

大豆白化致死突变系的发现与分析*

刘昭军¹ 李希臣¹ 刘丽艳¹ 刘琦¹ 李铁¹ 陈伊里²

(1. 黑龙江省农科院生物技术研究中心, 哈尔滨 150086; 2. 东北农业大学农学院, 哈尔滨 150030)

摘要 利用花粉管通道技术将携带有菜豆几丁质酶基因的质粒 pBch 转化大豆品种绥农 10 号, 在转化的 D₄ 代出现白化致死突变株系。通过同工酶技术、PCR 技术和 RAPD 分析方法对白化致死突变系进行了研究, 结果表明: 白化致死突变株各个部位的 SOD 酶活性、POD 酶活性均高于正常株, 在根中表现尤为明显; PCR 扩增结果表明在白化致死突变株系中存在几丁质酶基因, 证明转化成功; RAPD 方法初步分析了大豆白化致死突变株与正常植株间的差异, 获得 750bp 差异片段。

关键词 大豆; 白化致死; 同工酶分析; PCR; RAPD

中图分类号 S 565.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-9841(2005)03-0230-03

利用突变体研究基因功能是功能基因组学的重要方法。植物白化致死突变体的产生为研究叶绿素合成以及白化致死相关基因研究提供理想材料。目前未见通过花粉管通道外源 DNA 导入大豆产生白化致死突变体的报道。本文报导对黑龙江省农科院生物技术研究中心所发现的通过花粉管通道外源 DNA 导入产生的大豆白化致死突变系进行的同工酶及 PCR、RAPD 分析, 初步分析了白化致死原因。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1998 年我们利用花粉管通道技术将携带有几丁质酶基因的质粒 pBch 转化大豆品种绥农 10 号, 当年获得种子 12 粒。以后各世代种植采用荚系法。2002 年 D₄ 代种植后, 在出苗 10 天左右、两片真叶伸开后 2 天, 发现有三行部分植株叶片退绿逐渐产生白化的现象, 一周后白化植株死亡, 其余植株则正常生长。2002 年收获产生白化致死株行的正常株, 下年按单株继续种植。按此方式种植 2003 年、2004 年则继续产生白化现象。2004 年将白化突变株在叶色变白后两天未死亡之前将其取下, 同时取同株行的正常株留做实验分析材料。

1.2 实验方法

同工酶分析: 白化致死突变株与正常植株各取

5 株。分别取各自的根、下胚轴、上胚轴及叶片用于超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)的分析。活性测定及同工酶电泳按胡能书等方法进行^[1]。

导入基因的 PCR 验证: 根据菜豆几丁质酶基因两端的序列设计引物进行 PCR 扩增, 上游引物序列: 5'-AGCAGTGTGGAAGGCAAGCAG-3'、下游引物序列: 5'-CTGACCTTGTCACCTCTCAG-3', 反应体积为 20μl (20mM dNTP16μl, 25Mm MgCl₂ 2μl, 10X 反应缓冲液 2μl, 引物 1、引物 2 各 1μl, 模板 DNA 1μl, 4U/μl Taq 酶 0.4μl, 水 10μl)。反应程序为 95℃, 10min+30 个循环(94℃, 1min; 46℃, 1min; 72℃, 2min)+72℃, 10min, 4℃保温。反应结束后, PCR 扩增产物在 1.4% 琼脂糖凝胶上电泳。电压为 5V/cm, 电泳 2h。模板为白化致死植株, DNA 提取参照《分子克隆实验指南》^[2]方法进行。

RAPD 差异分析: 选用 8 株白化致死突变株及 4 株正常株, DNA 提取参照分子克隆实验指南方法进行^[2]。选取上海生工生物工程公司的 86 个随机引物对白化株及正常株进行 RAPD 扩增, 进行差异分析。扩增程序为 95℃ 2min30s+35 个循环(94℃ 30s、37℃ 1min、72℃ 2min)、72℃ 5min 延伸扩增。扩增产物在 1.2% 琼脂糖凝胶中电泳, 电压为 4V/cm, 电泳 3h。

* 收稿日期: 2005-03-07

作者简介: 刘昭军(1974-), 男, 助研, 在职博士研究生, 研究方向作物基因工程与分子育种。E-mail: liuzhaojun7@yahoo.com.cn

2 结果与分析

2.1 同工酶分析结果

通过同工酶活性及酶谱分析结果表明:白化株各个部位的 SOD 活性、POD 活性均高于正常株,在根中表现尤为明显。结果见表 1 及图版 1、图版 2。POD 和 SOD 同工酶是植物体内重要的活性氧防御酶,白化突变株的叶绿素破坏,引起自身活性氧产生与消除平衡的破坏,积累的活性氧启动了 POD 和 SOD 等防御酶的活性,使其大量表达。从另外一个角度上看,这在一定程度上反映了某些生理生化途径的阻断或变异使生物体自身“免疫系统”启动应急反应。当白化现象产生后,大豆白化株光合作用能力下降、缺乏营养供应,使机体各部分细胞走向衰败状态,机体应急抗逆信号启动自身抗逆系统,因而使两种具有保护功能的酶活性显著增强。

表 1 正常植株与白化突变株的 SOD、POD 同工酶活性比较
Table 1 Comparison of SOD and PPO isozymes activity between normal plant and albinos lethal plant

植株类别 Plant kinds	取样部位 Samples	SOD 酶活性 SOD enzyme activity	POD 酶活性 POD enzyme activity
正常株	根	55.60	28.44
	下胚轴	32.45	20.46
	上胚轴	13.98	10.29
	叶片	21.26	19.29
白化株	根	147.75	32.19
	下胚轴	42.49	25.16
	上胚轴	19.04	18.15
	叶片	32.87	22.12

2.2 导入基因的 PCR 验证

为了弄清外源几丁质酶基因是否已经整合到导入后代中,通过 PCR 扩增,7 株白化致死株均与阳性对照扩增出相同的 1100bp 大小的片段,结果见图版 3。白化致死植株均扩增出同阳性对照同样的,证明几丁质酶基因已经整合到白化致死植株中。对其它正常植株的分析表明只有部分植株扩增出几丁质酶基因,说明自交后部分植株几丁质酶基因存在丢失现象。通过实验表明花粉管通道导入目的基因转化大豆是可行的。对导入后代株系的抗病性鉴定表明:部分植株抗病能力有所提高。

2.3 RAPD 差异分析

白化致死株与正常株的基因组存在明显差异,利用 RAPD 技术可以了解其基因组变化的信息。RAPD 扩增结果表明:引物 S126 在 8 株白化致死突变株及 4 株正常株之间扩增出约 750bp 差异带,结果见图版 4。通过对该差异带的分析,可以获得白化致死株与正常植株间的基因差异,该片段有可能同白化致死基因紧密相关,对该片段测序后,通过染色体步移法可以获得白化相关基因。目前我们正对差异片段进行回收、测序及克隆,利用差异消减法筛选差异表达基因,有望在此基础之上克隆获得大豆与白化致死相关的基因。

3 大豆白化致死现象的分析

对大豆突变体的研究国外已有报道。Burzlaff (1999)、Chen (1998)、Palmer (2000)、Zou (2003)、Kato (2004)等分别报道黄化大豆突变体、棕色马鞍状种皮、线粒体苹果酸脱氢酶缺失 Y20 染色体区域的 10 个突变体,在形态学、同工酶水平与基因水平进行的研究,他们认为相关染色体区域高频率重排、受体因素的活动引起染色体区域的不稳定,导致多种突变体出现,另外认为该突变体出现可能与可转移因子系统有关,该现象出现还有待进一步在分子基础上给予准确解释^[3-6]。

植物白化致死突变现象一般为隐性基因纯合导致。我们发现的大豆白化致死现象是由花粉管通道法导入大豆转化目的基因而产生。经花粉管通道技术导入外源目的基因产生白化致死现象在大豆上未见报道。通过 4 年统计,该白化致死突变株与正常株的比例为 1/8~1/10 左右。其遗传特点不符合 1:3 的孟德尔遗传规律,有可能存在上位性抑制或其它修饰因素。通过 6 个世代的观察、遗传分析、分子检测,我们认为产生该现象的原因有如下几种可能:目的基因片段在基因组上整合位置破坏叶绿体的形态建成(膜、基粒片层)基因表达;目的基因片段插入叶绿素合成相关基因的中间,使叶绿素合成过程中断;再有可能破坏叶绿素合成相关启动子等等。另外遗传分析表明可能由于外源基因的导入激活可移动因子,该因子在染色体上移动,由于其插入造成叶绿素合成途径的破坏,产生白化现象。对白化致死原因的确定仍需生理生化、分子水平进行深入研究。最终期望克隆获得白化致死相关基因。

参 考 文 献

- 1 胡能书,万贤国.同工酶技术及应用[M].长沙,湖南科技出版社,1985.
- 2 J. 萨姆布鲁克, E. F. 弗里奇, T. 曼尼阿蒂斯著.分子克隆实验指南(第二版)[M].北京,科技出版社,1992.
- 3 Burzlaff J D, R G Palmer. Soybean Linkage Studies, y18 and y20[J]. Soybean Genetics Newsletter1999, 26, 459-464.
- 4 Chen X F, Palmer R G. Instability at the k2 Mdh1-n y20 chromosomal region in soybean[J]. Mol Gen Genet. 1998, 260(4), 309-18.
- 5 Palmer RG, Burzlaff JD, Shoemaker RC. Genetic analyses of two independent chlorophyll-deficient mutants identified among the progeny of a single chimeric foliage soybean plant [J]. J Hered. 2000, 91(4), 297-303.
- 6 Kato KK, Palmer RG. Duplicate chlorophyll-deficient loci in soybean[J]. Genome, 2004, 47(1), 190-8.
- 7 Kato KK, Palmer RG. Molecular mapping of four ovule lethal mutants in soybean[J]. Theor Appl Genet, 2004, 108(4), 577-85.
- 8 Zou JJ, Singh RJ, Hymowitz T. Association of the yellow leaf (y10) mutant to soybean chromosome 3[J]. J Hered, 2003, 94(4), 352-5.

DISCOVERY OF SOYBEAN ALBINO LETHAL MUTANT LINE AND ITS ANALYSIS

Liu Zhaojun¹ Li Xichen¹ Liu Liyan¹ Liu Qi¹ Li Tie¹ Chen Yili²

(1. Biotechnology Research Center, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086;

2. College of Agronomy, Northeast Agriculture University, Harbin 150086)

Abstract Soybean cultivar Suinong 10 had been transformed by pBch plasmid harboring chitinase gene through pollen tube pathway method. A albinos lethal mutant line appeared in D4 generation. Research has been done on albinos lethal mutant line by Isozyme analysis, PCR and RAPD techniques. The results showed as follows; that the enzyme activity of SOD and PPO in albinos lethal mutant line was higher than that in normal plant, and that was much more obvious in roots; chitinase gene had been amplified by PCR in albinos lethal mutant line, that certificated transformation was successful; Reason of soybean albinos lethal had been primarilly analysed using RAPD in molecular level, obvious differences are existed between genomes of normal plant and albinos lethal plant.

Key words Soybean; Albinos lethal; Isozyme analyzes; PCR; RAPD

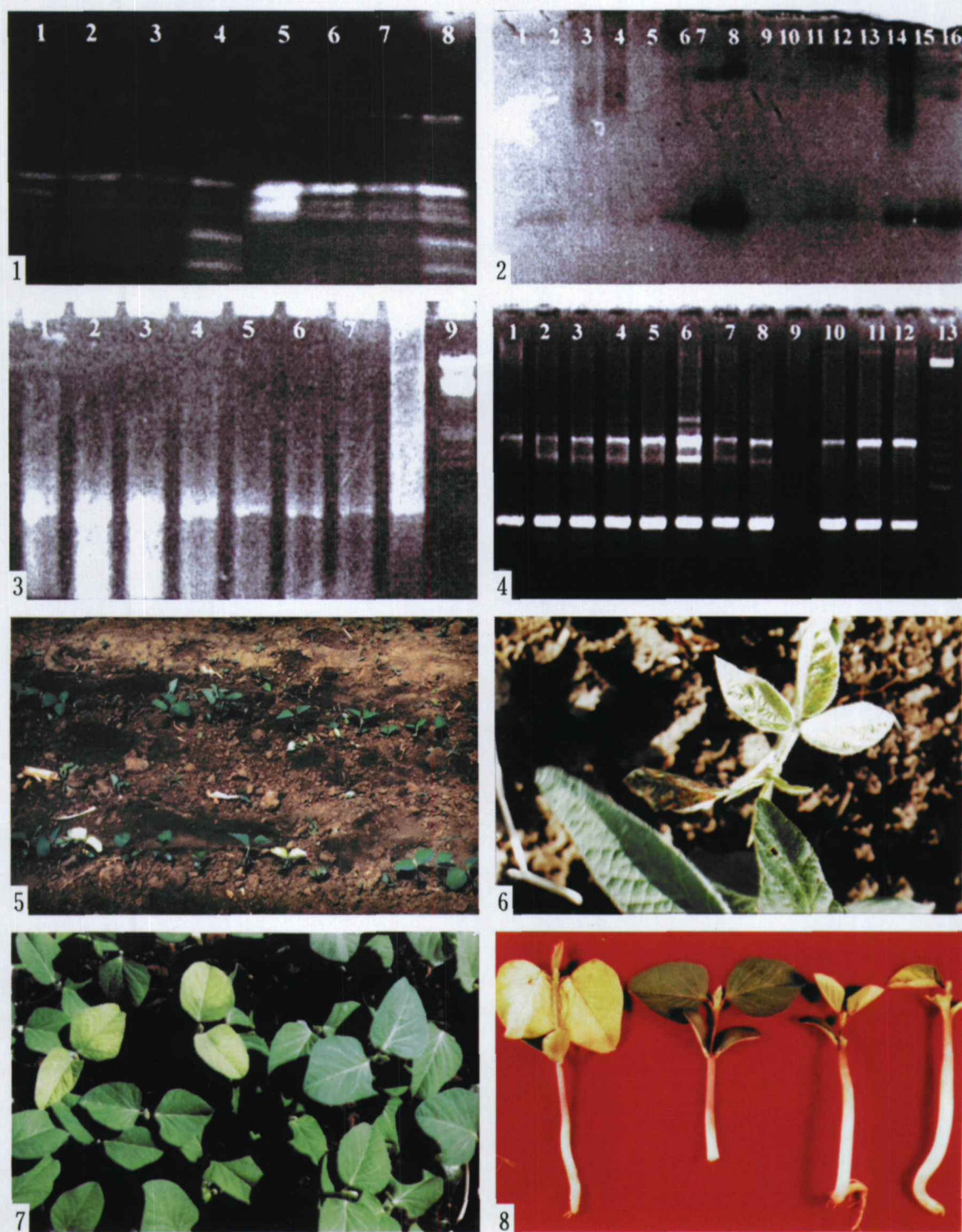
欢迎订阅 2006 年《黑龙江农业科学》

《黑龙江农业科学》是黑龙江省农业科学院主办的综合性学术期刊,是全国优秀期刊、黑龙江省优秀期刊、“中国期刊方阵”期刊、《中国核心期刊(遴选)数据库》收录期刊等。主要报道作物育种、耕作栽培、植物保护、土壤肥料、植物生理、畜牧兽医等方面以黑龙江省为主,其他省区为辅的最新农业科研成果、科学技术、发展趋势以及新产品、新品种等。设有科研报告、实用技术、调查总结、专题综述、品种选育、国内外科技动态、科技简讯、农业信息等栏目以及各类广告业务宣传。本刊发行面广,读者群大:农业科研工作者、农业院校师生、国营农场及各农业技术推广部门的科技人员、管理干部和广大农民群众等。

本刊为国际大十六开本,彩色四封,64 页,双月刊,刊号:ISSN1002-2767, CN23-1204/S, 邮发代号 14-61, 单月 10 日出版,每期定价 5.00 元,全年 30.00 元。全国各地邮局(所)均可订阅。漏订者可汇款至本刊编辑部补订(不另收邮费)。

地 址:哈尔滨市南岗区学府路 368 号 《黑龙江农业科学》编辑部

电 话:0451-86668373 E-mail:nykx13579@sina.com 邮 编:150086



图版说明：

1 正常苗与自化苗的超氧化物歧化酶酶谱；1-4 为正常株的叶、上胚轴、下胚轴、根；5-8 白化突变株的叶、上胚轴、下胚轴、根；2 白化苗与正常苗的过氧化物酶酶谱；1-4 为白化突变株的叶、上胚轴、下胚轴、根；5-8 正常株的叶、上胚轴、下胚轴、根；3 白化致死株的几丁质酶基因 PCR 结果；1-7 白化致死植株；8 质粒阳性对照；9 Marker (λ / EcoRI、Hind III 酶切)；4 大豆白化突变体的 RAPD 分析，1-8 泳道为白化突变体；9-12 泳道为正常植株；13 泳道为 Marker DL2000；5 一周苗龄的白化苗；6 两周龄的白化苗；7 室内种植的白化苗；8 白化苗与正常苗的对比。

Explanation of plates

1) SOD isozyme bands of normal plant and albinos plant, 1 to 4 is normal plant leaf, epicotyl, hypocotyl, root respectively; 5 to 8 is albinos plant leaf, epicotyl, hypocotyl, root respectively; 2) POD isozyme bands of albinos plant and normal plant, 1 to 8 is albinos plant leaf, epicotyl, hypocotyl, root respectively; 9 to 16 is normal plant leaf, epicotyl, hypocotyl, root respectively; 3) PCR analysis of chitinase gene in soybean albinos mutant, 1 to 7 is albinos mutants; 8 plasmid; 9 marker (λ / EcoRI, Hind III digested); 4) RAPD analysis of soybean albinos mutants, 1 to 8 albinos lethal mutants; 9 to 12 normal plants; 13 Marker DL2000; 5) one week old albinos plants; 6) two weeks old albinos plant; 7) albinos plant in greenhouse; 8) comparison of albinos plants and normal plant.