

籼稻 R996 转 *Pi9* 基因纯系的筛选及稻瘟病抗性鉴定

潘素君^a, 李魏^{a,b}, 高佳^b, 戴良英^{a,b*}

(湖南农业大学 a.作物基因工程湖南省重点实验室; b.植物保护学院, 湖南 长沙 410128)

摘 要: 采用农杆菌介导法将抗稻瘟病 *Pi9* 基因导入籼稻品种 R996, 获得转基因植株, 并对这些转基因植株进行遗传分析。结果表明: *Pi9* 基因已经整合到受体细胞基因组中, 并在转录水平上得到了有效表达; 对转基因植株后代进行潮霉素抗性、GUS 染色和 PCR 检测分析, 鉴定出 *Pi9* 基因阳性转化子; 经稻瘟病抗性鉴定, 从 T₁ 代符合孟德尔分离比(1 : 2 : 1)的分离群体中, 成功筛选出转 *Pi9* 基因的籼稻 R996 纯系。

关 键 词: 籼稻 R996; *Pi9* 基因; 转基因植株; 稻瘟病抗性

中图分类号: S511.2⁺10.34

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2014)06-0589-04

Screening of homozygous *Pi9* gene transgenic lines of *Indica* cultivar R996 and identification of its rice blast resistance

PAN Su-jun^a, LI Wei^{a,b}, GAO Jia^b, DAI Liang-ying^{a,b*}

(a.Crop Gene Engineering Key Laboratory of Hunan Province; b.College of Plant Protection, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract: *Pi9*, the first cloned gene with broad-spectrum resistance to rice blast, was introduced into *Indica* cultivar R996 via *Agrobacterium*-mediated transformation. The subsequent genetic analysis showed that *Pi9* was successfully introduced into the genome of the receptors, which displayed stable expression of *Pi9* at transcription level. The offspring of the transgenic plants were analyzed by hygromycin resistance assay, GUS staining and PCR detection. And the homozygous *Pi9*/R996 transgenic lines were identified from the T₁ generation showing 1 : 2 : 1 Mendel segregation through rice blast resistance assay conducted on *Pi9* positive transformants.

Key words: *Indica* cultivar R996; *Pi9* gene; transgenic plant; the resistance of rice blast

稻瘟病是水稻的三大病害之一, 常给水稻生产造成巨大的损失^[1-3]。利用转基因技术将抗稻瘟病基因转入优质的易感病的水稻品种中, 通过杂交、回交等方法获得高抗品系是减少稻瘟病病害的有效途径之一。目前, 在水稻的不同染色体上已定位了超过 86 个稻瘟病主效抗性基因, 350 个微效基因^[2,4]。1999 年, 通过图位克隆得到了第 1 个稻瘟病抗性基因 *Pib*^[5]。迄今, 采用此方法已从不同的水稻品种中成功分离克隆了 *Pi9*^[6]、*Pi2*^[7]、*Pi1*^[8]、*Pb1*^[9]等 22 个稻瘟病抗性基因^[10]。稻瘟病菌生理小种的多样性及

稻瘟病与抗性基因之间的协同进化关系, 限制了稻瘟病抗性基因和抗性品种的推广应用。

Pi9 基因位于水稻第 6 号染色体短臂近着丝粒区域的 *Pi2/9* 位点, 基因全长约 9.5 kb, 包括 2 个长度分别为 5 362 bp 和 128 bp 的内含子, 以及由 3 099 bp 的编码区和 910 bp 3' UTR 组成的 cDNA。*Pi9* 编码 1 个由 1 032 个氨基酸组成的蛋白产物。该产物羧基端含有富亮氨酸重复域(LRRs), 在氨基端含有核苷酸结合位点(NBS)。目前, 已证实 *Pi9* 基因对 100 多个稻瘟病菌小种具有抗性^[6]。笔者采用农杆菌介导法将

收稿日期: 2013-06-23

基金项目: 国家自然科学基金项目(31371246, 31300250); 转基因生物新品种培育重大专项(2013ZX08001-002, 2012ZX08009001)

作者简介: 潘素君(1973—), 女, 湖南宁远人, 博士, 副研究员, 主要从事分子生物学研究, sujunpan@163.com; *通信作者, daily@hunau.net

Pi9 转入籼稻品种 R996^[11], 并进行了转基因植株纯系筛选以及稻瘟病抗性的鉴定, 以期通过下一步遗传杂交方法获得高抗稻瘟病水稻新品种。

1 材料和方法

1.1 材料

R996 转 *Pi9* 基因植株; 含 *Pi9* 基因植株 75-1-127; 稻瘟病菌生理小种 110-2。

1.2 方法

1.2.1 潮霉素抗性筛选

选择 T_1 代符合孟德尔分离比(1 : 2 : 1)的转基因植株, 经几代繁殖筛选, 获得的单株成熟种子去壳, 用体积比为 30% 的次氯酸钠溶液消毒处理 30 min, 无菌水清洗 5~6 次后, 将种子转移到含有 50 mg/L 潮霉素的 1/2MS 培养基中, 置于 26 °C 的光照培养箱中培养, 10 d 后观察筛选情况。

1.2.2 GUS 活性测定

转基因水稻细胞中 *GUS* 基因的表达基本按文献[12]的方法测定。以受体 R996 的根和叶作染色对照, 将经过潮霉素筛选的转基因植株的根和叶片剪取一小部分, 放入 1.5 mL 离心管中, 加入适量 X-Gluc 染色液, 在 37 °C 恒温箱中保温过夜。倒掉染色液, 用 70% 的乙醇脱色。

1.2.3 PCR 检测

按 CTAB 法提取经过潮霉素筛选和 *GUS* 活性测定的转基因苗和对照受体植株 R996 的基因组 DNA。PCR 引物选用潮霉素抗性基因引物 HPT-1F/HPT-1R, 其扩增引物序列为: HPT-1F, 5'-TACCTCTACACAGCCATC-3'; HPT-1R, 5'-TATGTCCTGCGGGTAAAT-3'。扩增片段大小为 837 bp。分别以受体为阴性对照, 以质粒 pCAMBIA1301-*Pi9* 为阳性对照。PCR 扩增反应条件: 94 °C 预变性 3 min, 94 °C 变性 50 s, 52 °C 退火 50 s, 72 °C 延伸 60 s, 循环 37 次; 最后 72 °C 延伸 10 min。

1.2.4 转基因植株的稻瘟病抗性鉴定

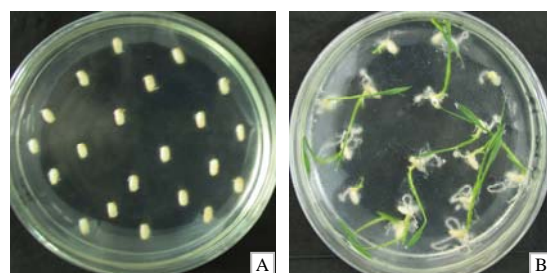
为检测呈阳性的转 *Pi9* 基因 R996 植株是否具有稻瘟病抗性, 用稻瘟病菌小种 110-2 对上述 3 种

方法均鉴定为阳性的转 *Pi9* 基因 R996 株系进行喷雾接种, 并以具有 *Pi9* 基因的植株 75-1-127 和受体 R996 为抗、感病对照。具体做法: 将稻瘟病菌接种在燕麦片番茄汁琼脂培养基上, 于 26 °C 培养 7~10 d, 用 0.1% 的 Tween20 水溶液洗下分生孢子, 接种孢子浓度约为 2×10^5 个/mL。清水浸种 24 h, 34~37 °C 催芽 20 h 左右至种子露白, 播种后放入 26 °C 的光照培养箱中生长, 幼苗长到 3~4 叶期时, 进行稻瘟病菌喷雾接种。接种后 26 °C 保湿暗培养 24 h, 然后光照培养 7 d, 调查发病情况。

2 结果与分析

2.1 转 *Pi9* 基因 R996 株系的潮霉素筛选结果

将受体和转基因植株的种子消毒后, 在潮霉素浓度为 50 mg/L 的 1/2MS 培养基中筛选, 受潮霉素抑制, 受体 R996 不萌发, 而转 *Pi9* 基因 R996 种子的根能正常生长, 还能长出叶片(图 1), 说明转 *Pi9* 基因 R996 植株中由于具有 *hpt* 基因使植株具有潮霉素抗性。



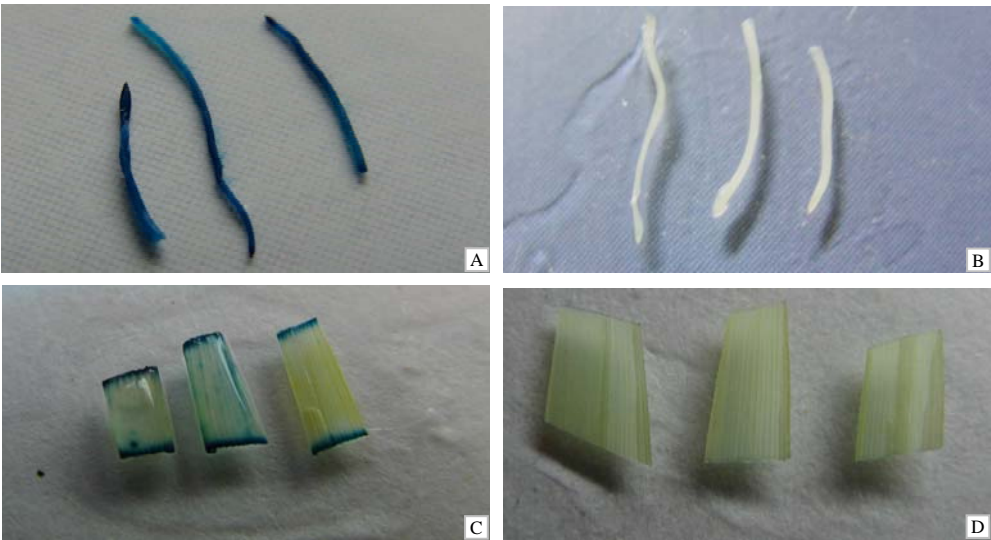
A 对照受体R996; B 转*Pi9*基因R996。

图1 潮霉素抗性筛选转基因植株

Fig.1 Screening of transgenic plants using hygromycin

2.2 *GUS* 基因在转 *Pi9* 基因 R996 植株中的瞬时表达

GUS 染色结果显示, R996 转 *Pi9* 基因植株后代株系的根呈明显蓝色(图 2-A), 而受体 R996 的根不显色(图 2-B)。同样, 转 *Pi9* 基因 R996 植株叶片被剪两端也呈现蓝色, 中间部分叶片因蜡质层阻挡, 染色液难到达, 所以基本无色(图 2-C)。对照 R996 叶片被剪两端没有蓝色(图 2-D)。表明 *GUS* 基因在转基因植株后代中能高效表达, 目的基因 *Pi9* 在后代中稳定遗传。



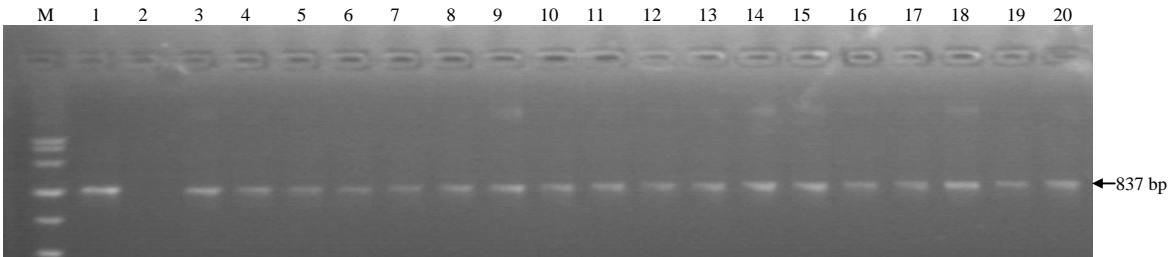
A 转*Pi9*基因R996植株的根；B 对照R996的根；C 转*Pi9*基因R996植株的叶；D 对照R996的叶。
图2 转基因植株GUS检测

Fig.2 Result of GUS detection of transgenic plants

2.3 转 *Pi9* 基因 R996 植株的 PCR 检测结果

由于 *Pi9* 基因同源片段在水稻基因组中广泛分布，较难设计 *Pi9* 的特异引物，故选用潮霉素抗性基因引物。T₁ 代表现为 1 2 1 孟德尔分离规律的转 *Pi9* 基因 R996 植株后代，经 PCR 检测均能扩增

出 837 bp 的特异条带，表明转 *Pi9* 基因的 R996 植株后代不再发生分离。这与 GUS 染色和潮霉素筛选结果一致，即有 GUS 显色和潮霉素抗性的植株均可扩增出 837 bp 的目的片段，而受体 R996 基因组 DNA 不能扩增出该目的条带(图 3)。



M DL 2 000；1 质粒；2 受体；3~20 转基因植株。

图 3 转基因植株的 PCR 检测结果

Fig.3 PCR result for transgenic plants

2.4 转 *Pi9* 基因 R996 植株的稻瘟病抗性检测

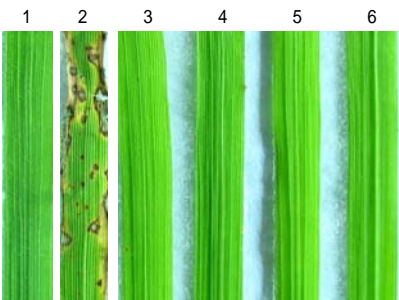
转 *Pi9* 基因 R996 植株的稻瘟病抗性检测结果(图 4)表明，转基因植株没有出现明显的稻瘟病病

斑，对稻瘟病表现出强抗性。含有 *Pi9* 基因的 75-1-127 植株叶片也没有病斑，而受体 R996 病斑明显，感病严重。

综合上述 GUS 染色、潮霉素抗性检测、PCR 分析以及稻瘟病抗性检测结果，说明 *Pi9* 基因不仅整合到转基因植株的染色体上，而且成功在子代中稳定遗传，并表现出对稻瘟病的强抗性。

3 讨 论

有研究^[13]表明，稻瘟病广谱抗性是持久抗性的重要组成部分。随着分子生物学的发展，广谱抗性基因在抗病育种中的应用越来越重要。*Pi9* 基因作



1 含 *Pi9* 基因的 75-1-127 植株；2 受体 R996；3~6 转 *Pi9* 基因 R996 植株。

图 4 稻瘟病菌接种结果

Fig.4 Result for rice blast inoculation test

为稻瘟病广谱、持久抗源,目前相对水稻其他功能基因在育种上的应用更有效、更广泛。潘素君等^[14]将 *Pi9* 基因导入籼稻 1701 品种获得的转基因植株对稻瘟病菌具有很强的抗性。梁海福等^[15]利用常规回交育种结合分子标记辅助选择技术,将高抗水稻白叶枯病 *Xa4* 和 *Xa23* 基因、广谱高抗稻瘟病 *Pi9* 基因聚合到同一株系中,获得了三基因聚合的纯合株系,对稻瘟病的抗性与供体亲本 75-1-127 水平相当。倪大虎等^[16-18]利用分子标记辅助选择将广谱高抗稻瘟病的 *Pi9* 基因和高抗白叶枯病的 *Xa21* 和 *Xa23* 基因聚合到优良株系中,获得了多抗基因的优良新株系。文绍山等^[19]将 *Pi9* 基因导入水稻品种泸恢 17,经田间抗性鉴定,抗性基因纯合株系的稻瘟病抗性比受体明显提高。殷得所等^[20]将 *Pi9* 基因通过杂交导入水稻品种扬稻 6 号和 R6547,经病圃鉴定有 *Pi9* 基因株系的稻瘟病抗性水平较受体品种扬稻 6 号和 R6547 有不同程度的提高。

本研究利用农杆菌介导法将 *Pi9* 基因导入籼稻 R996,通过 GUS 染色、潮霉素抗性筛选和 PCR 检测,鉴定出转基因植株的纯合系。经稻瘟病菌接种检测表明,转 *Pi9* 基因 R996 植株对稻瘟病抗性比受体 R996 明显增强。下一步将选用高产、优质但抗性差的水稻品种与转基因纯合系进行杂交育种,以期获得抗稻瘟病新种质。

参考文献:

- [1] Baker B, Zambryski P, Staskawicz B, et al. Signaling in plant-microbe interactions[J]. Science, 1997, 276: 726-733.
- [2] Ballini E, Morel J B, Droc G, et al. A genome-wide meta-analysis of rice blast resistance genes and quantitative trait loci provide new insights into partial and complete resistance[J]. Mol Plant Microbe Interact, 2008, 21(7): 859-868.
- [3] Moffat A S. Mapping the sequence of disease resistance[J]. Science, 1994, 265: 1804-1805.
- [4] Liu Y, Liu B, Zhu X, et al. Fine-mapping and molecular marker development for *Pi56(t)*, a NBS-LRR gene conferring broad-spectrum resistance to *Magnaporthe oryzae* in rice[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2013, 126(4): 985-998.
- [5] Wang Z X, Yano M, Yamanouchi U, et al. The *Pib* gene for rice blast resistance belongs to the nucleotide binding and leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes[J]. The Plant Journal, 1999, 19(1): 55-64.
- [6] Qu S, Liu G, Zhou B, et al. The broad-spectrum blast resistance gene *Pi9* encodes a nucleotide-binding site-leucine-rich repeat protein and is a member of a multigene family in rice[J]. Genetics, 2006, 172: 1901-1914.
- [7] Zhou B, Qu S, Liu G, et al. The eight amino acid differences within three leucine-rich repeats between *Pi2* and *Piz-t* resistance proteins determine the resistance specificity to *Magnaporthe grisea*[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2006, 19(11): 1216-1228.
- [8] Hua L, Wu J, Chen C, et al. The isolation of *Pi1*, an allele at the *Pik* locus which confers broad spectrum resistance to rice blast[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2012, 125(5): 1047-1055.
- [9] Hayashi N, Inoue H, Kato T, et al. Durable panicle blast-resistance gene *Pb1* encodes an atypical CC-NBS-LRR protein and was generated by acquiring a promoter through local genome duplication[J]. The Plant Journal, 2010, 64(3): 498-510.
- [10] 何秀英, 王玲, 吴伟怀, 等. 水稻稻瘟病抗性基因的定位、克隆及育种应用研究进展[J]. 中国农学通报, 2014, 30(6): 1-12.
- [11] 潘素君, 戴良英, 刘雄伦, 等. 广谱抗稻瘟病基因 *Pi9* 对籼稻的转化研究[J]. 分子植物育种, 2006, 4(5): 650-654.
- [12] Jefferson R A. Assaying chimeric genes in plants: The *GUS* gene fusion system[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 1987, 5(4): 387-405.
- [13] Wu J L, Fan Y Y, Li D B, et al. Genetic control of rice blast resistance gene in the durably resistant cultivar Gumei 2 against multiple isolates[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2005, 111(1): 50-56.
- [14] 潘素君, 戴良英, 刘雄伦, 等. 籼稻 1701 转 *Pi9* 基因株系的遗传分析及抗瘟性鉴定[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2008, 34(5): 579-582.
- [15] 梁海福, 阎勇, 秦钢, 等. 利用分子标记辅助选择聚合 *Xa4*、*Xa23* 和 *Pi9* 基因[J]. 广西农业科学, 2010, 41(5): 408-411.
- [16] 倪大虎, 易成新, 李莉, 等. 利用分子标记辅助选择聚合水稻基因 *Xa21* 和 *Pi9* (t) [J]. 分子植物育种, 2005, 3(3): 329-334.
- [17] 倪大虎, 易成新, 杨剑波, 等. 利用分子标记辅助选择聚合 *Pi9* (t) 和 *Xa23* [J]. 分子植物育种, 2007, 5(4): 491-496.
- [18] 倪大虎, 易成新, 李莉, 等. 分子标记辅助培育水稻抗白叶枯病和稻瘟病三基因聚合系[J]. 作物学报, 2008, 34(1): 100-105.
- [19] 文绍山, 高必军. 利用分子标记辅助选择将抗稻瘟病基因 *Pi-9* (t) 渗入水稻恢复系泸恢 17 [J]. 分子植物育种, 2012, 10(1): 42-47.
- [20] 殷得所, 夏明元, 李进波, 等. 抗稻瘟病基因 *Pi9* 的 STS 连锁标记开发及在分子标记辅助育种中的应用[J]. 中国水稻科学, 2011, 25(1): 25-30.

责任编辑: 苏爱华

英文编辑: 罗维