DOI:10.16423/j.cnki.1003-8701.2012.06.016

文章编号:1003-8701(2012)06-0017-04

利用农杆菌介导法获得转柠檬酸合成酶基因粳稻及其耐低磷的研究

于志晶,蔡勤安,李淑芳,刘 丽,林秀峰*,马 瑞*

(吉林省农业科学院农业生物技术研究所,长春 130033)

摘 要:利用根癌农杆菌介导法将柠檬酸合成酶 *CS* 基因导入吉林省主栽超级粳稻品种吉粳 88 中。经 PCR 检测,获得 162 株转基因阳性植株。转基因植株后代进一步经过 PPT 抗性筛选、分子检测和耐低磷筛选,获得 5 株(T_3 代)耐低磷性状明显且农艺性状较好的转基因植株。对转基因植株柠檬酸合成酶活性和柠檬酸含量的测定以及形态学和产量性状调查结果表明:转基因植株优于非转基因对照植株。

关键词:水稻;柠檬酸合成酶基因(*CS*);耐低磷;遗传转化

中图分类号:S511.2+2 文献标识码:A

Genetic Transformation of Japonica Rice Mediated with *Agrobacterium tumefaciens* Harboring the Citrate Synthase Gene and Tolerance of the Transgenic Plants to Low Phosphorus in Soil

YU Zhi-jing, CAI Qin-An, LI Shu-fang, LIU Li, LIN Xiu-feng*, MA Rui*

(*Agricultural Biotechnology Research Institute, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun* 130033, China)

Abstract: The citrate synthase gene was transformed into main cultivar (super rice 'Jijing 88') of Jilin Province, mediated with *Agrobacterium tumefaciens*. Total 162 obtained transgenic plants (T0) were validated by PCR and southern blot. Five transgenic plants (T_3) with tolerance to low phosphorus in soil and good agronomic characteristics were obtained by PPT selection, PCR and Southern blot confirmation and tolerance test to low phosphorus. The citrate synthase activity and citrate acid contents in root tips and leaves of the 5 transgenic plants were higher than the control. The growth and yield of the transgenic plants were superior to the control.

Keywords: Japonica rice; Citrate synthase gene; Tolerance to low phosphorus; Genetic transformation

水稻是我国重要的粮食作物,播种面积和总产量均占粮食作物首位。东北地区是我国的优质粳米主产地,商品率高达 50%以上。然而随着现代农业的发展,土壤养分失衡,肥效下降,缺磷面积在不断增加。据统计,我国 1.07 亿 hm^2 农田约有 2/3 的耕地缺磷。鉴于磷矿为不可再生的资源正趋于耗竭,这一问题将日趋严重,土壤磷素不足已经成为制约水稻生产的主要因素之一。因此,要提高水稻的产量,必须施用大量磷肥以提高土壤有效磷,然而,由于施入的磷肥易被土壤大量固定或者淋溶,使其成为作物难以利用的固定态磷,这不仅造成当季作物利用效率低,同时也污染了环境。选育磷高效基因型水稻是提高磷肥利用率和缓解磷矿资源缺乏的有效途径。然而由于我国现有磷高效利用型水稻种质资源极为匮乏,成为磷高效利用水稻育种的一个主要限制瓶颈。利用基

收稿日期:2012-10-31

基金项目:吉林省科技发展计划项目(20090564)

作者简介:于志晶(1977-),女,助理研究员,主要从事作物基因工程研究。

通讯作者:林秀峰,女,研究员,E-mail:linxiufeng8581@163.com

马 瑞,男,研究员,E-mail:ruimaa@yahoo.com

中国知网 https://www.cnki.net

因工程有望创制磷高效转基因水稻新种质，培育磷高效利用转基因水稻新品种。近年来，科研工作者已经从许多植物和微生物中成功克隆磷高效基因。

柠檬酸合成酶是调节植物体内有机酸的活性酶之一，增加植物体内的柠檬酸并分泌到土壤中可使难溶性无机磷活化，提高植物对土壤中磷的吸收。近些年来，人们对通过增加植物体内柠檬酸的分泌来提高植株对低磷的耐性作了一些尝试，并取得了有益的结果[1-9]。

本研究将从假单孢杆菌分离的柠檬酸合成酶 *CS* (citrate synthase)基因通过导入吉林省主栽超级水稻品种中，以提高水稻植株柠檬酸合成酶活性，增加柠檬酸在根系中合成和分泌，进一步培育适宜于我国东北地区耐低磷胁迫的转基因水稻新种质。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料为吉林省主栽超级水稻品种吉粳88。目的基因为从假单胞杆菌(Pseudomonas，aeruginosa) 基因组分离出的柠檬酸合成酶基因(*CS*)，由华中农业大学林拥军教授惠赠。农杆菌菌株为 EHA105。

1.2 植物表达载体

本研究使用的农杆菌 Ti 双元载体为 pCAMBIA3300 载体，目的基因启动子为 CaMV35S (P35S)，终止子为 nos，筛选标记基因为 Bar 基因，其 T- DNA 区结构见图 1。

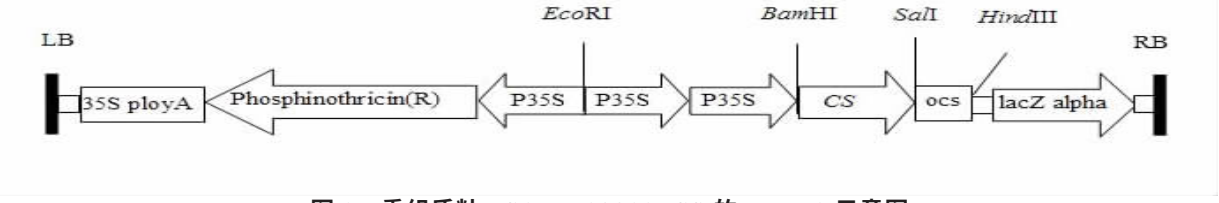

图 1 重组质粒 pCAMBIA3300- CS 的 T- DNA 示意图

1.3 农杆菌介导的遗传转化

将消毒后的种子接种在诱导培养基上暗培养约 7～10 d，胚乳变软时，拔掉芽鞘，将种子转到继代培养基 NB [N6 大量元素、MS 铁盐、B5 微量元素、B5 有机(盐酸硫胺素 10 g/L、盐酸吡哆醇 1 g/L、烟酸 1 g/L、肌醇 100 g/L)、蔗糖 30 g/L、植物凝胶 3 g/L、pH 5.2]上，20～30 d，挑选颗粒状、质地紧密的愈伤组织继代培养，每 15 d 左右一次。从预培养 3～5 d 的愈伤组织中挑选质地紧密的愈伤组织与农杆菌共培养 3d 后，转入含有 30 mg/L 草丁膦(PPT)的筛选培养基上，经过 3 ～ 4 次筛选后，选取色泽亮黄的抗性愈伤组织接种到预分化培养基于弱光下培养 10 d 左右，再转到分化培养基上进行光照培养约 30～50 d，分化成苗。将 2 cm 左右高的幼苗转到生根培养基上进行生根培养。当苗高至 8～10 cm 时打开瓶口炼苗，7 d 左右移栽，单本插秧。

1.4 转基因植株 *CS* 基因 PCR 检测

采用 CTAB 法提取转基因植株的叶片总 DNA。以 *CS* 基因序列设计引物，引物序列分别为：正向引物 5'- CGGGATCCTCAGCCGCGATC-CTTGAG- 3'，反向引物 5'- GCGGATCCATGGCT-GACAAAAAAGCG- 3'。 PCR 反应体系为：DNA 模板 30～50 ng，10 × buffer 2.0μ L，2 mM dNTP 1.5μ L，25 mM $MgCl_2$ 2.0μ L，10μ M 引物(F/R)各 0.4μ L，加 ddH_2O 至 20μ L。扩增反应程序为：95℃预变性 5 min，然后 95℃变性 45 s，56℃退火 45 s，72℃延伸 1 min，30 个循环，最后 72℃延伸 10 min，PCR 产物大小为 900 bp。

1.5 转基因植株 Southern 杂交

本研究利用 CTAB 法提取植物叶片总 DNA，取 10μ g DNA 用 HindIII 限制性酶切，经电泳分离后转移到尼龙膜，然后用地高辛标记的 *CS* 基因片段与之进行杂交。杂交完毕后用 1× SSC 和 0.1% SDS 于室温漂洗 1 次，再用 65℃的 1× SSC 和 0.2% SDS 洗膜液洗涤 2 次后晾干，在暗处使杂交膜显影后获得 Southern 杂交结果。

1.6 耐低磷转基因株系的筛选

转基因植株后代材料 (T_1、T_2、T_3) 在低磷土壤(有机质 24.0 g/kg、速效氮 301 mg/kg、速效磷 8.1 mg/kg、速效钾 139 mg/kg)上种植，以筛选耐低磷转基因株系。

1.7 柠檬酸合成酶活性的测定

取 1 cm 水稻根尖加入预冷的 50 mmol/LHEP-ES- NaOH 缓冲液(pH7.5)[包含 5 mmol/L $MgCl_2$、5 mmol/LEDTA、10%(v/v) 甘油和 0.1%(v/v) Triton X- 100] 中，研磨，匀浆于高速冷冻离心机离心(<4℃，10 000 rpm)5 min，上清液作为测定的酶

中国知网 https://www.cnki.net

液，紫外分光光度计测定 412 nm 处乙酰辅酶 A 的减少值，计算根尖柠檬酸合成酶的活性。

1.8　根尖柠檬酸含量的测定

取 0.2 g (根)加入 1.5 mL 0.5 mol·L^{-1} 的 HCl 研磨成匀浆后转入 2 mL 离心管，沸水浴 30 min，冷却后用 0.5 mol·L^{-1} 的 HCl 平衡，10 000 r·min^{-1} 离心 15 min，取上清液再离心 1 次，用 0.45μ m 的微孔滤膜过滤后取 20μ L 上机测定。使用高效液相色谱测定柠檬酸含量。

1.9　转基因株系形态指标和产量性状调查

对耐低磷性状较好的转基因株系后代(T_3 代)植株进行了根系干鲜重、根体积、根数、根总长、株高、叶面积等形态学性状以及单株穗数、穗粒数、单株产量等性状进行了调查。

1.10　统计分析

试验数据用 Excel 统计，利用 DPS3.01 软件进行显著性分析和多重比较。

2　结果与分析

2.1　转基因植株的获得

共 4 200 块愈伤组织与农杆菌菌株共培养，共获得 316 块抗性愈伤组织，抗性比率为 7.5%，最终获得 162 株转基因阳性植株。

2.2　转基因植株的 PCR 鉴定

经 PCR 检测后有 162 株材料扩增出条带(图 2 为其中 5 个转基因植株的 PCR 结果)，阳性率为 72%。

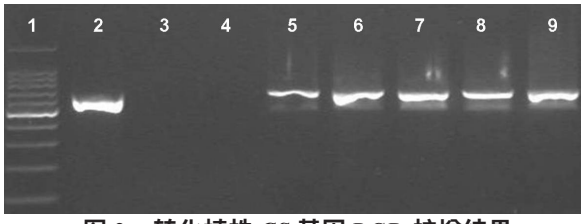

图 2　转化植株 *CS* 基因 PCR 扩增结果

注：1 标准分子量；2 质粒阳性对照；3 阴性对照；4 未转化植株(对照)；5～9 分别为转化植株。

2.3　转基因植株 Southern 杂交结果

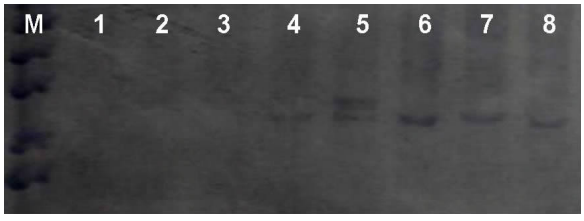

图 3　转基因后代植株(T_3 代)的 Southern 杂交

注：M：λ DNAHindⅢ酶切，1：非转基因植株；4-8：转基因植株。

转基因后代材料继续经过 PPT 抗性结合 PCR 和低磷胁迫筛选，对其中除草剂抗性、耐低磷性状明显且农艺性状较好的转基因植株进行 Southern 杂交，大部分为单拷贝植株，也有 2 个拷贝植株 (图 3 为获得的 5 个 T_3 代转基因植株的 Southern 杂交结果)。

2.4　转基因后代植株(T_3 代)柠檬酸合成酶的活性

对获得的 5 个 T_3 代耐低磷性状明显且农艺性状较好的转基因材料及对照植株根尖柠檬酸合成酶 *CS* 活性进行测定 (图 4)，转基因株系 *CS* 活性均显著高于对照($P<0.01$)。

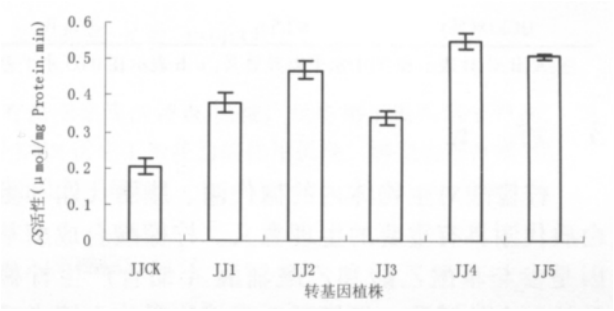

图 4　转基因植株根系柠檬酸合成酶 *CS* 活性

(数据为 5 个数值的平均值± 标准差)

2.5　转基因植株根尖柠檬酸含量

转基因植株根尖柠檬酸含量显著高于对照($P<0.01$)(图 5)。

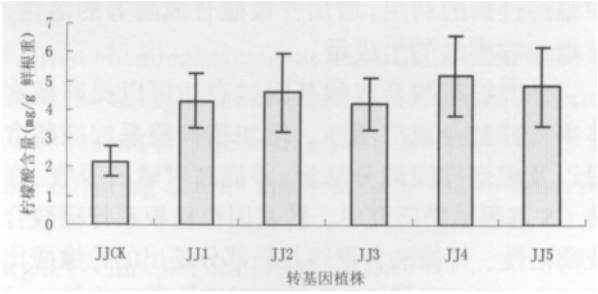

图 5　转基因植株根尖柠檬酸含量

(JJ1- JJ5 为转基因植株，JJCK 为对照，数据为 5 个数值的平均值± 标准差)

2.6　转基因后代植株根系生长情况

统计分析结果表明，转基因植株根系生长显著好于对照($P<0.01$)(表 1)。

表 1　转基因水稻植株根系生长情况

转基因植株	根系生长情况			
	根系鲜重(g/ 株)	根系干重(g/ 株)	根数	根总长(cm)
JJ1	1.60Aa	0.25AB	32.96AB	628.7Aa
JJ2	1.63Aa	0.21B	33.24AB	630.0Aa
JJ3	1.58Aa	0.21B	30.69B	621.9Aa
JJ4	1.72Aa	0.29A	36.21A	640.5Aa
JJ5	1.64Aa	0.28A	33.40AB	632.5Aa
JJCK(对照)	0.98Bb	0.12C	20.90C	310.6Bb

注：A、B、C 表示在 0.01 水平差异显著，a、b 表示在 0.05 水平差异显著(数据为 5 个重复的平均值)。

中国知网　https://www.cnki.net

2.7 转基因水稻株高、叶面积及产量性状调查

表 2 中转基因材料 JJ2、JJ4、JJ- 5 与对照材料株高差异显著($P<0.05$),转基因植株与对照材料单株穗数、穗粒数和单株产量差异极显著($P<0.01$)。

表 2 转基因水稻株高、叶面积及产量性状调查

转基因植株	株高、叶面积及产量性状				
	株高(cm)	叶面积(cm^3/ 单茎)	穗数(穗数 / 株)	穗粒数(粒 / 穗)	单株产量(g/ 株)
JJ1	105.4 ab	42.5 AB	9 BC	106 Aab	22.74 C
JJ2	107.6 a	43.6 AB	9 BC	108 Aab	23.04 C
JJ3	104.2 ab	42.3 AB	8 C	102 Ab	19.83 D
JJ4	110.6 a	46.2 A	11 A	110 Aa	28.80 A
JJ5	109.5 a	44.5 AB	10 AB	109 Aab	25.90 B
JJCK(对照)	92.5 b	37.8 B	6 D	83 Bc	16.25 E

注:A、B、C、D 表示在 0.01 水平差异显著,a、b 表示在 0.05 水平差异显著(数据为 5 个重复的平均值)。

3 讨 论

柠檬酸对生物体内的糖代谢、脂肪代谢和蛋白质代谢具有重要的生理意义。柠檬酸合成酶基因是参与草酰乙酸和乙酰辅酶 A 缩合产生柠檬酸的一个关键酶。柠檬酸对于植物吸收土壤中难溶性磷起着重要的作用。一般情况下,磷素只有在中性土壤 pH 值范围内才能被植物吸收。在低磷的环境下,许多植物通过调节有机酸代谢中酶的活性来提高有机酸的分泌量,以提高植物对土壤中难溶性磷的利用。增加柠檬酸合成酶等的活性,可增加柠檬酸的生成量。

外源柠檬酸合成酶基因过表达可以提高植物体内柠檬酸合成酶活性,增加植株根系柠檬酸含量以及根部柠檬酸分泌量,并提高对磷的吸收。在转 *CS* 基因植物研究中,转基因植株根系柠檬酸合成酶活性、柠檬酸含量以及根部分泌出的柠檬酸比对照都有显著地提高[1-3],转基因植株磷吸收量比对照显著增加,植株生长较对照明显加快[3,8-9]。本研究中,我们将来源于假单胞杆菌的柠檬酸合成酶基因(*CS*)导入吉林省主栽超级稻品种吉粳 88 中,经过耐低磷筛选,获得的转基因后代植株根系柠檬酸合成酶活性、根系柠檬酸含量等都显著高于对照,转基因植株根系 (根系鲜干重、根数和根总长)、茎叶(株高和叶面积)生长情况以及产量性状(穗数 / 株、穗粒数和单株产量) 显著高于对照植株,说明外源柠檬酸合成酶基因 *CS* 在水稻中过表达能够有效增加水稻植株对难溶性磷的吸收和利用,促进水稻生长并提高产量,这与周泽明等[8]和胡利华等[9]在水稻上研究的结果相一致。

参考文献:

[1] De la Fuente J M, Ramirez- Rodrigez V, Cabrera- Ponce J S, et al. Aluminum tolerance in trans- genic plants by alteration in citrate synthesis[J]. Science, 1997(276): 1566- 1568 .

[2] Lopez- Bucio J,Martinez de la Vega O,Guevara- Garcia A,et al. Enhanced Phosphorus uptake in transgenic tobacco plants that overproduce citrate [J]. Nature Biotechnology, 2000(18): 450- 453 .

[3] Koyama H,Kawamura A,Kihara T,et al. Overexpression of mitochondrial citrate synthase in Arabidopsis thaliana improved growth on a Phosphorus limited soil [J] . Plant Cell Physiology, 2000(41): 1030- 1037 .

[4] AnoopV M,Basu U,McCammon M T, et al. Modulation of citrate metabolism alters aluminum tolerance in yeast and transgenic canola overexpressinga mitochondrial citrate synthase[J] . Plant Physiology, 2003(132): 2205- 2217 .

[5] Han Y Y, Zhang W Z, Zhang B L, et al. One novel mitochondrial citrate synthase from Oryza sativa L. can enhance aluminum tolerance in transgenic tobacco [J]. Molecular Biotechnology, 2009(42): 3299- 3305 .

[6] Han D G, Wang Y, Zhang L, et al. Isolation and functional characterization of MxCS1: a gene encoding a citrate synthase in Malus xiaojinensis [J] . Biologia Plantarum, 2012 (56): 50- 56 .

[7] Wang Q F,Yi Q,Hu Q Q, et al. Simultaneous Overexpression of Citrate Synthase and Phosphoenolpyruvate Carboxylase in Leaves Augments Citrate Exclusion and Al Resistance in Transgenic Tobacco [J] . Plant Molecular Biology Reporter, 2012(30) :992- 1005 .

[8] 周泽民,林拥军,贺立源,等 . 超表达外源柠檬酸合成酶基因提高水稻粳稻品种合江 19 对低磷的耐性[A] . 中国的遗传学研究 - 中国遗传学会第七次代表大会暨学术讨论会论文摘要汇编[C] . 2003 .

[9] 胡利华,吴慧敏,周泽民,等 . 利用农杆菌介导法将柠檬酸合成酶基因 (*CS*) 导入籼稻品种明恢 86 [J] . 分子植物育种,2006,4(2) :160- 166 .

中国知网 https://www.cnki.net