

转修饰 *cry1Ac* 基因籼稻明恢 81 经花药培养获得抗虫 DH 系

曾千春¹ 吴茜¹ 冯德江¹ 周开达² 刘翔¹ 朱祯^{1*}

¹(中国科学院遗传与发育生物学研究所 北京 100101)

²(四川农业大学水稻研究所 温江 611130)

摘 要 对基因枪法获得的明恢 81 转修饰的 *cry1Ac* 基因当代植株进行花药培养,共接种花药 2600 枚,获得 83 份花培植株,其中双倍体植株 43 份,单倍体植株 40 份。PCR 结果表明含有 *cry1Ac* 基因的植株 55 份,花培植株群体中转基因与非转基因植株的比值为 2:1(55/28)。进一步结合 Southern blot 和 ELISA 分析,于花培植株当代筛选到转基因纯合株系 36 份。外源蛋白表达量上,花药来源于同一克隆的 DH 系的不同植株之间基本一致,最高的 *Cry1Ac* 含量达 0.25%。田间抗虫性试验表明,经花药培养纯合获得的部分转基因纯合系植株对二化螟(*Chilo suppressalis*)表现出高抗,而且主要农艺性状保持不变。以上结果表明水稻花药培养可以加速转基因的纯合与育种利用。

关键词 修饰的 *cry1Ac* 基因,抗虫基因,转基因水稻,花药培养,生物检测,二化螟
中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2002)04-0442-06

近年来,植物基因工程在作物遗传育种中得到了广泛应用并迅速发展成为现代农业生物技术产业,转基因作物的推广面积逐年增加^[1]。水稻转基因研究也取得较大进展,通过基因枪或农杆菌介导获得的抗病、抗虫、抗逆和品质改良的转基因水稻部分已进入育种利用阶段^[2-4]。但是,不论何种转化方法其初始转化体往往是杂合体且常常为多拷贝整合,因而需要多次自交加代并严格筛选才能获得外源基因纯合的转基因植株,不利于转基因材料的育种应用。杂交水稻为中国粮食生产作出了重要贡献,但由于质源的相对单一,病虫害的危害已经成为其主要生产制约因子之一^[5]。笔者所在实验室通过协作率先培育出抗螟虫转基因杂交稻特优科丰 1 号和特优科丰 2 号(已获得国家 863 中试项目资助),大田抗虫性试验连续 3 年表现良好。2001 年 8 月在福建省福州抗虫转基因水稻培育现场会上得到专家一致好评。转基因育种实践过程中注意到,早代实现目标基因的快速纯合是获得可资育种利用的转基因株系的重要保障。为此,我们通过花药培养对基

因枪法获得的转修饰 *cry1Ac* 基因杂交籼稻优良恢复系明恢 81 进行纯合,并对获得的转基因纯合植株进行了外源基因的表达分析和抗虫性鉴定。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 花药供体植株 基因枪法获得的籼稻(*Oryza sativa* L. subsp. *indica*)明恢 81 转修饰 *cry1Ac* 基因当代植株中(转修饰 *cry1Ac* 基因明恢 81 转基因植株的获得过程另文发表)农艺性状基本未变,并经 PCR 和 ELISA 检测为阳性的 3 个克隆(I、II、III)为花药培养供体植株。*cry1Ac* 基因由加拿大渥太华大学 I. Altosaar 教授惠赠,我们所作的修饰是在 *cry1Ac* 基因 5' 端添加内质网定位的前导信号肽序列 Signal peptide(S),3' 端添加内质网滞留信号序列 KDEL。植物选择标记基因 *hpt* 编码潮霉素抗性,目的基因由 *ubi1* 启动子控制,转基因植株产生的 *Cry1Ac* 毒蛋白可富集于内质网及衍生自内质网的蛋白体上,并赋予转基因植株对二化螟(*Chilo suppressalis*)等鳞

收稿日期 2002-01-24,修回日期 2002-04-12。

基金项目 国家自然科学基金项目(No. 39989001、39580012、39880023),国家重点基础研究发展规划“973”项目(No. 2001CB10901),国家高技术“863”计划资助项目(No. 2001AA212041),国家“863”计划生物技术领域中试研究项目(No. 101-06-01-06),国家转基因植物研究与产业化开发专项(No. ZJY-B-01),美国洛氏基金水稻生物技术项目(No. 97001 # 581)。

* 通讯作者。Tel: 86-10-64873490; E-mail: zzh@genetics.ac.cn; pgml@genetics.ac.cn 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

翅目害虫的抗性。图 1 为转基因结构简图。

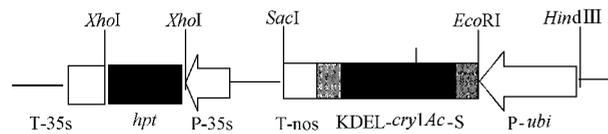


图 1 植物表达载体结构简图

Fig. 1 Diagram of plant expression vector

1.1.2 酶和生化试剂:限制酶购自华美公司。放射性同位素 α - 32 P dCTP 购自亚辉生物工程公司。其它试剂为国产或进口分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 转基因植株的花药培养:花药愈伤诱导和分化培养基用 SK3^[6], 主要操作过程:事先用 I_2 -KI 染色, 镜检花粉并确定取材时的幼穗形态。傍晚剪取穗子置 9~10℃ 低温处理 7~10d 即可剥取幼穗, 饱和次氯酸钠 30%(V/V) 消毒后取出花药接种到 SK3 愈伤诱导培养基上, 每皿 80~90 个花药, 用 parafilm 封口, 黑暗处培养(27±1℃); 约 1 个月后可将小颗粒愈伤转入分化培养基上进行光照培养分化苗(光周期 16/8h), 苗高约 7cm 时练苗移栽^[7,8]。

1.2.2 PCR 和 Southern 检测:水稻基因组 DNA 提取参照 Sambrook 等的方法^[9]进行。*cry1Ac* 基因扩增引物(PA): 5' TGC AGA GAG CTT CAG AGA GTG 3', (PB): 5' ACA CCC TGA CCT AGT TGA GC 3', 扩增的目的片段 743 bp。50 μ L 反应体系中加入 5 μ L 缓冲液、两个引物各 1 μ L (终浓度为 50pmol/L), 质粒 DNA 模板及样品模板(2 μ L × 200pmol/L), 1 μ L dNTP (终浓度 200 μ mol/L), 1 μ L Taq 酶(2u), 用无菌的双蒸水补足体积, 最后在反应体系上覆盖一层液体石蜡(基因公司生产的 PCR 仪 MJ-PTC 100 可不加矿物油)。PCR 反应条件为 95℃ 预变性 4min, 一次循环为 95℃ 变性 1min, 56℃ 退火 1min, 72℃ 延伸 2min, 35 个循环结束后, 72℃ 延伸 10min。PCR 产物用 1.5% Agarose 电泳, 溴化乙锭染色后用凝胶成像系统扫描存盘。Southern 分析时, 用 CTAB 法^[9]提取转基因花培水稻植株基因组 DNA, 取 10 μ g 的 DNA 用 *EcoR* I 酶切。酶切的 DNA 用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳。采用碱法转移至 Hybond N⁺ (Amersham) 尼龙膜。预杂交, 杂交按照 Sambrook 等方法^[9]。探针标记依随机引物标记试剂盒进行(Boehringer Mannheim)。杂交膜用 SSC 洗去背景后, 压 X-光片(Fuji)放射自显影后观察。

1.2.3 Cry1Ac 毒蛋白的 ELISA 分析:分蘖盛期取待检测水稻植株(PCR 阳性的 DH 植株)的第二伸展叶

提取可溶性总蛋白, 每样品 3 次重复。Cry1Ac-ELISA 检测采用试剂盒, 试剂盒由北京大学生态教研室许崇仁教授提供, 操作过程和 Cry1Ac 蛋白含量计算参见文献[10], 用 Cry1Ac 蛋白含量(mg/L)占可溶性总蛋白含量(mg/L)的百分数, 衡量 Cry1Ac 蛋白在转化植株中的表达水平。

1.2.4 抗性分析:田间自然感虫, 分株系于蜡熟期调查感虫株数和感虫穗数, 以实生种子苗为同步对照, 计算感虫株率和感虫穗率进行抗性评价, 同一 DH 系所有单株均无感虫分蘖时视为抗虫株系。

2 结果

2.1 花培植株的获得

花药培养共接种 30 皿约 2600 个花药, 来自 3 个克隆(I、II、III), 每克隆 10 皿。图版 I-abc 示花药培养过程 30 d 后可见从逐渐变褐的花药上长出紧密的鲜黄色愈伤, 有时 1 个花药可长出 4 个愈伤团, 从形态发生来看源于不同的花粉粒(图版 I-b) 这种情况是不多见的。共获得 19 丛 83 株绿苗(克隆 I 8 丛共 32 株, 克隆 II 6 丛共 25 株, 克隆 III 5 丛 26 株, 花培结果见表 1, 自然加倍的花粉植株 43 株, 单倍体植株 40 株, 自然加倍率为 51.8%。按克隆计算, 纯合效率为 100%(3 个克隆均获得加倍的纯系)。移栽成活后按丛(DH 克隆)分株系种植, 田间观察注意到花培纯系不同 DH 克隆之间, 植株的倍性和结实率有差异, 同一 DH 克隆内不同植株之间比较一致。

2.2 花培植株的分子验证

依据植株形态可以直接区分单倍体和二倍体水稻植株, 单倍体植株株高变矮, 叶片变窄, 穗子和颖花变小而且不育。对 83 株花培植株分二倍体植株(共 43 株)和单倍体植株(40 株)进行 *cry1Ac* 基因的 PCR 扩增(表 1, 图版 I-d)。36 株二倍体植株和 19 株单倍体植株及阳性质粒扩增出 *cry1Ac* 基因的目的带, 而非转化对照、7 株二倍体植株和 21 株单倍体植株无扩增带。花培植株群体中转基因与非转基因植株的比值为 2:1(55/28)。

选取加倍二倍体 PCR 阳性植株进行 Southern blot 分析, 非转化植株为对照, 转基因植株总 DNA 不酶切或经 *EcoR* I 单酶解后电泳, 转移至 Hybond N⁺ 膜上。用双酶切中间质粒获得长约 1.85kb 的 *cry1Ac* 基因编码区作探针, α - 32 P dCTP 标记后与膜杂交。转基因植株 *EcoR* I 单酶切的泳道共 4 条带, 暗示至少 4 个拷贝, 阳性对照在 1.85kb 处有一条杂

交带,非转化对照无杂交信号,表明 *cry1Ac* 基因已经整合到基因组中(图版 I-e)。

表 1 明恢 81 转修饰 *cry1Ac* 基因植株的花药培养及 PCR 检测

Table 1 Anther culture of the modified *cry1Ac*-transgenic rice Minghui 81 and their PCR detection

Transgenic Line	Anther inoculated (No)	Plantlet regeneration Plant (Clone)	<i>cry1Ac</i> -PCR of haploid plants (n)		<i>cry1Ac</i> -PCR of double haploid plants (2n)	
			Positive	Negative	Positive	Negative
I	900	32(8)	13	4	11	4
II	850	25(6)	2	6	14	3
III	850	26(5)	4	11	11	0
Total	2600	83(19)	40		43	

2.3 *Cry1Ac* 毒蛋白在转基因花培纯合系中的表达

花培纯合后的二倍体 PCR 阳性植株的 ELISA 检测表明(图版 I-f):来自 3 个克隆的转基因花培纯系均有 *Cry1Ac* 毒蛋白表达,同一克隆来源不同花培植株之间 *Cry1Ac* 毒蛋白的含量基本一致,如克隆 I 来源的 DH 克隆系 I-1~4,克隆 II 来源的 DH 克隆系 I-1~3,克隆 III 来源的 DH 克隆系 III-1~3,其相应的 *Cry1Ac* 毒蛋白含量分别接近各个 DH 克隆系植株毒蛋白含量的平均值 0.25%、0.12% 和 0.05%。不同来源克隆间 DH 植株毒蛋白表达量差异较大,克隆 I 是克隆 III 的 5 倍以上,克隆 I 的 *Cry1Ac* 毒蛋白占可溶性总蛋白含量的 0.25%。

2.4 转基因花培纯合植株的抗虫性

PCR 和 ELISA 分析均为阳性的 10 个 DH 克隆系共 36 个单株,以及非转化对照植株的田间自然感虫性观察(当年恰逢螟虫大发生)表明,转基因 DH 植株与非转化水稻植株田间对二化螟的抗虫性差异明显(表 2)。大多数转 *cry1Ac* 基因花培纯合植株表现出很好的抗虫性,最好的纯合株系,其感虫株率和感虫率均为 0,而非转化对照则高感螟虫,感虫株率 100%,感虫率 73.4%(明恢 81 较感螟虫)。而 *Cry1Ac* 毒蛋白表达量较低的转基因纯系,其相应的抗虫性也低,如 DH 系 III。这些结果与供体花药植株的抗虫性是一致的。

表 2 转修饰 *cry1Ac* 基因水稻明恢 81 DH 系对二化螟的田间抗性

Table 2 Striped stem borer (*Chilo suppressalis*)-Resistance of the modified *cry1Ac*-transgenic rice Minghui 81 DH lines at field trials

DH clones	Plant (tiller)	S. plant (tiller)	S. plant percent	S. tiller percent	Resistance evaluation
I-1	4(74)	0(0)	0	0	HR
I-2	2(32)	0(0)	0	0	HR
I-3	3(30)	0(0)	0	0	HR
I-4	2(21)	0(0)	0	0	HR
II-1	5(44)	1(9)	20	2.0	MR
II-2	5(70)	1(13)	20	1.8	MR
II-3	4(41)	1(8)	25	1.9	MR
III-1	4(72)	4(42)	100	58.3	S
III-2	4(45)	4(27)	100	60.0	S
III-3	3(36)	3(21)	100	58.3	S
CK	5(64)	5(47)	100	73.4	S

S-Susceptible; HR-highly resistant; MR-Middle resistant; CK-Check

3 讨 论

转基因植株的纯合是育种利用的基础,而其纯合速度则直接影响到育成品种的价值。水稻花药培

养是细胞工程育种的重要途径^[8],同时也是转基因技术应用于水稻育种的重要补充。本研究初步建立了转基因水稻花药培养纯合体系,我们以转基因当代植株为花药培养供体,当年获得 83 株花培植株

(绿苗),通过分子标记辅助选择于转基因第二代即实现目的基因纯合,而且农艺性状基本保持不变, DH 纯合系内不同植株 *Cry1Ac* 毒蛋白含量以及对二化螟的抗性基本一致。本研究获得的明恢 81 转基因 DH 植株,其外源基因已经表达并表现出好的抗虫性,转基因的遗传稳定性研究和育种利用正在进行中。

花药培养在没有选择标记辅助的情况下可以实现转基因的纯合。出于食品安全性考虑,转基因后代消除筛选标记基因的研究已经越来越受到重视,根据所用植物选择标记通过抗生素筛选纯合目标基因的途径不再可取^[11]。水稻花药培养过程中,有时同一个花药不同花粉粒均有胚性愈伤发生(一个花药可长出 4 个愈伤块,见图版 I -b)。花粉粒来源的愈伤可以分化出完整植株(药隔来源的愈伤不能分化出完整植株),花粉植株自然加倍率 50% ~ 60%^[8],有利于加速繁殖转基因植株。一旦获得转基因水稻的 DH 植株,借助 PCR 筛选即可获得没有选择标记基因但目标基因纯合的转基因植株。在培育无选择标记基因抗虫水稻的研究方面,我们也正在进行水稻花药培养纯合转基因的工作。

获得转基因 DH 植株的另一途径是直接转化单倍体愈伤。烟草上有过研究报道但转化频率极低,基因枪法转化烟草花药的总转化频率大约为 10^{-7} ^[12]。水稻组织培养最早成功于花药培养^[13],主要是因为花药培养所得愈伤生长迅速而且胚性好,这种愈伤作为转基因受体易于获得愈伤转化体。我国水稻花药培养无论在理论上还是育种利用上都成绩斐然,实际操作中,诱导水稻花药获得愈伤后,较短时间内即转入再分化阶段常能获得较高比例的绿苗率,花药愈伤继代时间一长往往容易产生白化苗或者难以分化^[6-8]。笔者曾利用滇型杂交稻恢系南 29 花培后代 H14 的花药愈伤为受体进行遗传转化,获得 40 多个抗性克隆,分化出的潮霉素抗性白化苗生长旺盛,但没有得到绿苗(未发表资料),可能是愈伤继代时间长的原因。Datta 等^[14]曾用花粉来源的愈伤,进行原生质体培养,用 PEG 法获得过抗除草剂的转基因籼稻植株。陈东方曾提到,他所在实验室用根癌土壤杆菌 *A. tumefaciens* 介导进行大麦遗传转化时,花药培养来源的愈伤易于成功(私人通讯)。如何将水稻花药培养直接应用于水稻转基因值得进一步研究。

REFERENCES (参考文献)

- [1] James C. Global review of commercialized transgenic crops : ISAAA Briefs 2001 , No. 24
- [2] Cheng X , Sardana R , Kaplan H *et al.* Agrobacterium-transformed rice plants expressing synthetic *cryIA(b)* and *cryIA(c)* genes are highly toxic to striped stem borer and yellow stem borer. *Proc Natl Acad Sci U S A* , 1998 , **94** : 2767 ~ 2772
- [3] Tu J , Zhang G , Datta K *et al.* Field performance of transgenic elite commercial hybrid rice expressing *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin. *Nature Biotech* , 2000 , **18** : 1101 ~ 1104
- [4] Ye A , AL-Babili S , Kloti A *et al.* Engineering the provitamin A (beta-carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. *Science* , 2000 , **287** (5451) : 303 ~ 305
- [5] ZENG Q (曾千春) , ZHOU K (周开达) , ZHU X (朱祯) *et al.* Current status in the use of hybrid rice heterosis in China. *Chinese J Rice Sci* (中国水稻科学) 2000 , **14** (4) : 243 ~ 246
- [6] CHEN Y (陈英) , ZUO Q (左秋仙) , WANG R (王瑞丰) *et al.* Screening anther culture medium for indica \times japonica rice through orthogonal array. in , *Symposium of anther culture* , Science Press (科学出版社) , Beijing , 1978 , pp. 65 ~ 72
- [7] ZENG Q (曾千春) , ZHANG S (张树华) , XIE J (谢建华) *et al.* Breeding on purple rice 921H with resistance to rice blast (*Magnaporthe grisea*) *in vitro*. *Journal of Yunnan Agri Uni* (云南农业大学学报) , 1997 , **12** (3) : 223 ~ 225
- [8] LUO Q (罗琼) , ZENG Q (曾千春) , ZHOU K (周开达) *et al.* Rice anther culture and its use in rice breeding. *Hybrid Rice* (杂交水稻) 2000 , **15** (3) : 1 ~ 2
- [9] Sambrook J , Fritsch E F , Maniatis T. *Molecular Cloning : A laboratory manual* (2nd ed.) New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press , 1989.
- [10] SHI C (石春林) , ZHU Z (朱祯) , XU H (徐鸿林) *et al.* Expression behavior of Bt toxin gene in transgenic tobaccos. *Acta Bot Sin* (植物学报) 2000 , **26** (3) : 269 ~ 273
- [11] Komari T. Vectors carrying two separate T-DNAs for co-transformation of higher plants mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and segregation of transformants free from selection markers. *Plant J* , 1996 , **10** (1) : 165 ~ 174
- [12] Stoger E , Fink C , Pfosser M. Plant transformation by particle bombardment of embryogenic pollen. *Plant Cell Rep* , 1995 , **14** : 273 ~ 278
- [13] Niizeki H , Oono K. Induction of haploid rice plants from anther culture. *Proc Japan Academy* , 1968 , **44** : 554 ~ 557
- [14] Datta SK , Peterhans A , Datta K *et al.* Genetically engineered fertile indica - rice recovered from protoplasts. *Biol Technol* , 1990 , **8** : 736 ~ 740

Anther Culture Generated Stem Borer-resistance DH Lines of Minghui 81(*Oryza sativa* L. *subsp.* *indica*) Expressing Modified *cry1Ac* Gene

ZENG Qian-Chun¹ WU Qian¹ FENG De-Jiang¹ ZHOU Kai-Da² LIU Xiang¹ ZHU Zhen^{1*}

¹(Institute of Genetics and Developmental Biology , Chinese Academy of Sciences , Beijing 100101 , China)

²(Rice research Institute , Sichuan Agricultural University , Wenjiang 611130 , China)

Abstract 2600 Anthers from T₀ modified *cry1Ac*-transgenic rice lines of Minghui 81 , an elite restoring line of commercial CMS *indica* hybrid rice , were cultured on SK3 media. 83 green plantlets were recovered , 43 double haploid (DH) and 40 haploid among them. Results of PCR analyzes indicated that 55 plants of 83 were harbored the *cry1Ac* gene , and the ratio of *cry1Ac*-positive against *cry1Ac*-negative was 2 : 1 (55/28). 36 putative transgenic DH plants were further confirmed by Southern blot. ELISA detection showed that Cry1Ac level in different transgenic rice plants of the same *cry1Ac*-DH clone was almost equal and the highest one amount to 0.25 % of the total soluble protein. Pest insect-resistant bioassay at field trials demonstrated that some of the homozygous *cry1Ac*-transgenic rice plants not only showed high-level resistance against striped stem borer(*Chilo suppressalis*) but also retained elite agronomy characters. These results demonstrated that rice anther culture has a great value in rice molecular breeding.

Key words modified *cry1Ac* gene , insecticidal gene , transgenic rice , anther culture , bioassay , *Chilo suppressalis*

Received : 01-24-2002

This work was supported by Grants from the National Natural Science Foundation of China(No.39989001 , 39580012 and 39880023) , the Special Funds for Major State Basic Research of China(No.2001CB10901) , State 863 High Technology R&D Project of China(No.2001AA212041) , National 863 Project for Pilotscale Experiment of Biotechnology(No.101-06-01-06) , State program of Transgenic Plant Research and Commercialization(No. ZJY-B-01) , and Rockefeller Foundation of Rice Biotechnology(No. 97001 # 581).

* Corresponding author. Tel : 86-10-64873490 ; Fax : 86-10-64852890 ; E-mail : zzhzhu@genetics.ac.cn , jgmlzz@genetics.ac.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn