

文章编号: 1001-411X(2001)01-0056-04

转基因水稻外源基因的遗传和表达初步研究

简玉瑜¹, 陈远玲¹, 李 静¹, 高丽丽¹, 董 春²

(1 华南农业大学生物技术学院, 广东 广州 510642; 2 华南农业大学资源环境学院, 广东 广州 510642)

摘要: 将天蚕抗菌肽 B 基因应用基因枪法导入水稻 TN₁ 发芽种胚, 获得转基因植株 2 株. 转基因水稻 T₁~T₅ 5 个世代不同株系, 对 bar 基因、抗菌肽基因的遗传和表达进行初步研究. 结果表明: 转基因后代株系 bar^R:bar^S 大部分符合 3:1 分离比率. T₁、T₄ 转基因株系 PCR、Southern 印迹分析表明: T₁ 8 株有抗菌肽 B 基因; T₄ 仍有 4 个株系有抗菌肽基因, 其他的株系基因丢失. T₃ 1 个株系 Northern 印迹证明抗菌肽基因在 RNA 水平有表达; 抗菌肽 B 转基因水稻对白叶枯病的抗病性有提高, 抗性能传递到高世代, 在 T₃ 得到抗病性提高的株系.

关键词: 天蚕抗菌肽 B 基因; bar 基因; 基因枪转化; 水稻; 转基因植株; 白叶枯病

中图分类号: S330; Q78

文献标识码: A

水稻是世界上最重要粮食作物之一. 应用转基因技术, 培育高抗、优质新品种, 创造传统育种方法难以获得的、具有重要经济价值的新种质. Zhan 成功地获得水稻转基因植株以来, 水稻的遗传转化技术逐渐完善和发展; 特别是 Christou^[1], Cao 等^[2] 利用基因枪法转化水稻取得了成功. 本研究报道 1994 年采用基因枪法将天蚕抗菌肽 B 基因导入高感白叶枯病品种 TN₁, 获转基因植株^[3]; 1994~1999 年对 T₁~T₅ 转基因株系, 观察其对 bar 基因及白叶枯病的抗性; 通过后代株系分子检测, 观察抗菌肽 B 基因遗传传递情况; 试图探明抗菌肽 B 基因改良水稻白叶枯病抗性的可行性.

1 材料与方法

1.1 转基因后代种植、Basta 筛选及白叶枯病抗病检测

通过基因枪转化, 已将天蚕抗菌肽 B 基因导入国际上公认的高感白叶枯病品种 TN₁, 获 4 株转基因植株; 2 株结实. 1995~1999 年在华南农业大学遗传工程室控制区域内盆栽种植转基因水稻 5 个世代. T₁ 种植 315 株. T₂ 根据抗病性和分子检测阳性的选 54 株系, 每株系种植 20 个单株. T₃ 选 25 株系, 每株系种植 9 株. T₄ 选 23 株系, 每系种 15 株. T₅ 选 9 株系, 每系种 15 株. T₂~T₅ 各株系是由系内每单株随机取一定数量的种子混合, 播前用 Basta(10 mg/L)发芽筛选. 每年插秧后 1 个月(孕穗初期), 用华南优势白叶枯菌 IV 型菌株 X00-812 接种; 接种前在 PSA 培养基上 28℃ 培养 72 h, 用无菌水稀释至 3×10^8 cfu/mL;

采用剪叶法接种, 每株接 4~5 片叶子. 接种后 7 d 测量病斑的长度, 21 d 调查发病情况并分级. 各世代所用的菌种及接种水平、方法均同.

分级标准如下: 0 级——hR 剪口处无明显病斑; 1 级——R 病斑长度 2~3 cm 或病斑面积小于叶片面积 10%; 2 级——mR 病斑长度小于接种叶长的 1/4 或病斑面积小于 20%; 3 级——mS 病斑长度达到 1/4, 但小于 1/2, 或病斑面积在 20%~40% 之间; 4 级——S 病斑长度达到 1/2, 但小于 3/4, 或病斑面积在 20%~70% 之间; 5 级——hS 病斑长度达 3/4, 或病斑面积大于 75%.

1.2 转基因株系分子检测

参照 McCouch 等的方法抽提叶的 DNA. 天蚕抗菌肽 B 扩增引物 1 与 2 详见文献[3]. DNA 斑点杂交, 分别抽提质粒及抗性愈伤组织 DNA, 点于尼龙膜上, 处理后进行杂交, 经洗膜压 X 光片显影. 转基因 T₁、T₄ 代 PCR 和 Southern 及 T₃ 的 RNA 的 Northern, 均参照 Sambrook 的方法进行.

2 结果

2.1 转基因后代对 bar 基因抗性

T₁~T₅ 以世代计算 bar^R 与 bar^S 分离株数比率和 χ^2 检验结果见表 1, TN₁-1 的 T₄、T₅ 和 TN₁-2 的 T₂、T₃ bar^R 与 bar^S 的分离比率符合 3:1, 而 TN₁-2 的 T₄、T₅ bar^R 的比率有逐步增加的趋势, R/S 达 5:1. 以 TN₁-2 的个别 T₂~T₅ 株系计算 bar^R 分离比率和 χ^2 检验(表 2), 大部分符合 3:1.

收稿日期: 2000-05-22

作者简介: 简玉瑜(1932-), 女, 研究员.

基金项目: 博士点基金资助项目(940505); 华南生物科学与技术研究中心资助项目

©1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

表 1 TN₁ 转基因株系 T₁~T₅ bar^R 基因表达的分离¹⁾

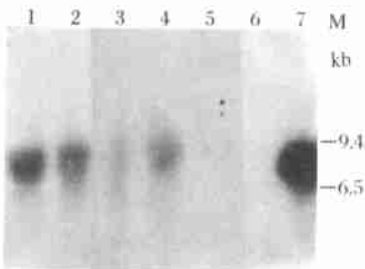
Tab. 1 Segregation of Basta-resistant plants in transgenic T ₁ ~T ₅ lines of TN ₁					
株系 plant line	世代 generation	调查株数 No. of plant	bar ^R 株数 bar ^R of plant	R/S	χ ²
TN ₁ -1	T ₁	176	102	1.38:1	26.37
	T ₂	346	280	4.24:1	6.16
	T ₃	435	260	1.49:1	53.00
	T ₄	290	231	3.92:1	3.10 [†]
	T ₅	250	182	2.68:1	0.53 [†]
TN ₁ -2	T ₁	146	84	1.36:1	22.83
	T ₂	871	628	2.58:1	3.74 [†]
	T ₃	810	600	2.87:1	0.32 [†]
	T ₄	440	376	5.82:1	25.09
	T ₅	200	169	5.45:1	9.12

1) χ²=3.841, †)χ² 测验分离比率符合 3:1

表 2 TN₁-2 个别株系 T₂~T₅ bar^R 的 χ² 测定

Tab. 2 χ ² test of Basta-resistant plants in transgenic T ₂ ~T ₅ different lines of TN ₁ -2				
株系 plant line	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅
TN ₁ -2-17	0.00 [†]	0.04 [†]	3.84 [†]	5.23
TN ₁ -2-61	0.07 [†]	1.60 [†]	1.67 [†]	0.96 [†]
TN ₁ -2-72	3.24 [†]	6.40	0.07 [†]	0.10 [†]

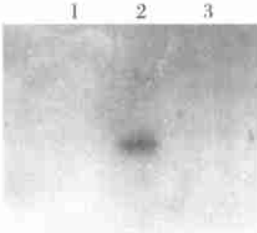
†)χ² 测验分离比率符合 3:1



1. TN₁-2-20, 2. TN₁-2-12, 3. TN₁-2-35, 4. TN₁-2-9, 5. PPT-resistant callus, 6. CK-, 7. CK+

图 1 T₁ 基因组 DNA 的 Southern 印迹分析

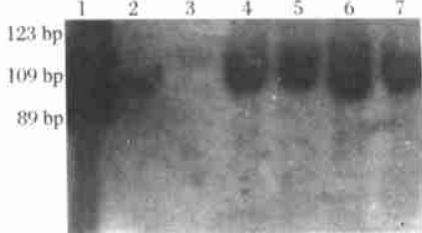
Fig. 1 Southern blot analysis of T₁ genomic DNA



1. CK-, 2. TN₁-2-9, 3. TN₁-1-11

图 2 T₂ 总 RNA 的 Northern 印迹分析

Fig. 2 Northern blot analysis of total RNA from T₂



1. PCB6.2, CK-, 3. TN₁-2-61, 4. TN₁-2-72, 5. TN₁-2-50, 6. TN₁-2-21, 7. TN₁-2-17

图 3 T₃、T₄ 基因组 DNA 的 Southern 印迹

Fig. 3 Southern blot analysis of T₃, T₄ genomic DNA

2.3 转基因后代对白叶枯病抗病性检测

T₀ 接种白叶枯病菌, 叶子的病斑长度比对照缩短, 说明转基因当代植株比对照抗病. T₁ 种植 315 株, 抗病性有分离, 23%~25% 株系抗级比对照高, 其中 17% 株系抗级显著提高. T₂ 种植 54 个株系, 调查 19 个株系, 每系调查 20 株, 结果见表 4. 21 d 后调查病级, 抗病类型在中抗 (mR) 和中感 (mS) 之间, 而对照品种 TN₁ 平均病级为 4~5 级. 大多数 T₂ 株系病斑长度比对照缩短, 病级比对照降低. 但各株系间抗病性有差异.

从 T₃ 测试的 11 个株系看, 病斑平均长度的变异

2.2 转化植株分子检测结果

2 株 TN₁ 转化植株, 经过斑点杂交和 2 次 Southern 印迹检测, 均呈阳性, 表明抗菌肽基因已整合到 TN₁ 的 T₀ 基因组中. T₁ 用 PCR 检测抗性植株, 检测的 13 株, 9 株具有抗菌肽特异扩增带. 对 PCR 阳性植株的总 DNA 用 Hind III 酶切进行 Southern 印迹分析: 检测 13 株中, 8 株呈阳性 (其中 TN₁-1, 2 株; TN₁-2, 6 株) (图 1).

选取 TN₁ 转基因 T₂, 抗病性强、T₁ PCR 及 Southern 阳性株系 2 个, 剪取 T₃ 株系叶片, 进行 Northern 印迹分析. 结果其中 1 个株系 (TN₁-2-9) 有特异 mRNA 表达, 分子长度为 400~600 nt; 证明抗菌肽基因可遗传到 T₃ 代, 并在 RNA 水平上得到表达. 而 TN₁-1-11 没有表达 (图 2).

T₄ 检测 T₁ 9 个阳性的株系, 只有 2 个呈阳性. 检测其他 14 个 T₃ 株系, 也有 2 个呈阳性. PCR 阳性株系进行 Southern 分析, 也呈阳性. 这 4 个株系均来自 TN₁-2 (TN₁-2-17, TN₁-2-21, TN₁-2-61, TN₁-2-72) (图 3). 从多代分子检测中 (表 3) 证明抗菌肽基因可遗传到 T₃、T₄ 代, 但不稳定有丢失.

系数都较原品种大. 说明株系内植株间差异大. 根据株系与对照的显著性测定结果, 其中 8 个株系 *t* 值为 6.48, 达到极显著水平. 为了了解白叶枯病世代间抗性的传递情况, 对 9 个株系 T₃~T₅ 的病斑长度作了 *t*-检验 (成对双样本均值分析、表 5). 综合 4 a 观察结果, 发病的高低与当年气候条件关系很大, 高温、高湿、多雨、寡照和强风是诱发白叶枯病暴发流行的气象要素. T₃ 在高温、高湿、寡照条件下, 对照发病重, 有 10 个株系病斑长度显著比原品种短; 其他年份对照发病轻, T₄ 仅有 1 个株系病斑比原品种短, T₅ 转基因系与对照的病斑长度无显著差异. 转

基因 T₂~T₅ 世代间抗病性并不相关, 未发现高抗和免疫类型; 大多数是中抗、中感类型, 抗性比对照提高一级.

表 3 TN₁ 转基因 T₁~T₄ 分子检测的结果

Tab. 3 PCR and Southern hybridization analysis of different transgenic T ₁ ~ T ₄ lines of TN ₁						
株系	T ₁		T ₃		T ₄	
plant lines	PCR	Southern	PCR	Southern	PCR	Southern
TN ₁ -1-1	+	+			—	—
TN ₁ -1-9	+				—	—
TN ₁ -1-11	+				—	—
TN ₁ -1-18	+	+			—	—
TN ₁ -1-19	+					
TN ₁ -1-20	+				—	—
TN ₁ -2-9	+	+			—	—
TN ₁ -2-12	—	+	—	—		
TN ₁ -2-17		+			+	+
TN ₁ -2-20	—	+			—	—
TN ₁ -2-21		+			+	+
TN ₁ -2-35	+	+	—	—		
TN ₁ -2-50	+		—	—		
TN ₁ -2-61			+	+		
TN ₁ -2-72			+	+		

表 4 TN₁ 转基因 T₂ 株系对白叶枯病的抗性测定¹⁾

Tab. 4 Resistant level of transgenic T ₂ plantlines of TN ₁ to Bacterial blight after inoculation					
株系 plant lines	病斑平均长度 average lesion length/ cm		株系 plant lines	病斑平均长度 average lesion length/ cm	
TN ₁ -1-1	1. 88		TN ₁ -2-3	1. 80	
TN ₁ -1-5	2. 00		TN ₁ -2-7	1. 09	
TN ₁ -1-9	2. 05		TN ₁ -2-9	1. 09	
TN ₁ -1-11	1. 67		TN ₁ -2-10	1. 10	
TN ₁ -1-12	1. 96		TN ₁ -2-12	2. 70	
TN ₁ -1-18	1. 17		TN ₁ -2-15	1. 65	
TN ₁ -1-19	1. 30		TN ₁ -2-17	0. 96	
TN ₁ -1-20	2. 73		TN ₁ -2-20	1. 14	
TN ₁ -1-22	1. 99		TN ₁ -2-21	1. 47	
TN ₁ -1-14	2. 15		TN ₁ -(CK)	2. 67	

1) 平均病斑长度为接种后 7 d 调查

转基因后代中观察白叶枯病菌侵染速度, 与华志华^[4] 观察相似, 侵染速度明显可分为 2 个阶段. 感病初期, 抗病性提高的株系, 对接种白叶枯病菌表现出一定的抗性, 病斑长度缩短, 这可能是抗菌肽 B 基因起作用, 对白叶枯病菌繁殖有抑制. 感染后期, 由于人工接种细菌呈对数增长, 接种的白叶枯病菌快速繁殖, 转基因植株体内表达的抗菌肽 B 不能完全

抑制病原菌, 接种后 14 d 病斑长度与原品种差异不大, 个别甚至超过对照.

表 5 转基因 TN₁ 的 T₃~T₅ 代株系病斑平均长度 *t*-检验¹⁾

Tab. 5 <i>t</i> -test of average lesion length in transgenic T ₃ ~T ₅ lines of TN ₁			
株系 plant line	T ₃	T ₄	T ₅
TN ₁ -1-1	1. 86 **	2. 33	2. 02
TN ₁ -1-9	3. 07 **	2. 60	1. 88
TN ₁ -1-11	6. 79 **	2. 18	2. 29
TN ₁ -1-18	3. 03 **	2. 21	2. 03
TN ₁ -1-20	4. 06 **	1. 74 *	2. 50
TN ₁ -2-7	2. 66 **		
TN ₁ -2-9	9. 15	2. 07	1. 78
TN ₁ -2-10	5. 69 **		
TN ₁ -2-17	9. 46	1. 92	2. 11
TN ₁ -2-20	13. 20	2. 03	1. 4
TN ₁ -2-21	2. 20 **	2. 61	2. 23
TN ₁ -2-61	3. 46 **	2. 54	3. 29
TN ₁ -2-72	3. 36 **	2. 22	1. 99
TN ₁ CK	9. 44	2. 53	1. 24

1) T₃: $n-1=8$ $t=5.041$; T₄: $n-1=14$ $t=2.145$; * * 表示株系病斑平均长度与对照成对双样本均值 *t* 检验为极显著; * 为显著

3 讨论

转基因植物中外源基因能否稳定遗传和表达是关系到转基因技术实用化的关键问题. 抗菌肽 B 转基因水稻, 有 2 个外源基因, 即选择标记基因 bar 和抗菌肽 B 基因. bar 基因在转化时经多轮选择, 后代每年均用 Basta 筛选, bar 基因在 T₁~T₅ 能稳定保持 3 : 1 比率; 反映作为一个显性基因传递给后代, 遵循孟德尔自花受粉后代表现 3 : 1 分离规律. 而抗菌肽 B 与 bar 基因构建在同一质粒, 我们以转基因植株自交后代结合 Southern blot 检测, 分析抗菌肽基因在后代中的遗传传递情况. T₁ 检测 13 个株系 8 个阳性, Southern 阳性比率为 1. 6 : 1, 比 3 : 1 低. T₃、T₄ 分别检测 14 个和 9 个株系, 各得 2 个阳性, 比率更低. 抗菌肽基因与 bar 虽然位于同一质粒, 但后代不是协同分离, 其共表达频率很低. TN₁-1 和 TN₁-2 是同一质粒的不同转基因系, 表达效率明显不同. T₄ 中 TN₁-1 全部株系没检测到抗菌肽基因, TN₁-2 只有 4 个株系有抗菌肽基因. 致于抗菌肽基因与白叶枯病抗性关系更复杂. 以病斑长度比较转基因株系对白叶枯病抗性, 病斑长度受当年气象条件影响很大. 7 d 对照病斑平均长度, T₃ 发病严重, 病斑长; T₄、T₅ 发病轻, 病斑短. 以对照品种的病斑长度与转基因株系作比较,

T₃ 差异显著, T₄、T₅ 差异不显著。另外 T₄、T₅ 有些株系, 抗菌肽基因存在与白叶枯病抗性并不直接相关。检测阳性株系, 白叶枯病抗性与对照相仿, 抗菌肽基因似沉默; 而连续表达抗性提高的株系, 抗菌肽基因却丢失。这与 Srivastava^[5] 在小麦转化株系 2B-2 中观察的结果一样, 转基因自交一代能表达, 自交二代仅能检测到, 自交三代发生了丢失, 用 Southern blot 没有检测到外源基因的存在。基因丢失表明基因组中有些特定定位点对转基因可遗传的稳定整合是不利的。Florack^[6] 曾指出, 作物抗细菌病的遗传过程中, 应用抗菌肽 B 基因取决于 3 个因素: 即基因表达, 抗菌肽的合成水平要足以杀死病菌以及抗菌肽分泌到病菌生存地方。抗菌肽结构基因仅 108 bp, 编码 36 个氨基酸残基, 分子小, 容易被蛋白酶降解; 由于缺乏高水平杀菌物质, 抗病性提高不显著。苏金^[7] 提出转基因工作者将要面临的 2 个任务是: 第一, 如何确保在转基因植株中至少 5 个世代之内不发生转基因沉默现象, 并维持高水平的稳定表达。第二, 使用包括诱导型启动子在内的特异性启动子, 以实现特殊需求为目标的不同转基因的有效表达。目前植物转基因往往多拷贝、多位点、随机地整合、甲基化, 传递过程中转基因很可能发生基因丢失, 多拷贝基因间作用会导致基因沉默, 只有解决这些问题, 才能使转基因植物中外源基因实现最佳表达。说明应用抗菌肽基因工程改良水稻白叶枯病抗性还有许多问题需

要进一步去解决。

参考文献:

- [1] CHRISTOU P, FORD T L, KOFRON M. Production of transgenic rice (*Oryza sativa* L) plant from agronomically important Indica and Japonica varieties via electric discharge particle acceleration of exogenous DNA into immature zygotic embryos [J]. Bio Technology, 1991, 9: 957—962.
- [2] CAO J, DUAN X, MCELORY, et al. Regeneration of herbicide resistant transgenic rice plants following microprojectile mediated transformation of suspension culture cells [J]. Plant Cell Rep. 1992 11: 586—591.
- [3] 简玉瑜, 吴新荣, 莫豪葵, 等. 应用基因枪将蚕抗菌肽基因导入水稻获抗白叶枯病株系 [J]. 华南农业大学学报, 1997, 18(4): 132—141.
- [4] 华志华, 汪晓玲, 薛 锐, 等. Cecropin B 转基因水稻及其后代抗白叶枯病研究初报 [J]. 中国水稻科学, 1999, 13(2): 114—116.
- [5] SEIVASTAVA V, VASIL I K. Molecular characterization of the fate of transgenes in transformed wheat [J]. Thero Appl Genet, 1996, 92: 1031—1037.
- [6] FLORACK D, ALLEFS S, BOLLEN R, et al. Expression of giant silkworm cecropin B genes in tobacco [J]. Transgenic Research, 1995, 4: 132—141.
- [7] 苏 金, TARGOLI J, 吴乃虎, 等. 在转基因植物中实现外源基因最佳表达的途径 [J]. 生物工程进展, 1999, 19(4): 3—6.

Primary Studies on Inheritance and Expression of Foreign Gene in Transgenic Rice

JIAN Yu-yu¹, CHEN Yuan-ling¹, LI Jing¹, GAO Li-li¹, DONG Chun²

(1 College of Biotechnology, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China;

2 College of Resources & Environmental Sciences, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: Two transgenic plants transformed with cecropin B gene using biolistic method were generated from germinative embryo of rice variety TN₁. The inheritance and expression of bar and cecropin B gene in different transgenic plantlines of TN₁ from 5 generation of T₁ to T₅ were primary studied. Results showed that the segregation ratio of bar^R: bar^S was 3:1. The results of PCR and Southern blot analysis indicated that eight of T₁ and four of T₄ transgenic lines had cecropin B gene, the other plantlines of T₄ showed lost of cecropin gene. One of T₃ transgenic line expressed at mRNA level by Northern blot. The resistance to bacterial blight delivered from cecropin B transgene could be segregated and transmitted to high generation, resistance-improved plantlines were obtained in T₃ generation.

Key words: cecropin B gene; bar gene; biolistic method; rice; transgenic plants; bacterial blight

【责任编辑 柴 焰】