

花粉管介导的转 bar 基因水稻植株的 获得及其遗传*

赵 凌¹ 王才林^{1**} 宗寿余¹ 黄骏麒¹ 龚蓁蓁²

(1 江苏省农业科学院粮食作物研究所 南京 210014 2 中国科学院上海生物化学研究所 上海 200031)

摘要 采用花粉管通道法将 bar 基因导入籼稻品系 E32, 得到对除草剂 Basta 具有抗性的转基因水稻。遗传分析表明外源 bar 基因在受体植株后代中呈单基因显性遗传, 在世代间可以稳定遗传。目前已分离出抗性稳定的株系。

关键词 水稻 花粉管通道法 bar 基因 转基因植株 遗传

bar 基因是一种有效的筛选标记, 已被国内外育种工作者导入玉米、小麦、大麦、水稻、高粱等 20 多种作物^[1~5]。中国水稻研究所黄大年等^[6~8]利用基因枪法将 bar 基因导入到水稻品种/ 京引 1190 中, 并开展了利用 bar 基因提高和快速鉴定杂交稻纯度的尝试。本文通过花粉管通道法用 bar 基因转化两系法亚种间杂交稻/ 65396(培矮 64SPE32)0 的恢复系 E32, 获得了 E32 的转基因植株; 并对 bar 基因在转基因植株后代中的遗传进行了研究。

1 材料与方法

1.1 材料

bar 基因质粒来源于美国 Cornell 大学 Wu Ray 先生, 其基因结构与 Cao 等^[9]报道的相同。受体为两系超级杂交水稻 65396 的父本 E32。

1.2 方法

1.2.1 bar 基因的导入 采用花粉管通道法^[10, 11]进行 bar 基因的转导。取 E32 典型植株移栽到盆钵。开花后除去穗上已开过和尚未开放的颖花, 每穗保留当天已经或正在开放的颖花 20~ 30 朵, 剪去每朵颖花内颖的 IP2 后, 将 IP3 花柱连同柱头一起剪去, 用微量注射器将含供体 bar 基因质粒的溶液滴注到刚剪去柱头的花柱上, 每朵颖花滴注 2~ 3Ll, 立即套袋, 成熟后收种。

1.2.2 除草剂抗性鉴定 收获种子经消毒、浸种、催芽后播于盆钵。5 叶 1 心时, 用 0.12% 的 Basta 除草剂进行喷雾处理。7 天后调查抗性。抗性植株生长正常, 敏感植株整株发枯, 7 天后死亡。

1.2.3 PCR 分析 取分蘖期水稻叶片, 按 SDS 碱法提取总 DNA。所用的 bar 基因特异引物为:

引物 1: 5'-AAACCCACGTCATGCCAGTTC-3'

引物 2: 5'-CGAGACAAGCACGGTCAACTTC-3'

以提取的总 DNA 为模板, 加上引物、反应缓冲液、dNTP 和 Taq 酶后, 进行 PCR 扩增。95℃ 预变性 5min, 94℃ 变性 30s, 56℃ 复性 1min, 72℃ 延伸 1min, 35 个循环后, 72℃ 再延伸 7min。将扩增产物在 1% 琼脂糖凝胶上电泳并照相。

1.2.4 遗传分析 2000 年夏季在南京获得的 4 个抗性植株(T₁) 所结种子冬季在海南种成 4 个株系(T₂), 计 566 株。苗期用 0.12% Basta 除草剂进行抗性鉴定, 调查抗与不抗植株的比例, 抗性植株收获种子于 2001 年夏季在南京种植(T₃), 如此逐代跟踪调查。

2 结果

2.1 转基因植株的获得

1999 年夏季用花粉管通道法处理 E32 的小花 1090 朵, 获得 425 粒种子, 结实率为 38.199%。将其中的 231 粒种子冬季在海南播种, 其余种子于 2000 年夏季在南京播种, 共成苗 70 株, 成苗率为 14.112%。其中海南播种成苗的植株(T₀) 经 Basta 处理后, 有 30 个单株表现部分抗性, 收获种子于

收稿日期: 2003-04-07 修回日期: 2003-06-18

* 江苏省高技术研究基金项目(BG2001304, BG2002301), 中国水稻科学基金项目(0003215)

** 通讯作者, 电子信箱: cfwang@jaas.ac.cn

2000 年夏季在南京种成株系(T_1)后继续鉴定, 结果有 4 株表现完全抗性。2000 年夏季在南京播种成苗的植株中未获抗性植株。

212 转基因植株后代除草剂抗性的遗传

将获得的 4 个 T_1 代转基因植株所结种子冬季在海南种成 4 个株系, 计 566 株(T_2), 在苗期经

Basta 除草剂处理鉴定, 389 株表现抗性, 177 株不抗, 两者的分离比例符合 2B1 比例(表 1)。将其中 386 个抗性植株(有 1 个株系少收 3 个单株)于 2001 年夏季在南京种植(T_3), 苗期用 Basta 除草剂进行抗性鉴定。结果表明, 各系统中分离株系和稳定株系之比为 266B120, 符合 2B1 理论比例(表 1)。

表 1 转基因系统 $T_3 \sim T_5$ 代株系内除草剂抗性的分离比例

世代 Generation	株系数 No. of lines	分离株系数 Segregating lines	不分离株系数 Unsegregating lines	V^2 (2B1)	P
T_3	386	266	120	0.178	0.25~0.150
T_4	15	11	4	0.108	0.75~0.190
T_5	10	8	2	0.131	0.50~0.175

从 120 个稳定株系中的 5 个株系和 266 个分离株系的 3 个株系中, 每株系选择 5 株, 2001 年冬季在海南种植成 40 个株系(T_4), 苗期抗性鉴定结果表明, 5 个抗性稳定系统的 25 个株系抗性均不分离。3 个分离系统的 15 个株系中 4 个株系抗性不分离, 11 个株系呈 3B1 分离, 分离株系数与不分离株系数之比符合 2B1 理论比例。

2002 年春继续在 25 个稳定株系中选择 11 个系, 每个系选择 3 株, 在 11 个分离株系的 3 个系中共选择 10 株, 2002 年夏季在南京种植 43 个株系(T_5), 抗性鉴定的结果表明, 11 个抗性稳定系统的 33 个株系抗性不分离。3 个分离系统的 10 个株系中 2 个株系抗性不分离, 8 个株系呈 3B1 分离, 分离株系数与不分离株系数之比符合 2B1 理论比例。以上结果表明, 整合到受体植株基因组中的 *bar* 基因, 能在有性生殖过程中传递给后代, 并在 T_3 代开

始分离出抗性一致的稳定株系(图 1)。

此外, 在 2001 年夏季种植的 266 个 T_3 代分离株系中抽查了 54 个株系的除草剂抗性分离情况, 结果表明, 多数株系符合 2B1 和 3B1 分离, 也有部分大于 3B1、1B1 和 115B1 等分离比例(表 2)。

表 2 T_3 代株系内除草剂抗性的分离情况

分离比例 Segregation ratio	株系数 No. of lines	%
> 3B1	8	15
3B1	13	24
2B1	24	44
115B1	3	6
1B1	6	11
合计 Total	54	100

213 转基因植株后代的 PCR 分析

为了验证 *bar* 基因的导入与否, 从 T_3 代中选择 4 个抗性株, 以 E32 为对照进行 PCR 分析。其结

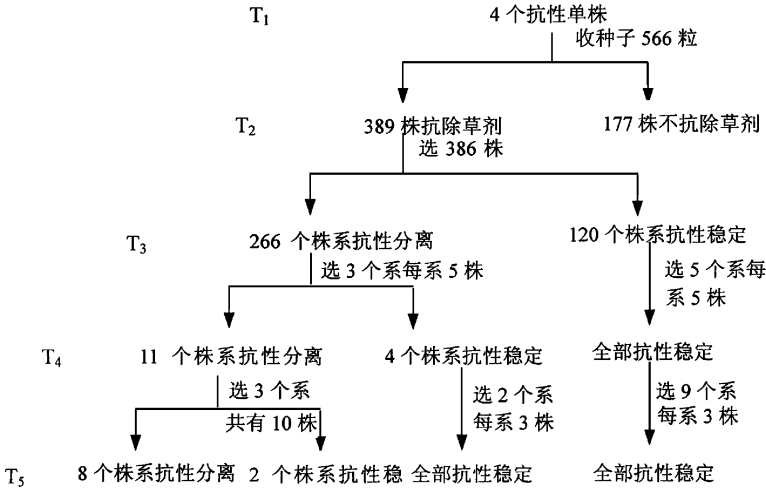


图 1 转基因水稻 $T_1 \sim T_5$ 代除草剂抗性的遗传与分离

果如图 2 所示,扩增片段长度为 426bp。从图可知,4 个抗性植株均产生了扩增片段,表明 *bar* 基因确已整合到 E32 的基因组中。

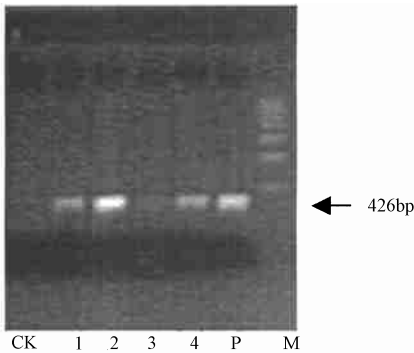


图 2 E32 转 *bar* 基因植株的 PCR 检测结果

CK: E32; 1~4: 转 *bar* 基因植株; P: 阳性对照; M: 1 kb marker

3 讨论

1985 年段晓岚等^[12]首次报道了通过花粉管途径将紫色稻总 DNA 导入绿色水稻,获得了具有紫色性状的植株。由于花粉管通道法操作简单,无基因型限制,省略了组织培养过程,避免了组织培养过程中的体细胞变异,且纯合速度快,已经为水稻育种工作者接受并得到了广泛应用^[13]。我国已有多例成功转化的报道,已将 *Bt* 基因、*Xa21* 基因导入水稻^[14, 15]。

近年来,转基因的研究热点已转向外源基因在受体植物中的遗传和表达,这也是影响转基因技术应用的关键因素之一。已有研究表明,外源基因在受体植物内的整合、遗传和稳定是十分复杂的^[16]。本研究用花粉管通道法将抗 Basta 除草剂的 *bar* 基因导入水稻品系 E32,在 142 个 T_1 代植株中获得了 4 个转基因植株,转化效率 21.8%。此外,本研究结果还表明, E32 转 *bar* 基因的抗性植株在 T_0 代仅表现部分抗性,在 T_1 代才表现完全抗性,而在 T_3 代才出现抗性稳定株系。由此可见,利用花粉管通道法转基因时外源基因的遗传与稳定是十分复杂的,要注意对早期世代表现部分抗性植株的分离选择。

本研究对转 *bar* 基因后代的 PCR 分析及除草剂抗性的跟踪鉴定表明, *bar* 基因已整合到受体植株的基因组中,并在有性生殖过程中传递给后代。根据转基因株系后代除草剂抗性的分离方式,推测 *bar* 基因以单拷贝插入受体染色体组,其遗传符合一对显性基因的遗传方式。转基因植株 $T_1 \sim T_2$ 代

抗性不稳定,从 T_3 代开始分离出抗性稳定的株系,这可能是由于外源 *bar* 基因插入早期没有在受体染色体中稳定,从而呈现不规则分离。随着世代增高,经过多次有丝分裂和减数分裂后,外源 *bar* 基因逐步稳定并遵循孟德尔遗传规律。

本研究将继续对转基因株系后续世代中 *bar* 基因遗传稳定性进行跟踪研究,并将通过基因定位和 Southern 杂交判断 *bar* 基因在受体中的拷贝数和插入位点,为进一步探讨花粉管通道法转基因的机理提供理论基础。

参考文献

- [1] Laursen C M, Krzyzek R A, Flick C E, et al. Production of fertile transgenic maize by electroporation of suspension culture cells. *Plant Mol. Biol.*, 1994, 24: 51~ 61
- [2] Vasil V, Castillo A M, Fromm M E, et al. Herbicide resistant fertile transgenic wheat plants obtained by microprojectile bombardment of regenerable embryonic callus. *Biotechnology*, 1993, 10: 667~ 674
- [3] Wan Y, Lemaux P G. Generation of large numbers of independently transformed fertile barley plants. *Plant Physiol.*, 1994, 104: 37~ 48
- [4] Rathmore K S, Chowdhury V K, Hodges T K. Use of *bar* as a selectable marker gene and for the production of herbicide-resistant rice plants from protoplasts. *Plant Mol Biol.*, 1993, 21: 871~ 884
- [5] Casas A M, Kononowicz A K, Zehr U B, et al. Transgenic sorghum plants via microprojectile bombardment. *Proc Natl Acad Sci*, 1993, 90: 11212~ 11216
- [6] 黄大年, 李敬阳, 章善庆, 等. 用除草剂基因快速检测和提高杂交稻纯度的新技术. *科学通报*, 1998, 44(1): 67~ 70
- [7] 朱冰, 黄大年, 杨炜, 等. 利用基因枪法获得可遗传的抗除草剂转基因水稻植株. *中国农业科学*, 1996, 29(6): 15~ 20
- [8] 章善庆, 董汉华, 薛锐, 等. 利用 *bar* 基因导入恢复系提高杂交稻纯度的尝试. *中国农业科学*, 1998, 31(6): 33~ 37
- [9] Cao J, Duan X L, Mcclary D, et al. Regeneration of herbicide resistant transgenic rice plants following microprojectile-mediated transformation of suspension culture cells. *Plant Cell Reports*, 1992, 11: 586~ 591
- [10] Zhou G Y, Wen J, Huang J Q, et al. Introduction of exogenous DNA into cotton embryos. *Methods in Enzymology*, 1983, 101: 433~ 488
- [11] 龚蓁蓁, 沈慰芳, 周光宇, 等. 授粉后外源 DNA 导入技术))) DNA 通过花粉管通道进入胚囊. *中国科学 B 辑*, 1988, 6: 611~ 614
- [12] 段晓岚, 陈善葆. 外源 DNA 导入水稻引起性状变异. *中国农业科学*, 1985, (3): 6~ 10
- [13] 曾君祉, 吴有强, 王东江, 等. 花粉管通道(或运载体)法转化的植株后代遗传表现及转化机理的探讨. *科学通报*, 1998, 43(6): 561~ 566
- [14] 谢道昕, 范云六, 倪丕冲. 苏云金芽孢杆菌杀虫基因导入中国栽培水稻品种中花 11 号获得转基因植株. *中国科学 B*

辑, 1991, 21(8): 830~ 834

[15] 严其成, 王光清, 葛扣麟, 等. 外源 DNA 通过花粉管通道法
导入水稻的研究. 中国农业科学, 1997, 30(1): 94~ 96

[16] 华志华, 黄大年. 转基因植物中外源基因的遗传学行为. 植
物学报, 1999, 41(1): 1~ 5

Herbicide Resistant Transgenic Rice(*Oryza sativa* L.) Transformed by Pollen2tube Pathway Method and Its Inheritance

Zhao Ling¹ Wang Cailin¹ Zong Shouyu¹ Huang Junqi¹ Gong Zhenzhen²

(1 Institute of Food Crops Jiangsu Academy of Agricultural Sciences Nanjing 210014

2 Shanghai Institute of Biochemistry Academy Sinica Shanghai 200031)

Abstract Transgenic rice plant were obtained by transferring the herbicide resistant gene *bar* into rice breeding line / E320 by pollen2tube pathway method. Genetic analysis showed that *bar* gene could be inherited stably, and its segregation ratio was in conformity with the inheritance law of a single dominant gene. Stable lines without segregation in herbicide resistance have been selected.

Key words Rice(*Oryza sativa* L.) Pollen2tube pathway Bar gene Transgenic plant Inheritance

(上接第 91 页)

Establishment of the Real2time Fluorescent PCR Detection Method for Genetically Modified GA21 Maize

Cao Jijuan^{1, 2} Zhu Shuifang³ Cao Yuanyin¹

(1 Shenyang Agriculture University Shenyang 110161

2 Liaoning Entry2Exit Inspection and Quarantine Bureau Dalian 116001

3 Institute of Animal and Plant Quarantine, AQSIQ Beijing 100029)

Abstract A event2specific real2time fluorescent PCR (RTF PCR) method was established for detection and identification of the genetically modified GA21 maize. The PCR primers and TaqMan probes were designed based on the GA21 border sequence of 270bp and 133bp of OTPPmEPSPS and 430bp of P actin IPmEPSPS. The results show that the TaqMan probe could detect and identify GA21 maize specifically. RTF PCR method is much convenient and quicker to operate than common PCR, much less contamination will occur because whole detection process is finished in the contained tubes. RTF PCR could be a new method for detection of genetically modified organism event2specifically.

Key words PCR Real2time fluorescent PCR GA21 GM2maize Detection and identification