

马凌霄,雷 闯,刘红双,等. 转 *OsCYP2* 基因水稻后代的遗传检测及生理特性[J]. 江苏农业科学,2014,42(5):98-100.

转 *OsCYP2* 基因水稻后代的遗传检测及生理特性

马凌霄,雷 闯,刘红双,马 建,马景勇

(吉林农业大学农学院,吉林长春 130118)

摘要:对转 *OsCYP2* 基因的吉农大 808 水稻的 T_4 代进行 PCR 检测,同时进行田间调查以及生理生化特性的测定,以观察吉农大 808 水稻的转基因 T_4 代与对照非转基因吉农大 808 水稻的差异。结果表明,吉农大 808 水稻的转基因 T_4 代植株中仍含有 *OsCYP2* 基因,且在 0.15% NaCO_3 溶液模拟盐碱胁迫的条件下,其发芽率明显高于对照品种;吉农大 808 水稻的转基因 T_4 代植株在田间的分蘖数明显高于对照,生育期延长;在生理指标方面,吉农大 808 水稻转基因 T_4 代植株的抗逆性高于对照品种。

关键词:转基因水稻;*OsCYP2* 基因;遗传检测;生理测定

中图分类号: S511.01 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)05-0098-03

转基因生物技术的迅速发展为水稻新品种培育提供了一个崭新的的重要途径,它可以克服生殖隔离,实现物种间遗传物质的转移,对我国水稻品种的遗传改良起到了划时代的推动作用。我国在转基因水稻的培育方面进行了大量的探索和研究,目前已经培育出了大量抗虫、抗病、抗除草剂以及具有其他优良品质性状的转基因水稻^[1-7],但是对于转基因植物后代的稳定性以及农艺性状、生理表现等方面需要进一步观察。本研究以转 *OsCYP2* 基因水稻的 T_4 代作为试验材料,对转基因植物后代的稳定性以及农艺性状、生理表现等方面进行测定,以期对转 *OsCYP2* 基因水稻的进一步研究提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验用水稻为吉林农业大学水稻育种课题组通过前期研究获得的转基因吉农大 808 的 T_4 代植株,对照为非转基因吉农大 808。于 2012 年在吉林农业大学农学院的水稻试验田内分别种植转基因吉农大 808 的 T_4 代植株、对照植株。

1.2 试验方法

1.2.1 转基因水稻的发芽率 挑选 100 粒饱满、均匀一致的种子,称量千粒质量后于 30 ℃ 浸种 24 h,用 0.2% HgCl_2 杀菌,洗净后置于垫有滤纸的培养皿中,加入 0.15% NaCO_3 溶液模拟盐碱胁迫^[8],于 30 ℃ 恒温光照条件进行发芽试验,每天用处理液冲洗处理种子以保持盐碱胁迫状态。

1.2.2 转基因水稻的分子检测 在水稻插秧后剪取其幼嫩叶片,使用改良的 CTAB 法提取 DNA,采用 35S 启动子特异引物组合 (F: 5′ - ATGGATTGTAGAGAGAGAC - 3′, R: 5′ - CTAGGAGAGCTFGCCGAGT - 3′) 进行扩增检测。20 μL 扩增体系:各 1 μL 10 μmol/mL 引物,1 μL 100 ng/μL DNA 模板,10 μL 2 × PCR mix,7 μL ddH_2O 。扩增程序:94 ℃ 预变性

3 min;94 ℃ 变性 30 s,55 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 1 min,30 个循环;72 ℃ 延伸 10 min。扩增产物用 2% 琼脂糖凝胶统计目的条带^[9]。

1.2.3 转基因水稻的农艺性状检测 调查转基因水稻的株高、穗长、千粒质量、结实率等农艺性状并与对照进行比较。

1.2.4 转基因水稻生理生化指标的测定 依据 PCR 检测结果,对呈阳性的株系进行生理生化指标的测定,测定方法依据张治安等的试验^[10]。

2 结果与分析

2.1 转基因水稻的发芽率

发芽试验进行 7 d 后,对各试验组的发芽率进行统计,并与对照的发芽率进行比较。由表 1 可见,在 0.15% NaCO_3 溶液模拟盐碱胁迫的条件下,吉农大 808 转基因水稻的发芽率均高于对照非转基因品种,1 cm 以上的芽数也高于对照品种。

表 1 转基因吉农大 808 与对照的发芽率比较

水稻种类	编号	1 cm 以上 的芽数(个)	1 cm 以下 的芽数(个)	发芽率 (%)
吉农大 808(对照)		70	3	73
转基因吉农大 808	1 号	86	7	93
转基因吉农大 808	2 号	74	21	95
转基因吉农大 808	3 号	93	4	97
转基因吉农大 808	4 号	76	6	82
转基因吉农大 808	5 号	78	15	94

2.2 转基因水稻的 PCR 检测

对选取的 5 个转基因水稻样品进行 PCR 检测,观察目的基因是否仍存在于植株中,结果如图 1 所示。由结果可以看出,对照植株未显示阳性,其余水稻品种均在 205 bp 处有条带,检测结果呈阳性,表明经过多代种植,目的基因仍存在于试验水稻中。

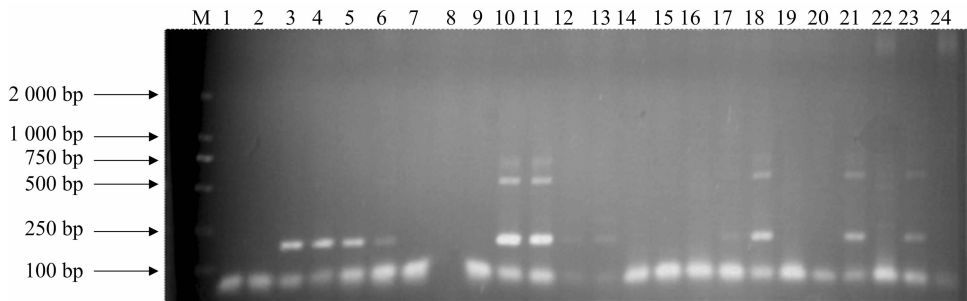
2.3 转基因水稻的农艺性状

由表 2 对转基因水稻与对照农艺性状的比较可见,转基因植株的株高、穗长、千粒质量、结实率与对照差别不大,但是

收稿日期:2013-09-17

作者简介:马凌霄(1989—),女,内蒙古赤峰人,硕士研究生,从事水稻遗传育种研究工作。E-mail:mlx200702@126.com。

通信作者:马景勇,教授,从事水稻遗传育种研究工作。E-mail:99n2@163.com。



M—Marker; 1—对照; 3、4、10、18、21分别为发芽试验中1号、2号、3号、4号、5号转基因水稻; 扩增样品均为转基因水稻后代; 500、600 bp左右条带为正常的水稻 PCR 扩增条带

图1 转基因水稻的PCR检测结果

表 2 转基因水稻与对照植株的农艺性状

水稻种类	编号	株高 (cm)	穗长 (cm)	分蘖数 (个)	穗粒数 (粒/穗)	实粒数 (粒/穗)	结实率 (%)	生育期 (d)	千粒质量 (g)
吉农大 808(对照)		102.00	17.33	5.67	159.00	127.33	80.11	137.33	20.37
转基因吉农大 808	1 号	99.00	17.00	12.33	244.00	173.33	71.15	142.33	25.27
转基因吉农大 808	2 号	103.00	16.00	14.67	241.33	117.67	48.82	144.00	24.83
转基因吉农大 808	3 号	109.11	18.31	12.33	217.44	177.78	81.60	155.00	22.53
转基因吉农大 808	4 号	113.58	17.90	13.33	189.22	134.00	71.05	157.33	22.20
转基因吉农大 808	5 号	104.30	18.75	13.24	203.00	156.37	79.82	164.00	23.70

分蘖数明显增多,且生育期加长。由结果还可以看出,转基因水稻各株系间的性状也存在差异,这与前期的研究结果一致。

2.4 转基因水稻的生理性状测定结果

2.4.1 水稻组织含水量 将水稻组织在 105 ℃ 烘干至恒重后对其含水量进行称量计算。由图 2 可以看出,转基因水稻的组织含水量与对照差别不大,但是各株系之间差别较大,与前期研究结果一致。

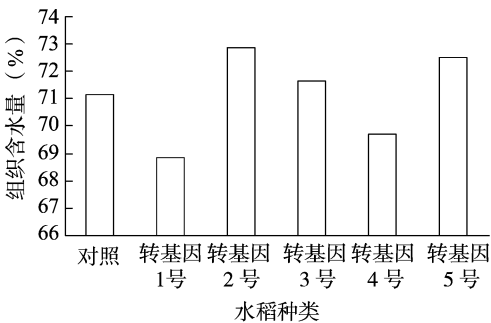


图2 水稻组织含水量测定结果

表 3 水稻叶片保水力测定结果

水稻种类	编号	自然脱水 24 h 后的 叶片含水量 (%)
吉农大 808(对照)		71.03
转基因吉农大 808	1 号	66.93
转基因吉农大 808	2 号	70.64
转基因吉农大 808	3 号	64.53
转基因吉农大 808	4 号	67.25
转基因吉农大 808	5 号	65.68

表 4 不同水稻的抗逆性比较

水稻种类	编号	电解质渗出率 (%)	SOD 活性 (U/g)	CAT 活性 (U/g)
吉农大 808(对照)		15.12	9.150 943	17.760 00
转基因吉农大 808	1 号	1.61	43.301 890	20.052 10
转基因吉农大 808	2 号	6.30	25.430 600	21.231 60
转基因吉农大 808	3 号	4.30	35.546 700	20.543 60
转基因吉农大 808	4 号	7.46	27.239 800	18.986 20
转基因吉农大 808	5 号	7.21	28.773 570	22.343 75

2.4.2 水稻叶片的保水力 叶片保水力以自然风干 24 h 后的叶片含水量作为衡量标准。由表 3 可见,自然脱水 24 h 后,各水稻组间的含水量差别不大,表明各组叶片的保水能力相近,即转入 *OsCYP2* 基因对植物的叶片保水能力影响不显著。

2.4.3 水稻抗逆性 针对植物的抗逆性相关关系,测定了逆境对水稻细胞膜的伤害程度,主要测定了超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)的活性。

采用电导仪法测定逆境对细胞膜的伤害程度,根据张治安等的方法^[10]计算电解质渗出率,以表示伤害程度。由表 4 可见,对照组吉农大 808 水稻的电解质渗出率最高,是转基因水稻的 2~9 倍,可见转基因水稻的抗逆性得到增强;在 560 nm

下测定 SOD 活性,结果转基因水稻的 SOD 活性是对照品种的数倍,表明转基因水稻的抗逆性比普通对照品种高很多;转基因水稻与对照的过氧化氢酶活性差别不大。

综合以上 3 项指标可知,转基因水稻的抗逆性均高于普通对照植株,也可以认为,在盐碱地中,转基因水稻的各方面表现均优于普通水稻。

2.4.4 游离脯氨酸含量 在测定游离脯氨酸含量前,先用脯氨酸母液绘制标准曲线。由图 3 可知,脯氨酸含量与吸光度呈线性正相关。在 520 nm 波长处用比色法测定,并根据含量公式计算出游离脯氨酸含量,结果见表 5。由表 5 可以看出,

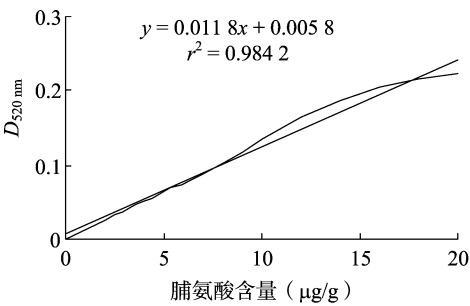


图3 脯氨酸含量标准曲线

表 5 游离脯氨酸含量

水稻种类	编号	游离脯氨酸含量 (μg/g)
吉农大 808(对照)		1.1670 75
转基因吉农大 808	1 号	1.044 225
转基因吉农大 808	2 号	1.026 100
转基因吉农大 808	3 号	1.157 350
转基因吉农大 808	4 号	1.042 350
转基因吉农大 808	5 号	1.375 920

对照与转基因水稻的游离脯氨酸含量差别不大,这与水稻组织含水量的测定结果相吻合。

3 结论与讨论

通过对转 *OsCYP2* 基因的 T4 代吉农大 808 水稻进行 PCR 检测和生理生化指标测定等发现,在 T4 代水稻中仍然具有 *OsCYP2* 基因,并且该基因在水稻的生育过程中具有一定作用。

在 0.15% NaCO₃ 溶液模拟盐碱胁迫的条件下,转基因水稻种子的发芽率高于对照品种;在田间正常条件下,转基因水稻的分蘖数明显增多,且生育期加长,但其余指标均与对照品种无明显差别;转基因水稻的各株系间存在较大差距,与前期结果一致,推测是由于外源基因的插入而影响性状的表现。对转基因水稻生理生化指标的测定结果显示,转入 *OsCYP2* 基因后较明显的效果为抗逆性增加,这与发芽试验结果相吻合,也解释了耐盐碱的机制。

水稻属于对盐碱胁迫中度敏感的一类作物^[11],盐碱胁迫对水稻一生不同生长发育阶段的影响差异较大^[12-13],且水稻耐盐碱性存在品种间的差异,因此在实际生产中仍有许多诸如适宜生产的盐碱地及水稻品种的选择等问题亟待解决^[14]。转基因水稻的研究解决了生产上的部分难题,目前取得了巨大的进步,不仅建立了成熟的遗传转化体系,而且获得了一大

批有应用潜力的转基因材料^[15]。然而尽管转基因水稻的遗传改良已取得较大进展,但外源基因的稳定遗传、高效表达及目的基因的沉默等遗传机理仍有待进一步研究^[16]。本研究通过对转 *OsCYP2* 基因的 T4 代水稻进行初步研究,探究了其部分特征特性,而其他特征则需要进一步探究。

参考文献:

[1] 卢宝荣,傅 强,沈志成. 我国转基因水稻商品化应用的潜在环境生物安全问题[J]. 生物多样性,2008,16(5):426-436.

[2] 朱 赓. 转基因水稻研发进展[J]. 中国农业科技导报,2010,12(2):9-16.

[3] 王彩芬,安平永,韩国敏,等. 水稻转基因育种研究进展[J]. 宁夏农林科技,2005(6):55-57,54.

[4] 崔荣荣,戴伟民,强 胜,等. 抗草铵膦转基因杂交水稻Ⅱ优 86B 及其恢复系 86B 向杂草稻的基因漂移[J]. 江苏农业学报,2013,29(4):708-714.

[5] 宋 涛,张小娟,苑中原,等. 转 *PEPC&PPDK* 双基因水稻灌浆期的光合生理特性[J]. 江苏农业科学,2013,41(1):58-61.

[6] 王北艳,殷奎德. 转 *Bt* 抗虫基因水稻生物安全性探讨[J]. 江苏农业科学,2012,40(9):271-273.

[7] 崔红云,苑中原,李 稳,等. 转 *PPc* 和 *PPD* 双基因水稻孕穗期光合生理日变化[J]. 江苏农业科学,2012,40(6):52-56.

[8] 祁栋灵,张三元,曹桂兰,等. 水稻发芽期和幼苗前期耐碱性的鉴定方法研究[J]. 植物遗传资源学报,2006,7(1):74-80.

[9] 闫海生,雷 闯,马凌霄,等. 转 *OsCYP2* 基因水稻后代的遗传分析及农艺性状观察[J]. 湖北农业科学,2013,52(7):1510-1511,1536.

[10] 张治安,陈展宇. 植物生理学实验技术[M]. 长春:吉林大学出版社,2008.

[11] 汪宗立,刘晓忠,王志霞. 水稻耐盐性的生理研究 I. 盐逆境下水稻品种间水分关系和渗透调节的差异[J]. 江苏农业学报,1986,2(3):1-11.

[12] 赵兰坡,尚庆昌,李春林. 松辽平原苏打盐碱土改良利用研究现状及问题[J]. 吉林农业大学学报,2000(S1):79-83.

[13] 刘兴土,何 岩,邓 伟,等. 东北区域农业综合发展研究[M]. 北京:科学出版社,2002:383-442.

[14] 步金宝,赵宏伟,刘化龙,等. 盐碱胁迫对寒地粳稻产量形成机理的研究[J]. 农业现代化研究,2012,33(4):485-488.

[15] 赵彦平,赵春海. 植物转基因育种的分析与研究[J]. 生物技术通报,2011(3):72-77.

[16] 宋晓慧,孙继峰,李春光,等. 水稻转基因育种研究进展[J]. 种子世界,2008(6):30-31.