

转 $P_{SAG12-ipt}$ 基因水稻叶片中叶绿体超微结构的变化

王亚琴¹, 夏快飞²

(1. 华南理工大学 生物科学与工程学院, 广东 广州 510640; 2. 中山大学 生命科学学院, 广东 广州 510275)

摘要: 研究了转 $P_{SAG12-ipt}$ 基因水稻和对照植株发育过程中叶片中的叶绿体结构的变化。发现水稻发育到乳熟期, 转基因植株叶片中的叶绿体与对照植株开始出现明显的差别。对照叶绿体中嗜锻体体积增大, 数目增多, 大部分基粒的类囊体膜膨胀、裂解, 片层结构解体。而转基因植株叶片中的叶绿体结构变化不大, 嗜锻体相对有所增加, 但体积较小, 大部分基粒类囊体片层结构仍然排列整齐, 少数类囊体垛叠化丧失。

关键词: $P_{SAG12-ipt}$ 基因; 叶绿体; 超微结构

中图分类号: Q942.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2006)05-0570-03

Ultrastructure changes of chloroplast in leaves of transgenic rice ($P_{SAG12-ipt}$)

WANG Ya-qin¹, XIA Kuai-fei²

(1. *College of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China;* 2. *School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China*)

Abstract: The structure of chloroplast was investigated during its development in transgenic rice ($P_{SAG12-ipt}$) and control. The results revealed that there was an obvious differentiation of chloroplasts between transgenic rice and control during milky ripe stage. In control, the size and number of osmiophilic granules increased greatly and the thylakoid membrane of most grana swelled and split and most grana lamellae disappeared. Whereas in transgenic rice, only the number of osmiophilic granules increased and most grana-thylakoid lamellae arranged in order.

Key words: $P_{SAG12-ipt}$ gene; chloroplast; ultrastructure

自 Gan and Amasino(1995)将高度衰老特异性启动子 P_{SAG12} 与 ipt 编码序列融合设计了自我调控衰老抑制系统 $P_{SAG12-ipt}$ 以来, 已有不少研究者利用此系统转化了农作物、花卉、水果、蔬菜及其它物种 (Chen 等, 2001; Geng 等, 2001; McCabe 等, 2001; Lin 等, 2002), 并证明此基因的表达在一定程度上可以延缓叶片衰老, 提高作物产量, 延长花卉的保鲜期、蔬菜和水果的贮藏期。但对于转化后植株的各项指标并没有人进行系统的分析, 作者将 $P_{SAG12-ipt}$ 转入籼稻不育系中 A 后, 曾详细比较了转化植株与对照植株在农艺性状、生理特性、叶片的细胞分裂素

含量等方面的差别 (王亚琴等, 2004, 2005)。在此基础上, 作者进一步对 $P_{SAG12-ipt}$ 转化植株和对照植株不同发育时期叶片中的叶绿体结构变化进行了详细的研究, 旨在从细胞超微结构方面验证叶片衰老抑制基因 $P_{SAG12-ipt}$ 在转化植株中的表达情况, 验证 $P_{SAG12-ipt}$ 转基因植株的延衰性能。

1 材料与方法

供试材料: 为籼稻不育系中 A 的 $P_{SAG12-ipt}$ 基因转化植株 (R_0) 和非转化植株, 分别于抽穗期、灌浆

收稿日期: 2005-12-12 修回日期: 2006-05-18

基金项目: 广东省国际合作项目(2004B50201021)[Supported by the Funds of International Cooperation of Guangdong Province (2004B50201021)]

作者简介: 王亚琴(1972-), 女, 山西忻州人, 博士, 讲师, 从事植物基因工程与生物制药的教学与科研, (E-mail)yqwang@scut.edu.cn.

期、乳熟期及成熟期选取植株主穗的剑叶下第一叶。

超微结构的制样与观察: 在水稻发育四个时期(抽穗期、灌浆期、乳熟期、成熟期), 取主穗剑叶下的第一片叶(每个时期至少取 5 株), 用锋利的刀片沿着与叶脉平行的方向将材料切成 $1 \times 1 \text{ mm}^2$ 的细条, 迅速投入预冷的 2% 戊二醛(用 2 mol/L 的磷酸缓冲液配制, pH7.2), 抽气直到细条下沉, 4°C 固定过夜。然后, 用 0.1 mol/L 磷酸缓冲液(pH7.2) 洗涤, 共 6 次, 15~20 min/次。用 1% 锇酸于 4°C 后固定过夜, 用 0.1 mol/L 磷酸缓冲液(pH7.2) 冲洗, 共 6 次, 15~20 min/次。逐级酒精脱水, 环氧丙烷过渡, Epon812 树脂包埋, Leica Ultra-S 切片超薄片(每个时期至少切 3 个样), 醋酸双氧钨和柠檬酸铅染色, JEM-1010 电子透射显微镜下 90 kv 观察并拍片。

2 实验结果

2.1 抽穗期转基因植株与对照的叶绿体形态观察

在水稻抽穗期, 转化植株和对照植株叶肉中的叶绿体形态结构发育正常, 基粒完整, 类囊体片层结构排列整齐, 叶绿体内很少有嗜锇体(图版 I : A, A-1, a, a-1)。

2.2 灌浆期转基因植株与对照的叶绿体形态观察

到了灌浆期, 对照植株叶肉中的叶绿体内嗜锇体增加, 较多基粒类囊体片层结构发生扭曲、膨胀, 膜变得松弛、膨胀。而转基因植株中的叶绿体仍保持较为完整的结构, 只有极少数的类囊体发生结构的变化, 膜出现轻微的扭曲(图版 I : B, B-1, b, b-1)。

2.3 乳熟期转基因植株与对照的叶绿体形态观察

水稻发育到乳熟期, 对照植株叶片中的叶绿体与转化植株的差别更为显著。对照植株叶绿体中的嗜锇体体积增大, 数目显著增加, 大部分基粒的类囊体膜膨胀、裂解, 片层结构解体。而转化植株叶片中的叶绿体结构较灌浆期变化不大, 仍然保持较为完整的结构, 嗜锇体数目有所增加, 但体积较小, 基粒中类囊体片层结构大部分排列整齐(图版 I : C, C-1, c, c-1)。

2.4 成熟期转基因植株与对照的叶绿体形态观察

到了水稻发育晚期(即成熟期), 对照植株叶片中的叶绿体中的嗜锇体数量、体积较乳熟期增加一倍多, 几乎所有基粒的类囊体膜都膨胀、裂解, 片层结构消失。转化植株叶片的叶绿体中嗜锇体数目也明显增多, 体积增大, 但仍有部分基粒的类囊体保持

垛叠状排列, 只是片层结构较松散, 且有大量淀粉粒出现(图版 I : D, D-1, d, d-1)。

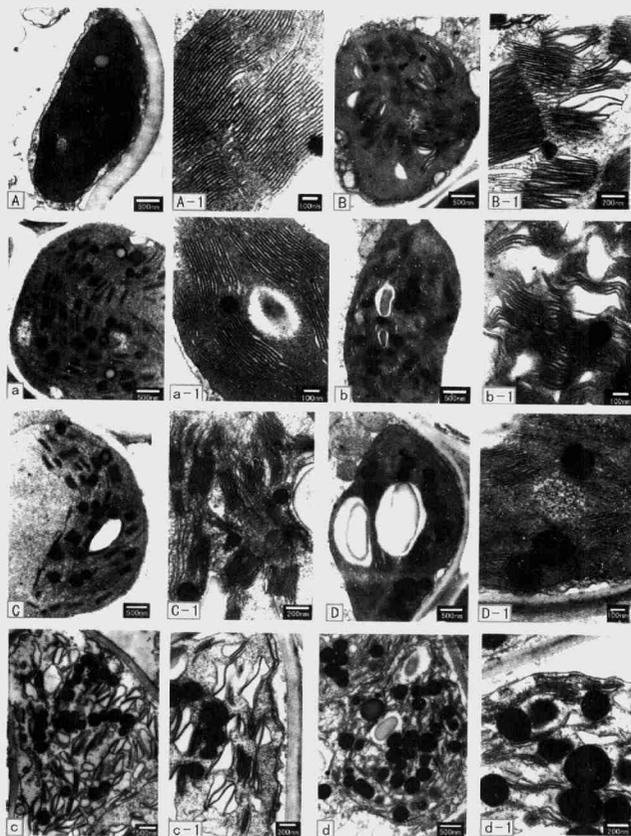
3 讨论

在叶片衰老期间, 叶绿体超微结构呈现一个明显有序的变化过程: 类囊体膜首先松弛、膨胀、裂解, 其中基质片层的变化先于基粒片层; 伴随基质蛋白、核糖体等数量或基质或叶绿体电子密度下降, 嗜锇体数目不变或逐渐增加, 体积也不断增大, 随后, 整个类囊体膜片层系统逐渐裂解为泡或板。叶绿体被膜始终保持完整性至最后, 其外层膜裂解先于内层膜(沈成国等, 2001)。本研究观察水稻不同生育期的叶绿体形态变化过程, 发现水稻发育到乳熟期, 对照植株叶片的叶绿体与转化植株开始出现明显不同。对照植株叶片中的叶绿体中的嗜锇体体积增大, 数量增加, 大部分基粒的类囊体膜膨胀、裂解, 片层结构解体。而转化植株叶片中的叶绿体结构较灌浆期变化不大, 嗜锇体有所增加, 但体积较小, 基粒类囊体片层大部分排列整齐, 少数类囊体垛叠化丧失。这说明叶片衰老抑制基因 $P_{SA12-ipt}$ 在转化植株中的表达可明显延缓叶片衰老, 较长时间保持叶片绿色。

关于嗜锇颗粒, 很早就有报道在不同物种衰老叶片的细胞质中存在嗜锇颗粒, 而且推测这些脂质体来源于叶绿体外的膜(Mittelheuser 等, 1971), 认为在叶绿体膜结构发育完好的情况下, 这种嗜锇颗粒就没有或很少存在; 结构遭到破坏处于解体状态下的叶绿体均有嗜锇体数量增加体积增大的现象(赖纯高等, 1998), 即随着叶片衰老、类囊体解体, 才有大量的质体小球, 在叶绿体中积累(Guamet 等, 1999), 这说明嗜锇颗粒数量的增多以及体积的增大是植物叶片衰老的标志之一。本研究发现从水稻灌浆期开始, 对照叶片的叶绿体中嗜锇体数量就明显增加, 而转化植株发育到乳熟期, 叶片的叶绿体中才明显有较多的嗜锇体。进一步说明 $P_{SA12-ipt}$ 基因的转化可以延缓叶片衰老, 延长水稻叶片利用光能的时间, 使其充分积累光合产物, 增加产量, 在农业生产上具有着一定的发展前景和应用价值。

参考文献:

- 沈成国, 等. 2001. 植物衰老生理与分子生物学[M]. 北京: 中国农业出版社: 157-158.
Chen LFO, Hwang JY, Charng YY, et al. 2001. Transformation of broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) with iso-



图版 I 转 $P_{SAG12-ipt}$ 基因水稻与对照在发育过程中叶绿体超微结构的变化 A, A-1, B, B-1, C, C-1, D, D-1; 转基因植株中 A; a, a-1, b, b-1, c, c-1, d, d-1; 对照植株; A, A-1, a, a-1; 抽穗期; B, B-1, b, b-1; 灌浆期; C, C-1, c, c-1; 乳熟期; D, D-1, d, d-1; 成熟期。

Plate I Ultrastructure changes of chloroplast in leaves of transgenic rice ($P_{SAG12-ipt}$) and control during its development A, A-1, B, B-1, C, C-1, D, D-1; transgenic Zhong A; a, a-1, b, b-1, c, c-1, d, d-1; the control; A, A-1, a, a-1; heading stage; B, B-1, b, b-1; filling stage; C, C-1, c, c-1; milky ripe stage; D, D-1, d, d-1; maturing stage.

pentenyl transferase gene via *Agrobacterium tumefaciens* for post-harvest yellowing retardation[J]. *Mol Breeding*, 7: 243-257.

Gan S, Amasino R M. 1995. Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin [J]. *Science*, 270: 1986-1988.

Geng S, Ma M, Ye HC, et al. 2001. Effects of ipt gene expression on the physiological and chemical characteristics of *Ar-*

temisia annua L. [J]. *Plant Science*, 160: 691-698.

Guilamet J J, Pichersky E, Nooden L D. 1999. Mass exodus from senescing soybean chloroplasts[J]. *Plant Cell Physiol*, 40(9): 986-992.

Hurkman W J, Kennedy G S. 1976. Ultrastructure changes of chloroplasts in aging tobacco leaves[J]. *Proc Indiana Acad* (下转第 540 页 Continue on page 540)

以看出温带成分在本区系中占有绝对优势,起着主导作用,该区系的温带性质不容置疑,这与本地区所处的地理位置及自然地理条件是一致的;一定量热带成分的存在,又说明本区系在发生发展的过程中与热带的明显联系和历史渊源;以温带成分为主,多种成分并存,又反映了本区系与其它区系联系广泛,成分相互渗透的特点;中国特有属较少,特有现象不明显。(3)通过对12个山区植物区系成分进行区系谱、R/T值等定量分析比较,结果显示:邢台西部太行山区种子植物区系与山西太岳山和中条山、北京东灵山、河北雾灵山关系最为密切,与河北小五台山、吉林长白山、甘肃六盘山及崆峒山关系次之,与湖北神农架和湖南八大公山关系较远,与福建龙栖山关系最远。这与本地区及其它地区所处的气候带、水热条件以及山体特征完全吻合,同时也反映了植物区系成分随纬度变化的地带性规律。

参考文献:

- 王荷生. 1997. 华北植物区系地理[M]. 北京: 科学出版社: 38-52.
- 王香亭. 1989. 六盘山自然保护区科学考察[M]. 银川: 宁夏人民出版社.
- 李振宇. 1994. 龙栖山植物[M]. 北京: 中国科学技术出版社.
- 吴晓菊. 2003. 甘肃崆峒山种子植物区系分析[D]. 兰州: 西北师范大学: 12-49.
- Feng TJ(冯天杰), Wang DY(王德艺), Li DY(李东义), et al. 1999. Research on the tracheophyta flora in nature reserve of Wuling Mountain(雾灵山自然保护区维管植物区系的研究)[J]. *Bull Bot Res*(植物研究), 19(3): 259-267.
- Fu PY(傅沛云), Li JY(李冀云), Cao W(曹伟), et al. 1995. Studies on the flora of seed plants from Changbai Mountain(长白山种子植物区系研究)[J]. *Bull Bot Res*(植物研究), 15(4): 491-500.
- Fu ZJ(傅志军), Zheng XT(郑雪婷). 1994. The characteristics of flora in the Zhongtiao Mountain(山西中条山植物区系的特征)[J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*(西北植物学报), 14(2): 148-152.
- Liao WB(廖文波), Zhang HD(张宏达). 1994. A comparison of the spermatophytic flora from Guangdong and its neighbouring regions(广东种子植物区系与邻近地区的关系)[J]. *Guihaia*(广西植物), 14(3): 217-226.
- Ma KP(马克平), Gao XM(高贤明), Yu SL(于顺利). 1995. On the characteristics of the flora of Dongling Mountain area and its relationship with a number of other mountainous floras in China(东灵山地区植物区系的基本特征与若干山区植物区系的关系)[J]. *Bull Bot Res*(植物研究), 15(4): 501-515.
- Qi CJ(祁承经), Yu XL(喻勋林), Cao TR(曹铁如), et al. 1994. Flora of hunan Badagongshan Mountains and its phytogeographical significance(湖南八大公山的植物区系及其在植物地理学上的意义)[J]. *Acta Bot Yunnan*(云南植物研究), 16(4): 321-332.
- Ru WM(茹文明), Zhang F(张峰). 2000. Analysis on the flora of seed plants of Wutai Mountainous, Shanxi(山西五台山种子植物区系分析)[J]. *Bull Bot Res*(植物研究), 20(1): 36-47.
- Wu XJ(吴晓菊), Chen XL(陈学林). 2003. Analysis of the flora of the family of the seed plants in Kongtong Mountain of Gansu Province(甘肃崆峒山种子植物区系科的分析)[J]. *Guihaia*(广西植物), 23(3): 203-210.
- Wu ZY(吴征镒). 1991. The areal-types of Chinese genera of seed plants(中国种子植物属的分布区类型)[J]. *Acta Bot Yunnan*(云南植物研究), Supp. IV(增刊IV): 1-139.
- Wu ZY(吴征镒), Zhou ZK(周浙昆), Li DZ(李德铎), et al. 2003. The areal-types of the world families of seed plants(世界种子植物科的分布区类型系统)[J]. *Acta Bot Yunnan*(云南植物研究), 25(3): 245-257.
- Lai CG(赖纯高), Dai QY(代庆阳), Su XH(苏学辉), et al. 1998. The ultrastructure of chloroplasts of virusinfected citrus leaves(柑桔病叶片中叶绿体的超微结构)[J]. *J Sichuan Teachers Coll(Nat Sci)*(四川师范学院学报)(自然科学版), 19(3): 304-306.
- Lin YJ, Cao ML, Xu CG, et al. 2002. Cultivating rice with delaying leaf-senescence by *PSAG12-ipt* gene transformation [J]. *Acta Bot Sin*, 44(11): 1333-1338.
- Lin ZF(林植芳), Li SS(李双顺), Lin GZ(林桂珠), et al. 1984. Superoxide dismutase activity and lipid preoxidation in relation to senescence of rice leaves(水稻叶片的衰老与超氧化物歧化酶活性及脂质过氧化作用的关系)[J]. *Acta Bot Sin*(植物学报), 26(6): 605-615.
- McCabe M S, Garratt L C, Schepers F, et al. 2001. Effects of *PSAG12-ipt* gene expression on development and senescence in transgenic lettuce[J]. *Plant Physiol*, 127: 505-516.
- Mittelheuser C J, Van Steveninck R F M. 1971. The ultrastructure of wheat leaves. I. Changes due to natural senescence and the effects of kinetin and ABA on detached leaves incubated in the dark[J]. *Protoplasma*, 73: 239-252.
- Wang YQ(王亚琴), Liang CY(梁承邗). 2004. Preliminary study on antisenesescence characteristics of transgenic rice (*PSAG12-ipt*)(转 *PSAG12-ipt* 基因水稻延缓性能的初步研究)[J]. *Guihaia*(广西植物), 24(6): 540-543.
- Wang YQ(王亚琴), Liang CY(梁承邗). 2005. Studies of the leaf-specific senescence-inhibitor gene (*PSAG12-ipt*) introduced into Zhong A(Cytoplasmic Male Sterile Indica)(叶片衰老抑制基因 *PSAG12-ipt* 转入籼稻不育系中 A 的研究)[J]. *Acta Sci Nat Univ Sun Yatseni(Nat Sci)*(中山大学学报)(自然科学版), 44(2): 78-81.

(上接第 572 页 Continue from page 572)