

# 转水稻 *osRACD* 反义基因拟南芥植株的育性分析\*

叶建荣<sup>1</sup> 黄美娟<sup>2</sup> 吴乃虎<sup>1\*\*</sup>

1. 中国科学院遗传与发育生物学研究所, 北京 100080; 2. 北京大学生命科学学院, 北京 100871

**摘要** 利用反义 RNA 技术, 将水稻低分子量 GTP 结合蛋白基因 *osRACD* 反向置于 CaMV 35 S 启动子的调控下, 构成反义基因表达载体 pBID, 并用真空渗透法转化拟南芥植株. 转基因植株的荚果自花谢之后就停止生长, 其后荚果便自顶端开始逐渐枯黄并死亡; 而对照植株的荚果在花谢之后仍继续生长直到成熟. 花粉离体萌发生长实验显示, 转基因植株花粉萌发后的生长延伸过程受到抑制, 形成短而略粗的花粉管; 而对照植株花粉萌发后的生长状况正常, 形成长圆柱形的花粉管. 这些结果表明, *osRACD* 基因的功能是参与控制花粉管的生长延伸过程, 其编码的蛋白质可能是调控光敏核不育水稻 58 S 育性的重要因子之一.

**关键词** 水稻 *osRACD* 基因 拟南芥 转基因

G 蛋白是真核生物信号传导通路上的关键分子开关, 它在与 GTP 结合的活性状态和与 GDP 结合的失活状态之间循环. 已知的信号分子 G 蛋白主要有两类, 即异源三聚体 G 蛋白和低分子量 GTPase 的 Ras 超家族<sup>[1]</sup>. 作为信号分子的低分子量 GTPase 的 Ras 超家族是由 RAS, RHO, RAB/YPT, ARF 和 RAN 等 5 个家族组成, 但其中只有 RAS 和 RHO 被认为是真正的信号蛋白<sup>[1]</sup>, 而 RAB/YPT, ARF 和 RAN 则直接参与囊泡或核运输的调节<sup>[2~4]</sup>. RHO 家族由 Rho, Rac, Cdc42 这 3 个亚类和几个单基因成员组成<sup>[1]</sup>. 哺乳动物的细胞学研究表明, Rac 亚类的低分子量 GTP 结合蛋白参与调控细胞极性建立、细胞骨架的形成、细胞凋亡、细胞内活性氧的产生、细胞增殖、细胞分裂、细胞分化等多种生命活动<sup>[5,6]</sup>.

自从 1993 年 Yang 等<sup>[7]</sup>从豌豆中首次分离到第一个编码类 RHO 的植物 GTPase 基因 *Rho1Ps* 以来, 已陆续从不同植物中克隆到相当数量的类 *Rho1Ps* 基因<sup>[8]</sup>. 几乎所有的这些基因, 都属于命名为 Rop(RHO-related GTPase from plants) 的独特 RHO 亚类. 由于 Rop 与 RHO GTPase 的 Rac 亚类

的总体同源性较高, 所以植物 RHO 相关的 GTPase 在文献中曾常被命名为 Rac. 但系统进化树和序列比较分析表明, Rop 与动物中其他 RHO GTPase 亚族完全不同, Rop 是植物特异的, 而且植物中明显没有 Rho, Rac 和 Cdc42 亚类<sup>[1]</sup>. 近期对一些植物特异的 Rop 亚类的研究表明, 高等植物 Rop 亚类低分子量 GTP 结合蛋白除了参与调控肌动蛋白依赖的花粉管生长之外, 还与依赖 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的防卫反应、胚的发育、种子休眠、幼苗发育、侧根起始、芽中侧生器官形态建成, 以及芽顶端优势等生理功能调节的信号传导通路密切相关<sup>[8~10]</sup>.

本实验室米志勇等<sup>[11]</sup>利用 DDRT-PCR 技术, 从水稻中分离到了一个植物特异的 Rop 亚类低分子量 GTP 结合蛋白基因 *osRACD*, 它在可育材料农垦 58N 和农垦 58S-SD 中均可正常表达, 但在不育的材料 58S-LD 中不表达. 序列比较分析表明, *osRACD* 与从拟南芥中所分离得到的 11 个 Rop 基因的核苷酸同源性都很高, 而且与植物中首次分离所得到的 *Rho1Ps* 的核苷酸同源性达 79.7%<sup>[7]</sup>. 为了阐明 *osRACD* 的生物学功能, 本实验利用反义 RNA 技术, 将该基因反向置于 CaMV35 S 启动子的调控

2002-10-09 收稿, 2002-11-29 收修改稿

\* 国家科技部转基因植物研究专项(J00-A-005)、国家重大基础理论研究项目(2001CB1088)和国家“八六三”计划(2002A224061)资助项目

\*\* 联系人, E-mail: nhwu@public3.bta.net.cn

下, 转入拟南芥植株, 观察转基因植株的生物学性状的变化.

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

(i) 植物材料. 拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 为 Landsberg 生态型, 由中国农业大学武维华教授惠赠. (ii) 菌种和质粒. 根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) XL1-BLUE 菌株及质粒载体 pBI121 为本实验保存, pGEM-T-easy 载体购自 Promega 公司. (iii) 酶和试剂. 限制性内切酶和 T<sub>4</sub>DNA 连接酶均购自 GIBCO BRL 公司. 其他试剂均为国产分析纯.

### 1.2 植株真空渗透转化及 T<sub>1</sub> 代转基因植株的筛选

转化所用材料为种植于温室内即将开花的拟南芥植株, 参照 Clough 等<sup>[12]</sup>的方法进行. 收集经农杆菌侵染的植株自花授粉所结的荚果, 并将如此得到的 T<sub>1</sub> 代种子用 0.1% 琼脂糖重悬后(大约 1000 粒种子/mL) 播种于筛选培养基 MS + 卡那霉素 60 mg/L + 琼脂粉 8 g/L 上<sup>[13]</sup>. 一周之后, 将长出小苗的平皿移放于 4℃ 冰箱中春化 2 d 后将小苗移栽于土壤中, 置温室内生长到开花结果.

### 1.3 T<sub>1</sub> 代转基因植株基因组 DNA 的 PCR 和 Southern 杂交分析

用 CTAB 法<sup>[14]</sup>提取拟南芥植株基因组 DNA. 利用构建载体时所用的引物 P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub> 对转基因拟南芥植株总 DNA 进行 PCR 扩增, 两个引物之间的距离约为 830 bp. Southern 杂交时, 取 20 μg 拟南芥叶片总 DNA 经限制性内切酶 *Hind* III 和 *Bam* HI 双酶切消化, 0.8% 琼脂糖凝胶电泳分离; 用毛细管法将 DNA 转移至尼龙膜上, 以随机引物标记试剂盒 (Promega 公司) 制备 α-<sup>32</sup>P dCTP 标记的 CaMV 35 S 启动子 DNA 序列作为探针进行杂交, 具体方法按文献<sup>[15]</sup>进行.

### 1.4 花粉离体萌发

参照文献<sup>[16]</sup>的方法, 收集种植于温室内的拟南芥植株抽苔后 1~2 周内开花的花粉, 室温下干燥 2 h 以上, 然后将花粉点播于花粉离体萌发培养基上. 培养基成分为 18% 蔗糖, 0.01% 硼酸钠, 1 mmol/L Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 1 mmol/L CaCl<sub>2</sub>, 1 mmol/L MgSO<sub>4</sub> 和 0.5% 的琼脂粉. 放置室温下萌发 6 h 后, 用 35 mm 的照相机于光学显微镜下观察, 拍照.

## 2 结果

### 2.1 反义表达载体 pBID 的构建与鉴定

为了利用转基因拟南芥研究 *osRACD* 的生物学功能, 构建了反义表达载体 pBID, 利用 CaMV35 S 启动子驱动其表达. 根据 *osRACD* cDNA 的 5'-UTR 和 3'-UTR 序列设计了一对分别含 *Sst* I 和 *Bam* HI 酶切位点的引物 P<sub>1</sub> 和 P<sub>2</sub>, P<sub>1</sub>: 5'GA GAG CTC TGA GGT CCG TGG C 3'(划线部分为 *Sst* I 酶切位点), P<sub>2</sub>: 5'CA GGA TCC CAA AGG CAG GAG GAC T 3'(划线部分为 *Bam* HI 酶切位点). 以克隆有 *osRACD* 基因全长 cDNA 的 pBS 质粒 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 将其产物与 pGEM-T-easy 载体连接后, 转化大肠杆菌 XL1-Blue 菌株. 经测序鉴定后, 提取转化子菌落的质粒 DNA, 经 *Sst* I 和 *Bam* HI 酶切消化后, 电泳回收分子量约为 830 bp 的片段, 将此片段与同样用 *Sst* I 和 *Bam* HI 双酶切质粒 pBI121 后得到的 11.13 kb 大片段连接, 并转化 XL1-Blue, 这样就得到将 *osRACD* 全长 cDNA 反向置于 CaMV 35 S 启动子调控下的重组质粒 pBID. 同时, 将去掉 1.87 kb 的 *GUS* 基因编码区的 pBI121 质粒 DNA 部分补平后自连, 并转化 XL1-Blue, 获得对照质粒 pBI(图 1). 经 *Sst* I 和 *Bam* HI 酶切消化质粒 pBID 和 pBI, 电泳、转膜和 Southern 杂交分析后, 证明本实验构建的反义表达载体 pBID 中含有 *osRACD* 基因全长 cDNA, 而对照空载体 pBI 中则无杂交信号(图未示出).

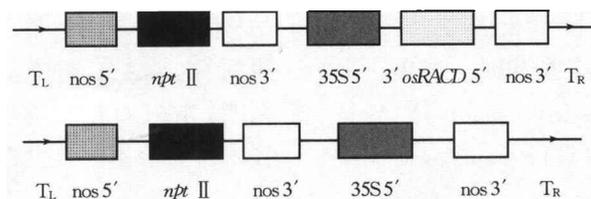


图 1 反义表达载体 pBID(上图)和对照空载体 pBI(下图)的结构示意图

*OsRACD* cDNA 反方向插入到 CaMV35 S 启动子和 nos 终止区之间并受其调控, *npt II* 基因作为转基因拟南芥植株的选择标记

## 2.2 转基因拟南芥植株的分子检测

将反义表达载体 pBID 和对照空载体 pBI 用电激法分别转化农杆菌 EHA105. 再通过真空渗透法将含有该表达载体的农杆菌浸染拟南芥花序. 获得的转基因 T1 代种子, 播种在含卡那霉素的培养基中来筛选转基因拟南芥植株. 作为阳性对照, 我们还转化并获得了仅含有空载体 pBI 的转化拟南芥植株.

将筛选出来的抗卡那霉素的拟南芥植株栽种于花盆内, 提取抽苔后植株丛生叶的基因组 DNA, 进行 PCR 分析和 Southern 杂交鉴定. 结果表明, 本实验随机挑选检测的经抗卡那霉素筛选后所生长的植株, 都能扩增得到 1 条分子量约为 830 bp 的特异条带, 而转化 pBI 的阳性对照植株中则无此特异扩增条带(图 2). 在 PCR 分析的基础上, 用限制性内切酶 *Hind*III 和 *Bam*HI 消化这些植株的基因组 DNA, 切下含 CaMV 35 S 启动子的 DNA 序列, 加样于 0.8% 的琼脂糖凝胶进行电泳分离, 转膜后与 <sup>32</sup>P 标记的 CaMV 35 S 启动子序列作为探针进行 Southern 杂交, 都得到相应的杂交条带(图 3). 这说明获得了转反义 *osRACD* 基因的转基因拟南芥植株.

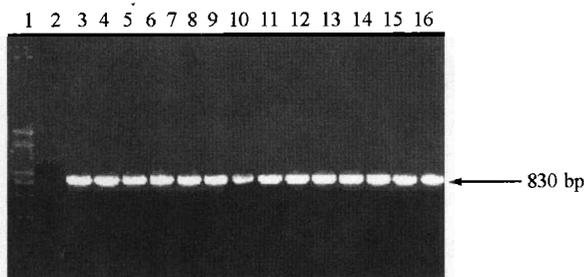


图 2 转基因拟南芥植株的 PCR 扩增鉴定

1. DNA 标志: 3 kb, 2 kb, 1 kb, 750 bp, 500 bp, 200 bp;
2. 对照植株; 3~16. 转基因植株

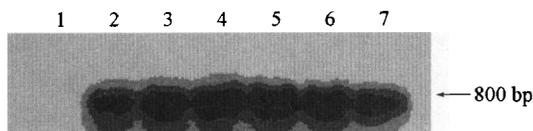


图 3 转反义 *osRACD* 基因拟南芥植株的 Southern 杂交鉴定

1. 阴性对照植株; 2~7. 转基因植株

## 2.3 转基因植株的育性分析

转基因植株从种子萌发到抽苔开花期间均未观察到异常表型, 即在此阶段, 与野生型植株相比其表型没有发生任何改变. 但在花凋谢后所结的荚果

表型比较中发现有显著差异(图 4). 育性分析以 9 周龄内开的花和所结荚果为统计依据. 随机调查 100 株转基因植株的育性, 结果显示转基因拟南芥植株的育性状态有 3 种不同的情况. 第 1 种情况为完全败育, 占 26%, 表现为所结的荚果自花凋谢后就停止生长, 大小仅为 2~3 mm, 细小枯黄, 荚果内没有一粒种子(图 4); 第 2 种情况为大部分败育, 占 64%, 表现为每株有 1~4 个荚果有部分种子, 但其数量要比正常荚果的少得多, 大多仅有 1~10 粒/荚, 且荚或为不正常形(粗短)或为底部有几粒种子, 荚顶部枯死, 其余的荚全为败育形; 第 3 种情况为正常可育, 占 10%, 荚果较大, 与正常对照植株的差不多, 但每株所结的荚果数目不定, 且每株仍有不少败育的荚果出现.

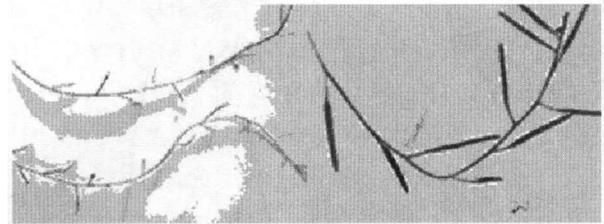


图 4 转反义 *osRACD* 基因拟南芥植株的育性分析

左图示转基因植株败育的荚果; 右图示对照植株发育正常的荚果

## 2.4 转基因植株的花粉离体萌发

以上结果说明, 转基因植株的花器官没有发生正常的受精过程, 也就是说有可能是因为转基因植株花器官发生了变异或败育, 导致无法完成正常的受精过程从而表现出败育. 为此, 本实验参照 Li 等的方法<sup>[16]</sup>, 取对照植株花粉与转基因植株花粉, 同时播种于同样的培养基中进行离体花粉萌发比较实验. 结果如图 5 所示, 对照植株花粉正常萌发, 花粉管成为长长的小圆柱形; 而转基因植株的花粉萌发后, 花粉管生长比对照植株的慢得多, 但形态基本相同, 只是花粉管比对照的短而略粗, 这可能是由于 Golgi 囊泡在顶端积累并在一较大区域融合造成的, 即花粉萌发后花粉管不能正常生长, 受到阻碍, 整体花粉管短而略粗. 这表明, 由转入的反义 *osRACD* 基因抑制了拟南芥中同源基因的正常表达, 致使花粉管无法正常生长延伸, 最终导致了败育, 从而证实了 *osRACD* 蛋白质是花粉管生长延伸调控中的重要成分. 其编码基因的功能显然是与育性密切相关的.

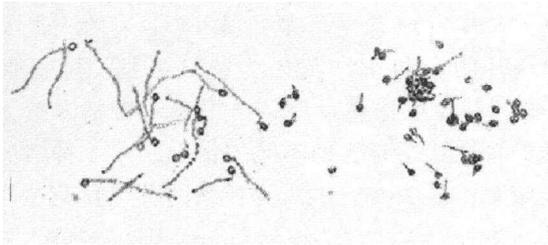


图5 拟南芥的花粉离体萌发

左方示对照植株的花粉管正常生长；右方示转反义 *osRACD* 基因植株的花粉萌发后，花粉管的生长受抑制

### 3 讨论

#### 3.1 光敏核不育水稻农垦 58 S 育性转换和 *osRACD* 基因的相关性研究

光敏核不育水稻农垦 58 S, 是我国已故的农业科学家石明松先生于 1973 年在大田中发现的一种晚粳水稻品种 58 N 的自然突变体. 它具有在长日照高积温环境条件下导致雄性不育, 而在短日照低积温环境条件下雄性可育的光周期育性转换遗传特征<sup>[17]</sup>. 经过以水稻泛素蛋白基因为内标的 RT-PCR 检测, *osRACD* 基因的组织特异性表达模式分析<sup>[11]</sup>, 大肠杆菌中表达的 *osRACD* 蛋白质体外功能鉴定, *osRACD* 蛋白质三维结构预测, *osRACD* 基因原位杂交研究, *osRACD* 基因启动区顺式元件鉴定及其与水稻幼穗蛋白质提取物的凝胶阻滞实验等(本实验室未发表材料), 均表明本实验室分离的水稻 *osRACD* 基因可能是控制农垦 58 S 光周期育性转换特性和光信号传导通路上的一个重要基因, 其功能是与水稻光敏核不育性状明显相关的. 本研究应用转反义 *osRACD* 基因技术培育的转基因拟南芥荚果不存在一粒正常的种子, 这种败育现象有力地支持了本结论的正确性.

#### 3.2 Rop GTPase 与花粉的萌发和生长

拟南芥花粉中有 3 个 *osRACD* 的同源基因, 即 *Rop3At*, *Rop5At/Rac2* 和花粉特异的 *Rop1At*<sup>[18]</sup>. 研究表明, 在花粉管生长过程中, *Rop1At* 不仅对生长位点的确定起关键作用, 而且还控制花粉管延长的速率. 用 GFP-*Rop1At* 融合蛋白在花粉管质膜中的定位研究表明 *Rop1At* 是定位于质膜顶端的, 这种极性定位对于顶端生长位点是关键的<sup>[16]</sup>. 显性无功能(DN-*Rop1At*)突变体的花粉管生长受到抑制, 但花粉管形状却没有显著改变, 只是直径略有增大, 这与本实验转反义 *osRACD* 基因拟南芥花粉管生长延伸受抑制相同(图 5). 在转基因拟南芥中,

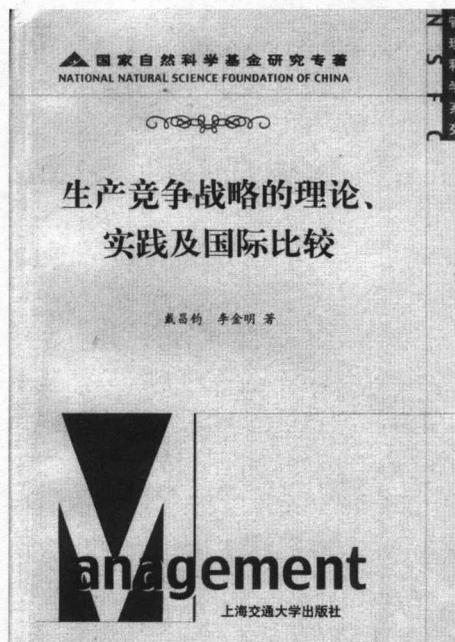
反义 *Rop1At* 的表达对花粉管生长的抑制效应比显性无功能突变体要小得多<sup>[19]</sup>. Lin 等对豌豆中 *osRACD* 的同源基因 *Rho1Ps* 的研究发现, 当用抗 *Rho1Ps* 的抗体显微注射入豌豆花粉管后, 能够完全抑制豌豆花粉管的生长<sup>[20]</sup>. 如果拟南芥花粉管中所有 Rop GTPase 完全失活, 花粉管的萌发便会被抑制<sup>[16]</sup>. 顶端定位的活性 ROPs 通过调控两个至关重要的下游途径来调节花粉管生长, 一是产生顶端集中的胞内  $Ca^{2+}$  梯度, 二是动态顶端 F 肌动蛋白的组装. ROPs 可能是分别激活这两个相关途径, 导致肌动蛋白组装和顶端  $Ca^{2+}$  积累<sup>[9,21]</sup>. 因此, 转反义 *osRACD* 基因拟南芥中所观察到的荚果败育和花粉管生长延伸受抑制等表明, *osRACD* 基因不仅在核苷酸序列上与花粉特异的 *Rop1At* 同源性高达 76.1%, 而且在功能上也是非常保守的, 即可能通过调控花粉管生长的机制来参与光敏核不育水稻农垦 58 S 光周期花粉育性转换.

反义 *osRACD* 基因在拟南芥植株中的表达, 导致转基因植株的育性下降间接说明了 *osRACD* 基因与光敏核不育水稻的育性相关. 近期我们将 *osRACD* 基因正向转入光敏核不育水稻农垦 58 S 中表达, 结果显示在长日照条件下, 有近 100 株转基因 58 S 植株的育性得到很大程度的恢复, 而约 200 株表达反义 *osRACD* 基因的农垦 58 N 水稻植株的结实率则明显下降(待发表的结果). 这些结果进一步说明 *osRACD* 基因有可能参与光敏核不育水稻农垦 58 S 的光周期育性转换遗传性状的调控, 有关这方面的研究目前正在进行之中.

### 参 考 文 献

- Zheng Z L, et al. The Rop GTPase: An emerging signaling switch in plants. *Plant Mol Biol*, 2000, 44(1): 1
- Moore M S, et al. The GTP-binding protein Ran/TC4 is required for protein import into the nucleus. *Nature*, 1993, 365: 661
- Stamnes M A, et al. The binding of AP-1 clathrin adaptor particles to Golgi membrane requires ADP-ribosylation factor, a small GTP-binding protein. *Cell*, 1993, 73: 999
- Lazar T, et al. Vesicular transport: How many Ypt/Rab-GTPase make a eukaryotic cell? *Trends Biochem Sci*, 1997, 22: 468
- Alan H. RHO GTPase and the actin cytoskeleton. *Science*, 1998, 279: 509
- Pontus A. Effectors for the Rho GTPase. *Curr Opin in Cell Bio*, 1999, 11: 95
- Yang Z, et al. Molecular cloning and characterization of rho, a ras-related small GTP-binding protein from the garden pea. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90: 8732

- 8 Li H, et al. The Rop GTPase switch controls multiple developmental processes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2001, 126(2): 670
- 9 Fu Y, et al. Rop GTPase-dependent dynamics of tip-localized F-actin controls tip growth in pollen tubes. *J Cell Biol*, 2001, 152(5): 1019
- 10 Oo E, et al. Essential role of the small GTPase Rac in disease resistance of rice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(2): 759
- 11 米志勇, 等. 水稻低分子量 GTP 结合蛋白基因的分离. *科学通报*, 2000, 45(19): 2047
- 12 Clough S, et al. Floral dip: A simplified method for *Agrobacterium* mediated transformation of *Arabidopsis*. *Plant J*, 1999, 16: 735
- 13 Christine D, et al. Female reproductive tissues are the primary targets of *Agrobacterium* mediated transformation of *Arabidopsis* by floral dip method. *Plant Physiology*, 2000, 123: 895
- 14 Saghai-Marouf M A, et al. Ribosomal DNA spacerlength polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984, 81: 8014
- 15 Sambrook J, et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 6.33~6.62
- 16 Li H, et al. Control of pollen tube tip growth by a Rop GTPase-dependent pathway that leads to tip-localized calcium influx. *Plant Cell*, 1999, 11(9): 1731
- 17 石明松. 对光照长度敏感的隐性雄性不育水稻的发现与初步分析. *中国农业科学*, 1985, (2): 44
- 18 Li H, et al. *Arabidopsis* Rho-related GTPases: Differential gene expression in pollen and polar localization in fission yeast. *Plant Physiol*, 1998, 118(2): 407
- 19 Zheng Z L, et al. The Rop GTPase switch turns on polar growth in pollen. *Trends Plant Sci*, 2000, 5(7): 298
- 20 Lin Y, et al. Inhibition of pollen tube elongation by microinjected anti-Rho1Ps antibodies suggests a crucial role for Rho-type GTPase in the control tip-growth. *Plant cell*, 1997, 9: 1647
- 21 Yang Z. Small GTPase: Versatile signaling switches in plants. *Plant Cell*, 2002, suppl: 375



国家自然科学基金研究专著

《生产竞争战略的理论、实践及国际比较》戴昌钧等 编著

上海交通大学出版社 定价: 19.00 元

本书较为全面地总结生产系统的竞争和战略功能, 内容包括: (1) 生产战略的基本框架; (2) 生产竞争战略的国际比较; (3) 我国制造业企业生产竞争的现状以及与其他国家的比较; (4) 生产竞争战略设计的方法程序; (5) 21 世纪生产管理技术发展的新动向。

本书为国家自然科学基金项目研究成果, 可供生产管理、运作管理的科研工作者以及制造业企业生产管理人员参考, 也可作为生产运作管理专业研究生的教学参考书。