

水稻转基因系“明恢 63-*Xa21*”的基因组分析

谢 兵^{1,2} 朱雪峰^{2,3} 翟文学^{2*} 鲁润龙¹ 朱立煌²

¹(中国科学技术大学生物系,合肥 230027)

²(中国科学院遗传研究所,北京 100101)

³(中国水稻研究所,杭州 310006)

关键词 水稻, *Xa21*, 转基因纯合系, 基因组分析, 分子标记

中图分类号 Q789 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2002)01-0102-04

植物基因工程研究已经建立了多种转基因的方法,这些方法包括农杆菌侵染^[1]、粒子轰击^[2]、电激转化和原生质体培养^[3]等。研究人员希望通过这些方法,将功能外源基因整合到受体基因组,而同时不引起其它性状的变化。已有的研究表明,各种转基因系统均能成功地将外源基因整合到受体基因组并能稳定地遗传到后代^[1-3]。然而通常情况下人们主要关注目标性状的变化,而对受体基因组的其它变化研究较少。事实上许多转基因植物发生了不希望出现的变异^[4,5]。已建立的各种分子标记如 SSRP(简单序列重复多态性)^[6]、RAPD(随机扩增多态性 DNA)^[7]和 AFLP(扩增片段长度多态性)^[8]等分析技术可以用来研究转基因植物的基因组的变化^[9-11]。这种分析不仅是对所采用的转基因方法及操作步骤的衡量与判断,也是基因工程体投放环境之前必须进行的检测。特别是近年来,随着转基因植物产业化的发展和人们对生物安全性的关注,对转基因植物的全基因组评估已变得越来越重要。

在前期研究中,利用农杆菌介导的转化系统成功地将克隆的 *Xa21* 基因转入我国水稻栽培品种包括生产上大面积推广的杂交稻恢复系^[12],并筛选获得了转基因 *Xa21* 纯合的恢复系“明恢 63-*Xa21*”^[13]。田间观察与调查表明转基因纯合系“明恢 63-*Xa21*”植株长势良好,整齐一致,没有观察到表型变异(未显示结果)。本研究利用已建立的水稻 SSRP、RAPD 和 AFLP 分子标记技术,对转基因纯合系“明恢 63-*Xa21*”的基因组进行分析。结果表明对于所检测的 550 个基因组位点,转基因纯合系的不同单株以及受体对照“明恢 63”之间均没有发现明显差异。这一研究为 *Xa21* 转基因恢复系“明恢 63-*Xa21*”的进一步利用与推广提供科学依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

转基因纯合系“明恢 63-*Xa21*”来自前期研究^[13],本研究

分析的是“明恢 63-*Xa21*” T_3 代植株。对照为非转基因“明恢 63”。

1.2 水稻 DNA 提取

分单株收获转基因纯合系“明恢 63-*Xa21*” T_3 代植株和对照“明恢 63”植株的叶片,按文献[14]方法(略有改动)提取 DNA。

1.3 SSRP 分析

SSRP 分析中所用的引物按照文献[6]提供的微卫星标记序列由上海生工公司合成。每一 SSRP 反应体积为 25 μ L,每升中含 10mmol Tris·HCl (pH8.3), 50mmol KCl, 1.5mmol MgCl₂, 1 个单位的 Taq 酶, 4nmol dNTP, 10pmol 引物, 50ng 模板 DNA。PCR 反应条件如下: 94 $^{\circ}$ C 5min; 94 $^{\circ}$ C 1min, 55 $^{\circ}$ C 1min, 72 $^{\circ}$ C 90s, 共进行 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10min。PCR 产物在 3% 的琼脂糖凝胶上检测。

1.4 RAPD 分析

RAPD 引物序列来自 Operon, 由上海生工公司合成。每一 RAPD 反应体积为 25 μ L, 每 L 中含 10mmol Tris·HCl (pH8.3), 50mmol KCl, 2.0mmol MgCl₂, 1 个单位的 Taq 酶, 4nmol dNTP, 15ng 引物, 20ng 模板 DNA。RAPD 反应条件如下: 94 $^{\circ}$ C 5min; 94 $^{\circ}$ C 1min, 36 $^{\circ}$ C 1min, 72 $^{\circ}$ C 2min, 共进行 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10min。PCR 产物在 1.5% 的琼脂糖凝胶上检测。

1.5 AFLP 分析

AFLP 分析参照 Vos P 的方法^[14]。采用 Gibicol 公司的 AFLP Analysis System I 试剂盒。引物序列与反应过程参照试剂盒说明书。

2 结 果

2.1 转基因纯系“明恢 63-*Xa21*”的 SSRP 分析

随机抽取转基因纯系“明恢 63-*Xa21*” T_3 代的 14 个单株和非转基因明恢 63 的 10 个单株, 提取 DNA, 共用了 41 对 SSRP 引物进行分析。其中 32 对 SSRP 引物产生可重复的 44

收稿日期: 2001-06-29, 修回日期: 2001-10-15。

基金项目: 国家 863 高技术研究发展计划项目 (No. 101-01-02-01) 和国家转基因植物专项 (No. J99-B-006) 资助。

* 联系作者。Tel: 86-10-64870491; Fax: 86-10-64873428; E-mail: wxzhai@genetics.ac.cn

条强扩增带(表 1),转基因纯系“明恢-*Xa21*” T_3 代的 14 个单株和非转基因明恢 63 的 10 单株用同种引物所产生的扩增带完全相同。SSRP 引物 OSR4 的扩增结果见图 1。而利用另外 9 对 SSRP 引物的 PCR 反应产生的 PCR 带极弱或没有带,不作统计。SSRP 分析结果表明转基因纯系“明恢 63-*Xa21*”的不同单株间未发现 SSRP 扩增带的多态性,转基因纯系“明恢 63-*Xa21*”和非转基因对照“明恢 63”之间也未发现 SSRP 扩增带的多态性。这说明转基因系“明恢 63-*Xa21*”在这 44 个 SSRP 位点上与对照相同。

2.2 转基因纯系“明恢 63-*Xa21*”的 RAPD 分析

对与 SSRP 分析相同的转基因纯系“明恢 63-*Xa21*” T_3 代的 14 个单株和非转基因明恢 63 的 10 单株,进行 RAPD 分

析。共用了 70 个 RAPD 引物进行扩增。其中 42 个 RAPD 引物能产生可重复的强扩增带,每一引物产生 3~7 条强扩增带,42 个引物共产生 205 条带(表 1)。转基因纯系“明恢 63-*Xa21*” T_3 代的 14 个单株和非转基因系“明恢 63”的 10 单株用同一 RAPD 引物所产生的扩增带完全相同。用 RAPD 引物 Z4 的扩增结果见图 2。而另外 28 个 RAPD 引物产生的扩增带很弱或不稳定,不作统计。RAPD 分析结果表明“明恢 63-*Xa21*”的不同单株间未发现 RAPD 扩增带的多态性,“明恢 63-*Xa21*”和“明恢 63”之间也未发现 RAPD 扩增带的多态性。这说明转基因系“明恢 63-*Xa21*”在这 204 个 RAPD 位点上与对照相同。

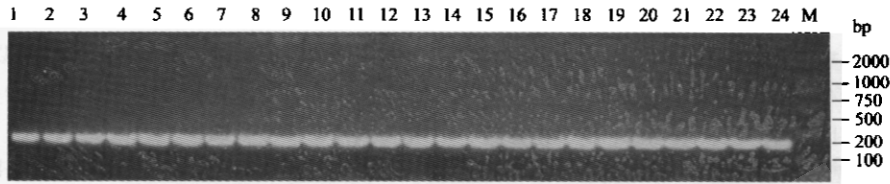


图 1 明恢 63-*Xa21* 及其对照用引物 OSR4 进行的 SSRP 分析

Fig.1 SSRP analysis of Minghui 63-*Xa21* and its control with OSR4 primers

1~14. Different individual plants in T_3 generation of Minghui 63-*Xa21*; 15~24. Different individual plants of the control Minghui 63; M. Molecular weight marker

表 1 转基因纯系“明恢 63-*Xa21*”和“明恢 63”对照的分析比较

Table 1 Comparison of genomic analysis between “Minghui 63-*Xa21*” and its control “Minghui 63”

Primers	Minghui 63- <i>Xa21</i>			Minghui 63		
	Average bands per plant	Total plants	Total variant bands (and %)	Average bands per plant	Total plants	Total variant bands (and %)
SSRP RM23, RM25, RM53, RM47, RM55, RM202, RM6, RM20, RM21, RM253, RM238b, RM2, RM207, RM206, RM254, RM229, RM258, RM244, RM224, RM200, RM168, RM203, RM224, RM244, OSR1, OSR6, OSR15, OSR16, OSR5, OSR3, OSR4, OSR22	44	14	0	44	10	0
RAPD P6, P13, P19, U5, P16, Q16, Q18, D16, O6, O13, O16, H3, H7, T16, T20, O10, U10, O8, H6, F18, O17, M2, O18, U19, B18, M6, U20, F15, H15, H10, F9, J3, O6, J13, J5, U1, Q12, Q15, Z4, V8, V4	204	14	0	204	10	0
AFLP EACT&MCAA, E-ACT&MCAG, E-ACG&M-CTC, E-ACG&M-CAA, E-AGC&M-CAC, M-CTT&E-ACT, E-ACG&M-CAT, E-AAC&MCAG	302	12	5 (0.0014)	302	8	3 (0.0012)

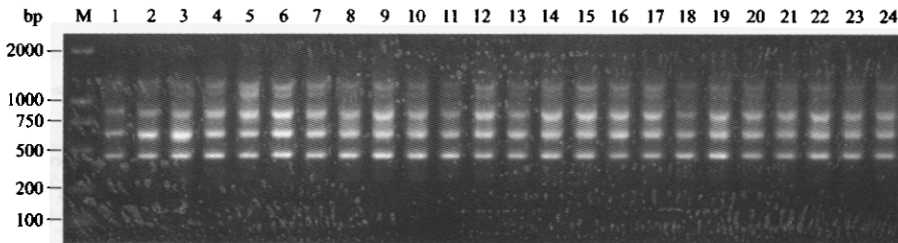


图 2 明恢 63-*Xa21* 及其对照用引物 Z4 进行的 RAPD 分析

Fig.2 RAPD analysis of Minghui 63-*Xa21* and its control with Z4 primers

1~14. Different individual plants in T_3 generation of Minghui 63-*Xa21*; 15~24. Different individual plants of the control Minghui 63; M. Molecular weight marker

2.3 转基因纯系“明恢 63-*Xa21*”的 AFLP 分析

对与 SSRP 分析相同的转基因纯系“明恢 63-*Xa21*” T_3 代的 12 个单株和非转基因“明恢 63”的 8 单株进行 AFLP 分析,共用了 8 对 AFLP 引物进行扩增。每对引物均能产生几十条可重复的强扩增带,8 对引物共产生 302 条带(表 1)。其中用 E-ACT 和 M-CAT 作引物的 AFLP 扩增结果见图 3。转基因纯系“明恢 63-*Xa21*” T_3 代的 12 个单株和非转基因“明恢 63”的 8 个单株用同一 AFLP 引物所产生的扩增带几乎完全相同。进一步观察发现转基因系和非转基因纯系的个别单株的个别条带有变化,我们进行了统计(表 1)。以大多数“明恢 63-*Xa21*”单株和大多数“明恢 63”单株所共有的扩增带为对照,任一单株中每增加或缺失一条扩增带均记作一条异型带。在转基因纯系“明恢 63-*Xa21*” T_3 代的 12 个单株中共检测到 5 条异型带,在非转基因“明恢 63”的 8 个单株中共检测到 3 条异型带。8 条异型带分别从不同的单株中检出,表明这些异型带由随机突变引起。将“明恢 63-*Xa21*”的 5 条异型带与“明恢 63”的 3 条异型带比较发现,二者之间有 1 条相同的异型带,表明该条带(及其代表的位点)容易发生突变。计算二者之间异型带占总扩增带的比例,“明恢 63-*Xa21*”与“明恢 63”出现异型带的百分率相当。综合 AFLP 分析结果,转基因系“明恢 63-*Xa21*”在这 302 个 AFLP 位点上与对照“明恢 63”比较没有发生明显变化。

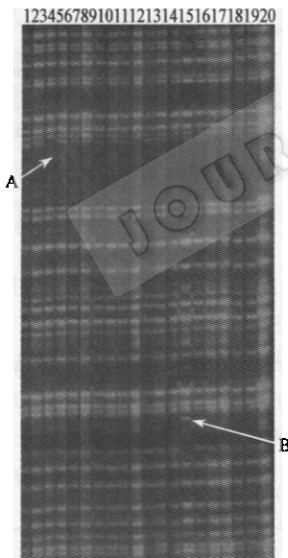


图 3 明恢 63-*Xa21* 及其对照用引物 E-ACT and M-CAT 进行的 AFLP 分析

Fig. 3 AFLP analysis of Minghui 63-*Xa21* and its control with E-ACT and M-CAT primers

1~8: Different individual plants of the control Minghui 63;
9~20: Different individual plants in T_3 generation of Minghui 63-*Xa21*. Arrow A indicated a missing band;
Arrow B indicated a new band

3 讨 论

利用克隆的 *Xa21* 基因通过遗传转化可快速培育抗白叶枯病新品系,转基因品系的稳定遗传和优良性状的保持是

进一步推广的前提。非整合位点的基因组分析是评价转基因品系遗传稳定性的重要依据。本研究利用 SSRP, RAPD 和 AFLP 3 种分析方法,分析了转基因纯系“明恢 63-*Xa21*”的 550 个基因组位点,同时对转基因纯系的不同单株以及与对照“明恢 63”进行了比较。结果表明“明恢 63-*Xa21*”在检测的 550 个位点上与对照没有差异。同时,用 *Xa21* 特异 PCR 标记检测,“明恢 63-*Xa21*”的不同单株给出了一致的扩增带,而对照“明恢 63”没有相应的扩增带(未显示结果)^[13]。这说明除转基因 *Xa21* 整合位点外,通过农杆菌介导获得转化体的过程以及随后的传代纯合过程没有改变原“明恢 63”的基因组。这也说明转基因系“明恢 63-*Xa21*”是非常纯合的,这与田间实验中除对白叶枯病抗性外“明恢 63-*Xa21*”与“明恢 63”的农艺性状相同的结果是相符的。综合基因组分析和田间分析的结果,“明恢 63-*Xa21*”可以替代“明恢 63”用于杂交稻育种。从而也证实了农杆菌介导的 *Xa21* 基因工程的安全性及可靠性。

纯系选择是育种的关键步骤,对于基因工程产生的转基因系尤为必要。借助分子标记尤其是基于 PCR 反应的标记,进行基因组分析可以快速鉴定育种系的纯度。SSRP 分析操作简单,重复性好,但每一反应揭示的位点较少,一般为 1 条带;RAPD 分析揭示的位点比 SSRP 多,一般有 3~8 条带,但重复性差;AFLP 揭示的位点较多,每一反应一般有 30 条带左右,重复性也较好,但操作较复杂。3 种 PCR 标记各有优缺点,可根据具体情况使用。对于要分析的位点,当然是越多越好。考虑到时间和经费等因素,一般分析几百乃至上千个位点就可以满足育种要求。

致 谢 中国科学院遗传研究所李晓兵和赵显峰参加部分工作。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Hiei Y, Ohta S, Komari T *et al*. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J*, 1994, 6: 271 ~ 282
- [2] Christou P. Genetic transformation of crop plants using microprojectile bombardment. *Plant J*, 1992, 2: 275 ~ 281
- [3] Datta S K, Peterhans A, Datta K. Genetically engineered fertile indica-rice recovered from protoplasts. *Bio/technology*, 1990, 8: 736 ~ 740
- [4] Schuh W, Netson M R, Bigelow D M *et al*. The phenotypic characterization of R2 generation transgenic rice plants under field conditions. *Plant Sci*, 1993, 89: 69 ~ 79
- [5] Dale P J, McPartland H C. Field performance of transgenic potato plants compared with controls regenerated from tuber discs and shoot cuttings. *Theor Appl Genet*, 1992, 84: 585 ~ 591
- [6] Temnykh S, Park W D, Ayres N *et al*. Mapping and genome organization of microsatellite sequences in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor Appl Genet*, 2000, 100: 697 ~ 712
- [7] Williams J G K, Kubelik A R, Livak K *et al*. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic*

- Acids Res*, 1990, **18**:6531 ~ 6535
- [8] Vos P, Hogers R, Bleeker M *et al.* AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucl Acids Res*, 1995, **23**:4407 ~ 4414
- [9] Ariel Arencibia, Eugenio Gentinetta, Elena Cuzzoni *et al.* Molecular analysis of the genome of transgenic rice (*Oryza sativa L.*) plant produced via particle bombardment or intact cell electroporation. *Molecular Breeding*, 1998, **4**:99 ~ 109
- [10] Bao P H, Granata S, Castiglione S *et al.* Evidence for genomic changes in transgenic rice (*Oryza sativa L.*) recovered from protoplasts. *Transge Res*, 1996, **5**:97 ~ 103
- [11] Wang G, Castiglione S, Chen Y *et al.* Poplar (*Populus nigra L.*) Plants transformed with a *Bacillus thuringiensis* toxin gene: insecticidal activity and genome analysis. *Transgen Res*, 1996, **5**:289 ~ 301
- [12] Zhai W, Li X, Tian W *et al.* Introduction of a Blight Resistance Gene, *Xa21*, into Chinese Rice Varieties through an *Agrobacterium*-mediated system, *SCIENCE IN CHINA* (Series C), 2000, **43**(4):361 ~ 368
- [13] Ma B J, Wang W M, Zhou J H *et al.* Efficient selection of homozygous lines of hybrid rice restorer with the transgene *Xa21* using test cross and PCR. *Chinese Science Bulletin*, 2001, **46**(2):125 ~ 128
- [14] McCouch S R, Kotcket G, Yu Z H *et al.* Molecular mapping of rice chromosome. *Theor Appl Genet*, 1988, **76**:815 ~ 829

Genome Analysis of Transgenic Homozygous Line “Minghui 63-*Xa21*”

XIE Bing^{1,2} ZHU Xue-Feng^{2,3} ZHAI Wen-Xue^{2*} LU Run-Long¹ ZHU Li-Huang²

¹ (University of Science and Technology of China, Hefei 30027, China)

² (Institute of Genetics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

³ (Chinese Rice Research Institute, Hangzhou 31006, China)

Abstract By using rice SSRP, RAPD and AFLP molecular markers, the genome of rice transgenic line “Minghui 63-*Xa21*” was analyzed. 32 SSRP primers, 42 RAPD primers and 8 AFLP primers could produce obvious PCR bands in the analysis of at least 12 individual plants selected randomly from “Minghui 63-*Xa21*” T₃ generation. Totally 550 PCR bands, equivalent to 550 genomic sites, were detected. Different individual plants of the transgenic homozygous line displayed almost the same PCR pattern. Compared with the control “Minghui 63”, no difference was found in their PCR patterns. This indicated that the introduction of *Xa21* into the genome of “Minghui 63” did not change these 550 genome sites and their heredity. Very few variant PCR bands were observed in some individual plants from both “Minghui 63-*Xa21*” and “Minghui 63”. However, the variant percentage was equivalent between the transgenic line and the non-transgenic control line.

Key words rice, *Xa21*, transgenic homozygous line, genome analysis, molecular marker

Received: 06-29-2001

This work was supported by a grant from the State 863 High Technology R&D Project of China (No. 101-01-02-01) and the Chinese Transgenic Plant Special Program (No. J99-B-006).

* Corresponding author. Tel: 86-10-64870491; Fax: 86-10-64873428; E-mail: wxzhai@genetics.ac.cn

本 期 广 告 索 引

企业	版位	企业	版位
Amersham Biosciences 公司	封底	常州三环生物工程公司	文前彩插 VII
Roche 诊断公司	封二	镇江东方生物工程公司	文前彩插 VIII
北京五洲东方科技公司	封三	杭州大和热磁电子公司	中心彩插 I、II
Promege 公司	文前彩插 I、II 文后黑白插 I	江苏大学生物工程所	文后黑白插 II
扬中韦宁科仪公司	文前彩插 V	扬中威柯特生物工程公司	文后彩插 I、II
江苏达森集团	文前彩插 VI	宁波新芝生物科技公司	p. 125
上海保兴生物设备公司	文前彩插 III、IV	宁波星普基因技术公司	p. 124