

抗稻瘟病和纹枯病的转基因水稻新品系^{*}

许新萍¹, 陈金婷¹, 张建中², 杨祁云³, 李宝健¹

(1. 中山大学生物工程研究中心, 广东 广州 510275;

2. 湛江海洋大学农学系, 广东 湛江 524088;

3. 广东省农业科学院植物保护研究所, 广东 广州 510640)

摘要: 将水稻碱性几丁质酶基因(RC24)导入优良籼稻品种竹籼B, 外源RC24基因可以稳定整合到R0代至R6代转基因水稻基因组中, 并得到表达. 已获得同时抗稻瘟病和纹枯病的转基因品系竹转68和竹转70以及43个转基因纯合株系.

关键词: 水稻; RC24基因; 转基因品系; 稻瘟病; 纹枯病

中图分类号: Q789 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579(2001)03-0131-02

近年来, 人们利用具有广谱抗真菌作用的几丁质酶基因等提高了水稻对其主要真菌病害稻瘟病、纹枯病的抗性, 但已有的报道还仅限于获得抗病转基因植株(R0代、R1代)^[1~3]或纯合株系(R2代)^[4]. 本文报道应用水稻酸性几丁质酶基因(RC24)转化易感稻瘟病和纹枯病的优良籼稻品种竹籼B, 培育出同时抗稻瘟病和纹枯病的转基因水稻新品系竹转68、竹转70.

用基因枪法将RC24基因(质粒pARN6)与标记基因hpt基因(质粒p35H)共转化至竹籼B的胚性愈伤组织, 筛选和再生得到40个潮霉素抗性再生植株系的496株R0代植株. Southern blot分析证明40个再生植株系全部都整合有hpt基因, 其中29个再生植株系同时整合有外源RC24基因. Northern blot分析表明整合在部分转基因水稻基因组中的外源RC24基因能在RNA水平上得到表达, 但不同转基因植株中表达量不同. 酶活分析表明转基因植株的几丁质酶酶活是未转化对照植株酶活的2.6~13.8倍.

选取广东省稻瘟病菌的5个代表菌株对R1代植株进行的苗期抗稻瘟病鉴定表明: 12.5%~37.3%的R1植株表现为高抗(0~3级), 4.8%~42.0%表现为中抗(4级), 而未转化对照植株表现为中感或高感(6~9级). 分子杂交及遗传分析证实: 大部分转基因植株中多个拷贝的外源RC24基因是整合在转基因水稻染色体上同一个位点或相近位点, 作为显性基因稳定地遗传至

R1代且在R1代的分离比符合3:1的孟德尔规律; 外源RC24基因在部分R1代转基因植株中能继续稳定表达, 表达量的高低与转基因植株对稻瘟病的抗性强弱呈正相关(图1). 对纹枯病菌的离体叶片接种实验表明对稻瘟病菌抗性增强的R1代转基因植株同时也增强了对纹枯病菌的抗性.

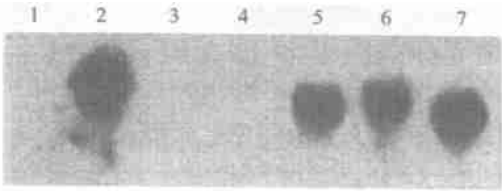


图1 R1代转基因植株RC24基因的Northern blot分析

Fig. 1 Northern blot analysis of R1 transgenic plants, hybridized with the α -³²P labeled probe of 0.7 kb RC24 gene fragment

1 CK; 2 1-15-3; 3 3-4-4; 4 17-5-2; 5 19-2-1; 6 23-4-5; 7 54-2-1

对R1代抗病转基因植株的R2代继续进行稻瘟病抗性鉴定, 16株R1植株的R2代各植株对广东省优势生理小种中的3个代表菌株均表现一致的高抗或中抗(0~4级), 对非优势生理小种但致病性强的2个菌株均表现一致的中感或高感(5~9级); 而未转化对照植株对这5个菌株表现为中感或高感. 其余R1植株的后代表现出

^{*} 基金项目: 国家八六三计划资助项目(101-01-02-02); 国家转基因植物研究与产业化专项资助项目(J99-B-012)

收稿日期: 2001-01-19; 作者简介: 许新萍(1964-), 女, 副研究员; 通讯联系人: 李宝健.

抗性分离现象. 对抗性不分离的 R2 代植株进行 PCR 分析和 Southern blot 分析, 选出了 7 个抗病转基因纯合株系. Southern blot 证明转基因纯系中 R2 代各植株的杂交模式完全相同并且与其 R1 代母株一致. Northern blot 分析、酶活分析表明这些转基因纯系中外源 RC24 基因得到稳定表达. 对 R2 代转基因纯系植株进行的人工接种抗纹枯病鉴定再次证实转基因植物不但提高了对稻瘟病的抗性, 同时也提高了对纹枯病的抗性.

综合分析苗期抗稻瘟病鉴定、PCR 分析及 Southern blot 杂交的结果, 在 R3 ~ R6 代继续选出了 36 个整合有外源 RC24 基因的抗病转基因纯系. 分子杂交也证明在 R2 代选出的转基因纯系, 其 R3 ~ R6 代中外源 RC24 基因的整合模式保持一致; 在大部分转基因纯系中外源 RC24 基因可持续多代得到稳定表达.

对抗病转基因纯系进行加代扩繁, 并作苗期抗谱测定和田间自然诱发抗病试验, 进一步培育成抗病转基因品系. R3 代 ~ R6 代竹转 68 (来自纯系 Z6-5-8-1)、竹转 70 (来自纯系 Z7-3-10-1) 种植在湛江遂溪、从化吕田、汕尾海丰稻瘟病高发区进行田间自然诱发抗病试验, 均没有发生叶瘟, 而且表现出抗或中抗穗瘟 (3、4 级). 未转化对照植株叶瘟发生较轻, 而穗瘟发病严重 (7~9 级) (图 2). 苗期抗谱测定结果表明 R4 代竹转 68、竹转 70 对广东省稻瘟病菌 10 个代表生理小种 26 个菌株的抗性频率分别为 73.1%、76.9%, 而未转化对照抗性频率为 46.2%.

对 R4 ~ R6 代竹转 68 和竹转 70 进行田间人工接种抗纹枯病试验, 结果表明接种后转基因水稻中纹枯病的横向和纵向扩展都受到抑制, 转基因品系平均病情指数和病秆率均明显低于未转化



图 2 转基因品系的田间自然诱发抗稻瘟病试验

Fig 2 Rice blast resistance test of transgenic strain in nursery field
上: 竹转 68; 下: 未转化对照

对照. 因此, 抗稻瘟病的转基因水稻品系对纹枯病的抗性也得到显著提高.

抗稻瘟病和纹枯病的转基因水稻品系竹转 68 和竹转 70 在田间试种时, 表现出产量高、米质好等优点, 用竹转 68 配制的一些强优组合增产显著. 预计这两个品系获准商品化生产后的推广应用前景良好.

参考文献:

- [1] LIN W, AUNRATHA C S, DATTA K, et al. Genetic engineering of rice for resistance to sheath blight[J]. Bio/Technology, 1995, 13: 686-691.
- [2] NISHIZAWA Y, NISHIO Z, NAKAZONO K, et al. Enhanced resistance to blast (*Magnaporthe grisea*) in transgenic japonica rice by constitutive expression of rice chitinase[J]. Theor Appl Genet, 1999, 99: 383-390.
- [3] 冯道荣, 卫剑文, 许新萍, 等. 转多个抗真菌蛋白基因水稻植株的获得及其抗稻瘟病菌的初步研究[J]. 中山大学学报(自然科学版), 1999, 38(4): 62-66.
- [4] 冯道荣, 许新萍, 卫剑文, 等. 应用双抗真菌蛋白提高水稻抗病性的研究[J]. 植物学报, 1999, 41(11): 1187-1191.

Novel Transgenic Rice Strains Resistant to Blast and Sheath Blight

XU Xin ping¹, CHEN Jin ting¹, ZHANG Jian zhong², YANG Qi yun³, LI Bao jian¹

(1. Biotechnology Research Center, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China;

2. Department of Agronomy, Zhanjiang Ocean University, Guangdong Zhanjiang 524088, China;

3. Plant Protection Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China)

Abstract: The genome a rice basic chitinase gene (RC24) was introduced into the elite indica variety Zhuxian B, and stably integrated in the genome of transgenic rice from R0 generation to R6 generation and expressed. Two transgenic strains, Zhuzhuan 68 and Zhuzhuan 70, and 43 zy transgenic lines were obtained, showing significantly higher resistance against rice blast and sheath blight.

Keywords: rice; RC24 gene; blast; sheath blight; transgenic strain