

导入 AGPase 基因的转基因可育水稻 及其经济性状的研究

宋 敏, 李援亚, 张云孙

(云南大学 生物技术系, 云南 昆明 650091)

摘要: 以农杆菌介导法将淀粉合成关键酶 AGPase (腺嘌呤二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶) 基因导入云南地方优质水稻合系 35, 38, 39, 41, 42 中, 获得了大量的可育转基因植株。PCR 扩增检测, 外源基因已稳定整合进水稻基因组中。大量的农艺性状及淀粉含量研究表明, 转基因水稻种子的千粒重比对照明显提高, 但总淀粉含量没有显著变化。

关键词: AGPase 基因; 根癌农杆菌; 聚合酶链式反应; 水稻淀粉含量; 千粒重

中图分类号: S511.035.3 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2001)04-0011-04

淀粉合成和积累发生在水稻种子发育的特定阶段, 稻米淀粉的合成是由几个重要的酶所催化的^[1], 其中关键的一个酶是腺嘌呤二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶 (ADPG pyrophosphorylase, AGPase), 它催化葡萄糖-1-磷酸和 ATP 形成葡萄糖 ADPG 和焦磷酸的反应^[2,3]。本实验室与美国华盛顿州立大学的 T. W. Okita 教授合作, 构建了以细菌 AGPase 突变子 glgC16 为目的基因, 以水稻胚乳谷蛋白 Gt15' 序列为启动子的一系列转化质粒, 并以云南地方优质稻种为转化受体, 首次将 AGPase 基因导入水稻, 为利用基因工程改良水稻品种提供理论依据和技术参考。

1 材料和方法

1.1 水稻材料

7 个水稻品系: 合系 35, 38, 39, 41, 42 和 YB9, 均由云南省农科院蒋志农研究员提供。

1.2 农杆菌菌株

用来介导 AGPase 基因转化的菌株为含双元载体系统的根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) LBA4404, 其中 Mini-Ti 质粒的 T-DNA 右端含有 35 s 启动子驱动的潮霉素抗性基因 (Hm) 和水稻胚乳谷蛋白 Gt15' 序列驱动的 AGPase 基因。在 T-DNA 的左端含有氨苄青霉素抗性 (Amp^r) 基因和四环素抗性 (Tet^r) 基因。

1.3 水稻转化及植株再生

将供试水稻的种子去壳后诱导胚性愈伤组织, 诱导出的愈伤组织和根癌农杆菌先进行预

收稿日期: 2000-10-17

基金项目: 云南省自然科学基金重点项目 (96C003Z)

作者简介: 宋 敏 (1968-), 女, 硕士, 讲师, 主要从事生物教学工作和植物基因工程研究。

处理,然后共培养,转入筛选培养基上继代 2 次,再将愈伤组织转入分化培养基上分化绿苗。

1.4 PCR检测

1.4.1 植物 DNA 的提取 采用改良的 CTAB 法和上海生工基因组 DNA 纯化试剂盒 SK252 法。

1.4.2 引物合成 委托美国 LifeTECH 公司完成。

1.4.3 PCR 扩增 参照分子克隆的方法并略有改动。(1)94 ℃, 2.5 min。(2)94 ℃, 45 s。(3)55 ℃, 1 min。(4)72 ℃, 1.75 min, 30 个循环,最后 72 ℃保持 10 min。扩增完毕,以 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测结果。

1.5 水稻种子千粒重测定

选取合系 41 号转基因水稻种子与对照,按农学常规标准方法由云南省农科院粳稻中心测定。

1.6 淀粉含量的测定

选取千粒重增加明显的转基因株系所得种子,送计量标准检测单位云南省农科院生物技术测试中心测定。

2 结果与分析

农杆菌介导的正常可育的转基因水稻植株在海南和云南的昆明、玉溪等地进行田间小区系统试验,合系 41,42 号转基因植株已接近进入品比试验阶段。

2.1 转基因水稻植株的 PCR 检测

取转化水稻植株和非转化水稻植株的后代(T₄、T₅)植株叶片,抽提 DNA,做 PCR 检测,多数转基因植株在预期的 948 bp 处出现扩增带,与阳性对照一致,而非转基因植株对照未出现扩增带,这表明目的基因已通过有性过程稳定传递到后代中,扩增结果如图 1。

2.2 转基因水稻种子的千粒重及淀粉含量测定结果(合系 41 号)

从表 1 可见,转基因水稻与对照(非转基因水稻)相比,水稻种子的千粒重提高了 5.6%~22%,而淀粉含量基本未变。

表 1 转基因水稻种子千粒重及淀粉含量测定

样品名称	世代	千粒重		总淀粉 (%)	支链淀粉 (%)	直链淀粉 (%)
		千粒重 (g)	比对照增减 (%)			
水稻 K2046	T ₃	30.13	22.9	81.47	60.11	21.36
水稻 K2051	T ₃	25.87	5.6	81.64	62.97	18.67
水稻 K2053	T ₃	28.80	17.6	81.61	61.62	19.99
水稻 K2058	T ₃	28.73	17.3	82.95	62.48	20.47
水稻 K2060	T ₃	28.75	17.3	82.94	63.46	19.48
水稻 K2061	T ₃	27.46	12.1	82.77	62.81	19.96
非转基因水稻 (ck)	T ₃	24.50	—	82.22	67.21	15.01



M:λDNA(EcoRI / Hind III)marker
1~3:转基因水稻 DNA 的 PCR 扩增产物
4:阳性对照; PTO127 经 BamHI 酶切后所扩增的产物
5, 6: 阴性对照: 未转化水稻 DNA 的扩增产物

图 1 转基因水稻 DNA PCR 扩增产物的电泳检测

3 讨论

利用基因工程手段提高作物产量, 第一个运用此方法提高植物中淀粉含量成功例子来自 Monsanto 公司的报道^[4]。近年来, 利用基因工程提高植物中淀粉含量, 最终提高产量的研究已取得了令人振奋的进展。但要真正用于生产还有许多问题需要进一步研究。

(1) 寻找新的具有细胞/器官特异性的启动子, 使我们感兴趣的基因恰当表达, 以达到在特定器官中增加淀粉含量的目的。Stark 等人利用突变的大肠杆菌株 618 来源的 AGPase 基因 *glgc16* (对变构调节不敏感) 加上不同的启动子, 构造植物表达载体^[3, 4]。其中, 以 CaMV 35S 为启动子的表达载体转化植物, 获得极少的转基因植株, 表明 AGPase 基因的组成性表达对植物的生长发育是有害的, 它很可能改变了植物不同组织之间源库与沉积的关系。而利用块茎特异性表达的 *patatin* 基因启动子的表达载体转化植物, 情况大为好转。把这个表达载体导入烟草愈伤组织中, 获得了大量转基因烟草愈伤组织。淀粉含量分析表明, 转基因烟草淀粉平均值占干重的 10.7%。有些转基因烟草淀粉干重高达 27%, 而对照非转基因烟草却仅含 3.4% 的淀粉^[5]。本研究中, 我们使用了水稻胚乳谷蛋白 *Gt15'* 序列为启动子, 虽然分子杂交试验(另文发表)和 PCR 扩增均证明目的基因已整合进水稻基因组中, 且千粒重有明显提高, 但淀粉含量却未见显著增加。可能启动子仍是有待解决的问题。

(2) 多种酶基因的表达, 虽然 AGPase 活性的增加导致淀粉含量的增加, 但一定量的外源 AGPase 基因的表达已足以克服淀粉合成中 AGPase 的限制, 而产生一个新的限速步骤^[5]。而且 AGPase 在淀粉合成中并不总是最有效的控制点^[4, 6], 要进一步提高淀粉含量就要设法增加底物浓度或同时提高淀粉合成代谢中其他酶的活性。

(3) 淀粉含量的增加或减少, 对作物而言, 都有利用价值。增加淀粉含量, 就可能增加干物质, 使其具有更高的商业价值。减少淀粉合成的碳流, 可生成其他贮存物质, 如贮存蛋白的积累量增加^[6]。目前, 在增加或减少淀粉含量的研究方面都有成功的报道。在增加淀粉含量方面, 如上述的有关 Stark 等的报道。在减少淀粉含量方面, Muller—Rober 等人利用含有不同启动子和反向连接的 AGPase 大或小亚基 cDNA 的融合基因构建表达载体, 转化马铃薯。在 35 s 加上反向连接的 AGPase 大亚基 cDNA 的融合基因转化植株中, 叶片的 AGPase 活性仅为野生型的 5%~30%。分析转化植株淀粉含量, 结果表明转化植株块茎淀粉含量仅为野生型的 3.5%~5%。伴随着淀粉含量的下降, 转化植株细胞内可溶性糖显著升高。蔗糖和葡萄糖分别占块茎干重的 30% 和 8%^[6]。本研究中, 虽然水稻种子淀粉含量变化不大, 但最重要的是千粒重增加 5.6%~22%, 农艺性状良好, 小区产量也增加近 10%, 达到了增产的目的。我们推测: 转化的目的基因有可能改变了整个种子充盈代谢反应过程, 使得包括淀粉在内的各种种子内含物含量相应提高, 但基本保持了各内含物的百分比, 从而导致种子增大, 千粒重增加。有关基因表达的研究工作本实验室正在进行, 结果将另文发表。

总之, 我们已成功地将 AGPase 基因导入水稻基因组中, 一方面, 希望利用基因工程来调节淀粉合成中特定酶的含量和活性, 从而达到增加淀粉含量, 获得高产的新型水稻品种; 另一方面, 希望利用基因工程手段进一步探索目前尚不十分清楚的淀粉合成调节过程。相信这一尝试将会为利用基因工程改良水稻品种提供一定的理论依据和技术参考。

参考文献:

- [1] Press J. Regulation of the biosynthesis and degradation of starch[J]. *Annu Rev Plant Physiol*, 1982, 33: 431—454
- [2] Okita T W. Is there an alternative pathway for starch synthesis ? [J]. *Plant Physiol*, 1992, 100: 560—564
- [3] Mueller-Rober B T, Kossmann J, Hannah L C, *et al.* One of two different ADP-glucose pyrophosphorylase genes from potato responds strongly to elevated level of sucrose[J]. *Mol Gen Genet*, 1990, 224: 136—146
- [4] 李 枫, 宋艳茹. 利用基因工程的手段提高植物中淀粉含量[J]. *植物学通报*, 1995, 12(1): 6—13
- [5] 包劲松, 夏英武. 水稻淀粉合成的分子生物学研究进展[J]. *植物学通报*, 1999, 16(4): 324—358
- [6] 徐军望, 李旭刚, 朱 祯. 基因工程改良淀粉品质[J]. *生物技术通报*, 2000, (1): 11—18

Studies on Transgenic Rice(*Oryza sativa* L.) Plants Transformed with AGPase Gene and Its Economic Characters

SONG Min, LI Yuan-ya, ZHANG Yun-sun

(Department of Biotechnology, Yunnan University, Kunming Yunnan 650091, China)

Abstract: AGPase gene, the critical starch synthesis enzyme gene, was transformed into high-class rice No. 35, 38, 39, 41, 42 by *Agrobacterium*-mediated transformation and fertile transgenic rice plants were obtained. The results of PCR indicated that the foreign gene had been integrated into the rice genome. The research showed that 1000-grain weight of transgenic plants was obviously improved, but the starch content of the rice was little changed.

Key words: AGPase gene; *Agrobacterium tumefaciens*; Polymerase chain reaction (PCR); The starch content of rice; 1000-grain weight