

杜京尧, 尚 飞, 王高华, 等. *OsRhoGDI2* 过表达转基因水稻的筛选鉴定及外源基因拷贝数的初步分析[J]. 江苏农业科学, 2019, 47(14): 50–54. doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.14.011

OsRhoGDI2 过表达转基因水稻的筛选鉴定及外源基因拷贝数的初步分析

杜京尧, 尚 飞, 王高华, 梁卫红

(河南师范大学生命科学学院, 河南新乡 453007)

摘要:水稻 Rho GDP 解离抑制基因 *OsRhoGDI2* 是从幼穗中分离出的功能未知基因。为鉴定该基因的功能, 笔者所在实验室前期构建了植物过表达载体 pCambia1302-*OsRhoGDI2*-GFP, 并对水稻进行了遗传转化。对 *OsRhoGDI2* 过表达转基因水稻 T₂ 代进行筛选和鉴定, 采用 PCR 技术鉴定转基因植株, 采用半定量 RT-PCR 和实时荧光定量 PCR 检测 *OsRhoGDI2* 在转基因水稻中的表达水平, 结果显示, 其中 6 个株系为过表达转基因植株, *OsRhoGDI2* 表达水平上调 1.69~13.35 倍。为检测外源基因在转基因水稻中的拷贝数, 分别以蔗糖磷酸合成酶基因 *SPS* 和潮霉素抗性基因 *HYG* 为内参基因和标记基因, 采用实时荧光定量 PCR (qPCR) 技术结合内参基因和标记基因的标准曲线进行分析, 结果显示在所检测的 6 个转基因株系中, 外源基因的拷贝数均为 1, 提示已经获得稳定遗传的 *OsRhoGDI2* 过表达转基因水稻, 为后续 *OsRhoGDI2* 基因的功能研究奠定基础。

关键词: *OsRhoGDI2*; 转基因水稻; 表达分析; 拷贝数; 外源基因

中图分类号: S511.03 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)14-0050-04

植物 Rho/Rac 也称为 Rop (Rho of plant), 是植物中唯一与信号转导有关的小 GTP 结合蛋白, 功能涉及细胞极性生长^[1-3]、肌动蛋白细胞骨架重组^[4-5]、次生壁形成^[6]、分生组织信号传递^[7]以及抗逆和激素应答^[8-11]等。作为信号通路的分子开关, Rho 蛋白通过与靶蛋白的相互作用, 实现对细胞生理活动的调控和影响, 已明确的一类相互作用蛋白是 Rho GDP 解离抑制因子 (Rho GDP dissociation inhibitors, RhoGDIs), 功能是调节 Rho 的胞内定位, 通过阻止 GTP 与 Rho 的结合, 抑制 Rho 的活化, 因而是 Rho 的负调控因子^[12-14]。但是目前对植物 *RhoGDIs* 研究的报道较少, 虽有从拟南芥、烟草、水稻等植物中筛选到 *RhoGDIs* 的报道^[15-17], 但是对其在植物生长发育等过程中生物学功能的研究非常有限。Carol 等对拟南芥突变体 *scn1* 的研究发现, 一种拟南芥的 *RhoGDI* 基因 *SCN1/AtrhoGDI1* 通过控制局部 RHD2/AtbohC NADPH 氧化酶的激活, 调控根毛细胞的生长^[18]; Wu 等的研究发现, 拟南芥 *AtRhoGDI1* 通过 ROP 信号通路, 介导对幼苗和叶表皮细胞形态建成的调节, 而且 *AtRhoGDI1* 被 CPK3 磷酸化是执行其功能的前提^[19], 但是至今尚未见水稻 *RhoGDIs* 基因功能的报道。

水稻 Rho GDP 解离抑制基因 *OsRhoGDI2* 是通过酵母双杂交筛选, 从雌雄蕊形成期水稻幼穗中分离的功能未知基因。对该基因编码蛋白的生物信息学分析和亚细胞定位检测发

现, 该基因编码蛋白在活细胞中广泛分布^[20]。对 *OsRhoGDI2* 基因启动子转基因功能鉴定的研究表明, 该基因 2 100 bp 的上游调控序列即可以启动 GUS 在颖花、花药和花粉中的特异表达, 该基因的表达受到生长素 (IAA) 等多种激素的胁迫和诱导^[21]。为了进一步鉴定 *OsRhoGDI2* 的功能, 本研究基于实验室的前期工作, 对 *OsRhoGDI2* 过表达转基因水稻 T₂ 代进行筛选和鉴定, 分别采用 PCR、RT-PCR 和 qRT-PCR 技术在 DNA 和 RNA 水平上进行检测, 并通过 qPCR 技术鉴定 *OsRhoGDI2* 在转基因株系中的拷贝数, 旨在为后续分析 *OsRhoGDI2* 基因的生物学功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 植物材料 水稻粳稻品种日本晴 (*Oryza sativa* L. *japonica*. cv. Nipponbare), 简称 WT, 由山东省农业科学院作物与分子育种实验室提供; *OsRhoGDI2* 过表达转基因水稻, 简称 OE-*OsRhoGDI2*, 由笔者所在实验室前期构建, 已筛选获得 T₁ 代种子, 遗传背景为日本晴。

1.1.2 载体 植物过表达载体 pCambia1302-*OsRhoGDI2*-GFP 由笔者所在实验室前期构建。

1.1.3 主要试剂 总 RNA 提取试剂 RNAiso Plus、PrimeSTAR HS DNA Polymerase、PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)、SYBR® Premix Ex Taq™ II 购自宝生物工程 (大连) 有限公司, 2 × Es Taq MasterMix (Dye) 购自北京康为世纪生物科技有限公司。

1.1.4 引物设计 本试验所用引物 (表 1) 均由苏州金维智生物科技有限公司合成。

1.2 试验方法

1.2.1 水稻取材 选取适量的对照 (WT) 水稻种子和

收稿日期: 2018-03-13

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 31171182、U1704101); 河南省高校科技创新团队支持计划 (编号: 15IRTSTHN020)。

作者简介: 杜京尧 (1990—), 男, 河南禹州人, 硕士研究生, 主要从事植物发育分子生物学研究。E-mail: dujingyao1990@126.com。

通信作者: 梁卫红, 博士, 教授, 主要从事植物发育分子生物学研究。

Tel: (0373) 3326340; E-mail: liangwh@htu.cn。

表 1 本研究所用引物一览表

名称	引物序列 (5'→3')	引物用途
F1	AACTGCAGGAACCCCTCCTCCTCCTCC	转基因水稻筛选上游引物
R1	AACCTAGGGGACTTGACAGGGCCAGTC	转基因水稻筛选下游引物
F2	ATCACGCTGGAGGTGGAGT	内参 <i>UBQ</i> 基因 RT-PCR 上游引物
R2	AGGCCTTCTGCTGTAGACG	内参 <i>UBQ</i> 基因 RT-PCR 下游引物
F3	GCTCAAGTTACCTTCTCTGT	<i>OsRhoGDI2</i> 基因 qRT-PCR 上游引物
R3	CTCCCATCGACCACAACA	<i>OsRhoGDI2</i> 基因 qRT-PCR 下游引物
F4	TCTTCCAGCCTTCCTTCA	内参 <i>OsAct1</i> 基因 qRT-PCR 上游引物
R4	ATCCACGTCGCACTTCAT	内参 <i>OsAct1</i> 基因 qRT-PCR 下游引物
F5	ACGGTGTCTGCCATCACAGTTTGCC	<i>HYG</i> 基因 qPCR 上游引物
R5	TTCCGGAAGTGCTTGACATTGGGGA	<i>HYG</i> 基因 qPCR 下游引物
F6	TTGCGCCTGAACGGATAT	<i>SPS</i> 基因 qPCR 上游引物
R6	CGGTGATCTTTTCGGGATC	<i>SPS</i> 基因 qPCR 下游引物

OE-*OsRhoGDI2* 水稻 T_1 代种子,2016 年 5 月 1 日播种于河南师范大学试验园地(113.90°E、35.32°N)。水稻生长至 20 d(幼苗期)、90 d(抽穗期)时,分别取其植株叶片,液氮冷冻处理,-80℃保存备用。

1.2.2 *OsRhoGDI2* 转基因植株的筛选 取幼苗期水稻嫩叶,采用十六烷基三甲基三甲基溴化铵(CTAB)法提取基因组 DNA。以 F1/R1 为引物,基因组 DNA 为模板进行 PCR 反应,按照 2×Es Taq MasterMix 说明书配制反应体系(10 μL):2×Taq Master Mix 5.0 μL、F1(10 μmol/L)0.4 μL、R1(10 μmol/L)0.4 μL、基因组 DNA 0.2 μL 和无菌水 4.0 μL。PCR 反应条件为 94℃预变性 2 min;94℃变性 30 s,58℃退火 30 s,72℃延伸 1 min,30 个循环;72℃延伸 2 min。扩增产物采用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.3 *OsRhoGDI2* 基因在转基因水稻中表达水平的检测

1.2.3.1 总 RNA 的提取和 cDNA 的制备 取抽穗期水稻叶片,根据宝生物工程(大连)有限公司 RNAiso Plus 试剂说明书,分别提取对照(WT)水稻和 OE-*OsRhoGDI2* 水稻 T_2 代幼苗叶片总 RNA,然后按照 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) 试剂盒说明书进行反转录,制备 cDNA。

1.2.3.2 半定量 RT-PCR 以“1.2.3.1”节获得的 cDNA 为模板,按照 PrimeSTAR HS DNA Polymerase 说明书配制半定量 RT-PCR 反应体系(50 μL),其中内参基因 *UBQ* 的 PCR 扩增体系为 5×PrimeSTAR Buffer(Mg²⁺ Plus)10.0 μL、dNTP (2.5 mmol/L)4.0 μL、*UBQ* 引物 F2(10 μmol/L)1.0 μL、*UBQ* 引物 R2(10 μmol/L)1.0 μL、PrimeSTAR HS DNA Polymerase 0.5 μL、cDNA 模板 2.0 μL 和无菌水 31.5 μL。PCR 反应条件为 98℃变性 30 s,55℃退火 15 s,72℃延伸 1 min,30 个循环。*OsRhoGDI2* 的扩增体系引物采用 F1/R1,其余同 *UBQ* 的 PCR 扩增体系。PCR 反应退火温度为 58℃,其余参数同 *UBQ* 的 PCR 反应条件。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.3.3 实时荧光定量 PCR 取“1.2.3.1”节制备的 cDNA 为模板,以 F3/R3 为引物进行 *OsRhoGDI2* 的 qRT-PCR 反应,以水稻 *OsAct1* 基因为内参,按照 SYBR® Premix Ex Taq™ II 说明书配制反应体系(20 μL):2×SYBR Premix Ex Taq 10.0 μL、PCR Forward primer (10 μmol/L)0.8 μL、PCR

Reverse primer(10 μmol/L)0.8 μL、cDNA 2.0 μL、灭菌水 6.4 μL。采用 2 步法进行 PCR 扩增:第 1 步 95℃预变性 30 s;第 2 步 PCR 反应 95℃变性 5 s,60℃延伸 30 s,40 个循环。

每组试验做 3 次重复,利用 Roche LightCycler® 96 自带软件 LightCycler® 96 v1.1 进行数据分析,以 2^{-ΔΔC_T}法^[22]分析 *OsRhoGDI2* 基因表达水平。

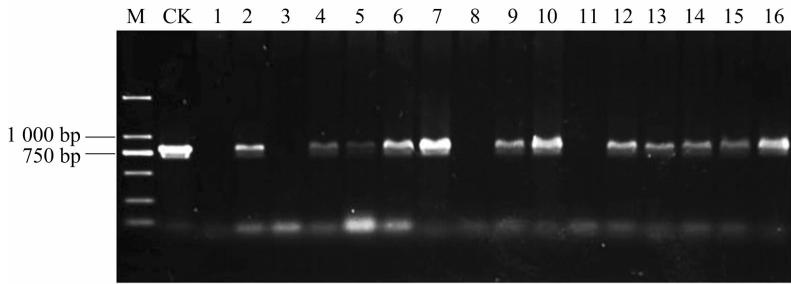
1.2.4 *OsRhoGDI2* 基因在转基因水稻中拷贝数的鉴定 *HYG* 基因标准曲线的制作参考杨立桃等的方法^[23],以含有 *HYG* 基因的 pCAMBIA1302-*OsRhoGDI2*-GFP 质粒 DNA 溶液(10⁷、10⁶、10⁵、10⁴、10³ 拷贝/μL)为模板,以 F5/R5 为引物进行 qPCR 反应,按照 SYBR® Premix Ex Taq™ II 说明书进行配制,反应体系同“1.2.3.3”节。采用 2 步法进行 PCR 扩增,进行 45 个循环,其余参数同“1.2.3.3”节。得到等梯度拷贝数对应的 C_T 值。依据 C_T 值与起始模板数的对数值之间的一定的线性关系来制作标准曲线。水稻内参基因 *SPS* 标准曲线的制作参考 Ding 等的方法^[24]。

以 6 个阳性 OE-*OsRhoGDI2* 水稻基因组 DNA 为模板,分别以 F5/R5 和 F6/R6 为引物进行 qPCR 反应,按照 SYBR® Premix Ex Taq™ II 说明书进行配制,反应体系同“1.2.3.3”节。采用 2 步法进行 PCR 扩增,进行 45 个循环,其余参数同“1.2.3.3”节。分别获得 6 个植株 *HYG* 与 *SPS* 基因的 C_T 值,并由 *HYG* 与 *SPS* 基因的相关性方程计算其起始模板数。用纯合二倍体水稻 *SPS* 作为内参基因,将 H₀ 与 S₀ 的比值乘以 2 得到 *OsRhoGDI2* 基因在转基因水稻中的拷贝数。

2 结果与分析

2.1 *OsRhoGDI2* 转基因水稻的筛选

以水稻基因组 DNA 为模板,用引物 F1/R1 进行 PCR 扩增,扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测,确定阳性转基因植株。由于 *OsRhoGDI2* 转基因表达载体内插入的目的基因长度为 795 bp,所以从阳性转基因水稻基因组 DNA 中能扩增出 795 bp 特异片段,而对照(WT)植株中不能扩增出该大小的条带。电泳结果显示,在检测的 15 个样品中,除了 3、8、11 号之外,都可以扩增得到预期大小的片段,且与阳性对照条带位置一致(图 1),说明 *OsRhoGDI2* 基因已经整合到水稻基因组中。

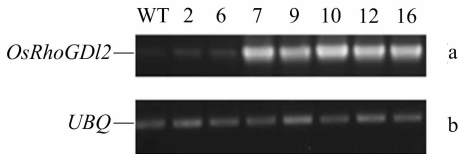


M—DL2000 marker; CK—以 *OsRhoGDI2* 植物过表达载体为模板的扩增产物;
1—对照 WT 水稻基因组 DNA 的扩增产物; 2~16—转基因水稻基因组 DNA 的扩增产物

图1 *OsRhoGDI2* 转基因水稻的鉴定

2.2 *OsRhoGDI2* 在转基因水稻中表达水平的检测

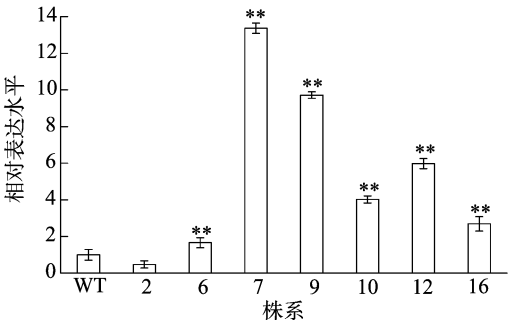
选取 PCR 检测为阳性的转基因水稻,提取叶片总 RNA,采用半定量 RT-PCR 检测该基因的表达水平,内参采用水稻泛素(*UBQ*)基因,扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测,结果显示,在对照(WT)水稻叶片中,*OsRhoGDI2* 基因的表达水平较低,而在所检测的 7 株转基因水稻中,*OsRhoGDI2* 基因的表达水平均有不同程度的提高,尤其是 7、9、10、12、16 号这 5 株的表达量有显著的增高(图 2),说明这 5 株水稻是 OE-*OsRhoGDI2* 阳性植株。



a.*OsRhoGDI2* 的扩增结果; b.内参基因 *UBQ* 的扩增结果

图2 RT-PCR 检测 *OsRhoGDI2* 基因在转基因水稻中的表达

进一步采用实时定量 PCR 方法检测 *OsRhoGDI2* 基因在转基因水稻中的表达水平。由图 3 可知,除 2 号外,在其余 6 株转基因水稻中 *OsRhoGDI2* 基因的表达水平均比对照(WT)高,基因表达量极显著上调的有 6 号(1.69 倍)、16 号(2.69 倍)、10 号(4.02 倍)、12 号(5.98 倍)、9 号(9.72 倍)和 7 号(13.35 倍),且与半定量 RT-PCR 检测结果一致,证明 *OsRhoGDI2* 基因在这些转基因水稻中实现了过量表达。



以水稻 *OsAct1* 作为内参基因; **表示 $P < 0.01$

图3 *OsRhoGDI2* 基因在转基因水稻叶片中的相对表达量

2.3 *HYG* 基因标准曲线的制作

以含有 *HYG* 基因的 pCambia1302-*OsRhoGDI2*-GFP 质粒 DNA 溶液(10^7 、 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 拷贝/ μ L)为模板,基于 qPCR 数据获得了 *HYG* 基因的标准曲线(图 4),其相关系数 $r = 0.9997$,说明相关性高。其 C_T 值与起始模板数(H_0)之间的相关性方程为: $H_0 = 10^{(-0.297C_T + 12.356)}$ 。

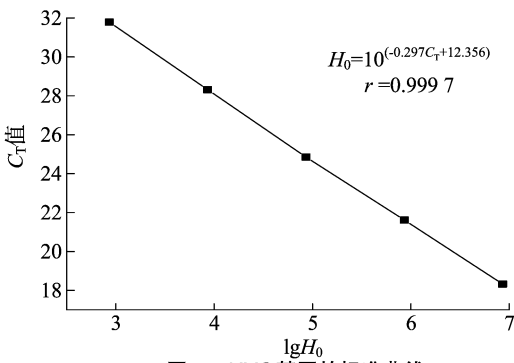


图4 *HYG* 基因的标准曲线

2.4 *OsRhoGDI2* 在转基因水稻中拷贝数的测定

以上述鉴定的 6 株阳性 OE-*OsRhoGDI2* 水稻基因组 DNA 为模板,分别以 F5/R5 和 F6/R6 引物组合,对 *HYG* 基因与 *SPS* 基因进行 qPCR,获得扩增曲线与待测样品的 C_T 值(表 2),并由 *HYG* 与 *SPS* 基因的相关性方程计算其起始模板数。

表 2 依据 *HYG* 和 *SPS* 基因的标准曲线所获得的样品 C_T 值

植株号	<i>HYG</i> 基因		<i>SPS</i> 基因	
	C_T 值	CV(%)	C_T 值	CV(%)
WT	32.94 ± 0.02	0.06	25.35 ± 0.04	0.16
6	32.55 ± 0.09	0.26	25.85 ± 0.08	0.31
7	31.55 ± 0.28	0.89	25.11 ± 0.09	0.36
9	31.60 ± 0.00	0.00	25.90 ± 0.07	0.25
10	31.50 ± 0.01	0.02	25.91 ± 0.07	0.25
12	31.80 ± 0.08	0.24	25.33 ± 0.06	0.22
16	31.21 ± 0.02	0.06	25.80 ± 0.12	0.45

注:每个样本测 33 次, C_T 值表示为每个样本的均值 ± 标准差, CV 是每个组的变异系数。

OsRhoGDI2 基因在转基因水稻中的拷贝数的计算结果显示,对照水稻拷贝数为 0,其余有 6 个 OE-*OsRhoGDI2* 水稻拷贝数均为 1(表 3)。

3 结论与讨论

植物遗传转化是农作物改良和基因功能研究的常用试验方法。本研究在实验室前期工作的基础上,对 *OsRhoGDI2* 转基因水稻 T_2 代进行了筛选和鉴定,获得 6 个阳性转基因水稻株系。现有的研究认为,过表达后代中外源基因拷贝数是影响目的基因表达水平和遗传稳定性的主要因素。据统计分析显示,外源基因拷贝数为 1 或 2 时能够稳定遗传高表达,而外

表 3 OE - *OsRhoGDI2* 水稻目的基因拷贝数的估算

植株号	H_0	S_0	$2 \times H_0/S_0$	目的基因的拷贝数
WT	371	2 200	0.337	0
6	556	1 565	0.710	1
7	960	2 591	0.741	1
9	928	1 512	1.228	1
10	994	1 502	1.324	1
12	1 604	2 230	1.439	1
16	1 212	1 619	1.497	1

注: H_0 表示 *HYG* 基因在 PCR 反应中的起始模板数; S_0 表示 *SPS* 基因起始模板数;拷贝数的均值是 $2 \times H_0/S_0$ 。

源基因拷贝数过多(达 4~5)往往使外源基因不表达甚至导致基因沉默^[25-26]。因此在获得阳性过表达转基因植株后,对其外源基因拷贝数进行鉴定分析是必要的。

本研究对外源基因拷贝数的检测所采用的内参基因为水稻特有的单拷贝基因 *SPS*^[24],转基因植株的标志基因是植物表达载体的标志基因 *HYG*,也是转基因植物筛选常用的标志。检测结果显示,*OsRhoGDI2* 在过表达转基因水稻中均为单拷贝,提示基因能够稳定遗传和表达,这与笔者所在实验室对其 T_1 代和 T_2 代的连续筛选结果是一致的,阳性率均在 85% 以上。

本研究采用基因组 DNA 扩增的方法,首先检测了 *OsRhoGDI2* 过表达植物载体是否稳定整合到水稻基因组中,进而采用半定量 RT-PCR、实时荧光定量 PCR 技术在转录水平检测了 *OsRhoGDI2* 在转基因水稻中的表达水平,并通过外源基因拷贝数的测算,证实外源 *OsRhoGDI2* 基因整合到水稻基因组中的拷贝数均为 1。本研究筛选和鉴定了 6 个独立的 *OsRhoGDI2* 过表达转基因株系,为后续以这些材料开展对 *OsRhoGDI2* 的功能鉴定奠定了良好的基础。

参考文献:

- [1] Kost B, Lemichez E, Spielhofer P, et al. Rac homologues and compartmentalized phosphatidylinositol 4,5 - bisphosphate act in a common pathway to regulate polar pollen tube growth[J]. Journal of Cell Biology, 1999, 145(2): 317 - 330.
- [2] Molendijk A J, Bischoff F, Rajendrakumar C S, et al. *Arabidopsis thaliana* Rop GTPases are localized to tips of root hairs and control polar growth[J]. EMBO Journal, 2001, 20(11): 2779 - 2788.
- [3] Jones M A, Shen J J, Fu Y, et al. The *Arabidopsis* Rop2 GTPase is a positive regulator of both root hair initiation and tip growth[J]. The Plant Cell, 2002, 14(4): 763 - 776.
- [4] Fu Y, Wu G, Yang Z B. Rop GTPase - dependent dynamics of tip - localized F - actin controls tip growth in pollen tubes[J]. Journal of Cell Biology, 2001, 152(5): 1019 - 1032.
- [5] Fu Y, Li H, Yang Z B. The ROP2 GTPase controls the formation of cortical fine F - actin and the early phase of directional cell expansion during *Arabidopsis* organogenesis[J]. The Plant Cell, 2002, 14(4): 777 - 794.
- [6] Delmer D P, Pear J R, Andrawis A, et al. Genes encoding small GTP - binding proteins analogous to mammalian rac are preferentially expressed in developing cotton fibers[J]. Molecular & General Genetics, 1995, 248(1): 43 - 51.
- [7] Trotochaud A E, Hao T, Wu G, et al. The CLAVATA1 receptor - like

kinase requires CLAVATA3 for its assembly into a signaling complex that includes KAPP and a Rho - related protein[J]. The Plant Cell, 1999, 11(3): 393 - 406.

- [8] Kawasaki T, Henmi K, Ono E, et al. The small GTP - binding protein rac is a regulator of cell death in plants[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999, 96(19): 10922 - 10926.
- [9] Kawasaki T, Koita H, Nakatsubo T, et al. Cinnamoyl - CoA reductase, a key enzyme in lignin biosynthesis, is an effector of small GTPase Rac in defense signaling in rice[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103(1): 230 - 235.
- [10] Fujiwara M, Umemura K, Kawasaki T, et al. Proteomics of Rac GTPase signaling reveals its predominant role in elicitor - induced defense response of cultured rice cells[J]. Plant Physiology, 2006, 140(2): 734 - 745.
- [11] Schultheiss H, Hensel G, Imani J, et al. Ectopic expression of constitutively activated RACB in barley enhances susceptibility to powdery mildew and abiotic stress[J]. Plant Physiology, 2005, 139(1): 353 - 362.
- [12] Dermardirossian C, Bokoch G M. GDIs: central regulatory molecules in Rho GTPase activation[J]. Trends in Cell Biology, 2005, 15(7): 356 - 363.
- [13] Dovas A, Couchman J R. RhoGDI: multiple functions in the regulation of Rho family GTPase activities[J]. The Biochemical Journal, 2005, 390: 1 - 9.
- [14] Klahre U, Becker C, Schmitt A C, et al. Nt - RhoGDI2 regulates Rac/Rop signaling and polar cell growth in tobacco pollen tubes[J]. Plant Journal, 2006, 46(6): 1018 - 1031.
- [15] Bischoff F, Vahlkamp L, Molendijk A, et al. Localization of AtROP4 and AtROP6 and interaction with the guanine nucleotide dissociation inhibitor AtRhoGDI1 from *Arabidopsis*[J]. Plant Molecular Biology, 2000, 42(3): 515 - 530.
- [16] Kieffer F, Elmayan T, Rubier S, et al. Cloning of Rac and Rho - GDI from tobacco using an heterologous two - hybrid screen[J]. Biochimie, 2000, 82(12): 1099 - 1105.
- [17] 梁卫红, 唐朝荣, 吴乃虎. 两种水稻 GDP 解离抑制蛋白基因的分离及特征分析[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2004, 20(6): 785 - 791.
- [18] Carol R J, Takeda S, Linstead P, et al. A RhoGDP dissociation inhibitor spatially regulates growth in root hair cells[J]. Nature, 2005, 438(770): 1013 - 1016.
- [19] Wu Y X, Zhao S J, Tian H, et al. CPK3 - phosphorylated RhoGDI1 is essential in the development of *Arabidopsis* seedlings and leaf epidermal cells[J]. Journal of Experimental Botany, 2013, 64(11): 3327 - 3338.
- [20] 彭威凤, 梁卫红. 水稻 *OsRhoGDI2* 蛋白生物信息学分析及亚细胞定位研究[J]. 生物技术通报, 2010(5): 82 - 86, 92.
- [21] Huang J J, Zhang J, Hao Y F, et al. Distinct expression patterns of the GDP dissociation inhibitor protein gene (*OsRhoGDI2*) from *Oryza sativa* during development and abiotic stresses[J]. Biologia, 2016, 71(11): 1230 - 1239.
- [22] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real - time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402 - 408.

李昕洋, 吴 丹, 熊武建, 等. 2 种姜属植物组培快繁体系的优化[J]. 江苏农业科学, 2019, 47(14): 54–58.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.14.012

2 种姜属植物组培快繁体系的优化

李昕洋¹, 吴 丹¹, 熊武建¹, 王英强^{1,2}

(1. 华南师范大学生命科学学院/广东省植物发育生物工程重点实验室, 广东广州 510631;

2. 广州市亚热带生物多样性与环境生物监测重点实验室, 广东广州 510631)

摘要:分别以光果姜块茎幼芽、珊瑚姜组培苗茎尖为外植体, 通过组织培养方式进行芽诱导、芽增殖, 以筛选出合适的培养基。结果表明, 光果姜适宜的增殖培养基配方为 MS + 6-BA 5.0 mg/L + TDZ 0.2 mg/L + NAA 0.5 mg/L + 琼脂 0.7% + 蔗糖 3%, 此时丛生芽增殖系数相对最大, 为 3.44, 芽增殖时期在 20 d 左右, 平均每株新生幼苗株高为 1.53 cm, 新叶展开数为 1.80 张, 且均能自然生根; 珊瑚姜增殖诱导的最佳培养基配方为 MS + TDZ 0.1 mg/L + NAA 0.5 mg/L + 琼脂 0.7% + 蔗糖 3%, 此时芽增殖系数为 5.47, 较佳配方为 MS + 6-BA 2.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L + 琼脂 0.7% + 蔗糖 3%, 此时芽增殖系数为 4.47, 2 个配方芽增殖诱导率均达到 100%, 外植体褐化死亡率均为 0%。

关键词:光果姜; 珊瑚姜; 快繁体系; 生长调节剂; 培养基

中图分类号: S632.504⁺.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)14-0054-05

姜科植物分布于热带及亚热带地区, 兼具药用和观赏价值, 是开发新型花卉品种的重要资源。目前, 姜科花卉在南方地区已形成一定规模, 并从国内外引种了一些品种, 但很多品种都没有进行大量开发利用。若想推动其产业发展, 加快繁殖是当前必须要解决的问题^[1]。

姜科植物通常采用分切根状茎这种常规技术进行繁殖, 繁殖速度慢, 且生产规模难以扩大。组织培养快繁技术是植物短期内进行大量繁殖的有效途径, 采用茎尖、腋芽、幼茎、幼小的花序轴作为外植体^[2], 在优化组织培养体系的基础上进行组织培养, 能够提高植物的再生效率^[3], 实现姜科种苗的大量繁殖。本研究以光果姜 (*Zingiber nudicarpum*) 和珊瑚姜 (*Z. corallinum*) 为材料, 建立、优化光果姜、珊瑚姜组织培养快速繁殖体系, 以提高芽增殖诱导率, 降低外植体褐化死亡率, 缩短培养周期, 为光果姜和珊瑚姜的进一步开发利用奠定良好的基础和技术支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料

光果姜引种自海南吊罗山, 其带芽块茎采集于华南师范大学生物园内; 珊瑚姜引种自广东阳春, 其茎尖采集于广东省植物发育生物工程重点实验室前期诱导出的组培苗。6-苄氨基腺嘌呤 (6-BA)、苯基噻二唑基脲 (TDZ)、萘乙酸 (NAA), 市购。芽增殖所用基础培养基为 MS + 琼脂 0.7% + 蔗糖 3%。

1.2 试验方法

1.2.1 光果姜组培快繁体系的优化

1.2.1.1 外植体的获得 采挖光果姜带芽块茎, 放入滴有洗洁精的清水中浸泡; 用细毛刷将粘连的泥土清洗干净, 用蒸馏水冲洗 8~10 次, 在无菌操作台上用 70% 乙醇、0.1% 氯化汞溶液消毒; 用无菌水冲洗 5 次, 再用灭菌滤纸吸干表面水分, 即获得无菌外植体。

1.2.1.2 芽的诱导 将获得的无菌外植体接种在芽诱导培养基 MS + 6-BA 2.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L 上, 3 个月后即得到无菌幼苗 (图 1)。为储备足够的无菌苗用于后续芽增殖试验, 30 d 继代 1 次, 连续继代 2~3 次。

1.2.1.3 不定芽的增殖 待光果姜无菌苗长至约 5 cm 时, 切下茎基部约 0.5 cm, 接入基础培养基中添加不同生长调节剂组合的芽增殖培养基上进行培养, 每个处理接种 30 个芽, 重复 3 次。选取 6-BA、TDZ、NAA 这 3 种生长调节剂, 其组

收稿日期: 2018-03-12

基金项目: 国家自然科学基金委-广东省联合基金重点项目 (编号: U1301213); 广东省自然科学基金重点项目 (编号: 7117864); 高等学校全国优秀博士学位论文作者专项 (编号: 2007B26)。

作者简介: 李昕洋 (1993—), 女, 山西吕梁人, 硕士研究生, 从事园林植物种质资源及利用研究。E-mail: lxycherry@163.com。

通信作者: 王英强, 博士, 教授, 博士生导师, 主要研究方向为植物繁殖生态与进化生物学。E-mail: wangyq@scnu.edu.cn。

[23] 杨立桃, 赵志辉, 丁嘉羽, 等. 利用实时荧光定量 PCR 方法分析转基因水稻外源基因拷贝数[J]. 中国食品卫生杂志, 2005, 17(2): 140–144.

[24] Ding J Y, Jia J W, Yang L T, et al. Validation of a rice specific gene, sucrose phosphate synthase, used as the endogenous reference gene for qualitative and real-time quantitative PCR detection of transgenes[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2004, 52

(11): 3372–3377.

[25] Flavell R B. Inactivation of gene expression in plants as a consequence of specific sequence duplication[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1994, 91(9): 3490–3496.

[26] Vaucheret H, Bécin C, Elmayan T, et al. Transgene-induced gene silencing in plants[J]. The Plant Journal, 1998, 16(6): 651–659.