

蜀恢 881 含玉米 C₄型 *pepc* 基因改良系的遗传背景及其光合特性

何立斌^{1,2,3} 向珣朝^{1,3} 李季航^{1,3} 钟黎^{1,3} 张楷正^{1,3} 李平^{1,3,*}

(¹四川农业大学水稻研究所,四川温江 611130; E-mail:ricehlab@163.com; ²合肥丰乐种业股份有限公司,安徽合肥 230031; ³四川农业大学西南作物基因资源与遗传改良教育部重点实验室,四川雅安 625014; *通讯联系人, E-mail:liping@cngk.com)

Analysis on Genetic Background and Photosynthetic Characteristics of the Improved Shuhui 881 with Maize C₄-type *pepc* Gene

HE Li-bin^{1,2,3}, XIANG Xur-chao^{1,3}, LI Ji-hang^{1,3}, ZHONG Li^{1,3}, ZHANG Kai-zheng^{1,3}, LI Ping^{1,3,*}

(¹Rice Research Institute, Sichuan Agricultural University, Wenjiang 611130, China; E-mail:ricehlab@163.com; ²Hefei Fengle Seed Co. Ltd, Hefei 230031, China; ³Key Laboratory of Southwest Crop Genetic Resource and Improvement, Ministry of Education, Sichuan Agricultural University, Ya an 625014, China; *Corresponding author, E-mail:liping@cngk.com)

Abstract: The genetic background of ten improved plants of Shuhui 881 with maize C₄-type *pepc* gene (*pepc* Shuhui 881) were analyzed with 530 pairs of SSR primers, only 1 - 4 differential SSR loci were found compared with Shuhui 881, and the similarities of genetic background were 95.15% - 99.03%. By using *pepc* Shuhui 881 with a similarity at 99.03% as materials, the photosynthetic characteristics were determined at the six different developmental stages. The PEPCase activities in the improved Shuhui 881 were higher than those in Shuhui 881. The highest PEPCase activity was 1264.2 μmol/(mg·h) at the elongation stage and the largest increased value of PEPCase activity in the *pepc* Shuhui 881 was 23.3-fold than that in Shuhui 881 at the initial-tillering stage. The net photosynthesis rates of the *pepc* Shuhui 881 increased at the initial-tillering, full-tillering, elongation and initial-heading stages, and peaked at 22.3% at the elongation stage. The results showed that the genetic background of the *pepc* Shuhui 881 were almost the same as Shuhui 881 by molecular marker-assisted selection(MAS) and the high expression level of maize C₄-type *pepc* gene was stably inherited in indica genetic background. Therefore, the system for selecting high photosynthetic efficiency rice had been established, which included selecting rice by MAS with the characteristic primers of C₄-type *pepc* gene marker, determining PEPCase activity and net photosynthesis rate and investigating phenotype performance in field. Meanwhile, it would be better to determine photosynthetic characteristics at the elongation stage.

Key words: rice; phosphoenolpyruvate carboxylase gene; molecular marker-assisted selection; photosynthetic characteristics; genetic background

摘要: 通过分子标记辅助选择育成的含玉米 C₄型 *pepc* 基因蜀恢 881 中筛选 10 株,利用 530 对 SSR 引物进行遗传背景分析,发现与蜀恢 881 表现差异的位点仅有 1~4 个,相似度在 95.15% 以上,最高的达 99.03%。进一步对相似度为 99.03% 的转育玉米 C₄型 *pepc* 基因蜀恢 881 的 6 个生长时期测定有关光合指标,表明 6 个时期的 PEPC 酶活性均比蜀恢 881 增强,PEPC 酶活性值最大时期是拔节期,为 1264.2 μmol/(mg·h),分蘖初期增加的幅度最大达到 23.3 倍;其净光合速率与蜀恢 881 相比,在分蘖初期、分蘖盛期、拔节期和始穗期都得到不同程度的提高,其中拔节期最高,达到 22.3%。研究表明通过杂交利用 C₄型 *pepc* 基因特征引物对 C₄型 *pepc* 基因进行分子标记辅助选择,能够获得携带 C₄型 *pepc* 基因且与受体亲本遗传背景十分接近的籼型水稻材料,而且 C₄型 *pepc* 基因在新的遗传背景下能够高水平表达和稳定地遗传。据此,建立了分子标记辅助选择、光合生理生化指标鉴定和田间综合农艺性状考查相结合的筛选玉米 C₄型 *pepc* 基因水稻的技术体系;同时认为在拔节期进行转育 C₄型 *pepc* 基因水稻光合生理指标的测定和筛选的效果可能较理想。

关键词: 水稻; 磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶基因; 分子标记辅助选择; 光合特性; 遗传背景

中图分类号: Q945.11; S336; S511.01

文献标识码: A

文章编号: 1001-7216(2006)01-0031-05

Ku 等^[1]通过农杆菌介导系统,已经成功地将玉米 C₄途径中 CO₂ 固定的关键酶——磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(phosphoenolpyruvate carboxylase, PEPCase)基因导入 C₃植物水稻 Kitaake 中,并得到相当或高于玉米的表达水平。李霞等^[2]通过系统选育获得第 7 代稳定转 *pepc* 基因种质,研究表明其 PEPC 酶活性比原种高 24 倍,净光合速率比原种高 50%。然而,该转基因水稻为粳稻,生育期较短,适应性较差等因素限制了它在实际生产中的推广和应用。

李霞等^[3]、王德正等^[4]、焦德茂^[5]的研究表明通过杂交可以将转玉米 *pepc* 基因水稻的高光效特性传递到杂交稻的不育系和恢复系中去,并且能够稳定地遗传。这就为转玉米 *pepc* 基因在水稻育种的广泛应用展示了美好的前景。本研究室较早引进了转玉米 *pepc* 基因水稻 Kitaake,并开展了与四

收稿日期: 2004-11-25; 修改稿收到日期: 2005-01-05。

基金项目: 国家 863 计划资助项目(2003AA212030); 教育部长江学者和创新团队发展计划资助项目(IR T0453)。

第一作者简介: 何立斌(1974-),男,在读硕士研究生。

川生产上应用比较广泛的恢复系蜀恢 881、蜀恢 725、蜀恢 955 等进行杂交和分子标记辅助育种,经过四川温江、海南陵水两地多年多点的选育,已育成一批含玉米 *pepc* 基因的籼型高光效恢复系材料。本研究就杂交转育而成的转玉米 C₄型 *pepc* 基因的蜀恢 881 进行遗传背景分析,并就转育玉米 C₄型 *pepc* 基因蜀恢 881 的 6 个生长时期的光合特性进行了动态研究,希望能够建立筛选转育玉米 C₄型 *pepc* 基因水稻新的途径和进一步揭示控制 C₄植物光合作用的关键酶基因 C₄型 *pepc* 在导入籼型水稻或杂交稻亲本后其光合生理特性的变化,以期对水稻的高光效育种进一步提供生理上的依据。

1 材料与方法

1.1 材料

转玉米 C₄型 *pepc* 基因水稻 Kitaake (简称转 *pepc* Kitaake),由江苏省农业科学院农业遗传生理研究所焦德茂先生提供;蜀恢 881,由四川农业大学水稻研究所提供;以转 *pepc* Kitaake 为供体,蜀恢 881 为受体,于 2000 年夏在南京杂交,通过四川温江、海南陵水两地不断回交和分子标记辅助选育,育成高世代的转玉米 C₄型 *pepc* 基因蜀恢 881 (简称转 *pepc* 881)。经过目的基因检测、田间综合农艺性状的考查,最终选择 10 株转 *pepc* 881 用于遗传背景分析。选择与蜀恢 881 遗传背景相似度比较高、综合农艺性状较好的转 *pepc* 881 用于光合特性的研究。

1.2 目的基因检测

DNA 提取采用王珍等^[6]的方法,稍加改进。实验所采用的 C₄型 *pepc* 基因特征引物由本实验室通过 BLAST 设计,其引物序列为:上游引物 5' AA GCA GGGAA GCGA GACG-3', 下游引物 5' GA TTGCCGCCA GCA GTA G-3'。PCR 反应体系(25 μL):10 × 反应缓冲液 2.5 μL, dNTPs 2.0 μL (2.5 mmol/L), 引物 2.0 μL (大约 1 μmol/L), DNA 模板 2.0 μL (模板大约 50 ng), Taq 聚合酶(5 U/μL) 0.2 μL, ddH₂O 16.3 μL。PCR 反应程序:94 °C 下预变性 240 s,94 °C 下变性 30 s,53 °C 下退火 30 s,72 °C 下延伸 30 s,共 35 个循环,最后 72 °C 下保温 10 min。检测结果通过 2%~3% 琼脂糖凝胶电泳加 EB 染色,在 BIO-RAD Quantity One 凝胶成像系统上观察得到。

1.3 遗传背景分析

根据 Chen 等提供的序列信息从上海博亚公司

合成了分布于水稻基因组 12 条染色体的 530 对 RM 系列微卫星引物,对亲本蜀恢 881 和转 *pepc* Kitaake 之间的多态性进行检测分析。然后,利用得到的所有在两亲本之间有差异的 SSR 引物对 10 株携有玉米 C₄型 *pepc* 基因、综合农艺性状较好的转 *pepc* 881 和轮回亲本蜀恢 881 之间进行遗传背景分析,以明确它们与轮回亲本间的相似程度。微卫星扩增方法参照文献[7]。其中相似程度 *F* 值为共有 DNA 片段比值 (proportion of shared DNA fragment, *F*),是应用 DNA 标记研究生物起源进化和遗传变异的一个基本参数,指两个生物个体共同具有的 DNA 片段的比例,代表两个个体之间的遗传相似程度。其计算公式为: $F = 2M_{xy} / (M_x + M_y)$, 式中 M_x 和 M_y 为两个个体分别具有的 DNA 片段数, M_{xy} 为两个个体共同具有的 DNA 片段数。

1.4 PEPC 酶活性测定

参照 Kung 等^[8]和 Gonzalez 等^[9]的方法。于上午 9:30~10:00,取不同生长时期主茎的倒数第 2 叶 0.25 g,加入适量提取液(50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 1 mmol/L MgCl₂, 5 mmol/L DTT, 5% 甘油)在冰冻条件下迅速充分研磨,滤液于 13 000 × *g* 下离心 10 min,取上清液测酶活性。反应总体积 1 mL,含 50 mmol/L HEPES-KOH, pH 8.0 的缓冲液, 10 mmol/L NaHCO₃, 5 mmol/L MgCl₂, 0.2 mmol/L NADH, 2 mmol/L PEP, 1.5 U 苹果酸脱氢酶,加适量提取液。加入 PEP 后开始计时,在 754 nm 紫外分光光度计上记录 340 nm 光密度的变化,测试温度为 30 °C,据此计算 PEPC 酶活性。测定的时期为:分蘖初期、分蘖盛期、拔节期、始穗期、齐穗期及成熟期,每个时期分别测定 5 株。

1.5 净光合速率的测定

用美国 LICOR 公司生产的便携式光合测定系统 LF6400,在早上 10:00 左右,选择人工控制条件为:参比 CO₂ 浓度 400 μmol/mol,温度 30 °C,光照 1200 μmol/(m²·s),测定不同生长时期主茎的倒数第 2 叶的光合速率。测定的时期与 PEPC 酶活性测定同步,每个时期测定 5 株,每株重复测定 3 次。

2 结果与分析

2.1 目的基因检测结果

对 10 株转 *pepc* 881、蜀恢 881、转 *pepc* Kitaake,用玉米 C₄型 *pepc* 基因的特征引物进行扩增。结果如图 1,不论是转 *pepc* Kitaake,还是转 *pepc* 881 都能扩增出带型一致约 310 bp 的片段,而蜀恢

881 没有扩增出带,表明用 C₄型 *pepc* 基因特征引物能够对转玉米 C₄型 *pepc* 基因水稻植株进行准确的筛选。

2.2 转 *pepc* 881 的遗传背景分析结果

2.2.1 亲本转 *pepc* Kitaake 与蜀恢 881 在整个水稻基因组上的多态性

用 530 对 SSR 引物对两亲本转 *pepc* Kitaake 和蜀恢 881 在整个水稻基因组上进行多态性分析,结果表明有 103 对 SSR 引物表现多态性,覆盖整个水稻基因组,其中在第 2 染色体上的差异位点数表现最多,第 12 染色体上位点差异表现最少(图 2)。

2.2.2 转 *pepc* 881 与轮回亲本蜀恢 881 的相似程度

用亲本间表现差异的 103 对 SSR 引物对 10 株转 *pepc* 881 和轮回亲本蜀恢 881 进行遗传背景分析,其中图 3 所示是 103 对 SSR 引物中的一对引物 RM248 的 PCR 结果。

由表 1 可以看出,10 株转 *pepc*881 与轮回亲本蜀恢 881 的相似程度 *F* 值为 95.15%~99.03%,其 SSR 差异位点只有 1~4 个且主要集中在第 1、2、4、5 染色体上,其中有 7 个单株与蜀恢 881 仅有 1~2 个差异位点,2 个单株与蜀恢 881 的相似度达到了 99.03%,差异位点仅为 1 个且分布在第 4 染色体上,其余位点均与蜀恢 881 相同。说明通过杂交转育后,利用玉米 C₄型 *pepc* 基因特征引物对育种亲本材料进行分子标记辅助选择能够将该基因导入籼型水稻并且其遗传背景与轮回亲本十分接近。

2.3 转 *pepc* 881 的光合特性

为了进一步明确在杂交转育的基础上,利用 C₄型 *pepc* 基因特征引物进行分子标记辅助选择得到

的转 *pepc* 881 的光合特性,本研究着重测定了与蜀恢 881 遗传背景相似度达 99.03%的转 *pepc* 881 在分蘖初期、分蘖盛期、拔节期、始穗期、齐穗期和成熟期的 PEPC 酶的活性和净光合速率的变化。

转 *pepc* 881 在 6 个时期的 PEPC 酶活性各不相同(图 4-A),差异显著。在拔节期 PEPC 酶(基于单位叶绿素量)达到最大,为 1264.2 μmol/(mg·h),分蘖初期最小,为 355.0 μmol/(mg·h)。转 *pepc* 881 的 PEPC 酶活性比蜀恢 881 的显著地提高,其分蘖初期、分蘖盛期、拔节期、始穗期、齐穗期和成熟期的 PEPC 酶活性分别是蜀恢 881 的 23.3、4.4、4.4、3.7、1.3 和 3.7 倍,分蘖初期的 PEPC 酶活性提高的幅度最大。这说明通过杂交转育和利用 C₄型 *pepc* 基因特征引物进行分子标记辅助选择将玉米 *pepc* 基因导入籼型水稻蜀恢 881 后,其 PEPC 酶活性能够得到显著的增强。

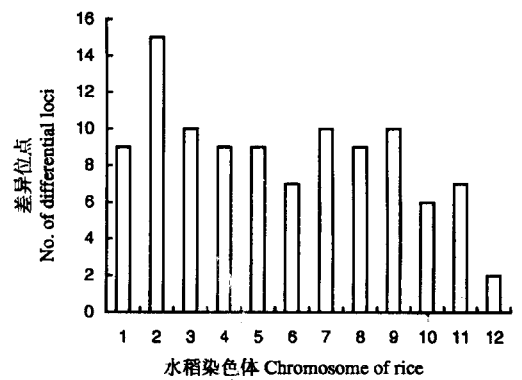


图 2 103 对差异引物在水稻染色体上的分布

Fig. 2. Distribution of 103 pairs of SSR primers on the chromosomes of rice.



图 1 转玉米 C₄型 *pepc* 基因蜀恢 881 的 PCR 筛选

Fig. 1. PCR analysis of the improved Shuhui 881 with maize C₄-type *pepc* gene.

1~10- 转玉米 C₄型 *pepc* 基因蜀恢 881 的植株;11- 蜀恢 881; 12- 转玉米 C₄型 *pepc* 基因水稻 Kitaake; M- 100 bp DNA marker.

Lanes 1 - 10, Improved Shuhui 881 with maize C₄-type *pepc* gene; Lane 11, Shuhui 881; Lane 12, Transgenic Kitaake with maize C₄-type *pepc* gene; M, 100 bp DNA marker.

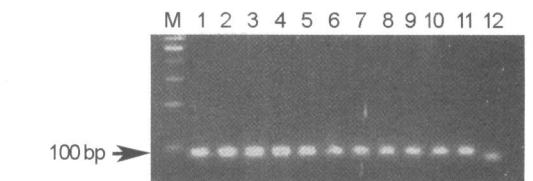


图 3 SSR 引物 RM248 在含玉米 C₄型 *pepc* 基因蜀恢 881 及其亲本遗传背景中的带型

Fig. 3. Bands showed in analysis of genetic background of Shuhui 881 with maize C₄-type *pepc* and their parents by RM248.

1~10- 转玉米 C₄型 *pepc* 基因蜀恢 881 的植株;11- 蜀恢 881; 12- 转玉米 C₄型 *pepc* 基因水稻 Kitaake; M- 100 bp DNA marker.

Lanes 1 - 10, Improved Shuhui 881 with maize C₄-type *pepc* gene; Lane 11, Shuhui 881; Lane 12, Transgenic Kitaake with maize C₄-type *pepc* gene; M, 100 bp DNA marker.

表 1 转 *pepc* 881 遗传背景分析结果

Table 1. Result of genetic background analysis of the improved Shuhui 881 with maize *pepc* gene.

株号 Plant code	检测位点数目 No. of loci tested	差异位点数目 No. of differential loci	差异标记 Differential SSR primers	差异位点在 12 条染色体中的分布	
				Distribution of differential loci on 12 chromosomes	F 值 F value/ %
1	103	2	RM307, RM413	4, 5	98.06
2	103	3	RM71, RM307, RM413	2, 4, 5	97.09
3	103	3	RM71, RM307, RM413	2, 4, 5	97.09
4	103	2	RM71, RM307	2, 4	98.06
5	103	2	RM71, RM307	2, 4	98.06
6	103	5	RM71, RM220, RM283, RM307, RM413	2, 1, 4, 5	95.15
7	103	2	RM71, RM307	2, 4	98.06
8	103	3	RM220, RM283, RM307	1, 4	97.09
9	103	1	RM307	4	99.03
10	103	1	RM307	4	99.03

转 *pepc* 881 在 6 个时期的净光合速率测定结果表明(图 4-B), 6 个时期的净光合速率存在着差异。与蜀恢 881 相比, 分蘖初期、分蘖盛期、拔节期和始穗期分别提高了 18.5%、1.4%、22.3% 和 0.3%, 其中拔节期的净光合速率提高的幅度最大, 这可能与该时期的 PEPC 酶活性最大有关。而齐穗期和成熟期的净光合速率与蜀恢 881 的相近, 这可能与这两个时期的 PEPC 酶活性提高的幅度不够大, 以至于不能够达到促进净光合速率提高的程度, 也有可能在这两个时期测定时的天气(阴雨天)有关。

3 讨论

为了克服转玉米 *pepc* 基因水稻 Kitaake 本身固有的局限性, 使它能够在育种上得到广泛的应用,

王德正等^[4,10]建立了潮霉素催芽初选、分子标记抽检、田间表型决选和生理生化指标定量鉴定的高光效水稻筛选技术体系, 并且通过该体系转育成了 3 个较稳定的高光效水稻株系。然而, 该体系表现烦琐、程序复杂、工作量大等缺点。本试验根据 *pepc* 基因相关序列, 通过比对设计了 *pepc* 基因的特征引物并且开展了分子标记辅助育种, 对转育成的转 *pepc* 基因蜀恢 881 的遗传背景分析表明这种方法能够准确地选育携带玉米 *pepc* 基因的水稻材料。进一步对其生长的 6 个关键时期光合特性的研究, 表明 6 个时期的 PEPC 酶活性得到大大的增强, 增强幅度最高的达到 23.3 倍; 分蘖初期、分蘖盛期、拔节期和始穗期的净光合速率也得到了不同程度的提高, 提高幅度最大的达到 22.3%。同时也表明玉米 C₄ 型 *pepc* 基因通过杂交转育到新的遗传背景下

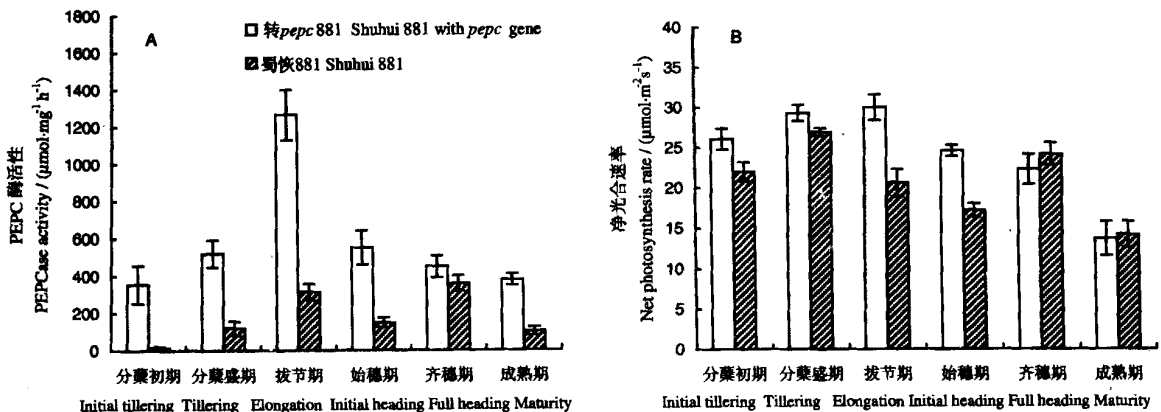


图 4 不同时期转 *pepc* 881 和蜀恢 881 的 PEPC 酶活性(A)和净光合速率(B)

Fig. 4. PEPCase activities (A) and net photosynthesis rate (B) of the improved Shuhui 881 with maize C₄-type *pepc* gene and Shuhui 881 at different developmental stages.

仍表现高水平表达。因而,利用 C₄型 *pepc* 基因的特征引物进行分子标记辅助选择和生理生化指标定量鉴定以及结合综合农艺性状的考查就能够筛选出携带玉米 *pepc* 基因的高光效水稻材料。该方法最大优点是简易、检测迅速准确、工作量较小。

本试验在研究转玉米 C₄型 *pepc* 基因蜀恢 881 的 6 个时期的 PEPC 酶活性和净光合速率时,不同时期表现差异较大,这就启示在杂交转育转 *pepc* 基因水稻时,应重视对后代转基因表达水平的筛选,选择适宜的时期进行筛选是十分必要的。王德正等^[11]在研究中也提出了重视对 *pepc* 基因在转育水稻后代的筛选问题。以光合速率高低作为水稻高光效育种的指标的适宜测定时期,屠曾平和刘贞琦分别认为水稻叶片光合速率以分蘖期和抽穗期叶片光合速率为最高,而王永锐对杂交水稻稻谷产量优势的预测结果认为,以测定分蘖期和乳熟期叶片的光合速率为宜^[12]。就本试验而言,拔节期的 PEPC 酶活性和净光合速率均达到最大,在该时期进行高光效材料的光合生理指标的测定筛选可能达到较理想的效果。

然而,水稻的光合特性在不同的单株、不同的叶位和不同的年份间存在着差异^[12]。本研究表明转玉米 *pepc* 基因蜀恢 881 在始穗期、齐穗期和成熟期的净光合速率提高不明显,而钟黎^[13]研究表明转玉米 *pepc* 基因蜀恢 881 的 BC₁ 在抽穗期的净光合速率比蜀恢 881 提高了 38% 左右,这说明在分析玉米 *pepc* 基因通过杂交转育到水稻尤其是籼稻中的基因效应时,有必要对转玉米 *pepc* 基因水稻的光合特性进行相同样本的多年、多点、不同世代和不同生育时期的深入研究。

参考文献:

- 1 Ku S B M, Sakiko A, Mika N, et al. High level expression of maize phosphoenolpyruvate carboxylase in transgenic rice plants. *Nat Biotechnol*, 1999, 17:76-80.
- 2 李霞,吴爽,焦德茂,等. 转 *pepc* 基因水稻的选育. *江苏农业学报*, 2001, 17(3):143-147.
- 3 李霞,焦德茂,戴传超,等. 转育 PEPC 基因的杂交水稻的光合生理特性. *作物学报*, 2001, 27(2):137-143.
- 4 王德正,焦德茂,吴爽,等. 转玉米 PEPC 基因的杂交水稻亲本的选择. *中国农业科学*, 2002, 35(10):1165-1170.
- 5 焦德茂. 运用光合机理揭示生理育种途径. 北京:中国农业出版社, 2002:57-64.
- 6 王珍,方宣钧. 分子植物育种实验室方法(一):植物 DNA 分离. *分子植物育种*, 2003, 1(2):281-288.
- 7 Zheng K L, Huang N, Bennett J, et al. PCR-based marker-assisted selection in rice breeding. *IRRI Discussion Paper Series*, No. 12. Manila: IRRI, 1995:1-24.
- 8 Kung S D, Chollet R, Marsho T V. Crystallization and assay procedures of tobacco ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase. *Method Enzymol*, 1980, 69:326-335.
- 9 Gonzalez D H, Iglesias A A, Andreo C S. On the regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase activity from maize leaves by L-malate: Effect of pH. *Plant Physiol*, 1984, 116:425-430.
- 10 王德正,迟伟,王守海,等. 转 C₄ 光合基因水稻特征特性及其在两系杂交稻育种中的应用. *作物学报*, 2004, 30(3):248-252.
- 11 王德正,王守海,吴爽,等. 玉米 PEPC 基因在杂交转育的转基因水稻后代中的传递和表达特征. *遗传学报*, 2001, 31(2):195-201.
- 12 王永锐. 水稻生理育种. 北京:科学技术文献出版社, 1995:25-31.
- 13 钟黎. 玉米 *pepc* 基因导入籼稻恢复系及高光效材料的创制 [学位论文]. 温江:四川农业大学, 2002:22-25.