

# 转 $P_{SAG12-ipt}$ 基因水稻延衰性能的初步研究

王亚琴<sup>1</sup>, 梁承邺<sup>2</sup>

(1. 华南理工大学食品与生物工程学院, 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:** 研究了叶片衰老抑制基因  $P_{SAG12-ipt}$  经基因枪导入籼稻不育系中 A 后, 转化植株农艺性状和生理特性的变化。结果显示, 在水稻生育期, 转化植株相对于对照而言, 叶绿素、蛋白质含量和 SOD(超氧化物歧化酶)活性下降以及 MDA(丙二醛)相对含量上升趋势较缓, 表现在农艺性状上是单株有效穗数、千粒重明显高于对照。说明叶片衰老抑制基因  $P_{SAG12-ipt}$  确实具有延缓叶片衰老的功能, 延长了水稻叶片利用光能的时间, 使之积累了大量的光合产物, 增加了产量。

**关键词:**  $P_{SAG12-ipt}$  基因; 生理特性; 农艺性状; 延衰性能

**中图分类号:** Q344 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2004)06-0540-04

## Study on antisenescence characteristics of transgenic rice ( $P_{SAG12-ipt}$ )

WANG Ya-qin<sup>1</sup>, LIANG Cheng-ye<sup>2</sup>

(1. College of Food and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China;

2. South China Institute of Botany, Academia Sinica, Guangzhou 510650, China)

**Abstract:** The agronomic traits and physiological characteristics of transgenic plants( $R_0$ ) were studied after the leaf-specific senescence-inhibitor gene( $P_{SAG12-ipt}$ ) was introduced into Zhong A (cytoplasmic male sterile indica) by particle bombardment. The results showed that during the developmental stages of rice, compared with controls, the descendant trend of the contents of chlorophyll, protein and SOD activity and the upward trend of the relative content of MDA were slow, and panicles per plant and weight of 1 000-grain were high distinctly. These data indicate that *ipt* gene might express in the transgenic rice by the induction of SAG12 promoter, the synthesized cytokinins maybe delay the senescence process and prolong photosynthesis period of functional leaves and make them accumulate a lot of photosynthetic products and increase yields.

**Key words:**  $P_{SAG12-ipt}$  gene; physiological characteristics; agronomic traits; antisenescence characteristics

自 1995 年 Gan and Amasino 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  $P_{SAG12-ipt}$  以来, 已有不少研究者利用此系统转化了农作物、花卉、水果、蔬菜及其它物种(Lin 等, 2002; Chen 等, 2001; McCabe 等, 2001; Geng 等, 2001), 并证明了一定程度上可以延缓叶片衰老, 提高作物产量, 延长花卉的保鲜期、蔬菜和水

果的贮藏期。但对转化后植株的各项指标没有进行系统的分析, 本实验详细比较了籼型不育系中 A 转化植株和对照的农艺性状、生理特性、叶片的细胞分裂素含量以及叶绿体的超微结构, 在此先就转化植株和对照的一些重要农艺性状以及生理特性作较为详细的阐述, 旨在了解叶片衰老抑制基因  $P_{SAG12-ipt}$  在转化植株中的表达情况, 从农艺性状和

收稿日期: 2003-12-08 修订日期: 2004-03-22

基金项目: 广东省科技重大专项项目(2003B21207)

作者简介: 王亚琴(1972-), 女(汉族), 山西忻州人, 讲师, 博士, 从事植物基因工程与生物制药的教学与科研。E-mail: wangyq@scib.ac.cn

生理特性两方面验证 PSAG12-ipt 转基因植株的延衰性能。

## 1 材料与方 法

### 1.1 植物材料

供试材料为籼稻不育系中 A 的 P<sub>SAG12-ipt</sub> 基因转化植株(R<sub>0</sub>)和非转化植株,各随机抽取 9 株,于抽穗期、灌浆期、乳熟期及成熟期选取植株主穗的剑叶下第一叶为材料进行各项生理生化指标测定,重复 3 次,取平均值。

### 1.2 农艺性状考察

水稻成熟后,齐地面收获;单株装袋,晒干;然后对株高、分蘖数、穗长、单株有效穗数、单株总粒数、千粒重等农艺性状进行考种。

### 1.3 酶液制备

取 1 g 去脉叶片,加入 5 mL 0.05 mol/L pH 7.8 的磷酸缓冲液及少量石英砂于冰浴中研磨,匀浆后过滤,19 000 × g 离心 20 min,上清液用作 SOD(超氧化物歧化酶)活性和脂质过氧化测定。

### 1.4 叶绿素含量测定

按沈伟其(1988)的方法,测定转化植株与对照

叶片的叶绿素含量。

### 1.5 蛋白质含量测定

按 Bradford(1976)的方法,测定转化植株与对照叶片的蛋白质含量。

### 1.6 SOD 活性的测定

按王爱国等(1983)的方法,测定 SOD 对氮蓝四唑(NBT)光还原的抑制作用。

### 1.7 脂质过氧化作用的测定

根据 Heath 和 Packer(1968)的方法测定过氧化产物丙二醛(MDA)的形成,以 MDA 相对含量作为膜脂过氧化的指标。

## 2 结果与分析

### 2.1 转化植株(R<sub>0</sub>)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,结果显示,转化植株的千粒重明显高于对照;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。

表 1 转基因植株(R<sub>0</sub>)的一些重要农艺性状

Table 1 Partial important agronomic traits of transgenic plants (R<sub>0</sub>)

株系 Plant line	株高(cm) Plant height	分蘖数 No. of tillers	穗长(cm) Panicle length	单株有效穗数 Panicles/Plant	单株总粒数 Total grains/ Plant	千粒重 Weight of 1 000-grain
中 1	60.80±3.23b	20.33±2.08a	17.73±1.96a	18.69±1.28a	2 036±23.14a	23.46±0.85a
中 2	64.32±1.49ab	22.67±1.53a	18.67±2.08a	17.67±1.01ab	2 029±26.47a	23.78±1.22a
中 3	64.29±2.30ab	19.92±0.72a	17.50±2.18a	18.79±1.09a	2 047±25.36a	23.76±1.01a
对照	68.83±1.43a	18.36±3.01a	17.83±2.52a	15.48±1.35b	2 031±14.93a	20.37±1.19b

### 2.2 转化植株中叶绿素含量的变化

水稻叶片衰老首先表现为叶绿素含量的下降。本实验比较了不同生育期转化植株与对照的叶绿素变化情况。从图 1 中可以看出,水稻抽穗、开花到灌浆,转化植株和对照叶片的叶绿素含量下降都较缓慢;但从灌浆期开始,对照的叶绿素含量下降速度开始加快,而转化植株的叶绿素含量下降仍较慢,这种状态一直持续到成熟期;说明从灌浆期开始,对照叶片的衰老速度就明显快于转化植株,转化植株表现出较长时间保持叶片绿色的功能。

### 2.3 转化植株中蛋白质含量的变化

蛋白质降解是叶片衰老的基本特征(杨淑慎等,2001)。本实验测定了水稻不同生育期转化植株与

对照叶片的蛋白质含量,发现不管是转化植株还是对照,从抽穗期开始,蛋白质降解都很快,但对照的蛋白质含量下降幅度要比转化植株大得多。

### 2.4 转化植株中 MDA 相对含量和 SOD 活性的变化

在水稻叶片衰老时,SOD 活性下降,MDA 含量显著升高。而且衰老程度越高,叶片中 SOD 活性下降越大,MDA 含量越高(林植芳等,1984)。从图 3、4 可以看出,水稻从抽穗开花到灌浆,转化植株与对照叶片中 MDA 相对含量水平相近,到了乳熟期,对照叶片中 MDA 相对含量迅速升高,而转化植株叶片 MDA 相对含量上升比较平缓;转化植株和对照的 SOD 活性从抽穗开花到灌浆下降幅度较大,而灌浆后一直到水稻成熟,下降趋势都较平缓,但明显地

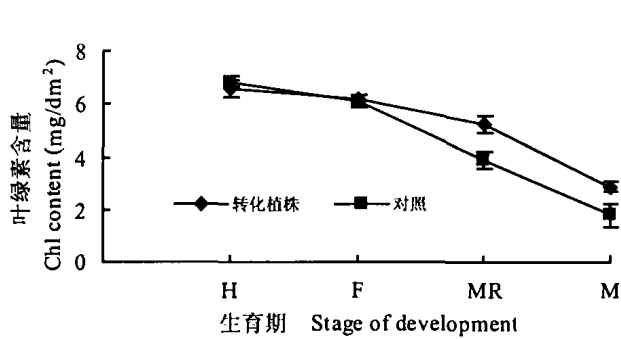


图 1 水稻不同生育期转化植株叶片的叶绿素含量变化  
Fig. 1 Changes of chlorophyll content in leaves of transgenic plants during different developmental stages of rice

H、F、MR、M 分别代表抽穗期、灌浆期、乳熟期及成熟期。  
H: Heading stage; F: Filling stage; MR: Milky ripe stage; M: Maturing stage.

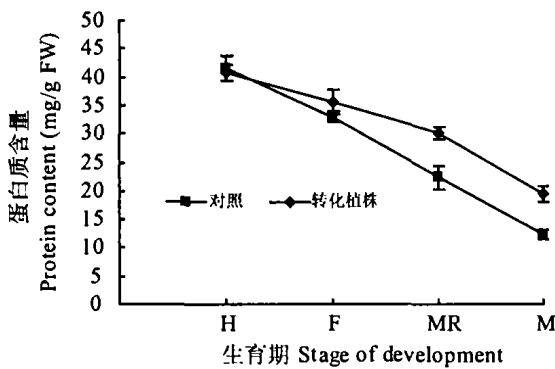


图 2 水稻不同生育期转化植株叶片的蛋白质含量变化  
Fig. 2 Changes of protein content in leaves of transgenic plants during different developmental stages of rice

H、F、MR、M 分别代表抽穗期、灌浆期、乳熟期及成熟期。  
H: Heading stage; F: Filling stage; MR: Milky ripe stage; M: Maturing stage.

对照的 SOD 活性较转化植株低。

### 3 结论与讨论

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(陆定志等,1988;Murchie 等,1999)。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

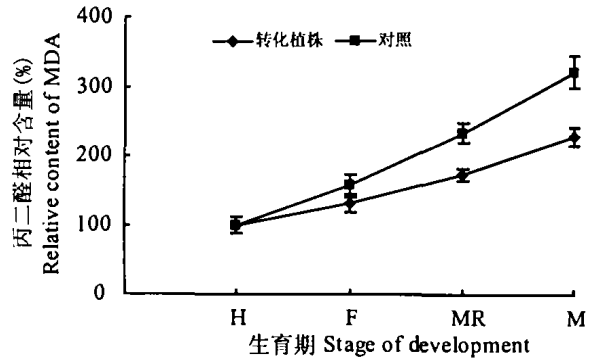


图 3 水稻不同生育期转化植株叶片丙二醛相对含量变化  
Fig. 3 Changes of relative content of MDA in leaves of transgenic plants during different developmental stages of rice

H、F、MR、M 分别代表抽穗期、灌浆期、乳熟期及成熟期。  
H: Heading stage; F: Filling stage; MR: Milky ripe stage; M: Maturing stage.

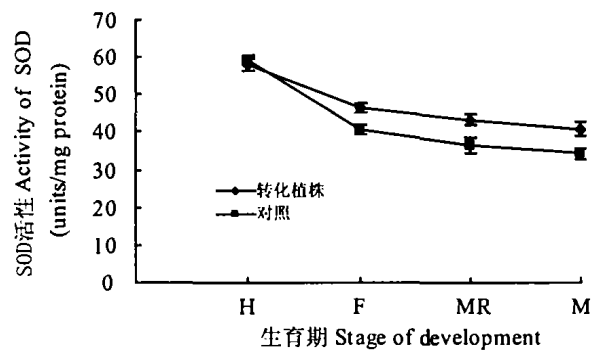


图 4 水稻不同生育期转化植株叶片的 SOD 活性变化  
Fig. 4 Changes of SOD activity in leaves of transgenic plants during different developmental stages of rice

H、F、MR、M 分别代表抽穗期、灌浆期、乳熟期及成熟期。  
H: Heading stage; F: Filling stage; MR: Milky ripe stage; M: Maturing stage.

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(陶利珍,1998)。

Biswas 和 Choudhuri(1980)研究水稻叶片衰老时指出,水稻叶片中叶绿素和蛋白质含量的下降可

作为衡量水稻叶片衰老的可靠指标。本实验比较了转化植株叶片与对照的叶绿素含量变化情况,发现水稻抽穗、开花到灌浆,转化植株和对照叶片的叶绿素含量下降都较缓慢;但从灌浆期开始,对照的叶绿素含量下降速度开始加快,而转化植株的叶绿素含量下降仍较慢,这种状态一直持续到成熟期;说明从灌浆期开始,对照叶片的衰老速度就明显快于转化植株,转化植株表现出较长时间保持叶片绿色的功能,这一点与 Lin 等(2002)的研究结果一致。其原因可能是由于转化植株中 *ipt* 基因表达导致细胞分裂素含量增加,从而促进了叶绿素的合成(Geng 等, 2001),但具体细胞分裂素如何调控叶绿素的合成还需进一步研究。同时还测定了水稻不同生育时期转化植株与对照叶片的蛋白质含量,发现不管是转化植株还是对照,从抽穗期开始,蛋白质降解都很快,但对照的蛋白质含量下降幅度要比转化植株大得多。本研究得出转化植株的这两个指标下降程度明显小于对照,尤其是在水稻发育的乳熟期,差异更为明显。这充分说明了叶片衰老抑制基因 P<sub>SAG12-ipt</sub> 在转化植株中得到了表达,转化植株具有较长时间保持叶片绿色的功能。

叶片老化时会出现活性氧的毒害作用,这是因为老叶中对抗活性氧毒害的内源保护酶活力降低,不能完全消除细胞内光合及呼吸作用所产生的活性氧,从而使细胞内氧自由基大量存在,增大了膜脂上不饱和脂肪酸的过氧化,形成许多过氧化产物。MDA 是过氧化产物,又是一种能强烈与细胞内各种成分反应的物质,因而引起对酶和膜的严重损伤,最终导致膜的结构及生理完整性破坏。本实验中转化植株和对照叶片的 SOD 活性从水稻抽穗到成熟不断降低,MDA 相对含量不断升高。虽然转化植株和对照的变化趋势相近,但转化植株叶片的 SOD 活性下降幅度和 MDA 相对含量升高幅度都比对照小,即在水稻生育后期转化植株叶片 SOD 活性比对照高,MDA 相对含量比对照低。这一点也验证了叶片衰老抑制基因 P<sub>SAG12-ipt</sub> 在转化植株中的表达情况,说明其具有抑制叶片早衰的功能。

#### 参考文献:

- Biswas AK, Choudhuri MA. 1980. Mechanism of monocarpic senescence in rice[J]. *Plant Physiol*, **65**: 340—345.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding[J]. *Anal Biochem*, **72**: 248—254.
- Chen LFO, HWang JY, Charng YY, *et al.* Transformation of broccoli(*Brassica olearacea* var. *italica*) with isopentenyl transferase gene via *Agrobacterium tumefaciens* for postharvest yellowing retardtion[J]. *Mol. Breeding*, 2001, **7**: 243—257.
- Gan S, Amasino RM. 1995. Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin[J]. *Science*, **270**: 1 986—1 988.
- Geng S, Ma M, Ye HC, *et al.* 2001. Effects of *ipt* gene expression on the physiological and chemical characteristics of *Artemisia annua* L. [J]. *Plant Science*, **160**(4): 691—698.
- Heath RL, Packer L. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation[J]. *Arch Biochem Biophys*, **125**: 189—198.
- Lin YJ, Cao ML, Xu CG, *et al.* 2002. Cultivating rice with delaying leaf-senescence by P<sub>SAG12-ipt</sub> gene transformation [J]. *Acta Botanic Sinica*, **44**(11): 1 333—1 338.
- Lin ZF(林植芳), Li SS(李双顺), Lin GZ(林桂珠), *et al.* 1984. Superoxide dismutase activity and lipid preoxidation in relation to senescence of rice leaves(水稻叶片的衰老与超氧化物歧化酶活性及脂质过氧化作用的关系)[J]. *Acta Bot Sin* (植物学报), **26**(6): 605—615.
- Lu DZ(陆定志), Pan RC(潘裕才), Ma YF(马跃芳), *et al.* 1988. Physiological and biochemical studies on leaf senescence at heading and grain formation stage in hybrid rice(杂交水稻抽穗结实期间叶片衰老的生理生化研究)[J]. *Sci Agric Sin* (中国农业科学), **21**(3): 21—26.
- McCabe MS, Garratt LC, Schepers F, *et al.* 2001. Effects of P<sub>SAG12-ipt</sub> gene expression on development and senescence in transgenic lettuce[J]. *Plant Physiology*, **127**(2): 505—516.
- Murchie EH, Chen YZ, Hubbart S, *et al.* 1999. Interactions between senescence and leaf orientation determine in situ patterns of photosynthesis and photoinhibition in field-grown rice[J]. *Plant Physiol*, **119**(2): 553—564.
- Shen WQ(沈伟其). 1988. Extraction of mixed solution for determination of chlorophyll content in rice leaf blade(测定水稻叶片叶绿素和混合液提取法)[J]. *Plant Physiol Commun* (植物生理学通讯), (3): 62—64.
- Tao LZ(陶利珍). 1998. Engineering male sterile rice produced by the expression of a pollen specific ribonuclease gene with biolistic method and its inheritance(基因枪介导核糖核酸酶基因(PS1-bn)对水稻的转化及其遗传研究)[D]. Dissertation for the degree of Doctor of Academia Sinica(中国科学院博士研究生学位论文).
- Wang AG(王爱国), Luo GH(罗广华), Shao CB(邵从本), *et al.* 1983. A study on the superoxide dismutase of soybean seeds(大豆种子超氧化物歧化酶的研究)[J]. *Acta Phytophysiol Sin* (植物生理学报), **9**(1): 77—83.
- Yang SS(杨淑慎), Gao JF(高俊凤), Li XJ(李学俊). 2001. Leaf senescence in higher plant(高等植物叶片的衰老)[J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin* (西北植物学报), **21**(6): 1 271—1 277.