

抗除草剂基因导入培矮 64S 实现杂交水稻制种机械化的初步研究

傅亚萍 朱正歌 肖 晗 胡国成 斯华敏 于永红 孙宗修

(中国水稻研究所, 农业部水稻生物学重点实验室, 浙江 杭州 310006)

Primary Study on Mechanization of Seed Production of Hybrid Rice by Inducing *Bar* Gene to Pei'ai 64S

FU Ya-ping, ZHU Zheng-ge, XIAO Han, HU Guo-cheng, SI Hua-min, YU Yong-hong, SUN Zong-xiu

(Key Laboratory for Rice Biology, Ministry of Agriculture, P. R. China, China National Rice Research Institute, Hangzhou 310006, China)

Abstract: Using a high efficient rice transformation system mediated by *Agrobacterium tumefaciens*, *Bar* gene was introduced into a photoperiod-temperature sensitive genetic male sterile line Pei'ai 64S. The transgenic plants showed the resistance to herbicide Basta. PCR and Southern blot analysis indicate that *Bar* gene was inserted in genomic DNA of Pei'ai 64S. Simulation on seed production of hybrid rice using transgenic Pei'ai 64S as a female parent was also successful. This result proved the feasibility of mechanization to produce hybrid rice seeds via gene transformation. The problems on practical utilization of this protocol are discussed.

Key words: hybrid rice; gene transfer; mechanization; hybrid seed production

摘 要: 利用农杆菌介导的高效遗传转化技术, 成功地将 *Bar* 基因转入两系杂交稻的不育系培矮 64S。转基因植株具有明显的 Basta 抗性, 分子检测进一步证明 *Bar* 基因已整合到水稻染色体上。模拟制种的成功, 表明机械化制备杂交水稻种子是可行的。讨论了实现机械化制备杂交水稻种子所需解决的各种问题。

关键词: 杂交水稻; 转基因; 机械化; 制种

中图分类号: Q943; S511.035.3; S511.038

文献标识码: A

文章编号: 1001-7216(2001)02-0097-04

我国杂交水稻的研究为世人所瞩目, 包括美国在内的稻米种植国纷纷引进这一技术, 然而尽管杂交水稻的产量有口皆碑, 但劳动密集型的制种技术却使欧美发达国家望而却步。目前我国周边国家所种植的杂交水稻, 基本上是通过边境贸易从中国进口实现的。显然, 简化制种技术, 并最终实现制种的机械化, 是杂交水稻真正走向世界的关键。

近年来植物生物技术的飞速发展, 尤其是转基因技术的日趋成熟, 为杂交水稻的新发展提供了机遇。黄大年等把抗除草剂基因导入水稻的恢复系^[1], 以期提高大田种植杂交水稻纯度。为探索杂交水稻机械化制种的道路, 我们设想把抗除草剂基因导入水稻的不育系。本文报道的是初步结果, 并就深入研究、实现机械化制备杂交水稻种子所需解决的各种

问题进行了讨论。

1 材料与方 法

1.1 材 料

光温敏核不育系培矮 64S 种子由育成单位湖南杂交水稻研究中心提供。根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 菌株 EHA105 和质粒 pCAMBIA1304 由澳大利亚 Jefferson 博士提供。质粒 pCAMBIA1304 的 T-DNA 区含有 *Bar* 基因(对除草剂 PPT 有抗性)和潮霉素抗性基因 *Hyg^r*。质粒 pCAMBIA1304 经冻融法导入农杆菌 EHA105。

收稿日期: 2000-04-30; 修改稿收到日期: 2000-08-10。

基金项目: 国家 863 计划项目; 浙江省自然科学基金资助项目。

第一作者简介: 傅亚萍(1960-), 女, 实验师。

1.2 方法

1.2.1 转基因植株的获得和增殖

培矮64S的成熟种子剥去颖壳,用2.5%次氯酸钠表面灭菌2h后,无菌水冲洗3次,接种。基因转化的方法参见刘巧泉等^[1],但基本培养基为MS。从获得的转基因试管苗中选1株按孙宗修等^[3]的方法进行离体快速繁殖。当达到足够数量(约1000株)时,试管苗转到含(1/2)N、大量元素的无激素培养基上令其生根。当试管苗长到约8cm高并有发达的根系时,即可移栽入土。

1.2.2 转基因植株对Basta的抗性实验

移栽入土的转基因小苗在3叶期时涂Basta^[4],以检测Bar基因的表达情况。

1.2.3 转基因植株的分子生物学检测

1.2.3.1 植株总DNA的提取

按卢扬江等^[5]的方法提取叶片DNA,取幼叶5g左右,在液氮冷冻的条件下磨碎,加20mL经65℃预热的抽提缓冲液,于65℃预热40min,加入等体积的氯仿-异戊醇于60r/min振荡20min,3500r/min离心15min,取上清液,加0.8~1.0倍体积的异丙醇,钩出DNA沉淀。加TE溶解,RNA酶消化,再用醋酸钠、100%冷乙醇纯化。制备的DNA样品用于Southern blotting和PCR分析。

1.2.3.2 PCR扩增

引物P1:5'-GATAAAACGGTCGGTAACGGTCG-3',P2:5'-GATGCATGGGCTGTTTGTGTTCG-3'(由上海生物工程公司合成),反应系统按Carl等^[6]加入。扩增条件为94℃,3min;94℃,1min;58℃,30s;72℃,1.5min;共35个循环。72℃下延伸10min,扩增反应在PERKIN ELMER-9600 PCR仪上进行,扩增产物通过0.8%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.3.3 Southern blotting分析

(1)酶解、转膜。植株DNA经EcoR I限制性内切酶完全酶解,0.8%琼脂糖凝胶23V电压条件下电泳20h,0.5μg/mL溴化乙锭染色后,紫外光下检测酶切效果,然后再用毛细管转移法将胶中的DNA片段转移至尼龙膜上^[7]。

(2)DNA探针标记。DNA探针用直接核酸标记法(英国Amersham公司生产,ECL检测系统)进行标记。取所需标记的探针(10ng/μL),沸水中变性5min,冰浴5min,然后加入与探针等体积的DNA

标记试剂(辣根过氧化物酶聚合体)及戊二醛溶液,37℃下保温10min,放于冰上待用。

(3)杂交和洗膜。首先把经Southern转移的膜置于含有NaCl(0.5mol/L)和封闭试剂(5%)的杂交液(英国Amersham公司生产)中,42℃预杂交1h。加入已标记好的探针,混匀,42℃下杂交过夜。

杂交膜用洗液1(尿素5mol/L,0.5×SSC,pH7.0,0.4%SDS)于42℃下洗涤2次,每次10min,再用洗液2(2×SSC)室温下洗涤2次,每次5min。

(4)杂交信号的检测。等体积检测试剂1(H₂O₂)和检测试剂2(鲁米诺及增强剂)(英国Amersham公司生产)混合,倒于膜上,反应1min。X光片上曝光0.5~2.0h,常规方法冲片。

1.4 机械化制种的模拟实验

经快速繁殖获得的大批转基因试管苗(不育系)与恢复系隔行相邻种植。为确保花期相遇,采用了5个恢复系,每一小区有转基因苗150株,恢复系90株,常规管理。选恢复系与不育系同期抽穗的小区,每天赶花粉1次。授粉10d后喷洒0.1%的Basta,5d后检查喷Basta的效果。

2 结果与分析

2.1 转基因植株的获得和快速增殖

以光温敏不育系培矮64S的成熟胚为受体,进行农杆菌介导的Bar基因的遗传转化,从约100个抗性愈伤中获得了4个再生植株。

从4株转基因植株中任选1株转到液体的快繁培养基上,以70r/min的速度振荡培养,每14d更换一次培养基,同时把新的分蘖切下继续增殖,经多次增殖,获得试管苗925丛(每丛均有若干分蘖),于1999年5月初移栽入土。另3株直接转入土中,其中1株未能成活。

2.2 转基因植株对Basta的抗性

3株成活的转基因小苗涂Basta后,均表现出对Basta明显的抗性。而原始供体培矮64S的叶片涂Basta后迅速枯黄死亡。

2.3 转基因植株的分子生物学检测

2.3.1 PCR分析

PCR扩增结果表明,3株转基因植株均能扩出900bp的DNA片段,而从对照植株抽提的总DNA却不能扩出该片段(图1)。

2.3.2 Southern blotting分析



图1 转基因植株DNA的PCR扩增

Fig. 1. PCR amplification results to transgenic rice DNA (*Bar*).

扩增产物为560 bp *Bar* 基因片段。M—Marker; 1,2,3—转基因植株。

M—1000 bp DNA ladder; 1,2,3—Transgenic rice.

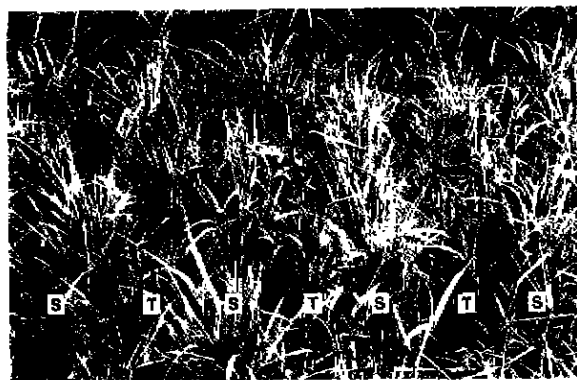


图3 转基因培矮 64S 植株的 Basta 抗性

Fig. 3. Transgenic rice showed the resistance to Basta.

S—培矮 64S(黄化); T—转基因培矮 64S(正常)。

S—Pe'ar 64S(Yellowing); T—Transgenic rice Pe'ar 64S(normal).

图2是DNA Southern blotting的结果。由图2可见,未转化水稻植株总DNA和探针无同源性,没有杂交带。而转化水稻植株的总DNA,因有*Bar*基因插入染色体基因组中,增加了一段和探针同源的DNA序列,因此出现了明显的杂交信号,证明*Bar*基因已整合到染色体基因组中。

2.4 模拟机械化制种

移栽成活的转基因小苗按行距40 cm与5个恢复系相间种于田里,形成5个面积约为18 m²的模

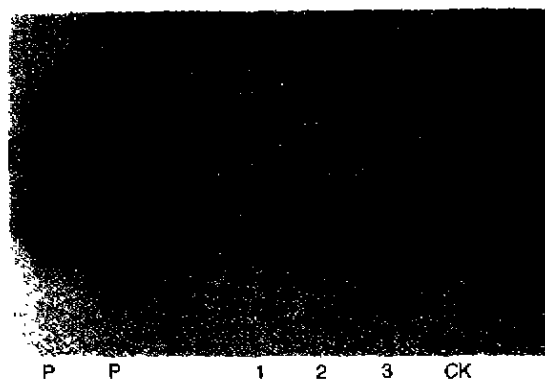


图2 转基因植株DNA的Southern blotting检测

Fig. 2. Southern blot analysis of the transformants.

探针为560 bp *Bar* 基因片段。P—质粒;1,2,3—转基因植株;CK—对照。

DNA of transformants digested by *Eco*R I. P—Plasmid; 1,2,3—Transgenic rice; CK—Control rice.

拟制种小区。

1999年夏季,长江下游出现历史上罕见的长时间低温,为防止培矮 64S 受气温影响出现育性波动而影响制种质量,先后两次拔去已抽出的穗子,令其再生。7月底起,温度升高,从8月6日~10日对花期相遇的培矮 64S/B1 和培矮 64S/B7 两个模拟制种小区进行赶粉。8月18日对这两个小区喷洒 Basta,结果转 *Bar* 基因的不育系培矮 64S 与恢复系表现完全不同。转基因培矮 64S 叶色不变,继续生长,而恢复系叶色褪绿,并迅速黄化。5 d 后恢复系全部枯黄(图3)。又经 15 d 后,枯黄的恢复系开始出现倒伏,而转基因培矮 64S 却能正常生长并在授粉后结实。

2000年夏,将3个杂交水稻组合的种子按常规播种和移栽,每个株系约300株(事先得到转基因植物田间种植的许可)。抽穗时考查结实率,3个株系的平均结实率都在85%以上,最高的达90%,与抽穗期相近的普通杂交水稻结实率相同。这表明抗除草剂基因的插入对杂交水稻的结实率没有影响。

3 讨论

随着转基因技术的日益完善,通过导入外源基因这一手段,提高水稻对病虫害的抗性与对逆境(如盐碱、干旱等)的耐性,改良植株性状、增加产量、

改善米质已成为可能。最近黄大年等又将抗除草剂基因导入杂交水稻的恢复系,成功地提高了杂交水稻的纯度。本研究把抗除草剂基因导入杂交水稻的不育系,并成功地进行了模拟制种。这一切表明生物技术与常规技术相结合,可以提高常规制种的效率,并解决某些常规制种很难解决的问题,应用前景十分广阔。

杂交水稻的制种程序复杂而严格,不育系和恢复系需要分别播种、移栽,尤其需要分别仔细收割,才能防止机械混杂,所有这些都需耗费大量人工。由于制种田要比普通田多花数倍的人工,因此杂交稻的种子价格也数倍于常规种子。随着我国经济的发展,青壮年外出务工,农村劳动力的结构发生了变化,妇女与老年劳力的比例迅速提高,变农业生产由繁重复杂为轻便简单的呼声日益高涨,抛秧、机插与农事集约化等形式深受农民欢迎生动地说明了这是大势所趋。所以改变杂交水稻的制种技术并最终实现机械化生产不但可使杂交水稻真正走向国门,而且也是国内水稻生产的必然之路。基因工程为此提供了一种手段,我们把抗除草剂基因导入了不育系,以普通恢复系作父本,在扬花10 d后喷洒除草剂,转 *Bar* 基因的不育系对除草剂表现抗性而正常生长,并向子房提供足够的营养使之发育成饱满的杂交稻种子。恢复系植株虽能自花传粉、受精、灌浆,但终因植株被除草剂杀死而不能正常结实。即使恢复系基部长出个别新的分蘖并抽穗开花,但发育进程毕竟推迟了10余天,收割时还没有正常结实,很容易被扬弃,从而较好地解决了杂交稻制种田收获的机械化问题。当然,模拟制种并不表示机械化制种已

经成功,如前所述,父母本的全生育期、花期调节,减少授粉障碍以及外源基因的安全性等特殊问题都需要一一解决。仅机械化收割这一问题,也还有喷除草剂的最适时期、最佳浓度、适宜次数等技术环节需要进一步探索。所有这些只有与育种学家的紧密合作,才能共同探讨出解决的方法。

谢辞:湖南杂交水稻研究中心罗孝和研究员提供培矮64S的种子,中国水稻研究所庄杰云副研究员、郑康乐研究员在分子生物学检测方面给予指导与帮助,艾格福公司叶天勋博士提供除草剂Basta,谨致谢忱。

参考文献:

- 1 章善庆,章汉华,薛锐,等.利用 *bar* 基因导入恢复系提高杂交水稻纯度的尝试[J].中国农业科学,1998,31(6):33~37
- 2 刘巧泉,张景六,王宗阳,等.根瘤农杆菌介导的高效转化系统的建立[J].植物生理学报,1995,24(3):259~258
- 3 孙宗修,朱旭东,董凤高,等.中国水稻基因组计划标准实验材料的构建[J].中国农业科学,1997,30(2):91~93
- 4 斯华敏,傅亚萍,肖晗,等.转基因水稻经花药培养获得纯系的研究[J].中国水稻科学,1999,13(1):19~24
- 5 卢扬江,郑康乐.一种简易的提取水稻DNA的方法[J].中国水稻科学,1992,6(1):47~48
- 6 Dveasler G S, Dieffenbach C W. PCR 技术实验指南[M].北京:科学出版社,1998. 88~105
- 7 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual[M]. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 9-38~9-40
- 8 孙宗修,程式华,闵绍楷,等.光敏核不育水稻的光温反应的研究. I 人工控制条件硬型光敏不育系的育性鉴定[J].中国水稻科学,1991,5(2):56~60