

Bt 水稻杂交育种中转基因的遗传分析

王忠华, 崔海瑞, 舒庆尧, 项友斌, 吴殿星, 高明尉, 夏英武

(浙江大学原子核农业科学研究所, 杭州华家池 310029)

成雄鹰, Illimar Altosaar

(加拿大渥太华大学生物化学系, 渥太华 KIN 6N5, 加拿大)

摘要: 利用 PCR、GUS 染色和 Western 印迹杂交技术检测了 Bt 水稻杂交后代群体, 发现在 394 株 GUS 阳性株中, 共有 392 株表达 Bt 蛋白, 协同表达株率达 99.49%。由此表明, 在杂交后代中报告基因 *Gus* 和目的基因 *cryIAb* 紧密连锁遗传与表达。本试验还发现, 在 BC₁、BC₁F₂ 和粳粳交 F₂ 群体中转基因呈单基因显性遗传, 而在籼粳交 F₂ 群体中偏离 3:1 分离。

关键词: Bt 水稻; 转基因; 遗传分析; 育种

中图分类号: Q943

文献标识码: A

文章编号: 0253-9772(2000)05-0309-04

Genetic Analysis of Transgenes in the Progenies of Bt Rice Crossed to Conventional Rice Varieties

WANG Zhong-hua, CUI Hai-ru, SHU Qing-yao, XIANG You-bing, WU Dian-xing, GAO Ming-wei, XIAYing-wu

(Institute of Nuclear Agricultural Sciences, Zhejiang University, Huajiachi Hangzhou, 310029, China)

Xiong-ying Cheng, Illimar Altosaar

(Department of Biochemistry, University of Ottawa, Ottawa KIN 6N5, Canada)

Abstract: Improved histochemical staining for GUS activity, PCR and Western blotting were used to detect the population of Bt rice crossed to conventional rice varieties. A total of 392 plants expressing Bt toxin protein were found in 394 GUS positive plants. The result demonstrated that *cryIAb* gene closely inherited and expressed with reporter gene *gus*. Therefore, it is possible to develop GUS-assisted-selection to preliminarily identify the Bt gene and study the inheritance of transgenes in (back)cross breeding. Mendelian segregation of reporter gene *Gus* was observed in F₂, BC₁ and BC₁F₂ progenies. Thus indicated that transgenes inherited as a single dominant gene in the progenies of Bt rice crossed to conventional rice varieties.

Key words: Bt rice; transgenes; genetic analysis; breeding

许多研究业已表明, 转基因植物中的外源基因在自交群体中一般以单显性基因方式传递, 在与非转化亲本回交的后代中则表现 1:1 分离^[7,9~11]。但也有异常情况的报道, 如在自交后代中表现出非孟德尔方式分离^[1,5,8]; 在自交一代中遵循孟德尔遗传分离规律, 但在自交二代中不符合^[12]; 在转基因当代出现纯合体^[16]。与此相似, 在转基因植株与常规

品种的杂交后代中, 也能表现为单位点显性基因方式遗传^[3,14]。本课题组利用农杆菌介导法成功地将 *cryIAb* 基因导入水稻品种“秀水 11”中获得转基因植株, 在其自交后代群体中报告基因 *Gus* 与目的基因 *cryIAb* 紧密连锁, 呈单基因显性遗传, 现已稳定传递至第 6 代(R₅代), 并将这些抗 7 种鳞翅目害虫的 Bt 水稻定名为“克螟稻”^[14,6]。本试验利用 GUS 组

收稿日期: 1999-09-20; 修回日期: 1999-11-15

基金项目: 浙江省科委“九五”重大项目和洛氏基金资助项目(RF97001#556)

作者简介: 王忠华(1972-)男, 汉, 浙江开化人, 现为浙江大学核农所在读博士, 专业方向: 诱变与生物技术。舒庆尧(1965-)男, 汉, 浙江新昌人, 现为浙江大学核农所副所长, 研究员, 专业方向: 诱变与生物技术, 通讯作者。E-mail: qingshu@hotmail.com; tel: (0571)6971202

织染色结合 PCR 分子检测与 Western 印迹杂交技术研究了 Bt 水稻在与常规水稻品种杂交、回交育种时外源转基因的遗传方式, 以期为 Bt 水稻育种利用过程中标记辅助选择提供依据。

1 材料和方法

1.1 亲本材料

本试验杂交育种时选取 2 个由不同来源的 R_0 转基因植株产生的株系, 一个为克螟稻 1 号 (R_0 时编号 TR30, 杂交时为 R_3 代纯合株系, 现定名为 KMD1); 另一个为克螟稻 2 号 (R_0 时编号 GS5, 杂交时为 R_2 代纯合株系, 现为 KMD2)。与克螟稻杂交的常规感虫亲本有: 早籼稻浙辐 504、浙辐 123、嘉早 935; 晚粳稻秀水 63、丙 9402、丙 9331; 籼型杂交稻保持系龙特甫 B、H32B; 籼型恢复系明恢 77、密阳 46。

1.2 杂交后代培育

杂交时, 选取正处于开花期的稻穗, 用常规品种作母本, 44℃ 温水去雄, 再用克螟稻花粉授粉。在开花前对 F_1 代植株进行 GUS 测定, 选用 GUS 阳性株作回交和自交留种。由于多数籼粳交 F_1 高度不育, 因此回交时用作母本, 常规品种用作父本。

1.3 叶片 GUS 组织染色

于苗期每株剪取 3 块小叶片, 按 Rueb 等^[13]的方法染色。

1.4 DNA 的提取

于分蘖盛期每株取约 5g 叶片, 液氮冷冻后迅速碾成粉末, 按李德葆等^[2]所述的方法提取。

1.5 PCR 分析

经过多次对模板、引物、 $MgCl_2$ 、dNTP 的用量和

退火温度的实验, 建立了总反应体积为 $25\mu l$ 的如下 PCR 反应体系(见表 1):

表 1 PCR 反应体系的建立

Table 1 Foundation of PCR reaction

试剂(Reagents)	浓度(Concentration)	程序(Protocol)
Tris-HCl, pH = 8.4	10mmol/L	94℃, 4min
		↓
KCl	50mmol/L	→ 94℃, 30s
		↓
Triton X-100	0.1%	↑ 35次 54℃, 60s
		↓
$MgCl_2$	2.0mmol/L	← 72℃, 90s
		↓
<i>Taq</i> DNA聚合酶	1个单位	72℃, 7min
4种dNTP	各0.1mmol/L	
上、下游引物	各0.25 μ mol/L	
模板	50~100ng	

具体操作: DNA 首先在 94℃ 下预变性 4min, 经过 3 步(94℃ 变性 30s, 54℃ 退火 60s, 72℃ 延伸 90s) 35 轮循环后, 在 72℃ 保温 7min。总反应体积为 $25\mu l$, 含 *Taq* DNA 聚合酶 1 个单位, 4 种 dNTP 各 0.1mmol/L, PCR 缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl, pH = 8.4, 50mmol/L KCl 和 0.1% Triton X-100), $MgCl_2$ 2.0mmol/L 及上、下游引物浓度各 250nmol/L。所用的上游和下游引物序列分别为 5'-TTCCTGGAC-GAAATCCGACC-3' 和 5'-GCCAGAATTG-AACACAT-GAGCGC3', 根据 *cryIAb* 的序列设计。PCR 产物用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳检测并拍照。

1.6 Bt 毒蛋白表达的 Western 印迹杂交检测

Bt 蛋白含量测定采用 Western 印迹杂交技术,

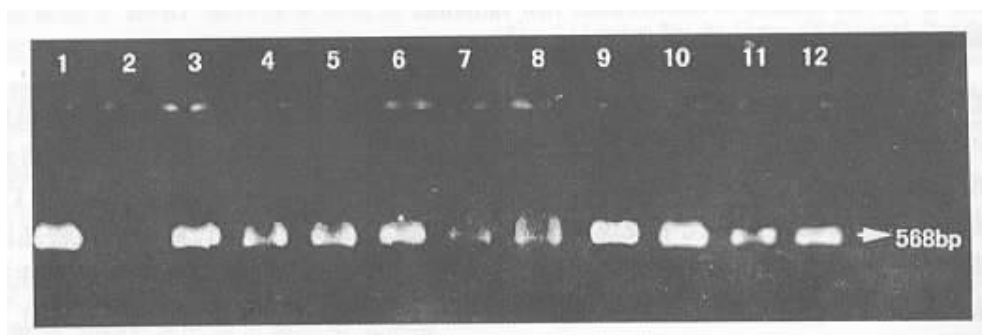


图 1 Bt 基因的 PCR 鉴定

1 为 KMD1 2 为 ZF504 (浙辐 504 Zhefu504) 3~12 为 ZF504/KMD1 F_2 代抗虫植株。

Fig. 1 Bt gene characterized by PCR

一抗为羊多克隆抗体,二抗为兔抗羊抗体。均由加拿大渥太华大学生物化学系成雄鹰博士赠送,其原理参见 Sardana^[15]的报道。于分蘖盛期用打孔器每株取 5~7 块小叶片。测定时将样品先在液氮中研磨成粉,加入提取缓冲液(Na_2CO_3 50mmol/L, DTT 10mmol/L)400~600 μl ,振荡混匀,4 $^\circ\text{C}$ 下浸提 2~3h,离心后取 1 μl 粗提液点在硝酸纤维素膜上进行 Western 印迹杂交分析。

2 结果与分析

2.1 杂交后代 Bt 基因的 PCR 分子鉴定

图 1 为 Bt 抗虫水稻与常规早籼品种浙辐 504 杂交 F_2 代的 10 个抗虫单株的 PCR 扩增结果。由图中可看出,浙辐 504 没有扩增出 DNA 条带,而随机选取的 10 个浙辐 504/KMD1 后代抗虫植株和 Bt 水稻亲本 KMD1 都扩增出了 559bp 的 DNA 片段,该片段的大小与预期的 DNA 条带相吻合。由此表明 Bt 水稻与常规水稻品种浙辐 504 杂交 F_2 中的抗虫单株均含有 *cryIAb* 基因。

2.2 Bt 水稻杂交后代转基因的连锁遗传稳定性分析

报告基因 *Gus* 和 *cryIAb* 基因在 T-DNA 中紧密连锁,与其他种杂交、回交后仍保持着这种关系。表 2 是不同杂交、回交后代群体中报告基因 *Gus* 与 *cryIAb* 基因连锁表达的小结。由表 2 可见,杂交后代 GUS^+ 株数与 *cryIAb* 基因表达株数的吻合率高达 99.5%。由此表明,报告基因 *Gus* 和目的基因 *cryIAb*

表 2 Bt 水稻杂交、回交后代植株中 GUS 阳性株的 *cryIAb* 表达情况

Table 2 *cryIAb* expression in GUS positive plants in the progenies of Bt rice crossed to conventional rice varieties

世代	组合数	GUS ⁺ 株数	<i>cryIAb</i> 基因表达株数
F_1	4	74	74(100%)
F_2	7	166	164(98.8%)
BC_1	10	86	86(100%)
BC_2	7	68	68(100%)
合计	28	394	392(99.5%)

表 3 Bt 水稻杂交后代 GUS 阳性与阴性的分离比

Table 3 Segregation ratio of GUS positive and negative plants in the progenies of Bt rice crossed to conventional rice varieties

组合	世代	检测数	GUS ⁺ 株数	GUS ⁻ 株数	GUS ⁺ /GUS ⁻	χ^2
ZF504/KMD1	BC_1	116	57	59	0.97:1	0.008(1:1)
	F_2	85	53	32	1.66:1	6.251(3:1)
	BC_1F_2	105	79	26	3.04:1	0.003(3:1)
ZF123/KMD1	BC_1	6	3	3	1:1	0.166(1:1)
	F_2	176	105	71	1.48:1	17.212(3:1)
JZ935/KMD1	BC_1	23	11	12	0.92:1	0.000(1:1)
	F_2	133	67	66	1.01:1	42.040(3:1)
	BC_1F_2	63	47	16	2.71:1	0.005(3:1)
LTH/KMD1	BC_1	41	21	20	1.05:1	0.000(1:1)
MY46/KMD1	BC_1	43	21	22	0.95:1	0.000(1:1)
XS63/KMD1	F_2	190	135	55	2.45:1	1.718(3:1)
ZF504/KMD2	BC_1	112	56	56	1:1	0.009(1:1)
	F_2	125	77	48	1.60:1	8.838(3:1)
	BC_1F_2	80	59	21	2.81:1	0.067(3:1)
ZF123/KMD2	F_2	146	90	56	1.61:1	13.891(3:1)
JZ935/KMD2	BC_1	17	8	9	0.89:1	0.000(1:1)
	F_2	140	94	46	2.04:1	4.609(3:1)
B9402/KMD2	F_2	185	139	46	3.02:1	0.001(3:1)

ZF504: 浙辐 504 Zhefu504; ZF123: 浙辐 123 Zhefu123; JZ935: 嘉早 935 Jiazao935; LTH: 龙特甫 B Lon - Te - Fu B; MY46: 密阳 46 Miyang46; B9402: 丙 9402 Bing9402; XS63: 秀水 63 Xiushui63。

* $\chi^2(0.05) = 3.84$

的连锁遗传性在 Bt 水稻杂交后代中也是稳定的。这与 Bt 水稻亲本的情况一致。因此报告基因 *Gus* 可用于研究 *cryIAb* 基因的遗传。

2.3 转基因的遗传分析

在不同杂交组合的不同世代群体中, GUS 染色的分离情况见表 3。在 BC₁ 群体中 GUS 阳性与阴性株的分离比率基本符合 1:1, 表明转基因呈单位点显性遗传, 同时也证明转基因在 Bt 水稻中是单拷贝插入的。由表 3 还可看出, 籼粳交 F₂ 群体中 GUS 阳性与阴性株的分离比率大多在 2:1 左右, 而粳粳交 F₂ 群体中 GUS 阳性与阴性的分离比率基本符合 3:1。另外, 试验结果发现籼粳交 BC₁ F₂ 群体中 GUS 阳性与阴性株的分离比率也基本符合 3:1。

3 讨 论

本试验利用 GUS 检测、PCR 分子鉴定和 Western 点杂交技术分析了 Bt 水稻杂交后代中 *cryIAb* 基因与 *Gus* 基因的协同分离与表达情况, 发现同含 *Gus* 与 *cryIAb* 基因的比率高达 99.49%。由此表明, 报告基因 *Gus* 和抗虫基因 *cryIAb* 在 Bt 水稻杂交后代中紧密连锁遗传与表达。因此, GUS 组织染色技术既可用于研究抗虫基因 *cryIAb* 的遗传, 同时也可作为快速而有效的标记辅助选择技术在 Bt 水稻杂交(回交)育种中加以运用。

李燕娥等^[3]报道, 外源抗虫基因 *cryIAb* 在转基因抗虫棉纯系与常规棉杂交 F₂ 代群体中以单位点显性基因方式遗传。Sachs 等^[14]报道, 利用不同来源的转基因抗虫棉 MON81 和 MON249 与常规抗虫棉杂交, 发现 *cryIAb* 基因在 MON81 与常规抗虫棉杂交 F₂ 和 F₂₋₄ 中以孟德尔单位点显性基因方式遗传, 而在 MON249 与常规抗虫棉杂交 F₂ 和 F₂₋₄ 中则并非如此。本研究发现, *Gus* 基因在 BC₁ 群体中按 1:1 分离、在粳粳交 F₂ 群体中按 3:1 分离。该结果表明, 转基因在 BC₁ 代和粳粳交 F₂ 代群体中以单位点显性基因方式遗传, 也从另一个侧面反映 T-DNA 是单拷贝插入水稻基因组中的。另外, 试验也发现 *Gus* 基因在籼粳亚种间杂交 F₂ 代群体中的分离比偏离 3:1, 而在 BC₁ F₂ 代群体中则按 3:1 分离, 这表明转基因在籼粳交 F₂ 群体中也是呈单位点显性基因方式遗传的。只是可能由于籼粳亚种杂交不亲和性导致携带转基因的花粉竞争力较低。由此表明, 转基因在 Bt 水稻杂交后代中以单位点显性基因方式传递, 这

为开展 Bt 水稻-高抗螟虫新种质的育种利用提供了有力的理论依据。

参 考 文 献:

- [1] Zhu B, Huang D-N, Yang W, et al. Production of herbicide-resistant transgenic rice plants from immature embryos using biolistic method [J]. *Sci Agric Sin*. 1996, 29(6): 15~20.
- [2] 李德葆, 周雪平主编. 基因工程操作技术[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1996.
- [3] 李燕娥, 焦改丽, 李淑君, 等. 转基因棉花纯合系的获得和遗传分析研究[J]. *中国农业科学*, 1998, 31(5): 44~47.
- [4] 项友斌, 梁竹青, 高明尉, 等. 农杆菌介导的苏云金杆菌抗虫基因 *cryIAb* 和 *cryIAc* 在水稻中的遗传转化及蛋白表达[J]. *生物工程学报*, 1999, 15(4): 494~500.
- [5] Huang D-N, Li J-Y, Zhang S-Q, et al. New technology to examine and improve the purity of hybrid rice with herbicide resistant gene[J]. *Chin Sci Bull*, 1998, 43: 784~786.
- [6] 舒庆尧, 叶恭银, 崔海瑞, 等. Bt 转基因水稻“克螟稻”选育[J]. *浙江农业大学学报*, 1998, 24(6): 579~580.
- [7] Casas A M, Kononowicz A K, Bressan R A, et al. Cereal transformation through particle bombardment[J]. *Plant Breed Rev*, 1995, 13: 235~264.
- [8] Cooley J, Ford T, Christou P, et al. Molecular and genetic characterization of elite transgenic rice plants produced by electric-discharge particle acceleration[J]. *Theor Appl Genet*. 1995, 90: 97~104.
- [9] Dillen W, Clercq J D, Goossens A, et al. Agrobacterium mediated transformation of *Phaeolus acuti-folius* A. Gray. *Theor Appl Genet*, 1997, 94: 151~158.
- [10] Hiei Y, Ohta S, Komari T, et al. Efficient transformation of rice mediated by Agrobacterium and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA[J]. *Plant J*, 1994, (6): 271~282.
- [11] Peng J, Kononowicz H, Hodges T K, et al. Transgenic indica rice plants[J]. *Theor Appl Genet*, 1992, 83: 855~863.
- [12] Peng J, Wen F, Lister R L, et al. Inheritance of *gusA* and *neo* genes in transgenic rice[J]. *Plant Mol Biol*, 1995, 27: 91~104.
- [13] Rueb S. Improved histochemical staining for β -D-glucuronidase activity in monocotyledonous plants[J]. *Rice Genet Newsl*, 1989, (6): 168~169.
- [14] Sachs E S, Benedict J H, Stelly D M, et al. Expression and segregation of genes encoding CryIA insecticidal proteins in cotton[J]. *Crop Science*. 1998, 38(1): 1~11.
- [15] Sardana R. Identification and use of specific promoters and synthetic *Bacillus thuringiensis* toxin genes in biotechnology [A]. 1996. In: *Rice Genetics III: Proceeding of the Third International Rice Genetics Symposium*[C]. Manila Philippines: IRRRI
- [16] Spencer T M, Gordon-Kamm W L, Daines R J, et al. Bialaphos selection of stable transformants from maize cell culture[J]. *Theor Appl Genet*, 1990, 79: 625~631.