

· 研究报告 ·

## 集胞藻*Sir1515*基因提高转基因水稻植株剑叶长度及叶绿素含量

杨浩萌\*, 薛哲勇, 赵乐, 漆小泉, 黄芳\*

中国科学院植物研究所, 北京 100093

**摘要** 蓝藻是古老的原核光合生物, 不仅在植物进化上有重要地位, 也是可利用的生物资源及重要的基因资源。*Sir1515*是来源于集胞藻6803(*Synechocystis* sp. PCC 6803)的基因, 其同源基因在蓝藻中普遍存在, 但对其生物学功能所知有限。以易于转化的水稻品种中花11(*Oryza sativa* subsp. *japonica* cv. 'Zhonghua 11')为材料, 通过农杆菌介导的遗传转化方法将*Sir1515*基因导入水稻胚性愈伤组织中。经过诱导分化, 获得了一系列转基因幼苗。通过PCR、GFP荧光及免疫印迹检测, 筛选出单拷贝插入的转基因阳性株系, 并对野生型和转基因株系的表型进行比较分析。结果表明, 灌浆期转基因株系的剑叶长度比同期的野生型提高了27.7%。进一步的测定结果显示, 转基因株系的剑叶叶绿素含量和PSII最大量子产率分别比野生型提高了0.65倍和4.4%。推测*Sir1515*基因可能在改善水稻农艺性状方面有一定价值。

**关键词** 叶绿素含量, 剑叶长度, 水稻, *Sir1515*, 蓝藻

杨浩萌, 薛哲勇, 赵乐, 漆小泉, 黄芳 (2013). 集胞藻*Sir1515*基因提高转基因水稻植株剑叶长度及叶绿素含量. 植物学报 48, 489–497.

水稻(*Oryza sativa*)是我国最重要的粮食作物之一。培育产量高、品质好的水稻品种, 对于解决我国人口持续增加但耕地面积日益减少的矛盾及保障国家粮食安全具有重要意义。《国家粮食安全中长期规划纲要》明确指出, 提高单产水平是水稻育种与生产追求的主要目标([http://www.gov.cn/jrzq/2008-11/13/content\\_1148414.htm](http://www.gov.cn/jrzq/2008-11/13/content_1148414.htm))。发掘有利用价值的基因资源和基因新功能, 并通过转基因技术进行验证和应用, 是实现该目标的重要途径之一(吴键等, 2011)。蓝藻是地球上古老的原核光合生物, 在极端寒冷的南北极冰湖和近于沸腾温度的温泉, 以及高盐、强碱的极端环境中均有存在(Tamagnini et al., 2002)。近年来, 随着世界粮食、能源和资源等不足的问题日益突显, 对包括蓝藻在内的微藻生物资源和基因资源的发掘和利用已成为一个重要的研发领域(Stephens et al., 2010)。集胞藻6803(*Synechocystis* sp. PCC 6803)为单细胞蓝藻, 具有结构简单、遗传背景清晰、生长繁殖快等优点, 是30年来用于光合作用机理研究的重要模式系统(Pakrasi, 1995)。基因组序列分析表明, 目前仍有近1/4的基因编码产物为缺乏功能线索的新蛋白(Kaneko et al., 1996)。通过转基因手段进行基因

功能研究, 既有希望发现基因功能线索, 也有助于发掘基因的潜在应用价值。

*Sir1515*是来源于集胞藻6803的基因, 在蓝藻基因组数据库中目前仍被注释为功能未知基因(<http://genome.kazusa.or.jp/cyanobase/Synechocystis>)。早期对聚球藻7942(*Synechococcus* sp. PCC 7942)中同源基因*ictB*的研究暗示, 该基因可能是蓝藻CO<sub>2</sub>浓缩机制(CO<sub>2</sub> concentrating mechanism, CCM)中的HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>转运蛋白(Bonfil et al., 1998)。但后来的研究又发现, *Sir1515*与CCM中的HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>转运没有直接关联(Shibata et al., 2002; Xu et al., 2008)。因此, 目前该基因在蓝藻细胞中的功能还不是很清楚(Price et al., 2013), 需要更多深入的研究。Lieman-Hurwitz等(2003)报道, 将聚球藻*ictB*转入拟南芥(*Arabidopsis thaliana*), 对低湿度下转基因植株的生长有促进作用。Yang等(2008)将*Sir1515*转入水稻Tainoung 67(*Oryza sativa* L. subsp. *japonica* cv. 'Tainoung 67')后也发现, 转基因株系的光合效率及生物量比野生型有所提高。但迄今为止, 没有见到在其它水稻品种中的研究报道, 相关表型的获得是否普遍也不是很确定。因此, 本研究选用易于转化的水稻

收稿日期: 2013-02-01; 接受日期: 2013-03-12

基金项目: 转基因生物新品种培育重大专项(No.2009ZX08009-121B)

\* 通讯作者。E-mail: yhmbbj@ibcas.ac.cn; fhuang@ibcas.ac.cn

品种——中花11号(倪丕冲, 1989; 谢道昕等, 1991; Ren et al., 2005)为受体材料, 通过农杆菌介导的转基因方法将*Slr1515*基因导入水稻胚性愈伤组织中, 并对转基因株系的表型进行分析, 以期揭示其在提高水稻剑叶叶绿素含量及长度方面的新功能。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

集胞藻(*Synechocystis* sp. PCC 6803)、水稻中花11号(*Oryza sativa* L. subsp. *japonica* cv. 'Zhonghua 11')、农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)菌株EHA105、大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5 $\alpha$ 均由本实验室保存。集胞藻在BG11培养基中培养(Allen, 1968), 培养条件及细胞收集参照Zhang等(2009)进行。水稻幼苗在昼/夜温度为30°C/25°C、每天12小时自然光照的温室中培养。

### 1.2 基因克隆及蛋白序列分析

集胞藻基因组DNA的提取参考Williams(1988)的方法。依据集胞藻6803基因组数据库(<http://genome.kazusa.or.jp/cyanobase/Synechocystis>)公布的目标基因序列, 通过Primer3软件(<http://primer3.wi.mit.edu/>)设计用于基因扩增的上下游引物, 提取对数生长期的集胞藻基因组DNA并以其为模板, 通过PCR扩增获得目的基因。扩增引物为F: 5'-ATGGTGTCTCCATCTCTATC-3'; R: 5'-TTATGAAGCAAGAA-GAGGTTTGTCC-3'。PCR扩增使用rTaq酶及其反应体系(Takara)。PCR反应程序为: 94°C4分钟; 94°C30秒, 50°C30秒, 72°C1分钟, 30个循环; 72°C10分钟。电泳回收目的条带后将其连接到pCR8/GW/TOPO载体上(Invitrogen), 转化大肠杆菌DH5 $\alpha$ 。将筛选到的阳性克隆进行测序验证(上海生工), 挑选正确的克隆载体pCR8/GW/TOPO-*Slr1515*用于转化农杆菌。采用ClustalW2(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>)进行氨基酸序列比对。通过TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)对跨膜螺旋结构域进行预测。

### 1.3 表达载体的构建及水稻遗传转化

采用Gateway技术及LR Clonase™ II试剂盒(Invitro-

gen)所描述的方法构建表达载体。将克隆载体pCR8/GW/TOPO-*Slr1515*的目标基因整合到表达载体pH7WG2D的重组位点, 测序验证后得到重组表达载体pH7WG2D-*Slr1515*。该载体包含组成型表达35S启动子、增强型绿色荧光蛋白(GFP)报告基因、潮霉素B及壮观霉素抗性标记基因。水稻遗传转化按照Toki等(2006)的方法进行。将转化后的愈伤组织接种于含50 mg·L<sup>-1</sup>潮霉素B和400 mg·L<sup>-1</sup>羧苄青霉素的N<sub>6</sub>培养基上(Hiei et al., 1994), 筛选抗性愈伤组织。在32°C持续光照培养2周后, 将生长旺盛的胚性愈伤组织转移到含50 mg·L<sup>-1</sup>潮霉素B和250 mg·L<sup>-1</sup>羧苄青霉素的再生培养基上持续光照诱导芽的分化。2周后将幼苗转移至含50 mg·L<sup>-1</sup>潮霉素B和200 mg·L<sup>-1</sup>羧苄青霉素的生根培养基上诱导生根。获得完整植株后, 炼苗5-7天, 移至温室培养。

### 1.4 转基因再生植株的PCR检测

选取T<sub>0</sub>代转基因水稻新鲜叶片, 提取基因组DNA(Murray and Thompson, 1980), 通过PCR对外源基因进行分子检测。特异性引物对为F: 5'-TACCTGG-TGCCCATGACG-3'; R: 5'-CCAACTACACCCGTT-TCCA-3'。采用本文1.2节所描述的PCR反应程序进行扩增(将循环次数增加至35个)。PCR产物用1%琼脂糖凝胶电泳检测, EB染色后观察结果。

### 1.5 多克隆抗体的制备

*Slr1515*基因编码蛋白的抗体由上海艾比玛特生物医药有限公司制备。用SEAL™软件获得抗原决定簇多肽序列: 1-AMSIFAGREDSSNNFRINWEGVKAM-IRARPIIGIPGNEAFNQIYPYMRPFTALSAYSIIY-LEILVETGVVGFTCMLWLLAVTLGKGVLELVK; 2-VELVKRCRQTLAPEGIWIWIMGALAAIIGLLVHGMVDTV-WYRPPVSTLWLLVAIVASQWASAQARLEASKE-ENEDKPLAS。重组蛋白的原核表达及纯化参考Zhou等(2008)进行。获得的重组蛋白混合后用于免疫兔子制备多克隆抗体, 取抗血清经特异性验证后用于样品的免疫印迹检测。

### 1.6 转基因再生植株的Western blot检测

取T<sub>0</sub>代抽穗期水稻叶片蛋白进行免疫印迹检测。总蛋白提取参考Cui等(2009)的方法进行。SDS/PAGE及

免疫印迹分析参考Huang等(2004)的方法进行。*Slr1515*抗体的稀释浓度为1:100(v/v)。采用ECL plus western(GE Healthcare)进行检测。

### 1.7 转基因水稻幼芽GFP荧光检测及拷贝数分析

转基因水稻种子萌发、GFP荧光检测及外源基因拷贝数分析,均参考Toki等(2006)及Saika和Toki(2010)的方法进行。选取PCR及Western blot检测阳性 $T_1$ 代转基因种子200粒,置于无菌水滤纸上,在黑暗条件下30°C培养箱中萌发。待幼芽长至约0.5 cm时,置于荧光体视显微镜(德国Leica MZ10F, 激发光波长400 nm, 发射光波长470 nm)下进行观察,计算发荧光种子所占的比例。用卡方( $\chi^2$ )检验推算转基因株系性状分离比是否符合孟德尔遗传规律。

### 1.8 水稻剑叶长度及其它农艺性状分析

选取3个独立的转基因株系进行剑叶长度等农艺性状的分析。每个株系取30棵植株,测定灌浆期剑叶长度、株高和分蘖数。调查采收期穗长、穗粒数及百粒重等。差异显著性用 $t$ -检验进行分析。

### 1.9 水稻剑叶叶绿素含量的测定

叶绿素含量(叶绿素a和b的总量)参考Arnon(1949)的方法测定。取灌浆期水稻剑叶中段,沿叶脉方向剪成5 mm x 10 mm的小片,混匀后称取2 g在80%丙酮中研磨提取2次,合并上清液,用分光光度计(Bio-Rad, SmartSpec<sup>TM</sup> Plus, 美国)进行测定。 $T_0$ 代和 $T_1$ 代转基因水稻各取3个独立株系,每个株系培养30-50棵植株。随机选取10株的剑叶,剪碎混匀后分成3份(3次平行)。结果以3次重复平均值±标准差表示( $n=9$ )。差异显著性用 $t$ -检验进行分析。

### 1.10 水稻剑叶PS II最大量子产率的测定

抽穗期水稻剑叶叶绿素荧光通过便携式叶绿素荧光仪(PAM2000, Walz, 德国)测定,具体操作方法按照说明书进行。 $T_0$ 代和 $T_1$ 代转基因水稻各取3个独立株系,每个株系取10棵,重复测定3次。对待测水稻剑叶中部先进行10分钟遮光处理,然后照射检测光,待荧光水平稳定后得到初始荧光( $F_0$ ),接着照射饱和脉冲光,得到最大荧光( $F_m$ ),算出 $F_v = F_m - F_0$ 。PSII最大量子产率以 $F_v/F_m$ 表示。

## 2 结果与讨论

### 2.1 *Slr1515*基因克隆及蛋白序列分析

根据集胞藻6803基因组数据库公布的*Slr1515*基因序列,通过Primer3软件设计并合成特异性引物。采用PCR扩增的方法,克隆了*Slr1515*基因序列。进一步的测序结果表明,扩增产物序列与该物种基因组数据库中目标基因DNA序列完全一致,预测编码一个分子量为52.2 kDa的蛋白质。氨基酸序列同源比对的结果表明,在高等植物(如水稻)中,无同源蛋白,但在已测序的蓝藻藻株中均有存在,属于高度保守的蓝藻特有蛋白(图1A)。*Slr1515*与聚球藻7002 (*Synechococcus* sp. PCC7002, Synpcc7002\_A0690)、聚球藻7942 (*S. elongates* PCC7942, Synpcc7942\_0357)、嗜热蓝藻(*Thermosynechococcus elongatus* BP-1, Tlr2249)及无类囊体蓝藻(*Gloeobacter violaceus* PCC7421, GII3744)的序列相似性分别为62.7%、62.2%、59.6%和51.3%。采用TMHMM软件进行的二级结构预测发现,*Slr1515*很有可能是一个具有12个跨膜螺旋结构域的疏水性膜蛋白(图1B)。

### 2.2 基因表达载体的构建及水稻遗传转化

图2显示采用Gateway技术构建的目的基因*Slr1515*表达载体,携带的潮霉素抗性基因(*Hyg*)和GFP报告基因(*EgfpER*)为转基因植株筛选标记。Chang等(1994)最早发现农杆菌介导的转基因方法具有转化效率高、导入外源基因拷贝数低及操作简便等优点。采用该方法,我们成功地将*Slr1515*导入水稻中花11的基因组中。从农杆菌侵染的270个水稻愈伤组织块中,获得了164个抗性愈伤组织块。将生长旺盛的胚性愈伤组织诱导发芽生根,获得 $T_0$ 代转基因再生植株22棵,用于进一步的转基因分子验证。

### 2.3 转基因植株的PCR及免疫印迹检测

为了验证转基因的有效性,我们对16个长势良好的 $T_0$ 代植株进行PCR及免疫印迹分析。分别提取转基因植株叶片的基因组DNA,用基因特异性引物进行PCR扩增,扩增产物用琼脂糖凝胶电泳进行检测分析。结果(图3A)显示,特异性目的基因片段(521 bp)仅在6个转基因植株中检测到,而野生型中没有,表明*Slr1515*基因已整合到这些转基因株系的基因组中。

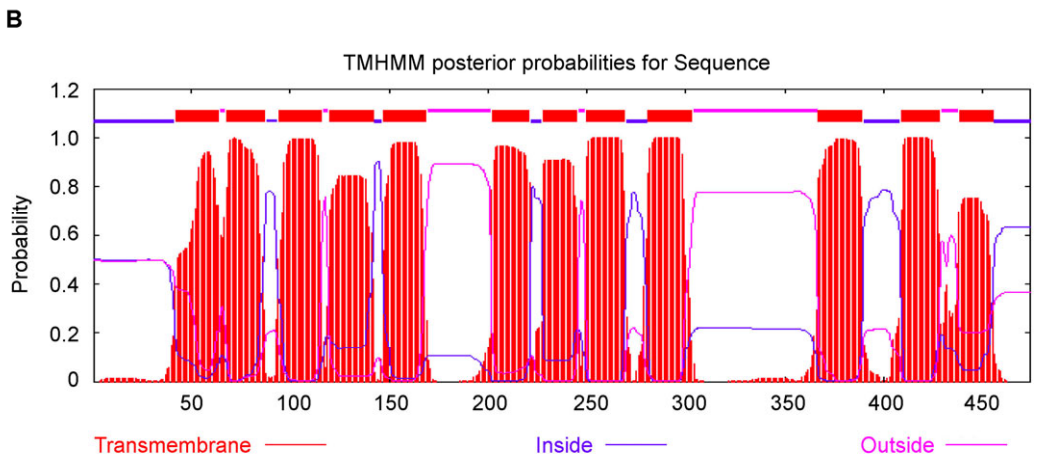
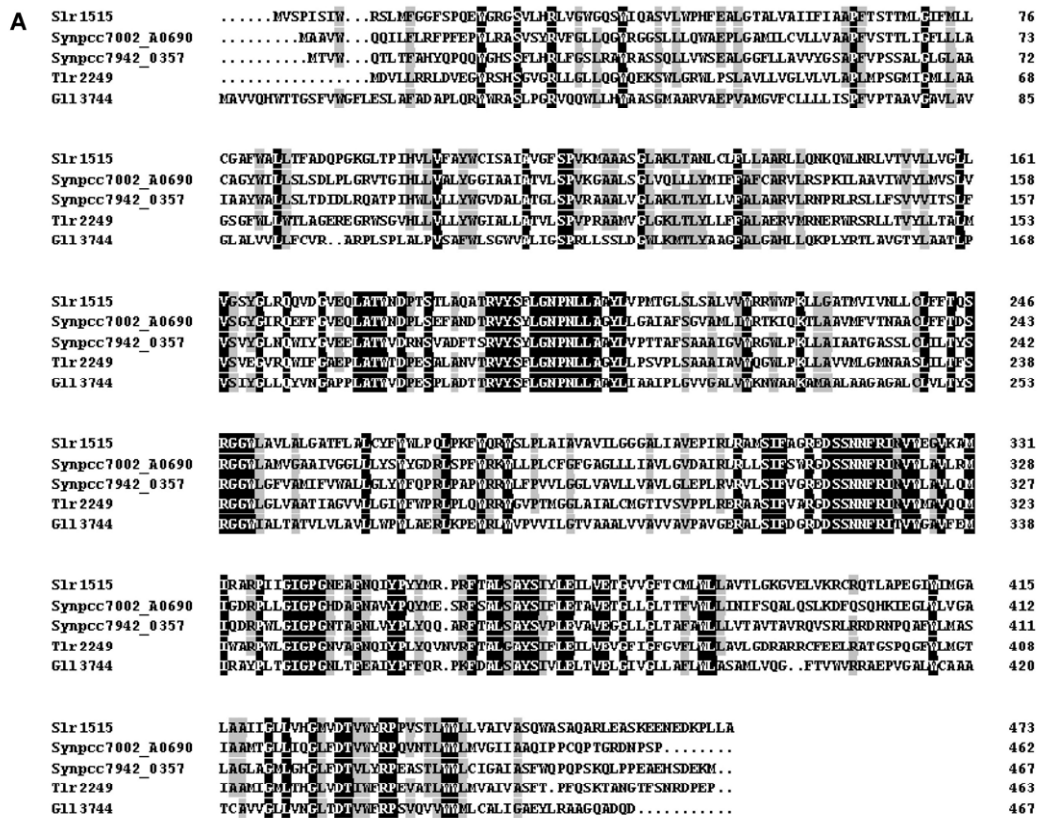


图1 Slr1515蛋白序列分析

(A) 同源蛋白氨基酸序列比对(Slr1515: 来源于 *Synechocystis* sp. PCC 6803; Synpcc7002\_A0690: 来源于 *Synechococcus* sp. PCC 7002; Synpcc7942\_0357: 来源于 *Synechococcus elongatus* PCC 7942; Tlr2249: 来源于 *Thermosynechococcus elongatus* BP-1; G113744: 来源于 *Gloeobacter violaceus* PCC 7421); (B) 跨膜结构域预测

Figure 1 Sequence analysis of Slr1515 protein

(A) Multiple alignment of Slr1515 homolog proteins (Slr1515: from *Synechocystis* sp. PCC 6803; Synpcc7002\_A0690: from *Synechococcus* sp. PCC 7002; Synpcc7942\_0357: from *Synechococcus elongatus* PCC 7942; Tlr2249: from *Thermosynechococcus elongatus* BP-1; G113744: from *Gloeobacter violaceus* PCC 7421); (B) Prediction of transmembrane helices

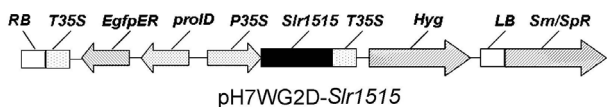


图2 表达载体基本结构示意图

P35S: 启动子; T35S: 终止子; Hyg: 潮霉素抗性基因; Sm/SpR: 壮观霉素抗性基因; EgfpER: 绿色荧光蛋白基因; proID: 启动子

Figure 2 Schematic structure of expression vector for transgenic rice

P35S: Promoter; T35S: Terminator; Hyg: Hygromycin resistant gene; Sm/SpR: Spectinomycin resistant gene; EgfpER: Green fluorescent protein gene; proID: Promoter

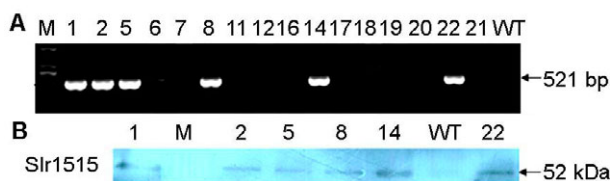


图3 转基因水稻植株中目的基因(A)及蛋白(B)的分子检测  
M: 标准分子量; WT: 野生型; 1-22: 转基因株系

Figure 3 PCR (A) and Western blot (B) analysis of transgenic rice

M: Ladder markers; WT: Wild-type; 1-22: Transgenic rice

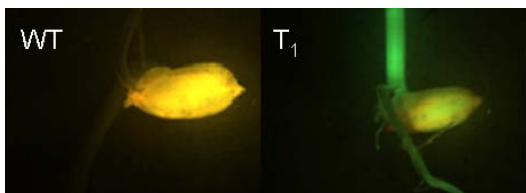


图4 T<sub>1</sub>代转基因水稻幼芽的GFP荧光检测

Figure 4 GFP fluorescence microscopy of germinated seeds of T<sub>1</sub> transgenic rice

为了进一步验证转入的目的基因是否表达, 我们对PCR检测呈阳性的6个转基因株系的叶片总蛋白进行免疫印迹检测。在转基因株系(1、2、5、8、14、22)中检测到分子量约为52 kDa的蛋白条带, 而野生型中没有(图3B), 表明Slr1515蛋白在转基因株系中得到表达。

#### 2.4 转基因植株GFP检测及外源基因拷贝数分析

为了进一步考察外源基因在转基因植株中的遗传稳

定性, 我们将上述已验证的6个转基因株系进行自交, 获得T<sub>1</sub>代转基因水稻种子。将种子萌发后的幼苗置于荧光体视显微镜下观察。绿色荧光蛋白GFP信号仅见于转基因水稻幼芽, 而在野生型中没有, 表明GFP所在的T-DNA区已遗传到转基因株系的T<sub>1</sub>代基因组中(图4)。考虑到外源基因的拷贝数会影响其遗传和表达的稳定性的(Toki et al., 2006), 从上述株系(Slr1515-1、Slr1515-2、Slr1515-5、Slr1515-8、Slr1515-14、Slr1515-22)中各选取200粒种子进行GFP荧光检测, 并统计发荧光种子所占的比例。从表1统计的结果可以看出, 转基因株系在自由度(df)等于1的卡方值( $\chi^2$ )均小于3.84( $P>0.05$ )。说明性状分离比为3:1的假设与实际观察之间没有显著差异, 该外源基因多为单拷贝插入, 获得的转基因植株可以用于靶标基因的进一步功能分析。

#### 2.5 转基因植株剑叶长度及其它农艺性状分析

为了考察Slr1515基因对水稻农艺性状的影响, 我们对3个独立的转基因株系(Slr1515-2、Slr1515-8和Slr1515-14)灌浆期剑叶长度、株高、分蘖数进行了测量, 并对采收期穗长、穗粒数及百粒重等指标进行了统计和分析。对T<sub>1</sub>代转基因植株的表型观察发现, 灌浆期转基因株系的剑叶明显长于野生型(图5), 而最大宽度与野生型基本一致, 两者均为1.1±0.1 cm。3个转基因株系平均剑叶长度为32.7 cm, 比相同发育时期的野生型(WT)和转空载体植株(CK)分别提高了27.7%和26.7%( $P<0.01$ )。由于转基因水稻的剑叶宽度没有变化而长度增加, 根据计算叶面积的长宽校正法(陶洪斌和林杉, 2006)推算剑叶叶面积也比野生型有所增加。这一表型在以台湾水稻品种Tainoung 67为转基因受体材料的研究报道中并没有见到(Yang et al., 2008)。在中花11号纯合体中该表型是否稳定有待进一步分析。表2为转基因株系其它农艺性状的统计数据。从表2可以看出, T<sub>0</sub>代转基因株系在株高、分蘖数、穗长、穗粒数及百粒重方面与野生型之间没有明显差异。

#### 2.6 剑叶叶绿素含量及PSII最大光化学量子产率分析

剑叶是灌浆期稻穗的主要光合功能叶片。为了进一步探讨Slr1515基因的导入对剑叶光合能力是否有影响,

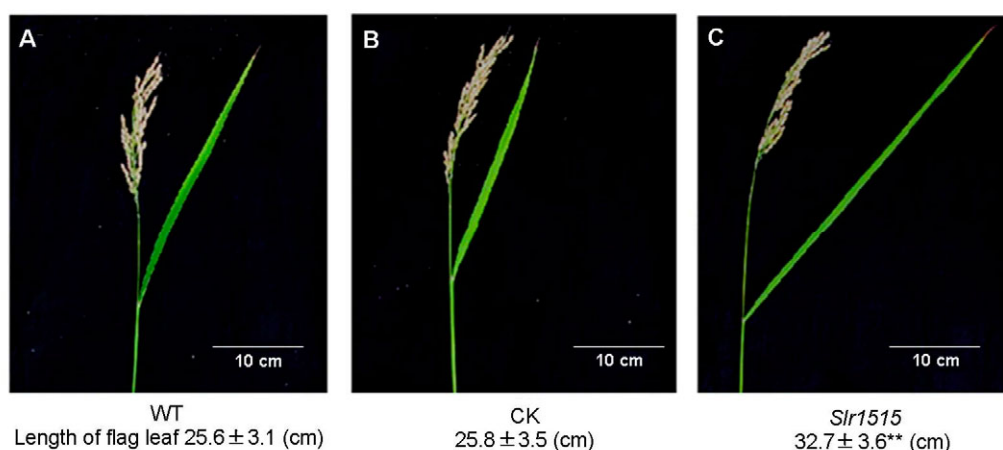


表1 转基因植株外源基因拷贝数分析

Table 1 Copy number of transgene in the transgenic rice

Transgenic generations	Fluorescent seeds	Non-fluorescent seeds	Segregation ratio	Copy number ( $\chi^2 < 3.84$ )	$\chi^2$
Slr1515-1	147	53	3:1	single	0.17
Slr1515-2	150	50	3:1	single	0.01
Slr1515-5	159	41	3:1	single	1.59
Slr1515-8	140	60	3:1	single	2.41
Slr1515-14	151	49	3:1	single	0.01
Slr1515-22	150	50	3:1	single	0.01

$\chi^2 < 3.84, P > 0.05 (df=1)$

图5 转基因水稻剑叶长度(平均值±标准差,  $n=90$ )的变化

(A) 野生型; (B) 转空表达载体的植株; (C) 转基因植株

\*\* 表示 $t$ -检验在0.01水平的差异显著性。

Figure 5 Change in flag leaf length in transgenic rice (means $\pm$ SD,  $n=90$ )

(A) Wild type; (B) Transgenic rice with empty vector; (C) Transgenic rice with *Slr1515*

\*\*  $t$ -test,  $P < 0.01$ .

表2 *Slr1515*转基因水稻农艺性状分析Table 2 Agronomic traits of transgenic rice with *Slr1515*

Types	Plant height (cm)	Tillering number	Spike length (cm)	Kernels per spike	Hundred-seed weight (g)
WT	78.7 $\pm$ 3.8	5.7 $\pm$ 1.5	18.5 $\pm$ 1.9	95.0 $\pm$ 3.7	2.5 $\pm$ 0.06
<i>Slr1515</i>	77.0 $\pm$ 4.4	7.3 $\pm$ 1.4	18.3 $\pm$ 0.9	84.4 $\pm$ 6.1	2.4 $\pm$ 0.04

我们对 $T_0$ 和 $T_1$ 代转基因株系剑叶的光合相关指标进行了测定,并与野生型进行比较。图6A为叶绿素含量测定结果。可以看出, $T_0$ 代转基因株系(Slr1515-2、Slr1515-8和Slr1515-14)剑叶叶绿素含量分别为1.9、2.4和1.8  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{FW}$ ,比野生型平均高36%。该表型在 $T_1$ 代转基因株系中更为显著,平均含量为2.65  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{FW}$ ,比野生型高0.65倍( $P < 0.01$ )。说明该表型在

$T_0$ 和 $T_1$ 代转基因株系中稳定性较好。

叶绿素荧光动力学参数是反映叶片光合生理状态的灵敏指标之一(Krause and Weis, 1991)。为了探究转*Slr1515*基因对剑叶光合能力有无影响,我们利用PAM2000叶绿素荧光仪(Walz, 德国)测定了野生型和转基因株系的PSII最大量子产率( $F_v/F_m$ )。从图6B可以看出,与野生型相比, $T_0$ 代和 $T_1$ 代转基因株系的

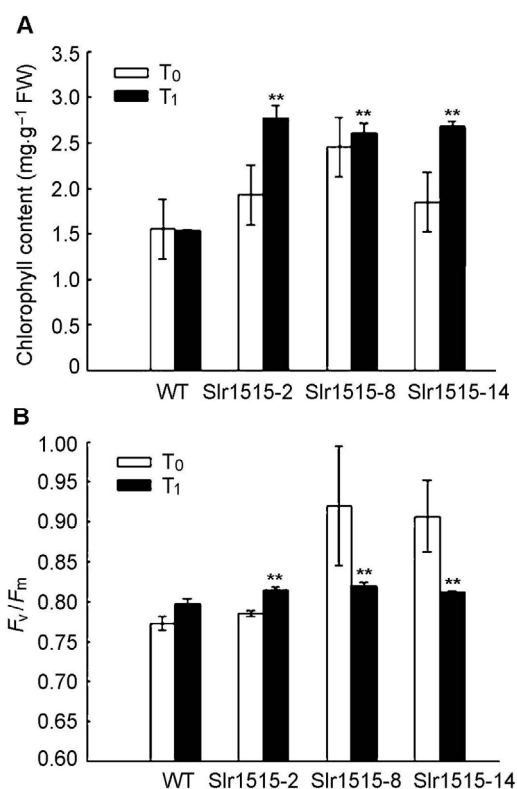


图6 转基因水稻植株剑叶叶绿素含量(A)及 $F_v/F_m$ (B)

\*\*  $t$ -检验在0.01水平的差异显著性。

Figure 6 Chlorophyll content (A) and  $F_v/F_m$  (B) of flag leaf in transgenic rice

\*\*  $t$ -test,  $P < 0.01$ .

$F_v/F_m$ 均有提高。T<sub>1</sub>代转基因株系的 $F_v/F_m$ 比野生型高4.4% ( $P < 0.01$ )。综合以上实验结果, 我们发现*Slr1515*基因的导入显著提高了中花11号水稻品种剑叶的光合面积及潜在光合能力。下一步对纯合体光合相关表型的分析, 将为该性状的遗传稳定性提供更多更可靠的依据。

## 2.7 讨论

*Slr1515*在蓝藻细胞中的功能尚不完全清楚。先前不同的实验室尝试将该基因或其同源基因敲除, 但均未获得完全分离的突变体。这些结果一方面表明该基因对蓝藻细胞生命活动非常重要(Bonfil et al., 1998; Price et al., 2013), 同时也说明阐明该基因的功能较为困难。通过转基因的手段进行基因功能研究, 不仅能够获得基因功能线索, 也可以提供有潜在应用价值的新

材料。因此, 在本研究中, 首先通过PCR扩增获得*Slr1515*基因全长序列, 然后采用农杆菌介导的遗传转化方法将该基因转入转化效率较高的中花11号中。进一步通过PCR、GFP荧光及免疫印迹检测, 筛选出一系列单拷贝插入的转基因阳性株系(图3, 图4; 表1), 并对野生型和转基因株系的表型进行比较分析, 揭示该蓝藻基因在水稻中的新功能。

实验结果表明, *Slr1515*基因的转入引起水稻剑叶长度增加。与相同发育时期(灌浆期)的野生型相比, T<sub>1</sub>代转基因株系的剑叶长度提高了27.7%(图5)。剑叶叶绿素含量及PSII最大量子产率的测定结果显示, T<sub>0</sub>和T<sub>1</sub>代转基因株系的叶绿素含量及 $F_v/F_m$ 也有所提高(图6)。由于剑叶是灌浆期稻穗的主要光合功能叶片(Gladun and Karpov, 1993; Li et al., 1998), 我们认为该外源基因可能在增加该品种剑叶光合面积、光合能力及延缓剑叶衰老方面有显著作用。本实验结果与Yang等(2008)在Tainoung 67中的观察结果不尽相同。我们推测, 这种差异可能与2个独立的研究所选用的水稻品种及培养条件不同有关。因此, 在相同条件下对上述不同水稻品种的转基因植株表型进行系统全面的比较分析, 将有助于发现造成上述差异的主要原因。依据TMHMM预测结果, *Slr1515*为具多个跨膜螺旋结构域的疏水性蛋白(图1B), 但转入水稻后其蛋白结构、细胞定位及其与上述表型之间的联系尚不清楚。下一步利用本研究制备的目的蛋白专一性抗体和T<sub>2</sub>代纯合转基因株系, 对*Slr1515*细胞定位及光合生理生化指标进行系统分析, 对阐明该基因引起上述性状变化的分子机理、探索其在水稻分子育种应用中的新思路将有重要意义。

## 参考文献

- 倪丕冲 (1989). 水稻花培新品种——中花11号. 作物品种资源 (4), 42–42.
- 陶洪斌, 林杉 (2006). 打孔称重法与复印称重法和长宽校正法测定水稻叶面积的方法比较. 植物生理学通讯 42, 496–498.
- 吴键, 刘学, 王永红 (2011). 植物重要功能基因研究进展及其应用. 生命科学 23, 168–178.
- 谢道昕, 范云六, 倪丕冲 (1991). 苏云金芽孢杆菌杀虫基因导入中国栽培水稻品种中花11号获得转基因植株. 中国科学(B辑) 21, 830–834.

- Allen MM** (1968). Simple conditions for growth of unicellular blue-green algae on plates. *J Phycol* **4**, 1–4.
- Arnon DI** (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol* **24**, 1–15.
- Bonfil DJ, Ronen-Tarazi M, Sültemeyer D, Lieman-Hurwitz J, Schatz D, Kaplan A** (1998). A putative HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> transporter in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. *FEBS Lett* **430**, 236–240.
- Chang SS, Park SK, Kim BC, Kang BJ, Kim DU, Nam HG** (1994). Stable genetic transformation of *Arabidopsis thaliana* by *Agrobacterium* inoculation in planta. *Plant J* **5**, 551–558.
- Cui SX, Hu J, Yang B, Shi L, Huang F, Tsai SN, Ngai SM, He YK, Zhang JH** (2009). Proteomic characterization of *Phragmites communis* in ecotypes of swamp and desert dune. *Proteomics* **9**, 3950–3967.
- Gladun IV, Karpov EA** (1993). Distribution of assimilates from the flag leaf of rice during the reproductive period of development. *Russ J Plant Physiol* **40**, 215–219.
- Hiei Y, Ohta S, Komari T, Kumashiro T** (1994). Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J* **6**, 271–282.
- Huang F, Hedman E, Funk C, Kieselbach T, Schroder WP, Norling B** (2004). Isolation of outer membrane of *Synechocystis* sp. PCC 6803 and its proteomic characterization. *Mol Cell Proteomics* **3**, 586–595.
- Kaneko T, Sato S, Kotani H, Tanaka A, Asamizu E, Nakamura Y, Miyajima N, Hirosawa M, Sugiura M, Sasamoto S, Kimura T, Hosouchi T, Matsuno A, Muraki A, Nakazaki N, Naruo K, Okumura S, Shimpo S, Takeuchi C, Wada T, Watanabe A, Yamada M, Yasuda M, Tabata S** (1996). Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803.II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. *DNA Res* **3**, 109–136.
- Krause GH, Weis E** (1991). Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **42**, 313–349.
- Li ZK, Pinson SRM, Stansel JW, Paterson AH** (1998). Genetic dissection of the source-sink relationship affecting fecundity and yield in rice (shape *Oryza sativa* L.). *Mol Breeding* **4**, 419–426.
- Lieman-Hurwitz J, Rachmilevitch S, Mittler R, Marcus Y, Kaplan A** (2003). Enhanced photosynthesis and growth of transgenic plants that express *ictB*, a gene involved in HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> accumulation in cyanobacteria. *Plant Biotechnol J* **1**, 43–50.
- Murray MG, Thompson WF** (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res* **8**, 4321–4325.
- Pakrasi HB** (1995). Genetic analysis of the form and function of photosystem I and photosystem II. *Annu Rev Genet* **29**, 755–776.
- Price GD, Pengelly JJ, Forster B, Du J, Whitney SM, von Caemmerer S, Badger MR, Howitt SM, Evans JR** (2013). The cyanobacterial CCM as a source of genes for improving photosynthetic CO<sub>2</sub> fixation in crop species. *J Exp Bot* **64**, 753–768.
- Ren ZH, Gao JP, Li LG, Cai XL, Huang W, Chao DY, Zhu MZ, Wang ZY, Luan S, Lin HX** (2005). A rice quantitative trait locus for salt tolerance encodes a sodium transporter. *Nat Genet* **37**, 1141–1146.
- Saika H, Toki S** (2010). Mature seed-derived callus of the model *indica* rice variety Kasalath is highly competent in *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant Cell Rep* **29**, 1351–1364.
- Shibata M, Katoh H, Sonoda M, Ohkawa H, Shimoyama M, Fukuzawa H, Kaplan A, Ogawa T** (2002). Genes essential to sodium-dependent bicarbonate transport in cyanobacteria: function and phylogenetic analysis. *J Biol Chem* **277**, 18658–18664.
- Stephens E, Ross IL, King Z, Mussnug JH, Kruse O, Posten C, Borowitzka MA, Hankamer B** (2010). An economic and technical evaluation of microalgal biofuels. *Nat Biotechnol* **28**, 126–128.
- Tamagnini P, Axelsson R, Lindberg P, Oxelfelt F, Wünschiers R, Lindblad P** (2002). Hydrogenases and hydrogen metabolism of cyanobacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**, 1–20.
- Toki S, Hara N, Ono K, Onodera H, Tagiri A, Oka S, Tanaka H** (2006). Early infection of scutellum tissue with *Agrobacterium* allows high-speed transformation of rice. *Plant J* **47**, 969–976.
- Williams JGK** (1988). Construction of specific mutations in photosystem II photosynthetic reaction center by genetic engineering methods in *Synechocystis* 6803. *Methods Enzymol* **167**, 766–778.
- Xu M, Bernát G, Singh A, Mi HL, Rögner M, Pakrasi HB, Ogawa T** (2008). Properties of mutants of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 lacking inorganic carbon sequestration systems. *Plant Cell Physiol* **49**, 1672–1677.



**Yang SM, Chang CY, Yanagisawa M, Park II, Tseng TH, Ku MSB** (2008). Transgenic rice expressing cyanobacterial bicarbonate transporter exhibited enhanced photosynthesis, growth and grain yield. In: Allen JF, Gantt E, Golbeck JH, Osmond B, eds. *Photosynthesis. Energy from the Sun: 14th International Congress on Photosynthesis*. Dordrecht: Springer. pp. 1247–1250.

**Zhang LF, Yang HM, Cui SX, Hu J, Wang J, Kuang TY,**

**Norling B, Huang F** (2009). Proteomic analysis of plasma membranes of cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 in response to high pH stress. *J Proteome Res* **8**, 2892–2902.

**Zhou J, Zhou JX, Yang HM, Yan CS, Huang F** (2008). Characterization of a sodium-regulated glutaminase from cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Sci China C Life Sci* **51**, 1066–1075.

## Increased Chlorophyll Content and Flag Leaf Length in Transgenic Rice Expressing *Slr1515* of *Synechocystis* sp. PCC 6803

Haomeng Yang<sup>\*</sup>, Zheyong Xue, Le Zhao, Xiaoquan Qi, Fang Huang<sup>\*</sup>

*Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China*

**Abstract** Cyanobacteria are unique prokaryotes performing plant-like photosynthesis and important organisms with valuable genes. We cloned *Slr1515* from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. The *Slr1515* was introduced into rice (*Oryza sativa* L. subsp. *japonica* cv. 'Zhonghua 11') by *Agrobacterium*-mediated transformation and verified by PCR and immunoblot analysis. Transgenic rice seeds were selected by GFP reporter signals, then seedlings underwent phenotype analysis. Agronomic traits such as chlorophyll content and flag leaf length were better in transgenic plants carrying *Slr1515* than non-transgenic plants. These observations provide preliminary information for improvement of rice performance.

**Key words** chlorophyll content, flag leaf length, *Oryza sativa*, *Slr1515*, *Synechocystis*

**Yang HM, Xue ZY, Zhao L, Qi XQ, Huang F** (2013). Increased chlorophyll content and flag leaf length in transgenic rice expressing *Slr1515* of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Chin Bull Bot* **48**, 489–497.

---

\* Authors for correspondence. E-mail: yhmbbj@ibcas.ac.cn; fhuang@ibcas.ac.cn

(责任编辑: 刘慧君)