

花器发育调节基因 *gaga1* 转化 大豆的初步研究^{*}

喻德跃¹ 魏国兰¹ 孙 英¹ Teemu H Teeri²

(1. 南京农业大学大豆研究所, 国家大豆改良中心, 作物遗传与种质创新国家重点实验室, 南京 210095;
2. Institute of Biotechnology, 00014—University of Helsinki, Finland)

摘要 通过花粉管通道法用非洲菊基因 *gaga1* 转化 N2899(质核互作雄性不育保持系)、通州豆、95—7等大豆受体。处理的花朵总数为 4300 朵, 共获 3000 多粒种子。经卡那霉素田间鉴定, 获得了 14 株抗卡那霉素的幼苗。通过抗性标记基因 *npt II* 和目标基因 *gaga1* 的 PCR 检测, 发现有两株 N2899 具有阳性信号, 初步证明非洲菊基因 *gaga1* 已整合到这两株大豆的基因组中。形态分析表明: 与未转化 N2899 相比, 转基因大豆株型矮小, 始花期提前, 盛花期花数量较少, 结荚不多。显微分析发现, 与对照相比转基因大豆花器官结构没有明显改变。

关键词 发育调节基因; 遗传转化; 花粉管通道; 大豆

中图分类号 S 565. 103. 53 文献标识码 A 文章编号 1000—9841(2003)02—0079—04

花器官形成与发育的分子遗传学基础研究在模式植物拟南芥和金鱼草上取得了突出的进展, 由此发展了著名的 ABC 模型 (Coen & Meyerowitz, 1991)。该模型认为, A 类基因决定第一轮器官(萼片)的形成, A 和 B 决定第二轮器官(花瓣)的形成, B 和 C 决定第三轮器官(雄蕊)的形成, 而 C 决定第四轮器官(雌蕊)的形成。由此可以根据需要改变或修饰植物花器官的结构 (Weigel D & Meyerowitz EM, 1994)。分子克隆和系统发育研究表明, 大部分 ABC 基因属于 MADS 家族——一个在动物、植物、微生物上均有相当保守序列的调节基因家族 (Theissen G et al. 1996)。大豆具有蝶型花, 由旗瓣、翼瓣和龙骨瓣组成。作为重要的蛋白质来源, 大豆植株的发育包括叶片、花和根的发育的分子机理研究与其他模式植物相比还相当滞后, ABC 类基因如何调节大豆器官发育的研究在国内外还未见报道。本研究采用非洲菊花器发育调节基因 *gaga1* (Yu et al. 1999) 转化大豆, 获得转基因植株, 并希望以此为起点研究 *gaga1* 对大豆发育的影响。

1 材料与方法

1.1 转化受体

N2899(质核互作雄性不育系保持系)、通州豆、95—7 等, 由国家大豆改良中心种质资源研究室提供。

1.2 外源基因

本研究采用的农杆菌菌株为 TA T613, 由芬兰 Helsinki 大学生物技术中心提供。该菌株含双元载体 pHT T613, 带有 CaMV 35S 启动子和 NOS 转录终止信号; 质粒上顺向插有非洲菊基因 *gaga1*, 大小为 1.4 kb。其筛选基因为 *npt II* (新霉素转移酶基因) (Yu et al. 1999)。质粒提取和纯化参照标准试验方案进行 (Sambrook et al. 1989)。

1.3 花粉管通道技术

在 7—8 月份大豆盛花期, 上午 6 点选择植株中上部未开放的花蕾 (花冠与最高花萼等高或花冠高于最高花萼 1 mm, 即花微露颜色) 挂牌, 于下午 3—6 点进行转化。不除去花瓣, 用镊子分开两个龙骨瓣, 露雄蕊和柱头。轻轻抖落花药, 用医用剪刀在花柱弯曲处剪去柱头, 然后用微量加样器在花柱上滴质粒 DNA (300 μg/ml) 2—3 μl, 蒸发干后, 再滴加第二次。3 天后和结荚期内调查成活率, 并随时去掉新长出的花芽。设滴加未加质粒的 TE 溶液的受体材

^{*} 收稿日期: 2002—09—16

基金项目: 国家转基因植物研究与产业化专项 (J00—B—003—07)、教育部霍英东青年教师基金 (71024) 和江苏省青年科技基金 (BQ98033)

作者简介: 喻德跃 (1965—), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向植物分子遗传学与生物技术。E-mail: dyu@smtp.njau.edu.cn

料为对照。试验在南京农业大学江浦试验站进行。

1.4 转基因大豆的卡那霉素初步检测

参照在棉花上的技术实行(孙敬等, 2000), 检测所用浓度为 400ppm。

1.5 转基因大豆的 PCR 检测

PCR 引物由上海生工公司(Sangon)合成。大豆基因组 DNA 提取按照标准实验方案进行(Sam-brook et al. 1989)。

npt II 引物:

P1. 5'-3':TCCGGCCGCTTG GGTGGAGAG

P2. 5'-3':CTG GCGGAGCCCCTGATGCT

gaga1 引物:

P1. 5'-3':ATGGAAAATTCTGATGTGCTT

P2. 5'-3':TTACTACTAACTGGAGCGGCGT

PCR 反应体系:采用 amersham pharmacia 生产的 Ready-To-Go™ PCR 试剂盒。加入引物各 1μl(7pmol), 10-50ng 的大豆叶片基因组 DNA 或 1ng 的质粒 DNA, 补 D. DH₂O 至 25μl。反应条件:预变性 95℃ 5min, 后经 95℃ 15s, 64℃ (或对于 *gaga1* 引物 52℃) 59s, 72℃ 2min, 30 个循环, 再延伸 10min。反应在 PE2400 型 DNA 扩增仪上进行。扩增后在 1%的琼脂糖凝胶电泳检测、拍照, 所用凝

胶成相系统为 amersham pharmacia MASTER-VDS。

2 结果与分析

2.1 转基因大豆的抗卡那霉素检测

运用花粉管通道法转化所获得的种子分两批种植和鉴定。第一批通州豆和 N2899 各 300 粒于 2000 年 10 月种植于温室内, 当第一对真叶出现时, 用浸渍有卡那霉素(400 ppm)的脱脂棉条沾叶, 5 天后观察植株反应。结果, 发现 2 株完全抗性的通州豆, 叶片呈绿色, 其余植株叶片上都有黄色斑点。同样, 在 N2899 中, 发现 1 株完全抗性的, 其表现情况与上相同。10 天后这 3 株呈抗性的植株的叶片仍为绿色, 无任何敏感性状表现。而敏感植株叶片上的黄色斑点已转变为褐色斑块(魏国兰, 2001)。以上都设注射未加质粒的 TE 溶液的受体材料为对照。剩余 2700 多粒种子于 2001 年 3 月种植于网室, 筛选出 11 株卡那霉素抗性植株。其中有 5 株 N-2899, 有 2 株通州豆, 有 4 株 95-7。因此, 以上 14 株大豆可能含有外源基因 *gaga1*。

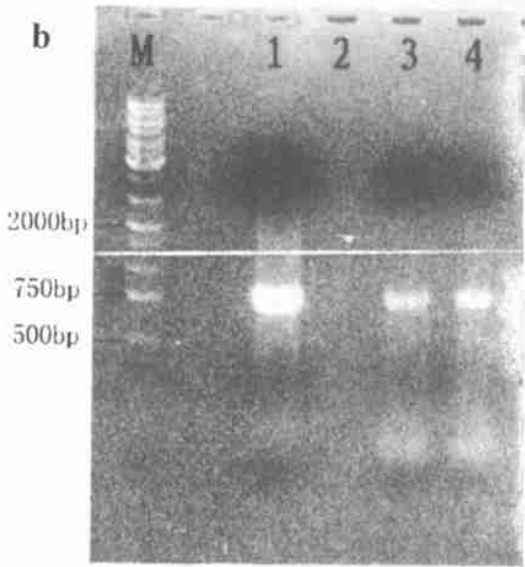
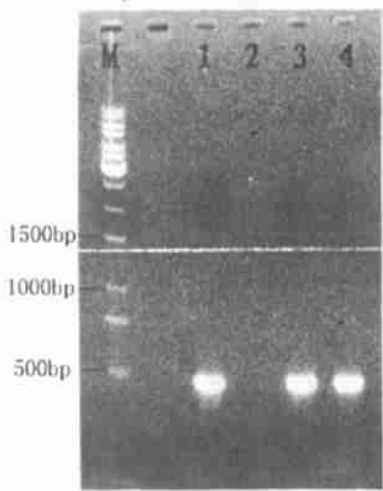


图1 *npt II* (a)和 *gaga1* (b)的 PCR 扩增检测

Fig. 1 PCR detection of *npt II* (a)and *gaga1* (b)

注: 1. 阳性对照(质粒 pHTT613); 2. 非转基因植株; 3-4. 转基因植株

Note: 1. Positive control; 2. Untransformed plants; 3-4. Transgenic plants

2.2 转基因大豆的分子验证

2.2.1 *npt II* 基因的 PCR 扩增检测

提取上述 14 株对卡那霉素呈抗性的大豆植株的基因组 DNA, 利用 *npt II* 引物进行 PCR 检测。

以质粒作为阳性对照, 未转化受体材料为阴性对照。结果仅发现有 2 株 N2899 的植株扩增出所导入的 *npt II* 基因编码区的 470bp 的片段, 大小与阳性对照相同。而非转基因大豆中则未能扩增出该片段。

(见图 1a)。

2.2.2 *gaga1* 的 PCR 扩增检测

利用 *gaga1* 引物对上面扩增出 *npt II* 编码区片段的 2 株 N2899 进行 PCR 检测。以质粒作为阳性对照, 未转化受体材料为阴性对照。结果发现这 2 株 N2899 的植株扩增出所导入基因 *gaga1* 编码区的 795bp 片段, 与阳性对照相同。而未转化植株未能扩增出相应片段(图 1b)。

2.3 转基因大豆的表型分析

上述两株 N2899 转基因植株中, N2899₁ 植株矮小, 只有少许花芽, 结一个荚, 内含一粒种子, 可能是由于温室中的生长条件不适宜所致(未展示)。图 2

为另外一株转基因大豆(N2899₂), 它表现矮小, 在 30 天苗龄时比同期的对照植株矮 10cm 左右。花芽数较少, 但花期却提前, 比对照提前 7 天; 结荚数为 9 个, 但成熟期延长。N2899₁ 和 N2899₂ 的共同特点是株型矮缩, 盛花期花量较少, 花器较小, 结荚数较少。显微镜分析没有明显的花器结构上的变化(未展示), 但同样的基因在油菜上的表达却获得了无花瓣油菜。由于 N2899₁ 和 N2899₂ 营养体较小, 而且还应尽力保证它们能结实。因而没有足够的材料进行更深一步的研究, 如 Southern 杂交、Northern 杂交、电子显微镜分析等, 这些工作只能在后续世代开展。



图 2 转基因大豆 N2899₂ 的表型(挂牌者)

Fig 2 Phenotype of transgenic soybean N2899₂(with etiquette)

3 讨论

gaga1 为 Yu 等(喻德跃, 1999)从非洲菊中分离出的控制花器官发育的 C 类基因之一, 与拟南芥的花器官基因 *agamous* 同源。鉴于国内外尚没有对大豆花器官的发育开展分子遗传学研究, 本文首次将 *gaga1* 基因导入大豆。根据花器官发育的 ABC 模型(Coen & Meyerowitz, 1991), 如 C 类基因 *gaga1* 的异位表达完全抑制大豆花器官 A 类基因的作用, 则大豆花器官的第一轮的萼片将变成雌蕊, 而第二轮的花瓣将变成雄蕊; 若 *gaga1* 的异位表达部分抑制大豆花器官 A 类基因的作用, 则大豆花器官的第

一轮的萼片将变成类雌蕊, 而第二轮的花瓣将变成类雄蕊; 二者应均为无(少)花瓣类型。但在本研究中的获得两个转基因植株的花器官结构与对照相比都没有明显改变, 因而在此应对其原因进行一些探讨。

从表面上看, 最直观的原因可能是基因沉默。事实上, 基因沉默是植物转基因研究中的普遍现象。基因沉默与所用的遗传转化方法有很大关系。王关林等(1999)认为, 应用花粉管导入也就是将裸露的 DNA 直接导入受体细胞。因此, 在转化过程中进入受体细胞的外源 DNA 拷贝数较多, 整合到植物细胞基因组的拷贝数也较多, 整合的位点也多。这很可能导致多拷贝的外源基因连在一起, 发生甲基化作

用而失活;这种失活被称作为顺式失活,它可能在转基因的后续世代,随着基因的分离而自然消失,恢复基因的正常表达。当然,整合的拷贝数的多少可通过Southern杂交来研究。本研究因材料的限制,未能对此进行分析。但孟金陵等用同样的基因 *gaga1* 转化油菜,发现 T_0 代的植株均有无花瓣的花朵出现。同时还伴有植株矮化;花序无分枝,育性减弱;盛花期花量极少等变异现象,这些现象与本研究中的两株转基因大豆的表现大体一致。

本研究中的 N2899₁ 和 N2899₂ 虽然在花器官的结构上没有发现变化,但与对照相比它们在株型等方面却有了比较明显的变异。由此看来,导入的基因并没有沉默而是在其它方面进行着调控。从花的发育的过程来分析, N2899₁ 和 N2899₂ 的植株矮小和花期提前,很可能是导入的 *gaga1* 调控着大豆花的诱导过程,缩短了从营养生长到生殖生长的时间,这样就很可能导致植株的营养体变小,但花期却提前。从生理的角度来分析, *gaga1* 也可能调控大豆内源激素如生长素的水平,从而使大豆植株矮小。当然,突变的原因还可能是 *gaga1* 插入植物基因组时,引起植物基因组的重排,导致其他性状的改变。此外,在非洲菊上, *gaga1* 和另外一个同源基因 *gaga2* 共同参与了花药的形成和发育(Kotilainen et al, 2000),因此,或许需要同时采用 *gaga1/gaga2*

转化大豆才有可能使在花瓣的位置形成花药或类花药结构,从而获得目标性状一无(少)花瓣,这正是以后应该尝试的研究。

参 考 文 献

- 1 王关林,方宏筠.植物基因工程原理与技术[M].北京:科学出版社,1998.
- 2 孙敬.利用卡那霉素间接鉴定法进行大规模的棉花转基因育种技术[J].作物学报,2000,12(5):270—276.
- 3 魏国兰.非洲菊花器发育调节基因 *gaga1* 转化大豆的初步研究[D].南京农业大学硕士论文,2001.
- 4 Coen ES, Meyerowitz EM. The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. *Nature*, 1991, 353: 31—37.
- 5 Kotilainen M. GRCD1, an AGL2-like MADS box gene, participates in the C function during stamen development in *Gerbera hybrida* [J]. *Plant Cell*, 2000, 12: 1893—1902.
- 6 Sambrook J. Molecular cloning: A laboratory manual (Cold Spring Harbor [R]. NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press), 1989.
- 7 Theissen G. Classification and phylogeny of the MADS-box gene multigene family suggest defined roles of MADS-box gene subfamilies in the morphological evolution of eukaryotes [J]. *Journal of Molecular Evolution*, 1996, 43: 484—516.
- 8 Weigel D, Meyerowitz EM. The ABCs of floral homeotic genes [J]. *Cell*, 1994, 78: 203—209.
- 9 Yu DY. Organ identity genes and modified patterns of flower development in *Gerbera hybrida* (Asteraceae) [J]. *Plant Journal*, 1999, 17(1): 51—62.

TRANSFORMATION OF SOYBEAN WITH FLORAL REGULATORY GENE GAGA1

Yu Deyue¹ Wei Guolan¹ Sun Ying¹ Teemu H Teeri²

(Nanjing Agricultural University, Soybean Research Institute, National Center for Soybean Improvement, National Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement, Nanjing 210095, Institute of Biotechnology, 00014—University of Helsinki, Finland)

Abstract Transformation of soybean with *gaga1* was conducted using several accessions including N2899, Tongzhoudou, 95—7 etc. through pollen tube pathway. About 3000 seeds were obtained from 4300 flowers treated with Ti plasmid pHT T613. By indirect identification method with Kanamycin in the field, 14 plants obtained were found resistant to Kanamycin. These 14 plants were examined by PCR with NPT II and *gaga1* specific primers. Two N2899 plant showed positive signals. This indicated preliminarily that *gaga1* was integrated into the genome of the two plants. These two transgenic plants were shorter and had less flowers during full blooming period, but no obvious modification was found in floral structure compared to untransformed N2899. The detailed characterization of transgenic plants shall be carried out in further generations.

Key words Regulatory genes; Genetic transformation; Pollen tube pathway; Soybean