将白叶枯病菌剪叶接种水稻剑叶, 21 d 后按白叶枯病病情分级标准调查发病情况 (表 3)。从表中结果可以看出, 转 *API* 基因植株剪口下有很小病斑, 很少向下延伸, 病斑长度都小于 3 cm, 按照江苏省农业科学院的白叶枯病病情分级标准, 均达到了抗病水平, *F* 测验也表明转基因植株的病斑长度与未转化对照之间有极显著差异, 未转化对照广陵香粳与武香粳 9 号的平均病斑长度达分别为 3.78 cm 和 2.62 cm, 分别处于中抗和抗病水平。因此, *API* 基因的导入, 提高了受体品种对白叶枯病的抗病能力。

2.4.2 纹枯病抗性鉴定

在水稻的孕穗期, 将长有菌丝的火柴梗插入水稻基部倒 2 叶或倒 3 叶叶鞘内, 25 d 后调查发病情况。先测出接菌稻株的病斑扩展长度和该稻株本身的高度, 然后计算其比值 (病斑的扩展长度/接种稻株高度)。从表 3 中可以看出, 对于来自于广陵香粳的 5 个转化子后代, 平均病斑比例有所减小, 与未转化对照相比, 3 个转化子后代 *F* 测验达到了极显著的差异, 2 个差异达显著水平, 来自于武香粳 9 号的转化子后代平均病斑比例亦有所减小, 与未转化对照相比也达到了极显著的差异, 但根据江苏省农业科学院的水稻纹枯病分级标准, 转基因材料与未转化对照均仍处于中感水平。

由上述抗病性分析结果可知, *API* 基因导入粳稻品种后, 转基因水稻对白叶枯病的抗性提高与未转化对照相比均达到了极显著的差异, 而对纹枯病的抗性, 虽然转基因材料与未转化对照均仍处于同一抗性水平, 但转基因材料的平均病斑比例有所减小, 与未转化对照相比达到显著或极显著差异水平。

表 3 无抗性选择标记转 *API* 基因水稻 T₄ 代纯系对稻白叶枯病和纹枯病抗性的鉴定Table 3 Resistance to bacterial leaf blight and sheath blight of the homozygous marker-free *API* transgenic rice lines in T₄ generation

品种 Variety	转基因品系 Transgenic lines	白叶枯病 Bacterial leaf blight		纹枯病 Sheath blight	
		平均病斑长 (cm) ± 标准差 Mean lesion length (cm) ± standard error	抗病等级 Resistance grade	相对病斑长度 (%) ± 标准差 Relative lesion length (cm) ± standard error	抗病等级 Resistance grade
广陵香粳 Guangling xiangjing	WT	3.78 ± 0.29	中抗 MR	20.36 ± 0.04	中感 MS
	A10	1.67 ± 0.052 **	抗 R	15.99 ± 0.0 **	中感 MS
	A16	1.22 ± 0.10 **	抗 R	18.92 ± 0.06 *	中感 MS
	A19	1.83 ± 0.12 **	抗 R	16.38 ± 0.05 **	中感 MS
	A22	0.95 ± 0.087 **	抗 R	17.85 ± 0.07 *	中感 MS
	A24	1.72 ± 0.28 **	抗 R	16.91 ± 0.04 **	中感 MS
武香粳 9 号 Wuxiangjing 9	WT	2.62 ± 0.26	抗 R	21.87 ± 0.02	中感 MS
	B15	1.06 ± 0.074 **	抗 R	17.15 ± 0.05 **	中感 MS

*和**分别表示与未转化对照相比, 差异达显著或极显著水平

* and ** mean the least significant differences at 0.05 and 0.01 probability levels, respectively, when compared with the wild type

3 结论与讨论

根癌农杆菌介导的双 T-DNA 双元载体共转化水稻, 可以从共转化植株的自交后代中获得只有目的基因而无选择标记基因的转基因植株^[11~13], 本研究将克隆自甜椒的两亲性蛋白 *API* 基因与潮霉素抗性选择标记基因 (*HPT*) 分别构建位于同一农杆菌双元载体上的两个独立的 T-DNA 区中, 并经农杆菌介导, 将其导入两个粳稻品种广陵香粳和武香粳 9 号中, 从共转化植株的自交后代中筛选到了无 *HPT* 基因的转 *API* 基因水稻植株, 并结合田间农艺性状考察, 选育了多个抗病性提高的无抗性选择标记基因的纯合的转 *API* 基因水稻新品系。本研究只能从部分的共转化的转基因植株后代中分离到无抗性选择标记基因的转基因植株 (25%~33%)。这与 Komari 等^[11], Breitler 等^[12] 和 Afolabi 等^[13] 的结果相一致, 其原因可能是由于目的基因与抗性选择标记基因整合的位点比较近或整合于同一个位点, 而较难获得无抗性选择标记基因的转基因植株^[13~15]。本研究中获得共转化的频率及无选择标记基因的转基因植株的频率与已有的研究结果^[11~13] 也不完全一致, 可能是由于本研究所用的转化受体不同、转基因在受体中的整合的位置不同等原因造成。

水稻中已经定位和克隆的抗病基因有多个, 这些抗性基因介导的抗性水平较高, 常表现为高抗, 但是, 这些抗性基因和其病原无毒基因的互作表现为品种对小种的专化性抗性, 所以其抗性会因病原菌群体生理小种的变化而被克服, 如我国科学家将 *Xa21* 基因导入受体后可以提高其对 *Xoo* 小种的抗性^[16,17], 而 Lee

等发现有一些小种可以克服 *Xa21* 的抗性^[18]。所以, 基于抗性基因的抗病基因工程研究应着眼于创建非小种特异性 (non-race specific) 的抗性, 以避免植物抗病性因病原菌群体生理小种的变化而被克服。克隆自甜椒的 *API* 基因编码的 *API* 蛋白可能的作用机制是通过干扰细菌激发子 harpin_{ps} 和植物中受体的互作而延迟过敏反应的发生。而使植物具有广谱的抗病性, 本研究将 *API* 基因导入水稻后, 既可以提高受体品种对细菌性病害 (白叶枯病) 的抗性, 又可以提高其对真菌性病害 (纹枯病) 的抗性, 但对纹枯病的抗性未能达到抗性级别, 因此, 如将 *API* 基因与其它的抗性基因聚合, 进一步提高受体品种的抗病性, 降低对病原物的的定向选择压力, 延长抗病品种的使用寿命, 将为抗病基因工程育种提供新的途径。

References

- [1] Wang Z X, Yano M, Yamanouchi U, Iwamoto M, Monna L, Hayasaka H, Katayose Y, Sasaki T. The *Pib* gene for rice blast resistance belongs to the nucleotide binding and leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes. *The Plant Journal*, 1999, 19: 55-64.
- [2] Bryan G T, Wu K S, Farrall L, Jia Y L, Hershey H P, McAdams S A, Faulk K N, Donaldson G K, Tarchini R, Valent B. A single amino acid difference distinguishes resistant and susceptible alleles of the rice blast resistance gene *Pi-ta*. *The Plant Cell*, 2000, 12: 2033-2045.
- [3] Song W Y, Wang G L, Chen L L, Kim H S, Pi L Y, Holsten T, Gardner J, Wang B, Zhai W X, Zhu L H, Fauquet C, Ronald P. A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance

- gene, *Xa21*. *Science*, 1995, 270: 1804-1806.
- [4] Yoshimura S, Yamanouchi U, Katayose Y, Toki S, Wang Z X, Kono I, Kurata N, Yano M, Iwata N, and Sasaki T. Expression of *Xa1*, a bacterial blight-resistance gene in rice, is induced by bacterial inoculation. *Genetics*, 1998, 95: 1 663-1 668.
- [5] Tang K X, Sun X F, Hu Q N, Wu A Z, Lin C H, Lin H J, Twyman R M, Christou P and Feng T Y. Transgenic rice plants expressing the ferredoxin-like protein (*API*) from sweet pepper show enhanced resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*. *Plant Science*, 2001, 160: 1035-1042.
- [6] 贾士荣. 转基因植物食品中标记基因的安全性评价. 中国农业科学, 1997, 30(2): 1-15.
Jia S R. Safety evaluation of marker genes in transgenic food plants. *Scientia Agricultura Sinica*, 1997, 30(2): 1-15. (in Chinese)
- [7] Hofgen R, Willmitzer L. Storage of competent cells for *Agrobacterium* transformation. *Nucleic Acids Research*, 1988, 16: 9877.
- [8] 刘巧泉, 张景六, 王宗阳, 洪孟民, 顾铭洪. 根癌农杆菌介导的水稻高效转化系统的建立. 植物生理学报, 1998, 24: 259-271.
Liu Q Q, Zhang J L, Wang Z Y, Hong M M, Gu M H. A highly efficient transformation system mediated by *Agrobacterium tumefaciens* in rice. *Acta Phytophysiologica Sinica*, 1998, 24: 259-271. (in Chinese)
- [9] 于恒秀, 刘巧泉, 陈秀花, 陆美芳, 王兴稳, 王宗阳, 顾铭洪. 根癌农杆菌介导的水稻转化系统的优化及转反义 *Wx* 基因植株的获得. 中国水稻科学, 2002, 16: 304-310.
Yu H X, Liu Q Q, Chen X H, Lu M F, Wang X W, Wang Z Y, Gu M H. Optimization of *Agrobacterium*-mediated transformation of rice and regeneration of transgenic plants with antisense *Waxy* gene. *Chinese Journal of Rice Sciences*, 2002, 16: 304-310. (in Chinese)
- [10] Murray M G, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, 1980, 8: 4321-4325.
- [11] Komari T, Hiei Y, Saito Y, Murai N, Kumashiro T. Vectors carrying two separate T-DNAs for co-transformation of higher plants mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and segregation of transformants free from selection markers. *The Plant Journal*, 1996, 10: 165-174.
- [12] Breiter J C, Meynard D, Boxtel J V, Royer M, Bonnot F, Cambillau L, Guiderdoni E. A novel two T-DNA binary vector allows efficient generation of marker-free transgenic plants in three elite cultivars of rice (*Oryza sativa* L.). *Transgenic Research*, 2004, PC1279: 1-17.
- [13] Afolabi A S, Worland B, Snape J W, Vain P. A large-scale study of rice plants transformed with different T-DNAs provides new insights into locus composition and T-DNA linkage configurations. *Theoretical and Applied Genetics*, 2004, 109: 815-826.
- [14] De Buck S, Jacobs A, Van Montagu M, Depicker A. The DNA sequences of T-DNA junctions suggest that complex T-DNA loci are formed by a recombination process resembling T-DNA integration. *The Plant Journal*, 1999, 20: 295-304.
- [15] De Neve M, De Buck S, Jacobs A, Van Montagu M, Depicker A. T-DNA integration patterns in co-transformed plant cells suggest that T-DNA repeats originate from co-integration of separate T-DNAs. *The Plant Journal*, 1997, 11: 15-29.
- [16] Tu J, Ona I, Zhang Q, Mew T W, Kush G S, Datta S K. Transgenic rice variety 'IR72' with *Xa21* is resistance to bacterial blight. *Theoretical and Applied Genetics*, 1998, 97: 31-36.
- [17] Zhang S P, Song W Y, Chen L L, Ruan D, Taylor N, Ronald P, Beachy R, Fauquet C. Transgenic elite *Indica* rice varieties, resistance to *Xa21 Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Molecular Breeding*, 1998, 4: 551-558.
- [18] Lee S W, Choi S H, Han S S, Lee D G, Lee B Y. Distribution of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* strains virulent to *Xa21* in Korea. *Phytopathology*, 1999, 9: 928-933.

(责任编辑 孙雷心)