

经基因工程改良的抗白叶枯病水稻粳型恢复系“C418-*Xa21*”及其杂交稻

李晓兵¹ 裔传灯² 翟文学^{1*} 杨振玉³ 朱立煌¹

¹(中国科学院遗传研究所 北京 100101) ²(扬州大学农学院农学系 扬州 225009)

³(辽宁省农业科学院北方杂交水稻中心 沈阳 110101)

摘 要 通过农杆菌介导的转化系统,将业已克隆的水稻抗白叶枯病基因 *Xa21* 导入重要的粳型杂交稻恢复系“C418”。PCR 和抗性分析表明单拷贝整合的 *Xa21* 在 T_1 代的分离比为 3:1。在 T_2 代通过 PCR 和抗性分析选择了 *Xa21* 纯合的转基因株系“C418-*Xa21*”。将选择的转基因纯合系“C418-*Xa21*”与常用的雄性不育系“屈锦 A”杂交,产生了带有转基因 *Xa21* 的杂交稻“屈优 418-*Xa21*”(简称转基因杂交稻)。分子分析表明转基因 *Xa21* 在杂交稻“屈优 418-*Xa21*”中能稳定遗传,抗性分析表明转基因恢复系“C418-*Xa21*”和转基因杂交稻“屈优 418-*Xa21*”对白叶枯病具有高度的广谱抗性,并保持了受体对照的优良农艺性状。另外我们还发现转基因杂交稻“屈优 418-*Xa21*”对白叶枯病的抗性水平高于转基因恢复系“C418-*Xa21*”,这可能是遗传背景的差异所致。抗白叶枯病转基因粳型恢复系和杂交稻的育成将有益于杂交稻在我国北方稻区的推广。

关键词 水稻白叶枯病抗性 粳型杂交稻,分子标记辅助选择,粳型恢复系,转基因 *Xa21*

中图分类号 Q943.2 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2001)04-0380-05

杂种优势的利用在世界水稻的生产中有着重要的地位,尤其在我国的杂交水稻已占水稻生产总面积的 50%和总产量的 60%^[1]。长期以来杂种优势的利用一直局限在籼稻中,通常认为粳稻没有明显的杂种优势^[2]。近年来几个粳型恢复系的选育成功促进了粳型杂交稻的快速发展,尤其是粳型恢复系“C418”具有广亲和性、高配合力和品质好等诸多优良性状,正被广泛用于杂交稻的生产^[2,3]。但“C418”及其配制的杂交稻对革兰氏阴性菌稻黄单孢菌白叶枯病致病变种(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, *Xoo*)引起的白叶枯病非常敏感,在病害流行时可造成严重的产量损失(杨振玉,未发表结果)。为了保证优良恢复系“C418”及其配制的杂交稻的大面积推广,迫切需要改善对白叶枯病的抗性。

目前控制水稻白叶枯病最经济有效的方法是将抗性基因导入感病品种^[4,5]。*Xa21* 是一个对白叶枯病具有广谱抗性的显性抗性基因,而且利用定位克隆的策略克隆了该基因^[6]。利用克隆的 *Xa21* 基因通过遗传转化可快速培育抗白叶枯病品种^[7]。目前通过基因枪或农杆菌介导的转化系统已将 *Xa21* 基因导入几个水稻品种^[8-12],但该基因尚未引入粳型

杂交稻品种。本研究将 *Xa21* 基因导入生产上正在大面积推广的粳型杂交稻恢复系 C418,从转基因后代筛选获得了单拷贝整合的转基因纯合系“C418-*Xa21*”,并进一步将“C418-*Xa21*”与常用的雄性不育系“屈锦 A”杂交产生转基因杂交稻“屈优 418-*Xa21*”。研究表明转基因恢复系“C418-*Xa21*”和转基因杂交稻“屈优 418-*Xa21*”均保留了对白叶枯病的广谱抗性和原有的优良农艺性状。

1 材料与方法

1.1 质粒和水稻品种

转化载体为 pCXK1301^[11,12],完整的 *Xa21* 基因(9.6kb 的 *Kpn*I 片段),位于 T-DNA 上两个标记基因 HYG 和 GUS 之间。含有转化载体 pCXK1301 的农杆菌菌株 EHA105 用于转化水稻的粳型恢复系“C418”。

1.2 转化和组织培养

采用已建立的转化方法^[11],对粳型恢复系“C418”成熟胚的愈伤组织进行转化。组织培养所用的基本培养基为 NB^[13]。选择培养基含 500mg/L 头孢霉素和 500mg/L 潮霉素。

1.3 用转基因 *Xa21* 培育抗白叶枯病杂交稻技术路线

利用 PCR 和抗性分析对粳型恢复系“C418”的 T_0 、 T_1 和 T_2 代转基因株系进行选择。从 T_2 代的转基因株系中选择转基因 *Xa21* 纯合系,并与雄性不育系杂交配制抗白叶枯病的杂种稻。整个过程见图 1。本研究中粳型恢复系“C418”的转基因纯合系“C418-*Xa21*”与雄性不育系“屈锦 A”杂交,配制的转基因杂交稻为“屈优 418-*Xa21*”。

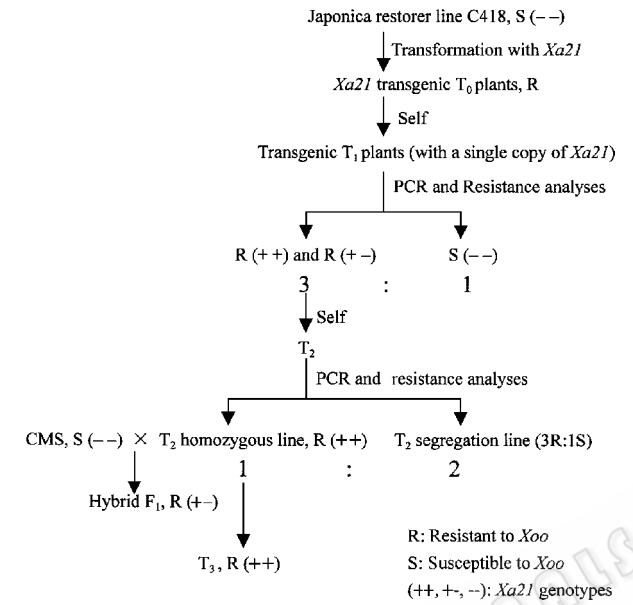


图 1 利用转基因 *Xa21* 培育抗白叶枯病粳型杂交稻技术路线

Fig.1 Strategy for breeding BB resistant japonica hybrid rice with the transgene *Xa21*

1.4 PCR 分析

据 Wang 等人^[8]的报道,合成一对引物 U_1 : 5'-CGATCGGTATAACAGCAAAAC-3', I_1 : 5'-ATAGCAACT-GATTGCTTGG-3'。利用这对引物进行 PCR 扩增,转基因 *Xa21* 可扩出 1 条 1.4kb 特异片段,阴性对照可扩出 1 条 1.3kb 的片段。PCR 反应在 PE-480 热循环仪上按下列程序进行:预变性 94℃ 5min;然后 94℃ 1min,56℃ 1min,72℃ 2min,共 35 个循环;最后保温 72℃ 10min。PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶上于 1×TAE 缓冲液中电泳检测。

1.5 Southern 杂交分析

Southern 杂交参照翟文学等人的方法^[11],杂交探针是从质粒 pCXK1301 上扩增的 1.4kb 的片段,其对应于 *Xa21* 基因的 5' 编码区,扩增引物为 Z_2 5'-ATTGAATAATTCAGTGGGTATTGG-3', Z_3 5'-GTCTTGC-CTTGCACTTCTGCACGA-3'。根据质粒 pCXK1301 的内切酶图谱,典型 T-DNA 整合的 *Xa21* 转基因植株

的 DNA 经 *Hind*Ⅲ 酶切后,含有外源基因 *Xa21* 的杂交片段应大于 6.8kb。

1.6 抗性鉴定

在分蘖盛期,用剪叶法^[15]接种白叶枯病 8 个生理小种,其中包括 *Xa21* 基因特异的鉴定小种菲律宾 6 号(P6)。每株接种 3~5 片叶,接种液的浓度为 10^9 cell/mL 左右。接种 2 周后,测量病斑长度,表型分析中病斑长度不大于整个叶片总长度的 15% 视为抗病,大于 15% 的视为感病。

1.7 农艺性状的考察

转基因株系“C418-*Xa21*”和“屈优 418-*Xa21*”及对照恢复系“C418”和品种“屈优 418”种于中科院遗传所的试验田,田间管理同常规。考察的农艺性状主要为生育期、株高、每株穗数、穗长、每穗粒数、结实率和千粒重。每株系或品系考察 20 株,取平均值。

2 结果与分析

2.1 粳型恢复系“C418”的 *Xa21* 转基因系的产生与选择

用业已建立的农杆菌介导转化系统^[11,12],将 *Xa21* 基因转入粳型恢复系“C418”中,转基因植株及其后代的分析与选择过程见图 1。通过转化共产生 11 株转基因单株(T_0),分析表明所有 T_0 植株均为 PCR 阳性和对鉴定小种 P6 抗性(结果未显示)。从 T_0 到 T_2 世代对不同的转基因系进行 PCR 和抗性鉴定,图 2 显示了一个具有单拷贝整合的转基因系的分析结果。PCR 扩增引物为 U_1 和 I_1 , T_0 转基因植株能扩增出 1 条来自 *Xa21* 基因的 1.4kb 的特异带和 1 条来自非转基因对照的 1.3kb 的背景带(图 2A)。选择含有单拷贝整合的 T_0 植株进行自交得到 T_1 代,通过 PCR 和抗性鉴定对转基因 *Xa21* 在 T_1 代的遗传进行分析。不同单株研究发现: T_1 代植株中产生 2 种 PCR 带型,抗性植株(包括转基因纯合株和杂合株)都能扩增出 1.4kb 和 1.3kb 的条带,而感病植株只能扩增出 1.3kb 的条带。PCR 和抗性分析的结果完全符合,均显示出单拷贝整合的转基因 3:1 分离(图 2A),没有看到转基因沉默或失活的现象。选择 T_1 代具有抗性的植株进行自交得到 T_2 代,从每个 T_2 代株系中任意选择 25 个以上的单株用于鉴定分析,经 PCR 分析发现 T_2 代株系有两种类型,即转基因 *Xa21* 杂合系和转基因 *Xa21* 纯合系(图 2B)。转基因纯合系中每株都能扩增出 1.4kb 和 1.3kb 的条带,而转基因杂合系中有些单株能扩出这两条带,有些单株只能扩出 1.3kb 的条带,转基因仍然按 3:1

表 1 转基因株系“ C418-*Xa21* ”及其杂交稻“ 屈优 418-*Xa21* ”对 8 个白叶枯病菌小种的抗性

Table 1 Resistance of C418-*Xa21* and Tiyou418-*Xa21* to 8 *Xoo* strains

Strains	Races or pathotypes	Origin	C418/cm	C418- <i>Xa21</i> /cm	Tiyou418/cm	Tiyou418- <i>Xa21</i> /cm
PX061	P1	Philippines	42.0 ± 3.3	8.0 ± 0.6	15.3 ± 1.5	1.0 ± 0
PX068	P2	Philippines	24.7 ± 1.6	4.0 ± 1.3	10.0 ± 2.0	0.5 ± 0
PX079	P3	Philippines	16.0 ± 1.3	4.7 ± 1.1	8.7 ± 3.2	0.7 ± 0.2
PX071	P4	Philippines	33.0 ± 4.0	3.7 ± 0.4	10.0 ± 0.6	0.8 ± 0.2
PX099	P6	Philippines	41.3 ± 3.2	8.0 ± 2.6	10.0 ± 1.3	0.8 ± 0.3
HB17	CII	China	26.3 ± 2.9	7.7 ± 1.1	14.0 ± 0.6	0.4 ± 0.2
Z173	CIV	China	16.0 ± 2.0	5.0 ± 0	6.0 ± 1.3	0.7 ± 0.2
GD1358	CV	China	18.5 ± 1.5	4.0 ± 0.6	5.7 ± 2.4	0.7 ± 0.2

The lesion length was the average of at least five plants from which three infected leaves were scored. The average whole leaf length was 60 ± 2.3cm

除了对水稻白叶枯病抗性分析外,我们还对转基因恢复系“ C418-*Xa21* ”和转基因杂交稻“ 屈优 418-*Xa21* ”的主要农艺性状作了调查。外观上转基因植株长势良好,整齐一致,看不出任何变异。调查结果也发现它们与相应的对照在生育期、株高、每株穗数、穗长、每穗粒数、结实率和千粒重等主要农艺性状上没有明显差异(表 2)。这些结果也表明转基因恢复系“ C418-*Xa21* ”保持了受体“ C418 ”的良好恢复力,可以作为新的抗白叶枯病恢复系在杂交稻生产上加以推广。

表 2 *Xa21* 转基因恢复系及其杂交稻的主要农艺性状

Table 2 Agronomic traits of the transgenic restorer line and hybrid rice with the transgene *Xa21*

Varieties	Growth duration /d	Plant height /cm	Panicles /Plant	Panicle length /cm	Grains /Panicle	Setting percentage /%	1000 grain weight/g
C418	125.5 ± 2.5	120.8 ± 1.5	8.2 ± 1.2	26.2 ± 1.0	166.1 ± 17.6	88.8	28.4 ± 0.2
C418- <i>Xa21</i>	125.0 ± 2.2	121.4 ± 2.0	8.5 ± 1.5	25.8 ± 0.8	165.8 ± 18.5	87.5	28.2 ± 0.2
Tiyou418	130.8 ± 2.5	114.2 ± 1.0	15 ± 3.6	27.2 ± 0.6	187.0 ± 17.6	87.0	28.5 ± 0.3
Tiyou418- <i>Xa21</i>	131.4 ± 2.8	115.6 ± 1.7	13.2 ± 1.4	27.0 ± 0.5	193.0 ± 18.4	89.7	28.6 ± 0.2

The data were the average of more than 20 randomly investigated plants in the test field

3 讨 论

Xa21 基因是粮食作物中第一个图位克隆的抗性基因,因其对白叶枯病广谱抗性,在水稻育种上具有重要的价值。*Xa21* 基因已被转化到几个水稻品种^[8~12],本研究着眼于利用转基因植株的自交和分子标记辅助选择获得 *Xa21* 纯合的转基因系,然后与不育系杂交培育抗白叶枯病粳型杂交稻。本研究也显示了在粳型杂交稻背景下转基因 *Xa21* 的抗病表现。

抗性分析显示转基因杂交稻“ 屈优 418-*Xa21* ”对白叶枯病的抗性水平高于转基因恢复系“ C418-*Xa21* ”(表 1),除表明在杂种遗传背景条件下外源基因 *Xa21* 对稻白叶枯病菌完全显性抗性外,可能还存在来自不育系“ 屈锦 A ”的抗源的累加效应。“ 屈锦 A ”可能存在抗白叶枯病 *Xa3* 基因。抗性基因在

杂种“ 屈优 418-*Xa21* ”中的累加,有助于提高该品种的抗性水平和抗谱,这与传统育种选育的抗性基因累加系的情形一致^[15]。可能是由于外源基因 *Xa21* 的单拷贝整合,在“ C418-*Xa21* ”和“ 屈优 418-*Xa21* ”的单株中没有发现转基因沉默或失活的现象,显然单拷贝整合有利于转基因稳定遗传和表达。

应用遗传工程和分子标记辅助选择的手段,本研究成功地将外源基因 *Xa21* 转入粳型杂交稻,同时还建立了一套杂交稻分子育种的有效方法。目前具有白叶枯病抗性的转基因系“ C418-*Xa21* ”和“ 屈优 418-*Xa21* ”已经获得国家农业部批准环境释放。在大田实验中,这两个转基因品系对白叶枯病均有高度的抗性,并具有优良的农艺性状,在不久的将来有望作为品种种植。

致 谢:中国农业科学院作物育种栽培研究所王春莲和中国科学院遗传研究所赵显峰参加部分工作。

REFERENCES (参考文献)

- [1] XIONG Z M (熊振民), CHAI H F (蔡洪法), MIN S K (闵绍楷) *et al.* Rice in China (中国水稻), Beijing: Chinese Agricultural Sciences and Technology Press (中国农业科技出版社). 1992, pp. 118 ~ 121
- [2] YANG Z Y (杨振玉). Studies on Japonica Hybrid Rice in Northern China (北方杂交粳稻育种研究), Beijing: Chinese Agricultural Sciences and Technology Press (中国农业科技出版社). 1999
- [3] YANG Z Y (杨振玉), ZHANG Z X (张宗旭), WEI Y L (魏耀林) *et al.* Breeding and characteristic of japonica type wide compatibility line C418. *Hybrid Rice* (杂交水稻), 1998, **13** (3): 31 ~ 32
- [4] Ogawa T. Methods and strategy for monitoring race distribution and identification of resistance genes to bacterial leaf blight (*Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*) in rice. *JARQ*, 1993, **27**: 71 ~ 80
- [5] Khush G S, Mackill D J, Sidhu G S. Breeding rice for resistance to bacterial blight. In: IRRI (ed) Bacterial blight of rice. *IRRI, Manila, Philippines*, 1989, pp. 207 ~ 217
- [6] Song W Y, Wang G L, Chen L *et al.* A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, *Xa21*. *Science*, 1995, **270**: 1804 ~ 1806
- [7] Ronald P C. The molecular basis of disease resistance in rice. *Plant Molecular Biology*, 1997, **35**: 179 ~ 186
- [8] Wang G L, Song W Y, Ruan D L *et al.* The cloned gene, *Xa21* confers resistance to multiple *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae* isolates in transgenic plants. *MPMI*, 1996, **9**: 850 ~ 855
- [9] Tu J, Ona I, Zhang Q *et al.* Transgenic rice variety 'IR72' with *Xa21* is resistant to bacterial blight. *Theor Appl Genet*, 1998, **97**: 31 ~ 36
- [10] Zhang S, Song W Y, Chen L *et al.* Transgenic elite *Indica* rice varieties resistant to *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*. *Molecular Breeding*, 1998, **4**: 551 ~ 558
- [11] Zhai W, Li X, Tian W *et al.* Introduction of a blight resistance gene, *Xa21* into Chinese rice varieties through an *Agrobacterium*-mediated system. *Science in China (Series C)*, 2000, **43** (4): 361 ~ 368
- [12] ZHAO H (赵彬), WANG W M (王文明), ZHENG X W (郑先武) *et al.* Introduction of wide spectrum rice bacterial blight resistance gene *Xa21* into two-line genic male sterile rice variety Pei'ai 64S. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), 2000, **16** (3): 137 ~ 141
- [13] Li L C, Qu R D, Beachy R N *et al.* An improved rice transformation system using the biolistic method. *Plant Cell Reports*, 1993, **12**: 250 ~ 254
- [14] Kauffman H E, Reddy APK, Hsieh SPY *et al.* An improved technique for evaluation of resistance of rice varieties to *Xanthomonas oryzae*. *Plant Dis Rep*, 1973, **57**: 537 ~ 541
- [15] Huang N, Angeles E R, Domingo J *et al.* Pyramiding of bacterial blight resistance gene in rice: marker-assisted selection using RFLP and PCR. *Theor Appl Genet*, 1997, **95**: 313 ~ 320

A Genetically Modified Japonica Restorer Line C418-*Xa21* and Its Hybrid Rice with Bacterial Blight Resistance

LI Xiao-Bing¹ YI Chuan-Deng² ZHAI Wen-Xue^{1*} YANG Zhen-Yu³ ZHU Li-Huang¹

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

²(Department of Agronomy, Agricultural College, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

³(North Hybrid Rice Research Center, Liaoning Academy of Agricultural Sciences, Shenyang 110101, China)

Abstract The cloned bacterial blight (BB) resistance gene *Xa21* was transferred into C418, a major restorer line of japonica hybrid rice in China using an *Agrobacterium*-mediated system. The integrated single copy of transgene displayed a 3:1 segregation ratio in T₁ generation in PCR and resistance analyses. The transgenic homozygous C418-*Xa21* lines were selected in T₂ generation through PCR and resistance analyses. The selected transgenic restorer lines were then crossed with a commonly used sterile line, TijnA, to produce *Xa21* transgenic hybrid rice. Molecular analysis revealed that the produced hybrid rice, named as Tiyou418-*Xa21* inherited the transgene. Both C418-*Xa21* and Tiyou418-*Xa21* plants displayed high resistance with a broad spectrum to *Xoo* races and maintained their normal elite agronomic characters. We also observed that the resistance level of Tiyou418-*Xa21* was obviously higher than that of C418-*Xa21* which may be attributed to their differences in genetic background. The propagation of this BB resistant hybrid variety with the transgene *Xa21* with extend hybrid rice production in north China.

Key words rice bacterial blight resistance, japonica hybrid rice, marker-assisted selection, transgenic japonica restorer line, transgene *Xa21*

Received January 10 2001

This work was supported by the grant from the Chinese 863 High Technology Program (101-02-02-01) and the Chinese Transgenic Plant Special Program (J99-B-006)

* Corresponding author. Tel 86-10-64870491, Fax 86-10-64873428, E-mail: zhai@genetics.ac.cn <http://journals.im.ac.cn>