

研究
简报

花粉管介导的水稻转 *bar* 基因植株后代除草剂抗性遗传

王才林 赵凌 宗寿余 朱镇*

(江苏省农业科学院粮食作物研究所, 江苏南京 210014)

Inheritance of Herbicide Resistance in Offsprings of *bar* Transgenic Rice (*Oryza sativa* L.) Obtained by Pollen-tube Pathway Method

WANG Cai-Lin, ZHAO Ling, ZONG Shou Yu, ZHU Zhen

(Institute of Food Crops, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, Jiangsu, China)

除草剂抗性基因(如 *bar* 等)的利用,为控制杂交稻纯度提供了有效途径^[1,2]。据报道,国内外育种工作者已成功地将 *bar* 基因导入玉米^[3]、小麦^[4]、大麦^[5]、水稻^[6]、高粱^[7]、油菜和番茄^[8]等20多种作物。中国水稻研究所黄大年利用基因枪法将 *bar* 基因导入到水稻品种“京引119”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^[1,9,10]。

本文报道通过花粉管通道法用 *bar* 基因转化两系亚种间杂交稻“65396(培矮64S/E32)”的恢复系,获得了E32的转基因植株,证明了 *bar* 基因在转基因植株中的整合与表达;研究了E32的转 *bar* 基因水稻植株后代除草剂抗性的遗传,旨在探讨 *bar* 基因在转化植株后代的遗传特性,为转基因植株后代的分离选择提供依据。

1 材料与方法

供试的受体亲本为两系杂交稻“65396(培矮64S/E32)”的父本“E32(粳)”。*bar* 基因来源于美国 Cornell 大学 Wu Ray 先生。其基因结构与 Cao *et al.* (1992)报道的相同^[11]。

采用花粉管通道法^[12,13]进行 *bar* 基因的转导。取典型植株移栽到钵钵。在盛花期选择正在开花的稻穗,去除未开过的颖花和已开过的颖花,每穗只留下当天刚开的颖花20~30朵。1.5~2.0 h后剪去小穗内颖和1/3~1/2的花柱及柱头。用微量注射器在刚剪去柱头的花柱上滴注含 *bar* 基因的溶液2~3 μ L,套上杂袋袋以防止水分蒸发。25~30 d后收获种子。

收获种子经消毒、浸种、催芽后播于钵钵内育苗。当苗龄达到5叶1心时,用0.2%的Basta除草剂进行喷雾处理。7 d后调查抗性。

按 SDS 碱法提取总 DNA^[14]。所用的 *bar* 基因引物为:

引物 1:5'-AAACCCACGTCATGCCAGTTC-3'

引物 2:5'-CGAGACAAACACGGTCAACTTC-3'

以提取的总DNA为模板,加上 *bar* 基因引物、反应缓冲液、dNTP 和 *Taq* 酶后,进行PCR扩增。扩增体系25 μ L,DNA模板2.5 μ L,95 预变性5 min,94 变性30 s,56 复性1 min,72 延伸1 min,35个循环后,72 再延伸7 min,将扩增产物在1%琼脂糖凝胶上电泳,检测结果并照相。

遗传研究材料为花粉管介导获得的E32转 *bar* 基因植株后代 T₂、T₃、T₄、T₅、T₆ 等世代。在各分离世代的苗期,用0.2%的Basta除草剂处理,7 d后调查统计抗与不抗植株的比例,成活苗移栽后做进一步试验与选择研究,如此逐代跟踪观察。试验于1999~2002年在江苏南京和海南进行。

2 结果与分析

2.1 转基因植株的获得及其对除草剂抗性的表现

1999年以E32为受体,以抗Basta除草剂的 *bar* 为基因供体,通过花粉管通道法进行了遗传转化。共处理1090朵小花,获得425粒种子。播种后成苗70株(T₀)。在6叶期经0.2%的Basta除草剂喷雾处理,结果大部分植株表现不抗,7 d后死亡。其中有30个单株呈部分抗性,叶片中下部有黑褐色抗性斑点,上半部则发黄干枯,生长受阻。7 d后逐渐恢复生长,以后生长正常,直至抽穗结实。收获种子于2000年在南京种成株系(T₁)后继续用0.2%的Basta除草剂处理鉴定,结果有4个植株能充分表达对Basta除草剂的抗性。对其进行PCR分析,检测到了与 *bar* 基因引物扩增片段长度相同的DNA片段(图1),证实 *bar* 基因已整合到受体植株的基因组中。

*基金项目:江苏省高技术研究项目(BG2001304,BG2002301);江苏省应用基础研究项目(BJ2000041);中国水稻科学基金项目(0003215)。

作者简介:王才林(1959-),男,博士,研究员,主要从事水稻遗传育种研究。

Received(收稿日期):2003-01-07,Accepted(接受日期):2003-05-03。

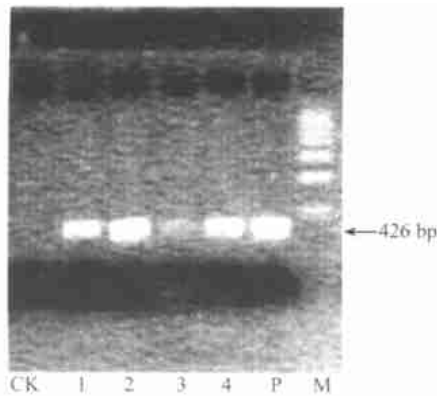


图1 E32 转 *bar* 基因植株的 PCR 检测结果
Fig. 1 PCR analysis of *bar* transgenic plants
CK: E32; 1~4: 转 *bar* 基因植株;
P: *bar* 基因引物; M: 1 kb marker
CK: E32; 1~4: *bar* transgenic plants;
P: *bar* gene primers; M: 1 kb marker

2.2 转基因植株后代除草剂抗性的遗传分析

2.2.1 T_2 和 T_3 代除草剂抗性的遗传分析 对 2000 年获得的 4 个抗性植株 (T_1) 冬季在海南种成 4 个株系 (T_2), 经 Basta 处理鉴定, 其除草剂抗性表现为 2:1 分离比例 (表 1)。

将 4 个株系的 386 个抗性植株 (H004260 收获 83 个单株) 于 2001 年正季在江苏南京播种, 苗期用 Basta 除草剂进行抗性鉴定的结果表明, 各系统中均有分离和不分离株系出现, 两者之比符合 2:1 理论比例 (表 2)。在 266 个分离株系随机抽取 54 个, 调查了株系内的分离比例。结果表明, 多数株系符合 2:1 和 3:1 分离, 这两类株系占 68%。此外, 还出现了大于 3:1 (15%)、1:1 (11%) 和 1.5:1 (6%) 等各种分离比例 (表 3)。

表 1 转基因植株 T_2 代除草剂抗性的遗传

Table 1 Inheritance of herbicide resistance in T_2 generations of transgenic rice plants

区号 Trial No.	抗性株数 Resistant plants	不抗株数 Sensitive plants	χ^2 (2:1)	<i>P</i>
H004258	99	50	0.00	> 0.90
H004259	64	27	0.40	0.50 ~ 0.75
H004260	86	34	1.13	0.25 ~ 0.50
H004261	140	66	0.10	0.75 ~ 0.90
合计 Total	389	177	0.99	0.25 ~ 0.50

表 2 4 个转基因系统 T_3 代株系间除草剂抗性的分离比例

Table 2 Segregation of herbicide resistance among T_3 lines in four pedigrees of transgenic rice plants

系统名 Pedigree No.	株系总数 Total lines	分离株系数 Segregated lines	稳定株系数 Non-segregated lines	χ^2 (2:1)	实际比例 Observed ratio
H004258	99	70	29	0.56	2.41
H004259	64	46	18	0.56	2.56
H004260	83	51	32	0.80	1.59
H004261	140	99	41	0.86	2.41
合计 Total	386	266	120	0.78	2.22

表 3 T_3 代株系内除草剂抗性的分离情况

Table 3 Segregation of herbicide resistance within T_3 lines of transgenic rice plants

分离比例 Segregation ratio	株系数 No. of lines	%
> 3:1	8	15
3:1	13	24
2:1	24	44
1.5:1	3	6
1:1	6	11
合计 Total	54	100

2.2.2 $T_4 \sim T_6$ 代除草剂抗性的遗传分析 在 T_3 代的 5 个稳定株系和 3 个分离株系中各选择 5 个单株, 2001 年冬季在海南种植 40 个株系 (T_4), 苗期继续用 Basta 除草剂进行抗性鉴定的结果表明, 5 个抗性稳定系统的 25 个株系均不分离, 表明在 T_3 代就分离出了抗性稳定的株系。3 个分离系统的 15 个株系中 4 个株系抗性不分离, 11 个株系表现 3:1 分离 (表 4), 分离株系数与不分离株系数之比符合 2:1 理论比例。

2002 年春继续在 11 个稳定株系中各选择 3 株, 在 3 个分离株系中共选择 10 株, 2002 年正季在南京种植 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 个株系抗性均不分离。3 个分离系统的 10 个株系中 2 个株系抗性不分离, 8 个株系表现 3:1 分离 (表 4), 分离株系数与不分离株系数之比符合 2:1 理论比例。继续从不分离株系中选择综合性状似受体亲本 E32 的单株, 2002 年冬季在海南种植 30 个株系, 苗期鉴定结果 26 个株系表现抗性稳定不分离, 4 个株系出现抗性分离, 其中 1 个株系呈 3:1 分离, 1 个呈 2:1 分离, 2 个呈 1:1 分离 (表 4)。

表 4 4 个转基因系统 $T_4 \sim T_6$ 代株系内除草剂抗性的分离比例

Table 4 Segregation of herbicide resistance within $T_4 \sim T_6$ lines in four pedigrees of transgenic rice plant

世代 Generation	株系数 No. of lines	植株数 Total plant	抗性株数 Resistant plant	不抗株数 Sensitive plant	χ^2 (3:1)	<i>P</i>
T_4	4	595	466	129	3.32	0.05 ~ 0.10
	3	1223	923	300	0.12	0.50 ~ 0.75
	4	741	542	199	1.26	0.25 ~ 0.50
T_5	3	863	633	230	1.17	0.25 ~ 0.50
	5	1382	1028	354	0.25	0.50 ~ 0.75
T_6	1	250	180	70	1.05	0.25 ~ 0.50
	1	244	168	76	0.43 (2:1)	0.50 ~ 0.75
	2	533	284	249	2.17 (1:1)	0.10 ~ 0.25

3 讨论

外源基因能否在受体植物中稳定遗传和表达是转基因育种成败的关键。已有研究表明,外源基因在受体植物内的整合、遗传和稳定性十分复杂^[15]。自 1988 年首次获得水稻转基因植株以来,已有不少关于外源基因在转基因水稻后代中的遗传报道。多数研究表明外源基因在受体植物中的遗传表达符合孟德尔遗传规律,但也观察到不少转基因后代外源基因的异常分离现象。Shimamoto 等^[16]第一次系统报道了 *hph* 基因在转基因水稻后代中的遗传分离现象。Christou^[17]、Toki^[18]的研究表明,*bar* 基因导入水稻后,转基因后代(R_1)对除草剂 Bialaphos(双丙氨膦)的抗感分离符合 3:1 比例。Cooley 等发现大部分转基因水稻后代的 *bar* 基因表达呈 3:1 分离,个别转基因水稻的后代呈现 1:1 或 15:1 等不规则的分离^[19]。朱冰等和章善庆等对转 *bar* 基因水稻后代的遗传研究发现,转基因株 T_0 代表现抗 Basta, T_1 、 T_2 代出现抗性分离,但分离比不符合孟德尔遗传^[9, 10]。

本研究通过花粉管介导用 *bar* 基因转化 E32, 获得了抗除草剂的转基因植株。对转 *bar* 基因后代($T_0 \sim T_6$)的除草剂抗性进行连续跟踪观察的结果表明,在 T_0 代获得 30 个部分抗性的植株,在 T_1 代才获得 4 个完全抗性植株,而抗性稳定株系则在 T_3 代才出现。因此,为了提高花粉管通道法的转化效率,要注意对早期世代中部分抗性植株的分离选择。对分离世代除草剂抗性的遗传分析表明, T_2 代株系内的呈 2:1 分离, T_3 代表现为不规则分离。究其原因可能是外源基因插入后受体亲本遗传上出现暂时性不平衡,导致雌雄配子分离异常所致。经过 2 个世代的繁殖适应,外源基因与原基因组达到平衡状态,其遗传也表现正常,因而 $T_4 \sim T_5$ 代株系内除草剂抗性的分离比例符合一对显性基因的遗传规律。由此看来,利用花粉管通道法将外源基因 *bar* 导入水稻后是可以稳定遗传的,且为一对显性基因的单基因遗传。至于 T_6 代开始少数株系又出现不同类型分离的现象,将对其在后续世代及其在杂交后代中的遗传稳定性作进一步的跟踪研究。

References

- [1] Huang D-N(黄大年), Li J-Y(李敬阳), Zhang S-Q(章善庆). 用除草剂基因快速检测和提高杂交纯度的新技术. *Chinese Science Bulletin* (科学通报), 1998, **44**(1): 67—70
- [2] Huang D-N(黄大年). 抗除草剂基因工程研究进展及其在水稻上应用. In: Lin Z-P(ed.) (林忠平主编). *Green Gene for 21st Century* (走向 21 世纪的植物分子生物学). Beijing: Science Press, 2000. 494—498
- [3] 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
- [4] 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
- [5] Wan Y, Lemaux P G. Generation of large numbers of independently transformed fertile barley plants. *Plant Physiol*, 1994, **104**: 37—48
- [6] 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
- [7] Casas A M, Kononowicz A K, Zehr U B, et al. Transgenic sorghum plants via microprojectile bombardment. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90**: 11212—11216
- [8] De Block M, Debrouwer D, Tenning T. Transformation of Brassica napus and Brassica oleracea using Agrobacterium tumefaciens and the expression of the *bar neo* genes in the transgenic plants. *Plant Physiol*, 1989, **91**: 694—701
- [9] Zhu B(朱冰), Huang D-N(黄大年), Yang W(杨炜). Production of herbicide-resistant transgenic rice plants from immature embryos using biolistic method. *Scientia Agricultura Sinica* (中国农业科学), 1996, **29**(6): 15—20
- [10] Zhang S-Q(章善庆), Tong H-H(童汉华), Xue R(薛锐). Tests on improving purity in hybrid rice seed productive by introducing *bar* gene to restorers. *Scientia Agricultura Sinica* (中国农业科学), 1998, **31**(6): 33—37
- [11] Cao J, Duan X L, McElroy 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
- [12] Zhou G Y, Wen J, Huang J Q, et al. Introduction of exogenous DNA into cotton embryos. *Methods in Enzymology*, 1983, **101**: 433—488
- [13] Gong Z-Z(龚藻藻), Shen W-F(沈慰芳), Zhou G Y(周光宇), et al. 授粉后外源 DNA 导入植物技术——DNA 通过花粉管通道进入胚囊. *Science in China* (B) [中国科学(B 辑)], 1988, (6): 611—614
- [14] Fu R-Z(傅荣昭), Sun Y-R(孙勇如), Jia S-R(贾士荣). 植物遗传转化技术手册. Beijing: China Sci and Tech Press, 1994. 132
- [15] Hua Z-H(华志华), Huang D-N(黄大年). Genetic mode of exogenous genes in transgenic plants. *Acta Botanica Sinica* (植物学报), 1999, **41**(1): 1—5
- [16] Shimamoto K, Terada R, Izawa T, et al. Fertile transgenic rice plants regenerated from transformed protoplasts. *Nature*, 1989, **338**: 274—276
- [17] Christou P, Ford T L, Koform T M. Production of transgenic rice (*Oryza sativa* L.) plants from agronomically important *indica* and *japonica* varieties via electric discharge particle acceleration of exogenous DNA into immature zygotic embryos. *Bio/Technology*, 1991, **9**: 957—962
- [18] Toki S, Takamatsu S, Nojiri C, et al. Expression of a maize ubiquitin gene in transgenic rice plants. *Plant Physiol*, 1992, **100**(3): 1503—1507
- [19] Cooley J, Ford T, Christou P. Molecular and genetic characterization of elite transgenic rice plants produced by electric-discharge particle acceleration. *Theor Appl Genet*, 1995, **90**: 97—104