

叶片衰老抑制基因 P_{SAG12} *ipt* 转入 籼稻不育系中 A 的研究^{*}

王亚琴¹, 梁承邨²

(1. 华南理工大学 生物科学与工程学院, 广东 广州 510640;

2. 中国科学院华南植物研究所, 广东 广州 510650)

摘 要: 以质粒 pSG516 (*ipt*) 为目的基因, pHQ9 (*hpt* 和 *gus*) 为选择/标记基因进行共转化, 以 PSD-1000- α 氨气基因枪介导, 将 *ipt*、*hpt* 和 *gus* 基因转化到籼型不育系中 A 的核 DNA 中, 得到了 98 个潮霉素抗性再生植株系。经过 GUS 基因组织化学染色检测、PCR 检测以及 Southern blot 杂交分析, 证实了叶片衰老抑制基因 P_{SAG12} -*ipt* 已经整合到水稻基因组中。

关键词: 叶片衰老抑制基因 P_{SAG12} -*ipt*; 基因枪; 籼型不育系中 A

中图分类号: Q812 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2005) 02-0078-04

在水稻育种生产中存在着杂交稻籽粒充实度不高、结实率不稳的现象, 这主要是由于叶片早衰引起。这个问题的常规方法通常是利用喷施外源激素来改善叶片的早衰性, 但往往会受到生产成本和基因资源的制约。于是通过基因工程来解决水稻早衰问题就成了当前工作的重点。水稻的抗衰老遗传工程始于编码细胞分裂素合成酶(异戊烯基转移酶 IPT)的 *ipt* 基因的分离^[1], 之后 Gan and Amasino^[2] 将高度衰老特异性启动子 P_{SAG12} 与 *ipt* 编码序列融合设计了自我调控衰老抑制系统 P_{SAG12} -*ipt*。利用此系统不少研究者转化了农作物、花卉、水果、蔬菜及某些物种^[3-6], 一定程度上延缓了叶片的衰老, 提高了作物产量, 延长了花卉的保鲜期、蔬菜和水果的贮藏期等。

籼型不育系中 A 是华南植物研究所遗传室培育出的新品种, 具有外观品质优、高抗稻瘟病、中抗白枯叶病、分蘖力强、配合力高等优点, 本文通过基因枪将 *ipt* 基因转入中 A, 旨在通过它与其他恢复系配组, 筛选得到具有抗早衰功能的组合, 从而解决杂交稻结实率不稳、籽粒充实度低的问题。

1 材料与方法

1.1 植物材料

供试水稻 *Oryza sativa* L. 品种一中 A 是华南地区的优质籼型不育系, 由中国科学院华南植物研究所提供。挑取成熟种子盾片长出的胚性愈伤组织

(2~3 mm, 继代不多于 3 次), 用于基因枪的转化。

1.2 质粒

质粒 pHQ9, pSG516 由中国科学院华南植物研究所遗传室提供。

1.3 植株再生

在选择条件下经过一系列选择后, 挑选发育良好具胚性结构的抗性愈伤组织用于植株再生。为了提高抗性愈伤组织的分化率, 可先将它们作干燥处理, 即置于灭菌的干滤纸上黑暗处理 24~48 h, 然后再转入分化培养基, 在光照条件下进行分化培养。

1.4 GUS 基因组织化学的生物鉴定

将 T0 代转化植株的叶片、根等器官浸泡于 X-Gluc 染色液 37℃ 温育过夜, 进行 GUS 组织化学染色^[7]。

1.5 PCR 检测和 Southern blot 分析

参考 Murry 和 Thompson^[8] 方法从水稻叶片提取基因组 DNA。检测筛选标记基因 *hpt* 所用的扩增引物为 5'-TCTGCGGCGATTGTGTAC-3' 和 5'-TATGCGCGATTGCTGATCC-3', 扩增片段长度为 484 bp, 包含 *hpt* 基因的部分编码序列; 检测目的基因 *ipt* 所用的引物为 5'-CCAACGGCGGGCTTATTCTT-3' 及 5'-ATTCCGAACGGATGACCTTC-3', 扩增片段长度为 450 bp, 包含 *ipt* 基因的部分编码序列。按 PCR 试剂盒(华美生物工程公司)说明

* 收稿日期: 2004-04-28

基金项目: 广东省重大科技专项基金资助项目(2003B21207)

作者简介: 王亚琴(1972年生), 女, 博士, 讲师; E-mail: yqwang@scut.edu.cn

书进行 PCR 扩增反应。参照 Sambrook 等^[9] 方法进行 Southern blot 分析，以 0.7 kb *ipt* 基因编码区片段作为探针，采用随机引物法进行标记。

2 结果与分析

2.1 潮霉素抗性植株的获得

将成熟种子诱导得到的愈伤组织继代培养 1 ~ 3 次后，挑选直径 2 ~ 3 mm 的颗粒状胚性愈伤组织作为轰击受体材料，以 *hpt* 基因作为筛选基因与 *ipt* 基因、*gus* 基因进行共转化。在 30 mg/L 潮霉素培养基上，转化和非转化愈伤组织均有增殖没有明显差异，当转到 50 mg/L 潮霉素培养基上培养 2 ~ 3 周后，转化组会出现少部分生长旺盛、结构紧密的抗性愈伤组织（图 1：a），而对照组的生长则明显受到抑制。将抗性愈伤组织转到含 50 mg/L 潮霉素的分化培养基上，部分抗性愈伤组织会继续增殖并分化出绿苗（图 1：b）。将绿苗转至 1/2MS 培养基 2 ~ 3 周后长出发达的根系，此时植株可移栽入土。

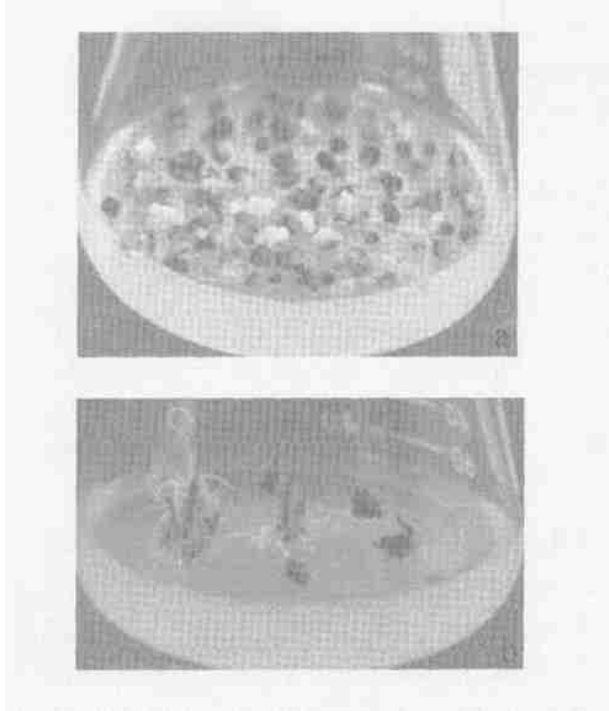


图 1 籼稻不育系中 A 的转化和再生

Fig 1 Transformation and regeneration of Zhong A

a: 在继代筛选培养基上筛选抗性愈伤组织;

b: 抗性愈伤组织在分化筛选培养基上分化成苗

经过潮霉素从继代到分化的筛选之后，得到一批转化再生植株。由表 1 可见，继代 1 ~ 2 次的愈伤组织，抗性愈伤组织形成率由 33.9% 升高为 47.3%，相应抗性植株系获得率也呈上升趋势；然而当继代次数继续增加时，抗性愈伤组织形成率与抗性植株系获得率均有所下降。

表 1 基因枪法转化中 A 愈伤组织的实验结果¹⁾

Tah 1 The results of transformation of calli in Zhong A by particle bombardment

继代次数	靶愈伤组织数	抗性愈伤组织数	抗性愈伤率/%	抗性植株系数	抗性植株系获得率/%
1	62	21	33.9	14	22.6
2	74	35	47.3	21	28.2
3	56	18	32.1	11	19.6

1) 抗性植株系指由同一块抗性愈伤组织再生的抗性植株；抗性植株系获得率=抗性植株系数/靶愈伤组织数×100%

2.2 潮霉素抗性植株的分子检测

首先对潮霉素抗性植株进行 Gus 基因组织化学染色检测，将待测植株叶片用梯度酒精脱色后，装入 1.5 mL 的 Eppendorf 管，加入适量的 GUS 染色液 (X Gluc 45 mg, Chloramphenicol 5 mg, 0.1 mol/L NaH_2PO_4 25 mL, Triton-100 0.5 mL, $\varphi = 10\%$ Methanol 10 mL; 加水至 50 mL)，于 37.0 °C 保温过夜。从图中可以看出转入 Gus 基因的植株叶片呈蓝色（图 2）。

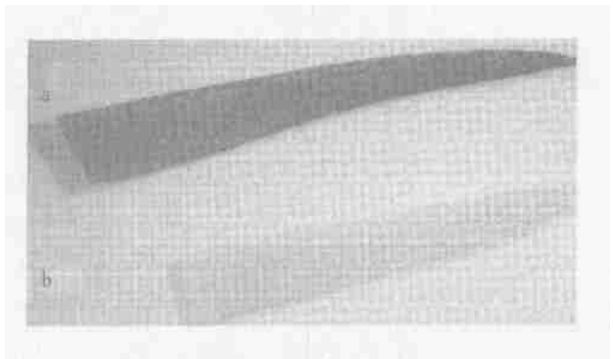


图 2 中 A 抗性植株叶片与对照的 GUS 染色分析

Fig 2 GUS analysis of leaves from resistant

plants and controls of Zhong A

a: 抗性植株叶片; b: 对照

将 46 个抗性愈伤系分化出的再生植株分别提取基因组 DNA，然后对其中的 98 株植株进行 *hpt* 和 *ipt* 基因的 PCR 分析，扩增产物经电泳检测，其中 98 株有 *hpt* 基因阳性扩增带，46 株有 *ipt* 基因阳性扩增带（部分结果见图 3：a，b），中 A 的共转化频率，为 46.9%。

上述 46 株经 PCR 检测有 *ipt* 基因阳性扩增带的植株叶片提取 DNA，用限制性内切酶 *Hind* III 酶切过夜后，进行 Southern 杂交。结果显示，46 株 PCR 阳性转基因植株均为 Southern 杂交阳性，且多数植株为多拷贝。说明在基因枪介导的转化中，*ipt* 基因一般是多拷贝地整合进水稻的基因组中，拷贝数至少 2 个以上（部分结果见图 3：c）。

2.3 转化植株 (R₀) 农艺性状的表现

对当代转化植株的一些重要农艺性状进行考种, 结果见表 2, 转化植株的千粒质量明显高于对照; 转基因株系中 1、中 3 的单株有效穗数明显高

于对照, 而中 2 与对照无明显差异; 转基因植株的株高比对照有所降低, 其中株系中 1 的株高明显低于对照; 转基因植株的分蘖数、穗长、单株总粒数与对照无明显差异。

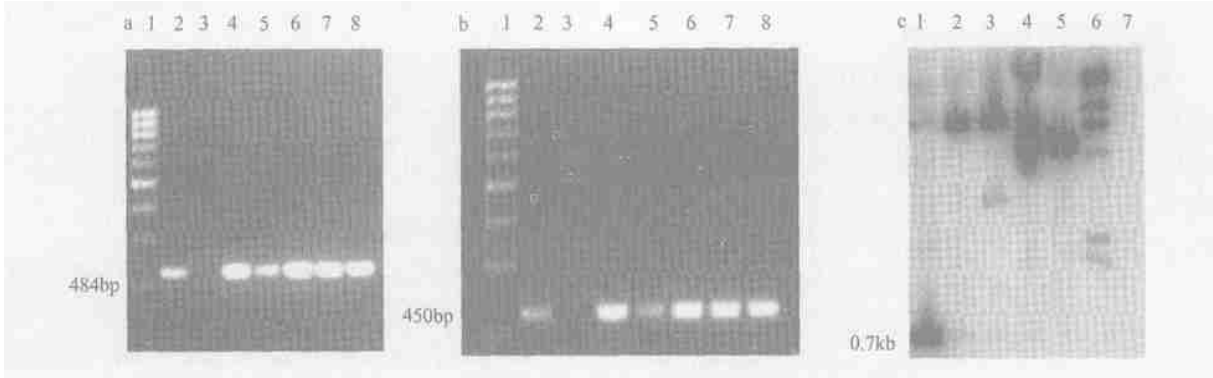


图 3 中 A 转基因植株的 PCR 鉴定和 Southern 分子检测
Fig 3 PCR and Southern blot analysis of transgenic plants of Zhong A

a: 转基因植株 *hpt* 基因的 PCR 分析
1: 200 bp DNA ladder; 2: 阳性对照 (*hpt*); 3: 阴性对照 (未转化植株); 4-8: 转基因植株
b: 转基因植株 *ipt* 基因的 PCR 分析
1: 200 bp DNA ladder; 2: 阳性对照 (*ipt*); 3: 阴性对照 (未转化植株); 4-8: 转基因植株
c: 转基因植株 *ipt* 基因的 Southern blot 分析

1: *Hind* III 酶切的 pSG516; 2-6: *Hind* III 酶切的转化植株基因组 DNA; 7: *Hind* III 酶切的未转化植株基因组 DNA

表 2 转基因植株 (R₀) 的一些重要农艺性状¹⁾

Tab 2 Partial important agronomic traits of transgenic plants (R₀)

株系	株高/cm	分蘖数	穗长/cm	单株有效穗数	单株总粒数	千粒质量/g
中 1	60.80±3.23b	20.33±2.08a	17.73±1.96a	18.69±1.28a	2036±23.14a	23.46±0.85a
中 2	64.32±1.49ab	22.67±1.53a	18.67±2.08a	17.67±1.01ab	2029±26.47a	23.78±1.22a
中 3	64.29±2.30ab	19.92±0.72a	17.50±2.18a	18.79±1.09a	2047±25.36a	23.76±1.01a
对照	68.83±1.43a	18.36±3.01a	17.83±2.52a	15.48±1.35b	2031±14.93a	20.37±1.19b

1) a、b 表示多重比较中 $\alpha=0.05$ 的差异显著。

3 讨 论

在水稻的遗传转化研究中, 粳稻的遗传转化已取得了很大的成功, 并进入了实质性的遗传性状改良阶段^[10]。然而籼稻转化成功的例子还较少^[3], 这主要是因为籼稻的基因型变化大, 较复杂, 难以建立一套高效的再生和转化系统, 而且在遗传转化中受体材料要经历一个较长时间的筛选继代过程。在此过程中, 籼稻的愈伤组织容易褐化而失去生活力。本研究比较了继代次数不同的愈伤组织的转化效率, 发现经短期继代培养形成的愈伤组织作为靶材料, 可以获得较高的转化效率, 并且从接种到获得转化植株仅需 3 个月左右。

最初的遗传转化多数为单质粒载体的转化, 即目的基因与选择标记基因在同一载体质粒上。目前

越来越多的学者将目的基因与选择标记基因构建于 2 个或更多质粒载体上进行共转化。共转化的优点在于后代分离中能将无生产价值的标记基因分离出去, 因为当需要转入新的外源基因时必须使用另外的标记基因, 尽管当前使用的标记基因可以满足多重转化, 但更需要的是导入优良性状基因, 而不是标记基因; 另外各种标记基因的安全性也值得考虑^[11]。本研究运用基因枪法将 2 个质粒载体上的 3 个不同基因 (*gus*、*hpt*、*ipt*) 转入籼稻不育系中 A, 获得了较高的共转化频率, 46.9%。不仅省略了将标记基因和目的基因构建在同一载体上的步骤, 简化了将目的基因导入水稻的途径; 而且符合基因工程育种中提高转基因植株生物安全性的要求, 在后代中可以筛选得到仅含目的基因 *ipt* 的株系。

水稻籽粒 2/3 以上的干物质是开花后通过光合

作用形成的，由于水稻叶片衰老导致光合作用下降，因此水稻在生育期内叶片衰老快慢会直接影响其产量^[12]。本研究对转 $P_{SAG12-ipt}$ 基因植株的一些农艺性状进行了考种，结果表明叶片衰老抑制基因 $P_{SAG12-ipt}$ 转入水稻确实延缓了叶片衰老，增长了叶片利用光能的时间，使之积累了大量的光合产物，表现在农艺性状上是明显提高了单株有效穗数、千粒重；同时还发现转基因植株的株高较对照有所降低，这可能是细胞分裂素含量的增加导致植株形态发生变化，表现为株高变矮；也可能是外源基因的导入方式（尤其是基因枪）对受体材料造成一定程度的伤害，进而影响了后期的生长发育，因为在很多不同目的基因的转化中，转化植株的株高都有不同程度的降低。

参考文献：

[1] AKIYOSHI D E, KLEE H, AMASINO R M, et al. T-DNA of *Agrobacterium tumefaciens* encodes an enzyme of cytokinin biosynthesis [J] . *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984, 81: 5994—5998.

[2] GAN S, AMASINO R M. Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinins [J] . *Science*, 1995, 270: 1986—1988.

[3] LIN Y J, CAO M L, XU C G, et al. Cultivating rice with delaying leaf senescence by $P_{SAG12-ipt}$ gene transformation [J] . *Acta Botanica Sinica*, 2002, 44 (11): 1333—1338.

[4] CHEN L F O, HWANG J Y, CHARNG Y Y, et al. Transformation of broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) with isopentenyl

transferase gene via *Agrobacterium tumefaciens* for postharvest yellowing retardation [J] . *Mol. Breeding*, 2001, 7: 243—257.

[5] MCCABE M S, GARRATT L C, SCHEPERS F, et al. Effects of $P_{SAG12-ipt}$ gene expression on development and senescence in transgenic lettuce [J] . *Plant Physiology*, 2001, 127: 505—516.

[6] GENG S, MA M, YE H C, et al. Effects of *ipt* gene expression on the physiological and chemical characteristics of *Artemisia annua* L. [J] . *Plant Science*, 2001, 160: 691—698.

[7] JEFFERSON R A, KAVANAGH T A, BEVAN M W. *Gus* fusion: β -Glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in high plants [J] . *Embo. J.*, 1987, 6: 3901—3907.

[8] MURRY H G, THOMPSON W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA [J] . *Nucl Acids Res.*, 1980, 8: 4321—4326.

[9] SAMBROOK J, FRITSCH E F, MANIATIS T. *Molecular Cloning a laboratory manual* [M] . 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, 492—512.

[10] JIANG J D, LINScombe S D, WANG J L, et al. High efficiency transformation of US rice lines from mature seed-derived calli and segregation of glufosinate resistance under field condition [J] . *Crop Sci*, 2000, 40: 1729—1741.

[11] YODER J I, GOLDSBROUGH A P. Transformation system for generating marker-free transgenic plants [J] . *Bio/Technology*, 1994, 12: 263—267.

[12] MURCHIE E H, CHEN Y Z, HUBBART S, et al. Interactions between senescence and leaf orientation determine in situ patterns of photosynthesis and photoinhibition in field-grown rice [J] . *Plant Physiol*, 1999, 119 (2): 553—564.

Studies of the Leaf specific Senescence inhibitor Gene ($P_{SAG12-ipt}$)
Introduced into Zhong A (Cytoplasmic Male Sterile Indica)

WANG Ya qin¹, LIANG Cheng ye²

(1.College of Bioscience and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China;
2. South China Institute of Botany, Academia Sinica, Guangzhou 510650, China)

Abstract: $pSG516 (ipt)$ and $pHQ9 (hpt \text{ and } gus)$ were co transferred into Zhong A (cytoplasmic male sterile indica) genomic DNA by the particle bombardment of Biolistic PSD-1000 He Particle Delivery System (BIO-RAD) with the plasmid DNA mixed to Gold Particle. Ninety eight independent lines were obtained by selecting for hygromycin resistance. Results of GUS, PCR and Southern blot demonstrated that the leaf specific senescence inhibitor gene ($P_{SAG12-ipt}$) has been integrated into rice genome.

Key words: leaf specific senescence inhibitor gene ($P_{SAG12-ipt}$); particle bombardment; Zhong A (cytoplasmic male sterile indica)