

## 水稻单拷贝 *Xa21* 近等转基因系的培育与抗性分析

张德春 夏志辉 赵显峰 范海阔\*\* 翟文学\*

(中国科学院遗传与发育生物学研究所, 北京 100101)

**摘 要** 植物转基因的表达在一定程度上受其所在宿主基因组整合位置的影响, 通常称为转基因位置效应。利用农杆菌介导法将抗白叶枯病基因 *Xa21* 转入水稻品种明恢 63, 获得带有不同转基因拷贝数的转化体。对转化体连续自交, 并对转基因整合位点进行鉴定和筛选, 获得了明恢 63 遗传背景下整合在不同染色体位点的单拷贝 *Xa21* 转基因纯合系。这些转基因系除一个单拷贝转基因整合位点外, 在基因组水平上是等同的, 构成了近等转基因系。经分子杂交和遗传定位验证, 共获得明恢 63 遗传背景下的 6 个近等转基因系。对这些近等转基因系进行抗白叶枯病分析, 显示出几乎相同的高抗水平。这表明整合位点对 *Xa21* 的抗性没有影响, 不存在转基因位置效应。

**关键词** 转基因水稻, 位置效应, *Xa21* 基因

**中图分类号** Q789 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2004)06-0839-04

通过转化已将一些农业上重要的优良性状或具重要经济价值的基因导入农作物基因组内并得到高效表达, 呈现出如抗虫、抗病及抗非生物逆境等特性<sup>[1-5]</sup>。但研究者也发现, 不同转基因系中外源转基因的表达效率相差甚远, 甚至根本不表达即转基因沉默<sup>[6]</sup>。一些研究表明外源基因在宿主基因组中的整合位置(位置效应)是影响外源基因的表达的因素之一<sup>[7-10]</sup>。但是这方面的研究还不够, 有些结果甚至是矛盾的, 特别是在转基因粮食作物中, 需要开展进一步的调查。

*Xa21* 是具有重要育种价值的水稻广谱抗白叶枯病基因, 利用克隆的 *Xa21* 通过遗传转化可以有效地改善水稻栽培品种对白叶枯病的抗性<sup>[11]</sup>。另外, 由于 *Xa21* 的抗性水平容易测量, 该基因也是一个有价值的模式基因, 用于研究转基因表达以及及各种影响因素的关系。利用农杆菌介导的转化系统将克隆的 *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明恢 63<sup>[12]</sup>。TAIL-PCR 和遗传定位表明在不同的转基因系中 *Xa21* 整合在不同的染色体位点<sup>[13]</sup>。经过鉴定和筛选, 本研究获得了明恢 63 遗传背景下整合在不同染色体位点的单拷贝 *Xa21* 近等转基因系, 构成了研究转基因位置效应的材料。通过对明恢 63 近等转基因系

对白叶枯病的抗性水平分析, 发现单拷贝转基因 *Xa21* 的抗性表现不存在位置效应。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

采用农杆菌介导的转化系统将 *Xa21* 转入水稻品种明恢 63 获得  $T_0$  转基因植株<sup>[12]</sup>。将转基因植株连续多代自交, 经分子杂交和转基因 *Xa21* 整合位点定位筛选获得整合在不同染色体位点的单拷贝 *Xa21* 近等转基因系(图 1)。

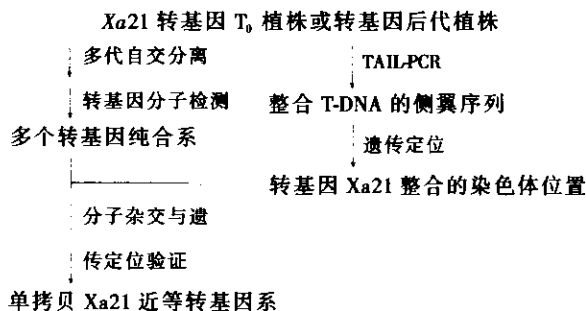


图 1 单拷贝 *Xa21* 近等转基因系的筛选过程

Fig.1 Strategy for selecting near iso-transgenic lines with a single copy of the transgene *Xa21*

#### 1.2 转基因水稻的 Southern 杂交分析

从 *Xa21* 转基因水稻植株叶片提取其基因组 DNA。基因组 DNA 用 *Hind* III 限制酶消化, 经 0.8%

收稿日期: 2004-04-06, 修回日期: 2004-09-14。

基金项目: 国家 863 高技术研究与发展项目基金资助 (No. 2002AA212131, 2002AA212111)。

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

\*\* 为四川农业大学硕士生。

琼脂糖凝胶电泳分离,转移到杂交膜。将引物  $Z_2$  和  $Z_3$  扩增产生的 1.4kb *Xa21* 特异产物标记为探针进行 Southern 杂交<sup>[12]</sup>。

### 1.3 转基因 *Xa21* 的染色体定位

利用 TAIL-PCR 方法分离转基因系中整合 T-DNA 的侧翼序列,作为探针进行遗传定位,确定不同转基因系中单拷贝转基因 *Xa21* 的染色体位置<sup>[13]</sup>。

### 1.4 转基因水稻抗病性鉴定

转基因水稻植株栽培在网室中,在分蘖盛期且白天气温高于 28℃ 时,用剪叶法对充分伸展的叶片接种水稻白叶枯病菌小种 P6(PXO99)。接种后 2 周当病斑面积明显而稳定时,测量病斑长度和叶片长度,以病斑长度占叶片长度的百分比代表抗病性。每一株系调查 5 株计算平均值。

## 2 结果

### 2.1 单拷贝 *Xa21* 近等转基因系的培育

将 *Xa21* 转化水稻品种明恢 63 获得  $T_0$  转基因植株,其中有转基因 *Xa21* 单拷贝和单位点整合,也有多拷贝或多位点整合。将转基因植株从  $T_0$  到  $T_2$  连续多代自交,使得可能的转基因多整合位点(或多拷贝)发生遗传分离,产生新的单拷贝和单位点整合的转基因纯合系。同时分离整合位点的侧翼基因组序列作为探针进行染色体定位,确定不同转基因系中转基因整合位点的位置,并通过分子杂交进行验证。整个筛选过程总结在图 1。经分子杂交和转基因 *Xa21* 整合位点定位筛选,在  $T_3$  代获得 W3a, W3b, W75a, W75b, W76 和 W8 共 6 个整合在不同

染色体位点的单拷贝 *Xa21* 近等转基因系。W3a 和 W3b 由具有 2 个转基因整合位点的转化体 W3 分离获得。W75a 和 W75b 由具有 2 个转基因整合位点的转化体 W75 分离获得。W76 和 W8 分别有具有单个转基因整合位点的转化体直接纯合获得。分子杂交证实这些明恢 63 遗传背景下的 *Xa21* 近等转基因系均只含有单拷贝转基因(图 2),而且近等转基因系中单拷贝 *Xa21* 定位在不同的染色体位置。W3a, W3b, W75a 和 W76 转基因系中的转基因 *Xa21* 分别定位在第 9, 5, 11 和 4 染色体。W75b 和 W8 转基因系中的转基因 *Xa21* 位于未知的不同位置(表 1)。这 6 个近等转基因系在基因组水平上除单拷贝转基因整合位点和未测出的变化外是等同的,它们对白叶枯病的表现较真实地反映转基因 *Xa21* 位置效应。

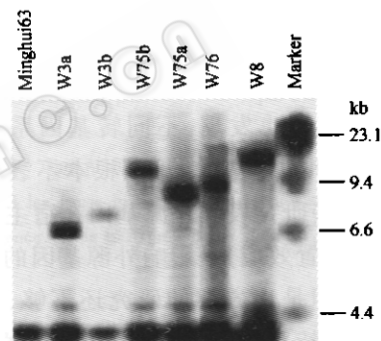


图 2 单拷贝 *Xa21* 近等转基因系的 Southern 分析

Fig. 2 Southern analysis of six near iso-transgenic lines with a single copy of the transgene *Xa21*

Rice DNA was digested with *Hind* III. The probe was the 1.4kb PCR fragment of the *Xa21* gene amplified from pCXK1301 with the primer pair of  $Z_2$  and  $Z_3$ <sup>[12]</sup>. The marker is  $\lambda$ -DNA/*Hind* III molecular standard. Non-transgenic Minghui63 was used as a control

表 1 *Xa21* 近等转基因系中转基因整合的染色体位置

Table 1 Chromosome locations of the transgene *Xa21* in near iso-transgenic lines

Transgenic line	Transgene fragment size revealed by Southern hybridization (kb)	Transgenic site of <i>Xa21</i> (Linked markers beside)	Lesion length percentage/%
W3a	6.8	Chr. 9 (C10403, C313)	3.9 ± 0.4
W3b	7.0	Chr. 5 (R566, R569)	3.8 ± 0.3
W75a	8	Chr. 11 (G320, RZ638)	4.1 ± 0.3
W75b	11	— 4.2 ± 0.3	
W76	9	Chr4 (C513, G271)	3.9 ± 0.2
W8	13	— 4.3 ± 0.3	
Minghui 63 (transgene receptor)			52.6 ± 2.3
IRBB21 ( <i>Xa21</i> donor)		Chr. 11 (RG103)	4.7 ± 0.4

## 2.2 单拷贝 *Xa21* 近等转基因系对白叶枯病的抗性比较

利用明恢 63 遗传背景下的近等转基因系对整合在不同染色体位点的单拷贝 *Xa21* 的抗性水平进行调查。近等转基因系 T<sub>3</sub> 植株在分蘖期接种白叶枯病菌 PX099 (*Xa21* 抗性鉴别小种)。统计每一个近等转基因系的平均抗性水平(病斑长度百分比),即代表每一个转基因位点的 *Xa21* 抗性。6 个近等转基因系,既在 6 个转基因位点上 *Xa21* 的抗性范围为 3.8%~4.3%,比阳性对照 IRBB21 的抗性水平有所提高(表 1,图 3)。在 6 个转基因位点上 *Xa21* 的抗性非常一致,差异不明显,说明转基因 *Xa21* 的抗性表现不存在位置效应。

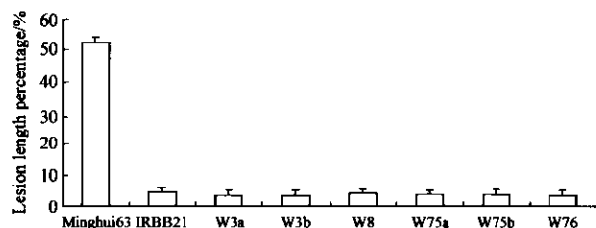


图 3 单拷贝 *Xa21* 近等转基因系对白叶枯病菌 P6 小种的抗性鉴定

Fig. 3 Resistance identification of near iso-transgenic lines with a single copy of the transgene *Xa21* to the bacterial blight strain P6. Minghui63 and IRBB21 were used as controls

## 3 讨论

转基因整合位点影响外源基因的表达,转基因的表达具有位置效应。转基因位置效应已在一些转基因研究中有所报道。在烟草转 *uidA* 植株中, Hobbs 等发现转基因的表达可以非常明确地分成高、低两类<sup>[7]</sup>。Peach 和 Velten 报道烟草转基因愈伤系之间报告基因 CAT 和 GUS 的活性变化分别可达 136 和 175 倍<sup>[8]</sup>。水稻转 *cry1Ac*、*cry2A* 和 *GNA* 植株中也观察到转基因蛋白表达水平的明显变化<sup>[9]</sup>。这些转基因表达的差异主要解释为转基因位置效应,但是不能排除有其它效应存在。本研究获得了相同遗传背景、不同插入位点的单拷贝 *Xa21* 转基因系,排除了其它因素对转基因表达的影响,构成了研究转基因位置效应的理想材料。

通过对近等转基因系进行抗白叶枯病测定,研究转基因 *Xa21* 位置效应。与已报道的那些具有明显位置效应的转基因不同,在相同遗传背景下转基因 *Xa21* 对白叶枯病的抗性没有显示位置效应。可能的原因是该基因来源于水稻基因组,转入水稻基

因组新位点后仍像内源基因一样,在固有的启动子作用下理想表达。而且完整的 9.9kb 转基因片段包含 *Xa21* 编码区两侧的较大非编码区<sup>[11]</sup>,可以保护转基因免受其它因素影响。可是在不同遗传背景下转基因 *Xa21* 对白叶枯病的高抗水平仍显示出明显差异<sup>[14]</sup>。这说明对转基因 *Xa21* 的抗性表现,基因组效应要大于位置效应。

## REFERENCES (参考文献)

- [1] Ding X, Gopalakrishnan B, Johnson LB *et al.* Insect resistance of transgenic tobacco expressing an insect chitinase gene. *Transgenic Res*, 1998, 7: 77-84
- [2] Kim JK, Jang IC, Wu R *et al.* Co-expression of a modified maize ribosome-inactivating protein and a rice basic chitinase gene in transgenic rice plants confers enhanced resistance to sheath blight. *Transgenic Res*, 2003, 12: 475-484
- [3] Ku MS, Agarie S, Nomura M *et al.* High-level expression of maize phosphoenolpyruvate carboxylase in transgenic rice plants. *Nat Biotechnol*, 1999, 17: 76-80
- [4] Markwick NP, Docherty LC, Phung MM *et al.* Transgenic tobacco and apple plants expressing biotin-binding proteins are resistant to two cosmopolitan insect pests, potato tuber moth and lightbrown apple moth, respectively. *Transgenic Res*, 2003, 12: 671-681
- [5] Shadle GL, Wesley SV, Korth KL *et al.* Phenylpropanoid compounds and disease resistance in transgenic tobacco with altered expression of L-phenylalanine ammonia-lyase. *Phytochemistry*, 2003, 64: 153-161
- [6] Iyer LM, Kumpatla SP, Chandrasekharan MB *et al.* Transgene silencing in monocots. *Plant Mol Biol*, 2000, 43: 323-346
- [7] Hobbs SL, Kpodar P, Delong CM. The effect of T-DNA copy number, position and methylation on reporter gene expression in tobacco transformants. *Plant Mol Biol*, 1990, 15: 851-864
- [8] Peach C, Velton J. Transgene expression variability (position effect) of CAT and GUS reporter genes driven by linked divergent T-DNA promoters. *Plant Mol Biol*, 1991, 17: 49-60
- [9] Maqbool SB, Christou P. Multiple traits of agronomic importance in transgenic indica rice plants: analysis of transgene integration patterns, expression levels and stability. *Molecular Breeding*, 1999, 5: 471-480
- [10] Kohli A, Fu X, Twyman R *et al.* Transgene integration, organization and expression. *Rice Genetics Newsletter*, 1999, 16: 135-138
- [11] Song WY, Wang GL, Chen LL *et al.* A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, *Xa21*. *Science*, 1995, 270: 1804-1806
- [12] Zhai WX, Li XB, 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] Zhu XF(朱雪峰), Chen XW(陈学伟), Li XB(李晓兵) *et al.* Genetic mapping of T-DNA integration sites in *Xa21* transgenic rice. *Acta Genetica Sinica (遗传学报)*, 2002, 29(10): 880-886
- [14] Zhou YL(周水力), Zhai WX(翟文学), Zhang Q(章琦) *et al.* Resistance and inheritance of *Xa21* transgenic rice to bacterial blight. *Acta Phytopathologica Sinica (植物病理学报)*, 2001, 31 (2): 123-129

## Breeding and Resistance Analysis of Near Iso-transgenic Lines with a Single Copy of the Transgene *Xa21* in Rice

ZHANG De-Chun XIA Zhi-Hui ZHAO Xian-Feng FAN Hai-Kuo ZHAI Wen-Xue\*

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

**Abstract** Plant transgene expression is affected by the integration sites in host genome to some degree, which is generally termed as "transgene position effects". The bacterial blight resistance gene *Xa21* was previously transferred into a rice variety, Minghui63, through *Agrobacterium*-mediated transformation, and transformants with different transgene copy numbers were obtained. Through self-pollination of transgenic plants, identification and selection of transgene integration sites for several generations, homozygous transgenic lines with only one copy of the transgene *Xa21* located at different chromosome positions were obtained on the Minghui63 genetic background. These transgenic lines were almost identical on their genome except for their different transgene locus and could be regarded as near iso-transgenic (NIT) lines. Six NIT lines were obtained and verified through Southern hybridization and genetic mapping of the transgene. These NIT lines displayed almost the same resistance level to bacterial blight, indicating that the integration sites did not affect the resistance expression of *Xa21*, and there were no position effects for the transgene.

**Key words** Transgenic rice, Position effects, *Xa21*

Received: 04-06-2004

This work was supported by Grant from National High Technology Research and Development Program of China (863) (No. 2002AA212131, 2002AA212111).

\* Corresponding author. Tel: 86-10-64870491; Fax: 86-10-64873428; E-mail: wxzhai@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>