

利用 *Bt* 基因和 *Xa21* 基因转化获得抗螟虫、白叶枯病的转基因水稻*

王爱菊^{1,*} 姚方印^{2,*} 温孚江^{1,**} 朱常香¹ 李广贤² 杨磊² 朱其松²
张洪瑞²

(¹山东农业大学生命科学学院, 山东泰安 271018; ²山东省水稻研究所, 山东济宁 272017)

摘要 利用水稻的愈伤组织作受体, 采用 PIG 基因枪法, 首先成功地将 *Bt* 基因 [*cryIA* (b)] 连同抗除草剂 *bar* 基因导入栽培水稻品种中国 91, 选育出纯合稳定的株系 T91 系。然后将 T91 系与黄淮区主栽品种豫粮 6 号杂交, 并辅以标记基因选择, 选育出纯合稳定、综合性状优良的转 *Bt* 基因株系 C48。利用农杆菌介导的转化系统将 *Xa21* 基因转入 C48, 根据标记基因测定, 转基因植株的 PCR 和 Southern 分析, 田间抗病虫性鉴定, 获得了双抗 (螟虫、白叶枯病) 转基因水稻。

关键词 水稻; 遗传转化; 基因枪; *cryIA* (b) 基因; *Xa21* 基因

中图分类号: S511 文献标识码: A

Obtaining of Transgenic Rice Plants Resistant to both Stem Borer and Bacterial blight Disease from *Bt* and *Xa21* Genes Transforming

WANG Ai-Ju^{1,*} YAO Fang-Yin^{2,*} WEN Fu-Jiang^{1,**} ZHU Chang-Xiang¹ LI Guang-Xian²
YANG Lei² ZHU Qi-Song² ZHANG Hong-Rui²

(¹ College of Life Sciences, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong 271018; ² Shandong Rice Research Institute, Jining, Shandong 272017, China)

Abstract Using rice calli as explants, a plasmid pBW3 containing *cryIA* (b) gene and *bar* gene was transferred into the rice variety Zhongguo 91 with PIG gene gun method, and a line named T91 which was homozygous to *cryIA* (b) and *bar* genes was then developed. The *cryIA* (b) gene was inherited stably into the progenies of the transgenic rice. A rice line C48 which showed ideal agronomic traits was developed by crossing T91 with a cultivated variety Yujing 6 followed by molecular marker-assisted selection. The *Xa21* gene, which confers resistance to bacterial blight disease, was then introduced into C48 line via the Agrobacterium mediated transformation system. Transgenic rice plants containing both *cryIA* (b) gene and *Xa21* gene were obtained. Biological tests showed that the transgenic rice was resistant to both stem borer and bacterial blight disease.

Key words Rice; Genetic transformation; PIG gene gun; *cryIA* (b) gene; *Xa21* gene

水稻白叶枯病是我国水稻三大病害之一, 造成水稻产量的巨大损失。同时, 每年水稻因鳞翅目害虫而造成的损失就达 1000 万吨^[1]。化学农药对防治病虫害起着十分重要的作用, 但随着时间的推移, 农药的残毒、环境污染以及害虫抗药性等问题日益突出。培育高产、优质品种的同时, 加强对病虫害的抗性是十分重要的课题。

由于水稻本身没有足够抗虫水平的基因, 因而抗虫育种工作进展缓慢, 近几年兴起的基因工程为水稻抗虫育种提供了强有力的手段。*Bt* 毒蛋白基因 (*Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein gene) 是目前使用最广泛的抗虫基因, 用转基因的方法将 *Bt* 基因导入水稻可使水稻对螟虫表现高抗^[2~4]。来自野生稻已被克隆的抗白叶枯病 *Xa21*

* 基金项目: 国家转基因植物研究与产业化专项资助项目 (J99-B-018)。 * 前两位作者对本研究有同等重要的贡献。

作者简介: 王爱菊, 女, 1978 年出生, 硕士研究生。 ** 通讯联系作者。

Received on (收稿日期): 2001-12-21, Accepted on (接受日期): 2002-03-21

基因已导入水稻,提高了抗性^[5-8]。但是至今尚未见有双抗(螟虫、白叶枯病)转基因水稻。本研究旨在利用 *Xa21* 和 *Bt* 基因培育出可供生产上推广利用的双抗水稻新品种。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 供试的水稻品种为不抗白叶枯病和螟虫的两个粳稻品种中国91和豫粳6号。中国91为20世纪90年代初黄淮区推广品种,豫粳6号为目前黄淮区主栽品种。

1.1.2 农杆菌菌株及表达载体质粒 菌株 EHA 105, 含有 pCXK1301 质粒, 由中国科学院遗传研究所翟文学先生惠赠。质粒 pCXK1301 含有 *hpt* 基因, 抗白叶枯病 *Xa21* 基因和 *GUS* 基因。质粒 pBW 3 含有 *Actin* 启动子, *cryIA (b)* 和 *bar* 基因^[2]。

1.1.3 供试的白叶枯菌系 中国7型白叶枯致病菌系 C1~C7, 有中国水稻研究所提供。

1.2 方法

1.2.1 转基因植株的获得 采用基因枪法和农杆菌介导转化法, 转化水稻胚性愈伤组织, 经选择、再生后, 获得转基因植株。具体转化方法和再生过程见文献^[2, 9, 10]。

1.2.2 *GUS* 活性的组织化学染色检测 将待检测的样品浸入 X-Gluc 染色液 (100 mmol/L 磷酸钠缓冲液, 10 mmol/L EDTA, 1 mmol/L X-Gluc, 0.1% Triton-100) 中, 37℃ 保温 8~24h, 观察染色情况。

1.2.3 转基因水稻的除草剂抗性鉴定 转基因水稻待长至 20 cm 左右时, 进行除草剂 Basta (有效成分 PPT) 抗性检测。PPT 浓度为 1 g/L, 涂抹于植株的叶片上, 3 天后, 调查抗性株数及敏感株数。

1.2.4 白叶枯病抗性分析 在孕穗期用剪叶法接种致病菌系 C1~C7, 菌液浓度为 10⁹ 个细菌/mL; 每菌系接种 5 片叶, 用剪刀蘸菌液从叶尖剪去 2~3 cm, 20 天后调查发病情况。

1.2.5 转基因植株的分子分析 DNA 的提取与纯化, Southern 杂交程序参照《分子克隆》手册^[11]。探针的合成, 以 *Bt* 基因的编码区段 (2.2 kb) 为模板, 采用随机引物法 (promega 试剂盒) 合成, 用 [³²P]dCTP 进行标记。

Xa21 基因的检测采用 PCR 方法。根据 *Xa21*

序列设计了特异扩增引物 P₁ 和 P₂。引物序列如下: P₁ 5'-ATTGAA TAA TTCA CTGGGTA TTGG, P₂ 5'-GTCTTGCCTTGCA CTCTGACGA。PCR 扩增反应按下列方法进行: 94℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 1 min, 56℃ 复性 1 min, 72℃ 延伸 2 min, 共 35 个循环。PCR 结束后, 产物进行 1% 琼脂糖电泳检测。

2 结果与分析

2.1 *Bt* 转基因植株的获得

用 PIG 基因枪轰击中国91水稻的愈伤组织 (图A), 在 14 mg/L PPT 条件下筛选获得抗性愈伤组织 (图B), 经分化培养后, 获得了含 *Bt* 基因和 *bar* 基因的转基因水稻。遗传分析表明 *Bt* 基因和 *bar* 基因连锁遗传^[2]。根据除草剂抗性鉴定 (图C), 抗螟虫性检测, 共获得 3 个综合性状优良的株系, 定名为 T91 系, 目前已稳定遗传至第 9 代, 田间表现良好的抗除草剂和抗螟虫性能。但是转基因株系结实率降低, 产量不高, 诱导的愈伤组织质量较差, 不适于作受体, 直接用于 *Xa21* 基因的转化。因此, 将 T91 系与黄淮稻区主栽品种豫粳6号杂交, 杂交后代根据标记基因 (*bar*) 选择, 获得了大量 *Bt* 基因和 *bar* 基因仍稳定连锁遗传的转基因植株。其中一个株系的田间综合性状优良, 产量高于双亲, 根据南繁编号, 定名为 C48。

2.2 双抗转基因水稻的获得及分子分析

用农杆菌介导转化法, 将 *Xa21* 基因转入了 C48 的愈伤组织, 经选择培养, 植株再生, 最终获得 67 株 T₀ 代转基因苗。根据标记基因选择, 获得了农艺性状优良的 T₂ 代株系 5 个, 分别定名为 BX₁~BX₅。

以 *Bt* 抗虫基因的 DNA 片段 (2.2 kb) 为探针, 双抗转基因植株 DNA 经 *Hind*III 酶切 (单酶切位点) 或 *Hind*III+*Sma*I (双酶切) 后, 进行 Southern 杂交。杂交结果 (图D、E) 显示, 经 *Hind*III 酶切的转基因植株均出现一条约 12.2 kb 的杂交条带, 经 *Hind*III+*Sma*I 双酶切的转基因植株均出现一条约 2.2 kb 的杂交条带, 而非转基因植株未出现任何杂交条带, 表明所获得的转基因植株中 *Bt* 基因是完整的单拷贝形式整合于水稻的基因组中。

为了研究 *Xa21* 基因受体基因组的整合情况, 对双抗转基因植株进行了 PCR 分析, 图F显示了部分转基因植株的检测结果。转基因植株经引物 P₁

和 P_2 扩增后均产生一条约 1.4 kb 的特异扩增带, 而对照没有相应的扩增带, 证明了 *Xa21* 基因已整合到受体基因组中。

2.3 双抗转基因植株的抗虫性及抗病性鉴定

在室内用转基因的水稻和未转基因的水稻幼嫩叶片饲喂水稻二化螟。未转基因水稻饲喂的二化螟, 虫体生长粗壮; 转基因水稻饲喂的二化螟, 生长非常缓慢且瘦弱。田间抗虫性调查显示, 在 8 月 5 号稻纵卷叶螟大发生期, 转基因水稻几乎没有受到卷叶螟的危害, 而对照遭受严重危害, 剑叶和倒二叶花白一片。在 9 月 15 日调查由于螟虫危害而引起白穗的情况(图 G), 对照品种中国 91 受害十

分严重, 白穗率高达 50%, 而转基因水稻的白穗率低于 1%。

对双抗转基因植株抗病性检测结果显示, 转基因植株高度抗水稻白叶枯病菌, 接种的转基因植株叶片病斑面积小于整个叶片的 5% (表 1)。

2.4 外源基因在转基因植株后代中的遗传

Bt 转基因纯合稳定单株与不同的常规粳稻品种进行杂交, 根据 Basta 抗性表现, 在 BC_1 分离群体中符合 1:1 分离, 在 F_2 分离群体中符合 3:1 分离(表 2), 证明了 *Bt* 基因是以单显性位点整合, 遵循孟德尔分离规律。

表 1 不同水稻株系对白叶枯菌系的抗性表现

Table 1 Resistance reaction of different rice lines to seven strains of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*

品种(株系) Cultivar (Line)	病斑面积 Lesion area (%)							平均 Average	病级 Lesion scoring	抗病性 Resistance reaction
	菌系 Strains									
	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7			
中国 91	37.82	15.67	24.12	40.75	22.61	7.23	18.34	23.79	6	感(S)
1	4.67	5.21	3.22	4.99	2.38	2.01	2.23	3.53	1	抗(R)
2	5.21	3.22	4.99	2.38	2.01	2.23	3.50	3.36	1	抗(R)
3	6.32	5.28	3.63	4.92	2.17	1.05	3.29	3.81	1	抗(R)
4	6.23	5.61	2.98	4.52	2.72	1.92	3.76	3.96	1	抗(R)
5	6.73	5.80	3.25	5.09	2.45	1.64	3.90	4.12	1	抗(R)

注: 1 至 5 为 T_2 代转 *Xa21* 基因水稻阳性植株

Note: 1 to 5 indicate *Xa21* transgenic rice positive plants in T_2 population

表 2 *Bt* 水稻杂交后代 Basta 阳性株与阴性株的分离比

Table 2 Segregation ratio of Basta positive and negative plants in the progenies of *Bt* rice crossed to rice varieties cultivated in Huanghua i area

组合 Cross	世代 Generation	抗性株数 No. of resistant plants	敏感株数 No. of susceptibility plants	期望比例 Ratio of expected segregation	χ^2
圣稻 301/T91	BC_1	110	125	1:1	0.958
Shangdao301/T91	F_2	732	237	3:1	0.152
豫粳 6/T91	BC_1	128	132	1:1	0.726
Yujing6/T91	F_2	816	285	3:1	1.459

df= 1, $\chi^2_{(0.05)} = 3.841$

表 3 T_1 水稻单株 GUS 染色分离比

Table 3 Segregation ratio of GUS staining in progenies of different T_1 transgenic rice lines

材料 Material	世代 Generation	阳性株数 GUS positive plants	阴性株数 GUS negative plants	期望比例 Ratio of expected segregation	χ^2
1	T_1	321	122	3:1	1.491
2	T_1	345	109	3:1	0.238
3	T_1	357	128	3:1	0.501
4	T_1	342	108	3:1	0.240

df= 1, $\chi^2_{(0.05)} = 3.841$

对来自 4 个 *Xa21* 转基因系的 T_1 代单株进行 GUS 检测, 统计 GUS 染色的阴阳性植株数, 经卡方测验证明其分离比例为 3:1, 证明了 *Xa21* 基因是以单显性整合的。

3 讨论

利用转基因技术将 *Bt* 基因或 *Xa21* 基因导入水稻提高抗虫或抗病性已有成功报道^[2~8]。但是,

理想的水稻品种要求抗病抗虫。因此把抗病和抗虫基因聚合到同一遗传背景并培育出可供生产上利用的双抗水稻新品种是本研究解决的关键问题。将几个抗性基因导入同一植株中有几种方式,其中先将一个基因导入植物,然后转入另一基因。由于受体中国91经组培和转化,结实率降低,并且转*Bt*基因的中国91诱导的愈伤组织质量太差,很难进行转化。利用转*Bt*基因的水稻中国91与生产上推广品种杂交,根据标记基因选择,获得了纯合稳定,综合性状优良的转*Bt*基因水稻株系,并以此为受体,进行*Xa21*基因的转化,获得了双抗转基因水稻植株。同时,对已获得的单抗转基因水稻(含*Bt*基因或*Xa21*基因),通过有性杂交的方法聚合*Bt*基因和*Xa21*基因的研究也在进行中。

转基因水稻成功运用取决于外源基因在植物体中保持遗传的稳定性,有的报道证明转基因作物的外源基因能够保持遗传的稳定性,有的试验证明外源基因在遗传传递中是不稳定的^[12]。本研究发现转*Bt*基因纯合稳定水稻已稳定遗传至第9代,并且连续3年分单株种植转*Bt*基因株系100余个,根据Basta检测,没有发现基因沉默现象,并且Basta阳性株与抗螟虫是协同表达的。为了证明外源基因的遗传模式,我们利用*Bt*转基因纯合稳定株系与常规品种杂交,根据Basta抗性检测结果,*Bt*基因在BC₁分离群体中符合1:1分离,在F₂分离群体中符合3:1分离,证明*Bt*基因是以单显性整合遵循孟德尔分离规律。同时根据*Xa21*基因的T₁代GUS检测结果,证明*Xa21*基因也是以单位点显性基因方式遗传。上述结果表明,通过有性杂交及转基因技术相结合聚合外源基因培育抗病虫水稻是切实可行的。

图版说明

A. 成熟种胚愈伤组织诱导。 B. 抗性愈伤组织筛选。 C. T₀代转基因苗除草剂(Basta)抗性鉴定。 D、E. 分别为*HindIII*单酶切和*HindIII*+*SmaI*双酶切*Bt*转基因水稻的Southern杂交分析。 1: 阳性对照, 2~5: 来自BX₁株系转基因植株, 6~9: 来自BX₂株系转基因植株, 10~13: 来自BX₃株系转基因植株, 14~17: 来自BX₄株系转基因植株, 18~21: 来自XB₅株系转基因植株, 22: 阴性对照。 F. T₂代*Xa21*转基因水稻的PCR分析, 1 Marker DL2000, 2 阳性对照, 3 阴性对照, 4~10 阳性植株。 G 转*Bt*基因水稻和对照中国91田间抗虫情况, 左: 转基因水稻, 右: 对照。

Explanation of plate

A. Calli induced from mature embryo of rice B. Resistant calli selected with PPT. C. Basta resistant detection in T₀ transgenic plants D, E: Southern blot analysis of transgenic plants genomic DNA, digested with *HindIII* and *HindIII*+*SmaI*. 1: Positive control 2~5: Transgenic plants DNA from BX₁ progeny. 6~9: Transgenic plants DNA from BX₂ progeny. 10~13: Transgenic plants DNA from BX₃ progeny. 14~17: Transgenic plants DNA from BX₄ progeny. 18~21: Transgenic plants DNA from BX₅ progeny. 22 Negative control F. PCR analysis of transgenic rice plants for *Xa21* gene 1: Marker DL2000 2: Positive control 3: Negative control 4: 4~10 positive plants G Field resistance of *Bt* transgenic rice and un-transformed rice Zhongguo91 to stem borer. Left: *Bt* transgenic rice plants, Right: Control

References

- [1] Heinrichs E A, Medrano F G, Rapusas H R. *Genetic Evaluation for Insect Resistance in Rice*. International Rice Research Institute, Los Banos, Philippines, 1985.
- [2] Zhu C-X (朱常香), Hu Q-A (胡全安), Wen F-J (温孚江) *et al*. Production of insect-resistant rice plants transformed with *cryI-A* (b) and *pinII* genes. *Journal of Agricultural Biotechnology* (农业生物技术学报), 1999, 7(3): 259~266.
- [3] Wu C, Fan Y, Zhang C, *et al*. Transgenic fertile japonica rice plants expressing a modified *cryIA* (b) gene resistant to yellow stem borer. *Plant Cell Reports* 1997, 17: 129~132.
- [4] Xu D, Xue Q, McEbray D *et al*. Constitutive expression of a cowpea trypsin inhibitor gene, *CPTI*, in transgenic rice plants confers resistance to two major rice insect pests. *Molecular Breeding*, 1996, 2: 167~173.
- [5] Song W Y, Wang G L, Romald, *et al*. A Receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, *Xa21*. *Science*, 1995, 270: 1804~1806.
- [6] Tu J, Ona I, Datta S K *et al*. Transgenic rice variety 'R72' with *Xa21* is resistant to bacterial blight. *Theor Appl Genet*, 1998, 97: 31~36.
- [7] Zhang S, Song W Y, Chen L, *et al*. Transgenic elite *Indica* rice variety resistant to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Molecular Breeding*, 1998, 4: 551~558.
- [8] Zhai W-X (翟文学), Li X-B (李小兵), Tian W-Z (田文忠), *et al*. Transformation of rice bacterial blight resistance gene *Xa21* to Chinese rice varieties by using *Agrobacterium* mediated system. *Science in China (Series C)* (中国科学, C辑), 2000: 30(2): 200~206.
- [9] Zhu C-X (朱常香), Wen F-J (温孚江), Pan C-X (潘春欣). Study on transformation of rice gene by PIG gene gun. *Acta Agronomica Sinica* (山东农业大学学报), 1996, 27(2): 123~128.
- [10] Zhu C-X (朱常香), Song Y-Z (宋云枝), Qi S-W (齐苏伟), *et al*. Mediate transformation of rice immature embryos and regeneration of transgenic plants. *Acta Agronomica Sinica* (山东农业大学学报), 2000, 31(1): 1~7.
- [11] Sambrook E F, Fritsch T, Maniatis T. *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [12] Peng J, Wen F, Lister R M, *et al*. Inheritance of *gusA* and neo genes in transgenic rice. *Plant Molecular Biology*, 1995, 27: 91~104.

王爱菊等：利用 *Bt* 基因和 *Xa21* 基因转化获得抗螟虫、白叶枯病的转基因水稻
 WANG Ai-Ju *et al.* : Obtaining of Transgenic Rice Plants Resistant to both Stem Borer and Bacterial blight Disease from *Bt* and *Xa21* Genes Transforming

图版 I
 Plate I

