

利用花粉管通道法将叶片衰老抑制基因 P_{SAG12} -IPT 导入普通小麦的研究

奚亚军^{1,2} 林拥军¹ 张启发¹ 侯文胜² 路明^{2*}

(¹ 华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室, 湖北武汉 430070; ² 西北农林科技大学, 陕西杨陵 712100)

摘要 利用花粉管通道法将叶片衰老抑制基因 P_{SAG12} -IPT 导入普通小麦品种西农 1376, 经 PCR、GUS 组织化学染色、点杂交和 Southern 杂交分析, 证明带有特异启动子的目的基因已整合到 5 个植株的基因组中, 且在大部分转基因植株中能够稳定遗传。通过叶片细胞分裂素含量、叶绿素含量、叶片衰老进程及农艺性状分析, 初步证明 P_{SAG12} -IPT 基因在部分转基因小麦的衰老叶片中特异表达, 叶片衰老受到明显抑制。

关键词 小麦 (*Triticum aestivum*); 花粉管通道法; 叶片衰老; P_{SAG12} -IPT
中图分类号: S512.103

Studies on Introduction of Leaf Senescence-inhibition Gene P_{SAG12} -IPT into Common Wheat through Pollen-tube Pathway

XI Ya-Jun^{1,2}, LIN Yong-Jun¹, ZHANG Qi-Fa¹, HOU Wei-Sheng², LU Ming²

(¹ National Key Lab for Crop Genetics and Improvement of Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, Hubei; ² Northwest Science and Technology University of Agriculture and Forestry, Yangling 712100, Shaanxi, China)

Abstract The leaf senescence-inhibition gene P_{SAG12} -IPT was used to improve wheat varieties that had disadvantage of leaf presentility. With wheat cultivar Xinong 1376 as material, 5 transgenic plants were obtained through pollen tube pathway mediated transformation. By means of PCR amplification, GUS histochemical analysis, Dot and Southern blot hybridization, the target gene with specific promoter was demonstrated to integrate into the wheat genome already. The P_{SAG12} -IPT gene could inherit steadily in the most transgenic plants. The leaf cytokinin, chlorophyll, senescence development and agronomic character of transgenic plants were discussed. The results indicated that P_{SAG12} -IPT gene might specifically express in the senescent leaf of some transgenic plants, and the leaf senescence was obviously delayed.

Key words Wheat (*Triticum aestivum*); Pollen tube pathway; Leaf senescence; P_{SAG12} -IPT

叶片衰老是制约作物产量的重要因素之一。有报道指出^[1], 在作物生育后期, 叶片功能期每延长 1 d, 产量可增加 2%。叶片衰老受植物激素的调节, ABA 和乙烯促进衰老, 赤霉素和细胞分裂素则延迟衰老。Gan 等^[2]构建的抑制叶片衰老自我调节系统利用衰老叶片特异表达的启动子 SAG12 与编码细胞分裂素合成的关键酶基因 IPT 融合成嵌合基因 (P_{SAG12} -IPT), 其原理为: 当叶片开始衰老时, 衰老叶片特异表达的启动子 SAG12 被激活, IPT 基因开始表达, 细胞分裂素含量增加, 使叶片衰老延缓; 而叶

片衰老的延缓反过来又使 SAG12 启动子失活, 从而避免了细胞分裂素过量合成造成植物的形态和发育异常。Gan^[3]、Astrid^[4]和付永彩^[5]、林拥军等^[6]分别用 P_{SAG12} -IPT 基因转化烟草、水稻, 其转基因植株的形态和生育期与对照基本一致, 而叶片衰老得到延缓。

本研究利用花粉管通道法将叶片衰老抑制基因 P_{SAG12} -IPT 导入生产上存在早衰缺陷的小麦优良品种西农 1376, 旨在通过调控叶片衰老进程来改善西农 1376 后期的光合功能, 提高其产量潜力。

*基金项目: 华中农大作物遗传改良国家重点实验室开放课题; 国家重点科技(攻关)项目(96-009-01-14)。

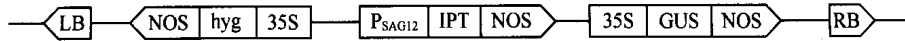
作者简介: 奚亚军(1969-), 男, 陕西白水人, 博士, 副研究员, 主要从事小麦杂种优势利用及转基因研究, 现在西北农林科技大学农学院工作。Tel: 029-7082205; E-mail: xjyjsc@163.net

Received(收稿日期): 2002-12-23, Accepted(接受日期): 2003-03-30.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 普通小麦品种西农 1376,由西北农林科技大学小麦中心提供。



1.2 方法

1.2.1 用花粉管通道法转化西农 1376 提取和纯化质粒 DNA (质粒 DNA 纯化采用 PEG 法),以 ddH_2O 为溶液介质;西农 1376 开花前人工去雄,套袋;人工授粉后 1~2.5 h 内剪去柱头,用微量注射器滴加 10 μL 质粒 DNA,其中质粒 DNA 浓度设 100、400 和 700 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 3 种处理;套袋,注明转化时期及质粒 DNA 浓度;小麦成熟后收获转化种子;春化处理后(云南南繁种子)播于大田,管理同常规品种。

1.2.2 PCR 检测 PCR 引物依据叶片衰老启动子 $P_{SA\text{Gl}2^-}$ 序列设计,引物序列为: $P_{SA\text{Gl}2^-}$ -R:5'-TGGCT-GAAGTGATAACCGTC-3', $P_{SA\text{Gl}2^-}$ -F:5'-GCAAGAGACGAGGAA GAAA-3'。PCR 循环参数为 94 1 min, 56 1 min, 72 1.5 min, 35 个循环 72 延伸 7 min, 4 保存。

1.2.3 点杂交、Southern 杂交和 GUS 基因表达的组织化学法 检测参照《分子克隆实验指南》^[8]和稍加修改后的 Rueb^[9]方法。

1.2.4 转基因植株的表达分析 根据转基因植株衰老叶片叶绿素含量、细胞分裂素含量(叶片衰老抑制基因 $P_{SA\text{Gl}2^-} IPT$ 表达产物为异戊烯基腺嘌呤)及形态学特征研究目的基因的表达。其中叶绿素含量测定采用丙酮法,细胞分裂素含量测定采用高压液相色谱法^[10],叶片衰老进程级别记载标准为 0 级:全叶青绿;1 级:叶尖缺绿坏死;2 级:叶尖叶缘缺绿坏死;3 级:半叶失绿坏死;4 级:全叶坏死。

1.2.5 转基因植株后代(T_1)的遗传分析 T_0 代套袋自交,从收获单株种子中随机取少量 T_1 代种子进行盆栽,提取单株 DNA 进行 PCR 检测,分析 T_1 代植株中 $P_{SA\text{Gl}2^-} IPT$ 基因的遗传。

2 结果与分析

2.1 转基因植株的 PCR 和 GUS 检测

从表 1 可以看出,利用花粉管途径转化后当代小麦的结实率与质粒浓度呈负相关,随着质粒浓度

1.1.2 菌株和质粒 大肠杆菌菌株 DH5 由华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室分子育种室保存。质粒 pCMLA35-1 (原始载体为 pCAMBIA1301)能在大肠杆菌 DH5 中扩增,由曹孟良博士构建^[7],简图如下:

的增加小花结实率下降,说明质粒 DNA 可能对小麦的正常受精结实过程有抑制作用。

由于湖北武汉当年春季干旱少雨,加之土壤黏度较大,春化处理后的麦种子田间出苗情况普遍较差,有接近一半的种子未能出苗。对田间所有植株苗期提取叶片 DNA,以质粒 pCMLA35-1 为阳性对照,利用 $P_{SA\text{Gl}2^-}$ 引物进行 PCR 扩增,其结果有 5 个单株和阳性对照能扩增出预期大小的目标片段(526 bp),在未转化的阴性对照中未能扩增出相应的片段(图 1)。进一步对这 5 个单株采用 GUS 染色检测,其结果与 PCR 扩增结果完全一致,初步证明在西农 1376 的这 5 个单株(田间编号为:TH1, TH2, TH3, TH4, TH5)的基因组中可能插入了 $P_{SA\text{Gl}2^-} IPT$ 基因序列。同时,表 1 结果显示,在 100~700 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度范围内,花粉管通道法转化植株的 PCR 和 GUS 阳性率随着质粒 DNA 浓度的升高而增加。

表 1 转基因植株的 PCR 和 GUS 分析

Table 1 PCR and GUS analysis of transgenic plants

质粒浓度 Plasmid concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	转化小花数 No. of transgenic spikelets	结实率 Seedset rate (%)	出苗数 No. of seedlings	PCR 阳性 株数 No. of PCR positive plants	GUS 阳性 株数 No. of GUS positive plants
100	1905	63.46	514	0	0
400	1943	53.11	499	1	1
700	1967	49.57	536	4	4

2.2 转基因植株的点杂交和 Southern 杂交验证

对 PCR 和 GUS 初步检测为阳性的单株 TH1、TH2、TH3、TH4、TH5 提取叶片 DNA,以 PCR 扩增的 $P_{SA\text{Gl}2^-} IPT$ 基因片段(526 bp)为探针,进行点杂交和 Southern 杂交分析,以进一步确证是否为转化体。

从图 2 可见,PCR 和 GUS 检测为阳性的 5 个单株点杂交均有杂交信号,与 PCR 和 GUS 检测结果完全吻合。采用 *Xba* 限制性内切酶酶切总 DNA 后进行 Southern 杂交,其结果与点杂交结果相同(图 3),5 个植株在 3.2 kb 处均有杂交带,与 $P_{SA\text{Gl}2^-} IPT$

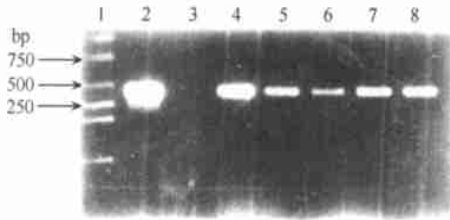


图1 转基因植株的 PCR 分析

Fig.1 PCR analysis of transgenic plants

1:DNA 分子量标准;2:阳性对照;3:阴性对照;
4~8:转基因植株
1:Ladder DNA ;2:positive control ;
3:negative control ;4-8:transgenic plants

基因大小基本一致,说明带有特异启动子的目的基因已完整整合到小麦基因组中。

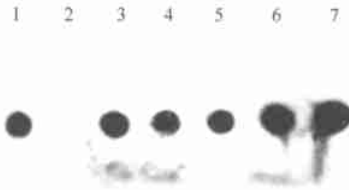


图2 转基因植株的点杂交分析

Fig.2 Dot blot analysis of transgenic plants

1:阳性对照;2:阴性对照;3~7:转基因植株
1:Positive control ;2:Negative control ;3-7:Transgenic plants

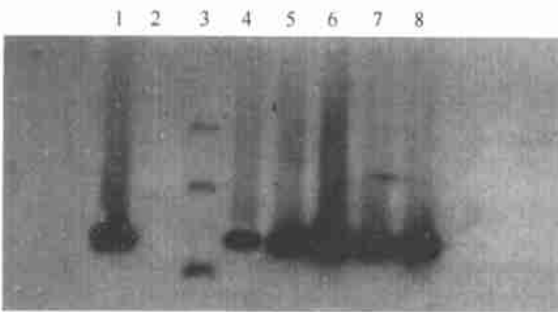


图3 转基因植株的 Southern 杂交分析

Fig.3 Southern blot analysis of transgenic plants

1:阳性对照;2:阴性对照;3:DNA 分子量标准;4~8:转基因植株
1:Positive control ;2:Negative control ;3:Ladder DNA ;
4-8:Transgenic plants

2.3 转基因植株的叶片细胞分裂素含量、叶绿素含量及衰老进程分析

在小麦开花后 20 d(对照西农 1376 小麦的倒二叶、倒三叶外观已呈明显的衰老迹象)测定转基因植株叶片细胞分裂素(异戊烯基腺嘌呤)含量。结果显示(图 4),TH1、TH5 倒二叶的细胞分裂素含量显著高于旗叶、倒三叶和对照,说明 $P_{SAG12^-} IPT$ 基因在衰

老叶片中特异表达,增加了衰老叶片的细胞分裂素含量;而倒三叶的细胞分裂素含量低于倒二叶和旗叶,可能是由于测定时间较迟,部分细胞分裂素发生降解所致。TH3 植株表现较为特殊,与对照相比,叶片细胞分裂素含量大幅度升高,表现趋势为:旗叶 > 倒二叶 > 倒三叶 > 对照,这可能是由于 $P_{SAG12^-} IPT$ 基因在转基因植株体内受整合位置、结构及其他因素影响导致 SAG12 启动子丧失特异性而产生了过量的细胞分裂素^[5]。TH2、TH4 植株的叶片细胞分裂素含量与对照无明显差异。

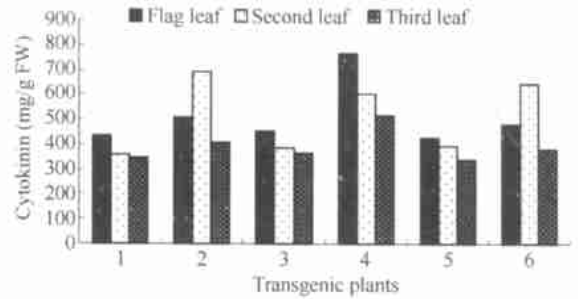


图4 转基因植株叶片细胞分裂素含量(花后 20 d)

Fig.4 Leaf cytokinin content in transgenic plants

(20 days after flowering)

1:CK;2:TH1 ;3:TH2;4:TH3 ;5:TH4 ;6:TH5

转基因植株叶片叶绿素含量与细胞分裂素含量表现趋势基本一致(图 5):TH1、TH5 植株的叶绿素含量显著高于对照,TH2、TH4 与对照差异不明显,而 TH3 较对照有较大幅度升高。由于在武汉春播小麦灌浆成熟期正值梅雨季节,高温寡照多雨,田间植株普遍发生早衰迹象。但与对照相比,TH1、TH5 植株的绿叶面积增加,叶片功能期延长,成熟时呈现穗黄叶绿,叶片衰老受到明显抑制。TH2、TH4 植株与对照无明显差异,而 TH3 表现叶色浓绿,贪青

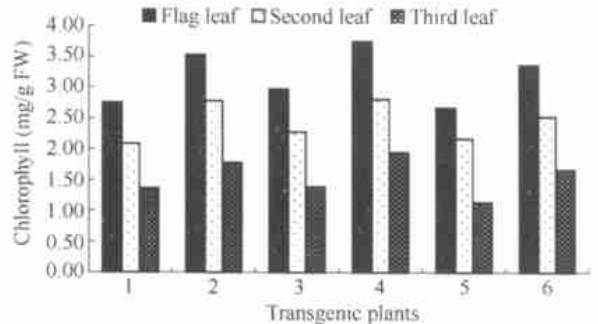


图5 转基因植株叶片叶绿素含量(花后 20 d)

Fig.5 Leaf chlorophyll content in transgenic plants

(20 days after flowering)

1:CK;2:TH1 ;3:TH2;4:TH3 ;5:TH4 ;6:TH5

晚熟(表 2)。

表 2 小麦生长后期叶片衰老进程分析

时间 Time (day/month)	材料 Material	旗叶 Flag leaf	倒二叶 The second leaf	倒三叶 The third leaf
20/5	CK	2	2	3
	TH1	1	1	2
	TH2	2	2	2
	TH3	1	1	2
	TH4	2	2	3
5/6	TH5	1	2	2
	CK	3	4	4
	TH1	2	2	4
	TH2	3	3	4
	TH3	2	2	3
	TH4	3	4	4
	TH5	2	3	3

2.4 转基因植株农艺性状分析

对转基因植株 T_0 代的农艺性状调查表明(表 3),转基因植株 TH1、TH2、TH4、TH5 的抽穗期、开花期、成熟期、株高、穗数、穗粒数等与对照基本一

致,说明在这些植株中导入叶片衰老抑制基因 $P_{SA\text{Gl}2^-IPT}$ 对其生育期和植株形态没有明显影响。而对 TH3 植株导入 $P_{SA\text{Gl}2^-IPT}$ 基因则影响较大,表现植株矮小、生长发育异常;这可能是由于 $P_{SA\text{Gl}2^-IPT}$ 基因非特异性表达而产生了过量的细胞分裂素,从而破坏了植株的正常生长发育。

与叶片细胞分裂素、叶绿素含量测定结果相似,转基因植株 TH1、TH5 的千粒重、籽粒产量和生物学产量明显高于对照,TH2、TH4 植株与对照基本一致,而 TH3 植株则低于对照,说明在转基因植株 TH1、TH5 中 $P_{SA\text{Gl}2^-IPT}$ 基因在衰老叶片中特异表达,增加了衰老叶片的细胞分裂素含量,使叶片衰老延缓,延长了小麦叶片的功能期,从而提高千粒重和单株产量;在 TH2、TH3 植株中 $P_{SA\text{Gl}2^-IPT}$ 基因可能不表达或表达量不足;而在 TH3 植株中可能非特异性表达。

表 3 转基因植株(T_0 代)主要农艺性状

Table 3 Main agronomic characters in T_0 transgenic plants

材料 Material	抽穗期 Heading stage	开花期 Flowering stage	成熟期 Mature stage	株高 Plant height (cm)	穗数 No. of spikes	穗粒数 Grains/spike	千粒重 1 000-grain weight (g)	籽粒产量 Grain yield (g)	生物学产量 Biological yield (g)
CK	29/4	4/5	8/6	72.6	6	33.5	32.81	6.13	13.08
TH1	29/4	4/5	8/6	74.0	7	34.0	36.09	8.27	17.41
TH2	29/4	4/5	8/6	75.1	6	34.5	33.46	6.65	13.67
TH3	4/5	10/5	13/6	58.7	1	18.0	26.12	0.44	0.89
TH4	30/4	4/5	8/6	70.3	6	34.0	32.67	6.46	14.03
TH5	29/4	4/5	9/6	72.9	6	34.5	35.72	7.39	15.96

2.5 转基因植株后代(T_1)遗传分析

对转基因植株 T_1 代的 PCR 分析结果表明(表 4), $P_{SA\text{Gl}2^-IPT}$ 基因在 TH1、TH2、TH3、TH5 的植株中能稳定遗传;而 TH4 植株 T_1 代 PCR 检测全为阴性,可能是外源基因发生了丢失。同时,将部分 T_1 代种子在陕西杨陵按株系种植,在小麦生长后期,观察到有些植株的叶片衰老受到明显抑制。

表 4 转基因植株 T_1 代 PCR 分析

Table 4 PCR analysis of T_1 transgenic plants

材料 Material	T_1 代种子数 No. of T_1 seeds	出苗数 No. of seedling	PCR 阳性株数 No. of PCR positive plants
TH1	20	18	15
TH2	20	20	16
TH3	10	10	5
TH4	20	17	0
TH5	25	21	15

3 讨论

根据目前的研究结果,花粉管通道法的转化效率受许多因素影响,如外源 DNA 的状态,缓冲液的成分,质粒 DNA 的浓度和体积,转化时间,转化方法,处理强度,注射深度,注射次数等。其中在质粒 DNA 的浓度研究方面,目前多倾向于在小麦上用 $100 \sim 300 \mu\text{g}/\text{mL}$ ^[11,12]。而本试验发现在 $100 \sim 700 \mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度范围内,花粉管通道法在小麦上的转化效率随着质粒 DNA 浓度的增加而增加,以 $700 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的转化效率最高。但质粒 DNA 浓度的增加会导致转化当代结实率下降,较高的质粒 DNA 浓度可能抑制小麦的正常受精结实过程。

在本试验中,叶片衰老抑制基因 $P_{SA\text{Gl}2^-IPT}$ 导入西农 1376,获得了 2 株(TH1,TH5)叶片早衰现象得到明显改善的转基因植株,其千粒重、籽粒产量和生物学产量均较对照显著增加,表明可以利用

$P_{SA\text{Gl}2^-}$ IPT 基因对生产上有早衰缺陷的小麦品种进行遗传改良,最大程度地发挥现存品种的生产潜力及为育种创造新种质,这也可能是挖掘小麦产量潜力的一条新的途径。同时,从 $P_{SA\text{Gl}2^-}$ IPT 基因在小麦中的表现及结合其他植物的转化经验,说明植物转基因研究必须保证大量转基因植株群体的获得,才能有利于优良目标植株的筛选。

References

- [1] Liu D-H(刘道宏). Plant leaf senescence. *Plant Physiology Communications* (植物生理学通讯), 1983, **2**: 14 - 19
- [2] Gan S S, Amasino R M. Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin. *Science*, 1995, **270**: 1986 - 1988
- [3] Gan S S, Amasino R M. Making sense of senescence - Molecular genetic regulation and manipulation of leaf senescence. *Plant Physiol*, 1997, **113** (2): 313 - 319
- [4] Astrid Wiegler, Antje von Schaewen, Richard C, Gucpna K. Regulation of leaf senescence by cytokinin, sugars and light. *Plant Physiol*, 1998, **116**: 329 - 335
- [5] Fu Y-C(付永彩), Ding Y-Y(丁月云), Liu X-F(刘新仿), Sun C-Q(孙传清), Cao S-Y(曹守云), Wang D-J(王东江), He S-J(何锬洁), Wang X-K(王象坤), Li L-C(李良材), Tian W-Z(田文忠). Transformation of rice with senescence-inhibition chimeric gene. *Chinese Science Bulletin* (科学通报), 1998, **43**(18): 1963 - 1967
- [6] Lin Y-J(林拥军), Cao M-L(曹孟良), Xu C-G(徐才国), Chen H(陈浩), Wen J(文静), Zhang Q-F(张启发). Cultivating rice with leaf senescence by $P_{SA\text{Gl}2^-}$ IPT gene transformation. *Acta Botanica Sinica* (植物学报), 2002, **44**(11): 1333 - 1338
- [7] Cao M-L(曹孟良). Sub-cloning an autoregulatory gene of inhibition leaf senescence. *J Hunan Normal University* (湖南师范大学学报), 2000, **23**(1): 73 - 78
- [8] Sambrook E F J, Fritsch T Maniatis. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 474 - 490
- [9] Rueb S, Hensgens L A M. Improved histochemical staining for β -D-glucuronidase activity in monocotyledonous plants. *Rice Genet Newsl*, 1989, **6**: 168 - 169
- [10] Shanghai Institute of Plant Physiology, Chinese Academy of Science(中国科学院上海植物生理研究所). Modern Phytophysiological Experiments(现代植物生理实验指南). Beijing: Science Press, 1999. 280 - 281
- [11] Mu H-M(牟红梅), Liu S-J(刘树俊), Zhou W-J(周文娟), Wen Y-X(文玉香), Zhang W-J(张文俊), Wei R-X(魏荣瑄). Transformation of wheat with insecticide gene of Arrowhead proteinase inhibitor by pollen tube pathway and analysis of transgenic plants. *Acta Genetica Sinica* (遗传学报), 1999, **26**(6): 634 - 642
- [12] Zhang M-Y(张茂银), Liu Q-C(刘庆昌), Wang Z-X(王子霞), Zhao M-A(赵明安), Miao J(缪军), Hai-Re-Gu-Li(海热古丽), Yang K-R(杨克锐), Yang S-J(杨松杰), Gu Ai-X(顾爱星). Introduction of *Leymus racemosus* [Lam.] Tzvel] DNA into common wheat through pollen-tube pathway. *Journal of Agricultural Biotechnology* (农业生物技术学报), 2000, **8**(2): 165 - 168