

大豆炸荚基因 *GmAGL8* 的转基因鉴定与功能初探

秦玉涛¹,王 瑞²,吕金东¹,田 源²,黄天珑²,谢 皓¹,郭 蓓^{2,3}

(1. 北京农学院 植物科学技术学院,北京 102206; 2. 北京农学院 生物科学与工程学院,北京 102206; 3. 中华人民共和国农业部华北都市农业重点实验室,北京 102206)

摘 要:炸荚是大豆的一种自然特征属性,是影响大豆产量的重要因素之一。本研究以前期获得的转大豆炸荚相关基因 *GmAGL8* 的 T₁代植株为材料,继续繁育获得 T₂和 T₃代;采用 PCR 和 RT-qPCR 检测方法对转基因植株进行基因遗传稳定性和表达情况分析;并以野生型中黄 10 号为对照,对大豆炸荚性状进行了鉴定分析。结果表明:转基因植株阳性率 T₁代为 87.5%,T₂和 T₃代均达到 100%,说明 *GmAGL8* 基因已基本能够在转基因后代中稳定遗传。RT-qPCR 检测结果显示,转基因植株中 *GmAGL8* 基因的相对表达量都明显高于非转基因植株,且各转基因植株之间表达量具有差异性。对 T₁、T₂和 T₃代植株炸荚率进行了统计,不同世代转基因大豆的平均炸荚率为 9.09%,而非转基因大豆炸荚率为 83.3%,转基因与非转基因大豆之间炸荚率存在显著差异。综上所述,*GmAGL8* 基因已基本实现在大豆转基因后代中稳定遗传并正常表达,表型鉴定结果初步证明了 *GmAGL8* 基因与大豆炸荚性状相关。

关键词:大豆;炸荚;*GmAGL8*;转基因
中图分类号:S565.1 **文献标识码:**A **DOI:**10.11861/j.issn.1000-9841.2017.03.0360

Transgenic Identification of Pod-shattering Gene *GmAGL8* in Soybean

QIN Yu-tao¹, WANG Rui², LYU Jin-dong¹, TIAN Yuan², HUANG Tian-long², XIE Hao¹, GUO Bei^{2,3}

(1. College of Plant Science and technology, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China; 2. College of Biological Science and Engineering, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China; 3. Key Laboratory of Urban Agriculture (North China), Ministry of Agriculture, P. R., Beijing 102206, China)

Abstract: Pod-shattering is a natural characteristic of soybean, which is one of the critical factors influencing production. In our previous study, we had transformed the gene *GmAGL8* (which putative related to soybean pod-shattering) into *Glycine max* and obtained the T₁ generation. In this study, the T₂ and T₃ generation were multiplied by the T₁ generation carrying the *GmAGL8* gene. The genetic stability and expression of transgenic plants were analyzed by using PCR and RT-qPCR methods. As a control group, wild-type Zhonghuang 10 was used to analyze and identify the traits of soybean pods. The results showed the positive rate of the *GmAGL8* gene in T₁, T₂ and T₃ generation were 87.5%, 100% and 100% respectively. It demonstrated that the *GmAGL8* gene can be inherited stably. The results of RT-qPCR analyzing showed the relative expression amount of *GmAGL8* gene in transgenic plants was significantly higher than that in non-transgenic plants, and the amounts were various among the transgenic plants. The statistical results for pod-shattering among all plants indicated that the rates of pod-shattering were different among transgenic plants and non-transgenic plants, the average rate of pod-shattering among transgenic plants of all generations was 9.09%, the rate of pod-shattering among non-transgenic plants was 83.3%. In conclusion, *GmAGL8* gene can be inherited stably and expressed normally among transgenic soybean. Furthermore, the phenotypic identification results proved the *GmAGL8* gene is related to pod-shattering.

Keywords: Soybean; Pod-shattering; *GmAGL8*; Transgene

大豆荚属于荚果中的一种,荚果是由背缝线和腹缝线相互连接的两个单心皮组成。在大豆成熟时,因果荚水分相对较低,豆荚的内生厚壁组织层细胞的张力发生改变,荚皮围绕着与内生后壁组织层的纤维方向的平行轴呈螺旋扭转而卷曲,进而将连接背、腹缝线的薄壁组织拉裂,使荚皮开裂随后散出种子的现象称为炸荚^[1-2]。大豆生产中炸荚现象是一种不良的生产现象,是导致栽培大豆产量损失的主要原因之一。早在 1989 年就有印度学者^[3]对热带和亚热带的地区大豆炸荚造成的损失进行了统计报道,易炸荚和中度炸荚大豆品种的田间产量损失分别为 57 ~ 175 和 0 ~ 186 kg·hm⁻²。

收稿日期:2017-03-17
基金项目:国家高技术研究发展计划“863 计划”(2012AA101106)。
第一作者简介:秦玉涛(1990 -),男,硕士,主要从事大豆分子遗传育种研究。E-mail: 372766399@qq.com。
通讯作者:郭蓓(1962 -),女,博士,教授,主要从事植物分子遗传育种研究。E-mail: guobeibac@sohu.com。

2006 年,张跃进等^[4]对黄淮流域主栽的 32 个大豆品种进行了炸荚性的研究,指出因炸荚造成的田间产量损失约为 $112.5 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$ 。

炸荚是大豆的一种不良属性,炸荚性状与豆荚本身的结构有着非常密切的联系,研究炸荚性状及其影响因素不仅对大豆炸荚的生物学机制具有重要的理论意义,而且对抗炸荚、高产量大豆新品种的选育也具有非常重要的实践意义。

MADS-box 基因家族是一类转录因子,广泛地存在于动物、植物和真菌等真核生物中,它们在 N 端含有一个由 58 ~ 60 个氨基酸组成的保守结构域^[5-6]。植物 *MADS-box* 基因在植物的生长发育过程中发挥着重要的调节作用,迄今为止,已经在植物中发现了很多 *MADS-box* 基因,其中大多数成员在植物器官发育中发挥着重要的作用^[7]。尽管 *MADS-box* 基因研究广泛,但是在大豆上少有研究。Huang 等^[8]研究发现 *GmMADS28* 属于 *MADS-box* 蛋白 AGL9/SEP 亚家族中的一员,对控制花器官数目和花特性等有重要作用,*GmMADS28* 基因能够激活烟草上 *SOC1*, *LEAFY*, *AGL8/FUL*, *DEF* 同源家族基因的表达,并且 *GmMADS28* 基因还能够与大豆中同源的 *SOC1*, *LEAFY*, *AGL8/FUL*, *DEF* 基因发生相互作用。

拟南芥中的 *FUL* 基因属于 *MADS-box* 基因家族,对拟南芥角果荚开裂性状起作用,在拟南芥中过表达 *FUL* 基因导致其成熟角果的果荚不开裂^[9]。从桃树中克隆出与 *FUL* 同源的基因 *PpMADS6*,通过使拟南芥过表达 *PpMADS6* 基因发现其开花时间提前,单花器官数目增多,并且出现顶端花和多果荚,角果在成熟期不开裂等性状^[10]。将拟南芥的 *FUL* 基因与大豆组进行比对,发现大豆中的 *AGL8* 基因与 *FUL* 基因同源性较高。有研究表明 *AGL8* 基因在调控分裂组织的分化以及随后的心皮发育中起调控作用^[11-12]。

本实验室前期根据拟南芥 *FRUITFULL* 和桃 *PpMADS6* 两个基因序列,利用同源克隆方法获得大豆 *AGL8* 基因(*GmAGL8*),片段长度为 735 bp^[13],并将其构建到表达载体 pCambia1300-35S-EYFP 上,通过农杆菌介导的大豆子叶节遗传转化方法,获得了转 *GmAGL8* 基因的大豆植株。

本研究意在确定目的基因在转基因大豆后代中的遗传稳定性,并通过对转基因植株进行基因表达分析以及炸荚表型观察,逐步确定 *GmAGL8* 基因在大豆生长发育过程以及炸荚性状表现中的作用,

为进一步探索 *GmAGL8* 基因的作用机制及转基因大豆的研究及应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

转基因受体为大豆品种中黄 10 号,由中国农业科学作物研究所邱丽娟老师提供(本实验室留种繁育);带有目的基因的 pCambia1300-35S-*GmAGL8*-EYFP 重组质粒由本实验室构建;SuperRT cDNA 第一链合成试剂盒购自北京康为世纪生物科技有限公司;SYBR[®] Premix Ex Taq[™] 试剂盒购自 TAKARA 公司;RNA prep Pure Plant 试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司。

1.2 方法

1.2.1 转基因植株后代的繁育 转基因植株在培养室内进行培养。光周期为光照 12 h/黑暗 12 h,控制温度在 28 ~ 30℃ 左右。将前期获得的转基因植株 T₀ 代继续繁育获得 T₁、T₂ 和 T₃ 代。

1.2.2 转基因植株的 PCR 鉴定 采用 CTAB 法,提取大豆植株幼嫩叶片的基因组 DNA。以 pCambia1300-35S-*GmAGL8*-EYFP 重组质粒为阳性对照,以野生型大豆为阴性对照,对转基因植株进行目的基因的 PCR 检测。PCR 反应条件如下:95℃ 预变性 5 min,95℃ 变性 30 s,57℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 2 min,35 个循环,最后 72℃ 延伸 10 min,4℃ 终止反应。将 PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳。

1.2.3 转基因植株的 RT-qPCR 检测 选取 PCR 检测鉴定为阳性的转基因植株,利用 RNA prep Pure Plant 试剂盒进行 RNA 提取,测定浓度后利用 SuperRT cDNA 第一链合成试剂盒将相对应的 RNA 反转录获得 cDNA。采用 Primer Premier 5 设计基因的特异 RT-qPCR 引物。选取 *GAPDH* 作为内参基因,野生型大豆中黄 10 号为对照组,使用转基因植株的叶片组织 cDNA 为模板,对目标基因 *GmAGL8* 进行 RT-qPCR 扩增。反应在 ABI7300 实时荧光定量 PCR 仪上进行,反应程序如下:50℃ 保温 2 min;95℃ 预变性 10 min;95℃ 15 s,60℃ 1 min,40 个循环。每个样本及对照均重复 3 次,采用两步法进行 PCR 扩增,根据相对定量中的 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法进行计算^[14]。

1.2.4 转基因大豆炸荚性状观察 随机选取 T₁、T₂ 和 T₃ 代转基因和野生型中黄 10 号的种子,放入培养皿中浸种至萌发后,栽植于花盆中,每盆 1 株在培养室中培育,光周期为光照 12 h/黑暗 12 h,温度控制在 30℃ 左右,定期浇水待其成熟观察大豆炸荚

情况,统计炸荚率。

2 结果与分析

2.1 转 *GmAGL8* 基因后代的遗传稳定性分析

种植 T_1 代植株,并继续繁育获得 T_2 、 T_3 代植株,提取 DNA 进行 PCR 检测, T_1 、 T_2 、 T_3 代植株在基因

扩增后均有 750 bp 左右的特异片段出现,片段大小与带有 *GmAGL8* 基因的重组质粒相符(图 1)。对检测的转基因大豆植株阳性率进行统计, T_1 代阳性率为 87.5%, T_2 代为 100%, T_3 代亦为 100%。证明 *GmAGL8* 在转基因后代中已基本能够实现稳定遗传。

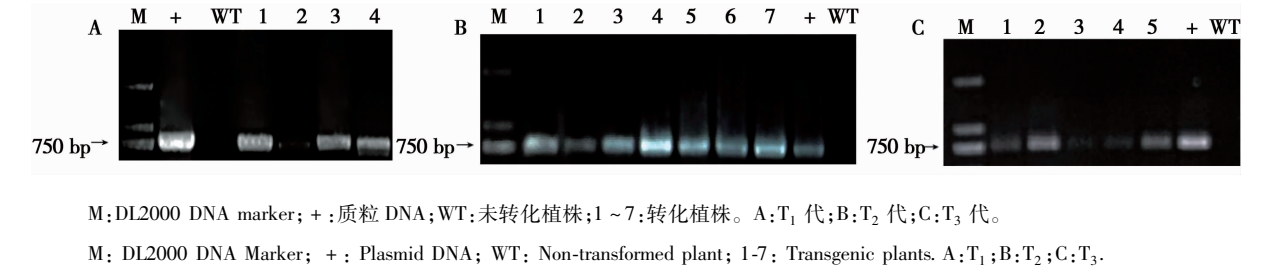


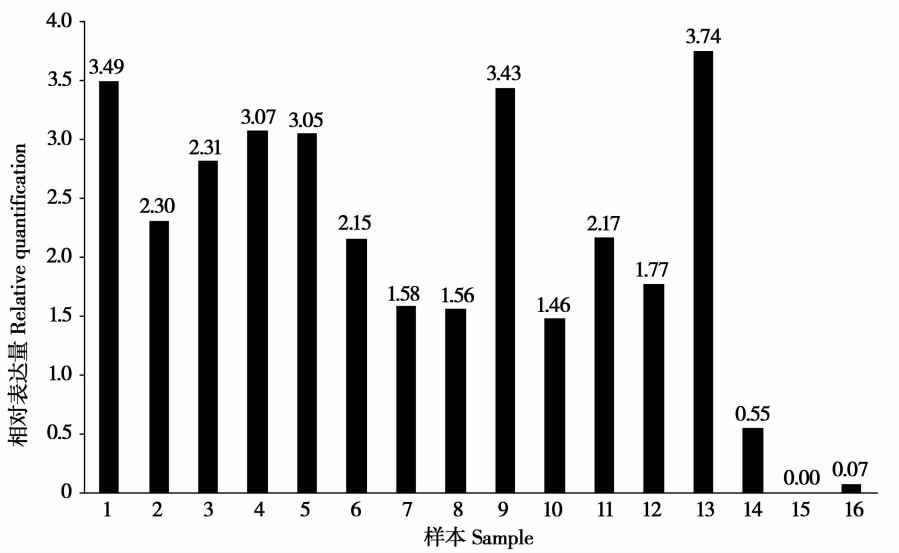
图 1 转基因后代 PCR 检测
Fig. 1 PCR detection of transgenic plants

2.2 转基因植株的荧光定量 PCR 检测

首先对内参基因 *GAPDH* 和目的基因 *AGL8* 进行了溶解曲线测试,结果 2 个基因均出现了单一且清晰的峰,这说明扩增产物单一,未出现非特异性产物。

之后,以野生型大豆中黄 10 号为对照进行基因表达分析。结果显示如图 2 所示,当以未转化植株

(图 2 中 15 号样品)作为校正物时,各转化株的 *GmAGL8* 基因表达量均高于野生型, T_1 代各植株间基因相对表达量的平均值为 2.944, T_2 代的平均值为 2.235。每个世代中转化植株之间 *GmAGL8* 的表达量有所不同,在 T_1 代中表达量最高的为 3.49, T_2 代中最高的为 3.74。



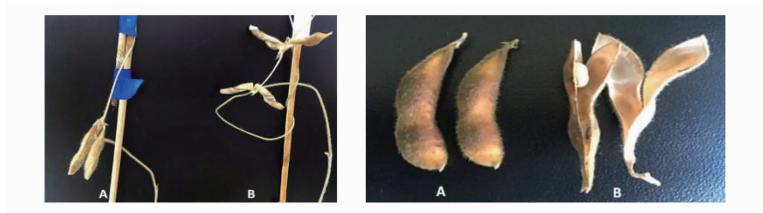
1~5: T_1 代植株;6~13: T_2 代植株;14~16:未转化植株。
1-5: T_1 transgenic plants;6-13: T_2 transgenic plants;14-16:Non-transgenic plants.

图 2 转基因植株 RT-qPCR 检测
Fig. 2 RT-qPCR detection of transgenic plants with *GmAGL8*

2.3 炸荚表型观察

经过近 90 d 温室培养,大豆植株豆荚陆续成熟,近 120 d 基本成熟。在相同环境和培养条件下,野生型较转基因大豆提前炸荚近 30 d,图 3 为培养 120 d 时转基因和非转基因大豆豆荚开裂情况对

比。 T_1 、 T_2 和 T_3 代的炸荚率分别为 14.3%、10.0% 和 6.25%,不同世代转基因大豆的平均炸荚率为 9.09%,而非转基因大豆炸荚率高达 83.3%,二者之间存在显著的差异(表 1)。由此初步推测 *GmAGL8* 基因确实与大豆炸荚性状有关。



A:转基因植株;B 非转基因植株。
A;Transgenic plant; B;Non-transgenic plant.

图 3 培养 120 d 大豆豆荚开裂对比

Fig. 3 Difference of the soybean pod-shattering after cultivated 120 d

表 1 转基因与非转基因炸荚率比较

Table 1 Different pod-shattering rate between transgenic and Non-transgenic plants

样品 Sample	株数 Plants	结荚数 Pod number	炸荚数 Pod-shattering number	炸荚率 Pod-shattering rate/%
T ₁	3	7	1	14.3
T ₂	3	10	1	10.0
T ₃	6	16	1	6.25
非转基因 Non-transgene	4	12	10	83.3

3 结论与讨论

在获得的转基因植物中目的基因能否稳定的遗传对基因工程育种具有重要意义。影响外源基因遗传稳定性的因素很多,有研究发现,植物转基因的稳定性受种子特异发育因子、热休克元件、光控因子等因素影响^[15]。本试验对 T₁、T₂、T₃ 代植株分别进行了 PCR 检测,随着世代增加,植株的阳性率逐渐趋于稳定,T₂ 和 T₃ 代均维持在 100% 的阳性率。这表明 *GmAGL8* 基因从 T₂ 代开始便可以维持在后代植株中的稳定遗传。

本试验中对转基因阳性株继续进行 RT-qPCR 检测后发现,*GmAGL8* 基因的表达量都明显高于非转基因植株,说明目的基因在受体中不仅能够稳定遗传,而且可以实现正常表达,同时各转基因植株之间的基因表达情况存在差异性。

通过本试验后续的对炸荚性状表型观察分析,明显看出野生型大豆较转基因大豆植株炸荚时间早,且转基因植株的炸荚率显著低于野生型,这说明目的基因在转基因受体中实现了功能表达,初步判断 *GmAGL8* 基因的过量表达具有抑制大豆炸荚的作用。

相关研究表明大豆炸荚是一个受多种因素影响的数量性状,主要是受遗传内因和环境外因两大因素影响的。已有研究表明,相同环境因素下,不同大豆品种间的抗炸荚能力差异显著。外界因素如温度、空气湿度也会对大豆炸荚产生很重要的影响^[16-18]。本试验进行的大豆炸荚表型鉴定是在培

养室中完成的,与大田环境存在明显不同,因此具有一定的局限性,后期需要进一步开展田间鉴定试验。

大豆的抗炸荚性对于产量及其收获都具有重要意义,因此,我们会在目前的研究基础上继续开展对 *GmAGL8* 基因功能的深入探讨,对转基因所引起的 *GmAGL8* 基因表达模式、豆荚结构与发育过程、炸荚特性等方面的变化加以研究,逐步揭示 *GmAGL8* 基因的作用机制。

参考文献

[1] 董钻. 大豆产量生理[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000: 17-18. (Dong Z. Soybean yield physiology[M]. Beijing: Agriculture Press, 2000, 17-18.)

[2] 王连铮, 郭庆元. 现代中国大豆[M]. 北京: 金盾出版社, 2007: 199-200. (Wang L Z, Guo Q Y. Modern Chinese soybean [M]. Beijing: Jindun Press, 2007: 199-200.)

[3] Philbrook B D, Oplinger E S. Soybean field losses as influenced by harvest delays [J]. Agronomy Journal, 1989, 81 (2): 251-258.

[4] 张跃进, 马赛斐, 高启云, 等. 黄淮流域主栽大豆品种炸荚性研究[J]. 河南农业科学, 2006(6): 56-59. (Zhang J Y, Ma S F, Gao Q Y, et al. Study on the pod-shattering of main soybean varieties of Huanghuai area[J]. Journal of Henan Agricultural Sciences, 2006(6): 56-59.)

[5] Theissen G, Becker A, Di Rosa A, et al. A short history of *MADS-box* genes in[J]. Plant Molecular Biology, 2000, 42(1): 115-149.

[6] Becker A, Winter K U, Meyer B, et al. *MADS-box* gene diversity in seed plants 300 million years ago[J]. Molecular Biology and E-

volution, 2000, 17(10): 1425-1434.

[7] 黄方, 迟英俊, 喻得跃. 植物 *MADS-box* 基因研究进展[J]. 南京农业大学学报, 2012, 35(5): 9-18. (Huang F, Chi Y J, Yu D Y. Research advances of *MADS-box* genes in plants[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2012, 35(5): 9-18.)

[8] Fang H, Guang L X, Ying J H, et al. A soybean *MADS-box* protein modulates floral organ numbers, petal identity and sterility [J]. BMC Plant Biology, 2014,14: 89.

[9] 褚婷婷, 谢华, 徐勇, 等. 植物 *MADS-box* 基因 *FRUITFULL* (*FUL*)研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2010, 30(9):98-104. (Zhe T T, Xie H, Xu Y, et al. Research advances of plant *MADS-box* gene *FRUITFULL*(*FUL*) [J]. China Biotechnology, 2010, 30(9): 98-104.)

[10] 徐勇, 张林, 马荣才. 桃(*Prunus persica*)中 2 个 *MADSbox* 基因功能的初步鉴定和遗传作图[J]. 科学通报, 2008, 53(5): 537-543. (Xu Y, Zhang L, Ma R C. Function preliminary evaluation and genetic mapping of two *MADSbox* gene in peach(*Prunus persica*) [J]. Chinese Science Bulletin, 2008, 53(5): 537-543.)

[11] Hempel F D, Weigel D, Mandel M A, et al. Floral determination and expression of floral regulatory genes in *Arabidopsis*[J]. Development, 1997, 124: 3845-3853.

[12] Ferrandiz C, Gu Q, Martienssen R, et al. Redundant regulation of meristem identity and plant architecture by *FRUITFULL*, *APETALA1* and *CAULIFLOWER* [J]. Development, 2000, 127: 725-734.

[13] 李冉阳, 秦玉涛, 张倩, 等. 大豆 *GmAGL8* 基因的克隆及生物信息学分析[J]. 安徽农业科学, 2015, 43(18): 45-48. (Li R Y, Qin Y T, Zhang Q, et al. Cloning and bioinformatic analysis of gene *GmAGL8* in soybean [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2015, 43(18): 45-48.)

[14] Lerat S, England L S, Vincent M L, et al. Real-time polymerase chain reaction quantification of the transgenes for roundup ready corn and roundup ready soybean in soil samples[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53(5): 1337-1342.

[15] 王海慧, 田源, 白国辉, 等. 转基因植物遗传稳定性影响因素的研究现状[J]. 贵州农业科学, 2013(9): 5-8. (Wang H H, Tian Y, Bai G H, et al. Advances in influencing factors of genetic stability of transgenic plants[J]. Guizhou Agricultural Sciences, 2013(9): 5-8.)

[16] 彭玉华, 袁建中, 杨国保. 黄淮流域大豆炸荚性初步分析[J]. 大豆科学, 1991, 10(4): 285-230. (Peng Y H, Yuan Z J, Yang B G. Primary analysis of soybean shattering in Chinese Yellow River soybean adaptation region [J]. Soybean Science, 1991, 10(4): 285-230.)

[17] 马赛斐, 南翠梅, 张凤彩, 等. 黄淮流域主栽大豆品种炸荚性研究初报[J]. 大豆通报, 2006(2): 21-23. (Ma S F, Nan C M, Zhang F C, et al. Preliminary investigation on pod-shattering of main soybean cultivars in Huanghuai area[J]. Soybean Bulletin, 2006(2): 21-23.)

[18] Kang S T, Kwak M, Kim H K, et al. Population-specific QTL and their different epistatic interactions for pod dehiscence in soybean[*Glycine max*(L.) Merr.] [J]. Euphytica, 2009, 166(1): 15-24.