

PttKNI 基因过表达对斑叶竹节秋海棠叶型的影响

徐全乐^{1,2}, 谢亚红³, 董江陵², 阮美煜², 胡鑫¹, 王崇英²

(1. 西北农林科技大学 生命科学学院, 陕西 杨凌 712100; 2. 兰州大学 生命科学学院 细胞生物学研究所, 甘肃 兰州 730000;

3. 西安市园林研究所, 陕西 西安 710065)

摘要:利用农杆菌介导的叶盘法对斑叶竹节秋海棠进行遗传转化后, 采用表现型观察法、石蜡切片法、扫描电镜法对叶片进行观察研究。结果表明:从抗性愈伤组织中分化出 168 株再生植株, 其中 72 株表现出与野生型相似的表型, 96 株呈现不同的表型变化, 主要有珊瑚状株型、异源小叶型、异常叶序型和矮小簇生型 4 类。除上述株型改变外, 约 60% 的转基因植株只在局部发生各种叶片形态的改变。横向石蜡切片观察发现野生型叶片的表皮细胞呈规则的四边形或多边形, 排列整齐, 主脉明显, 远轴面微有隆起。异源小叶型叶片则表现为叶片扭曲, 无明显主脉, 背腹面不易区分; 表皮细胞较小, 呈不规则圆形或三角形, 排列紊乱; 叶表面有异源分生组织产生。扫描电镜分析发现, 野生型叶片表面平坦光滑, 细胞大小相似, 呈多边形规则排列。而异源小叶型叶片的近轴面凹凸不平, 有许多大小和形状不同的突起, 细胞的形状和排列极度不规则, 并且有若干异源叶形成; 在异源叶的基部可见一些不规则结构, 这些不规则结构可以发育为新的异源小叶。

关键词:斑叶竹节秋海棠; PttKNI 基因; 遗传转化; 异源分生组织

中图分类号:S 685.99 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2011)21-0098-05

PttKNI (*Populus tremula* × *tremuloides* *KNOTTED1*) 基因是从杂交杨 (*Populus tremula* × *P. tremuloides*) 茎的维管束形成层中分离得到的一个 *KN1* (*KNOTTED1*) 同源基因^[1-2]。该基因属于 *KNOX1* (*KNOTTED1*-like homeobox genes) 基因家族, 可能作为转录因子在植株的形态发育^[1]和维管组织的形成^[3]中发挥作用。该基因在 1 a 生草本植物矮牵牛^[1]、康乃馨^[2]、烟草^[3]和鸡冠花^[4]等多种植物中的过表达均引起一系列的表型变化, 包括植株矮化、簇生、产生缺刻叶、扁茎、不规则叶序等。这些表型的变化可能是由于 *PttKNI* 基因参与到植物激素的合成与代谢中引起的^[1]。

斑叶竹节秋海棠 (*Begonia maculate* Raddi) 原产巴西, 俗名慈姑秋海棠, 又称红花竹节秋海棠。是多年生

小灌木, 茎直立, 茎节肥厚, 呈明显的竹节状。叶基部心形且偏斜, 腹面呈绿色, 上有许多白色小斑点; 背面紫红色。花小, 鲜红色或粉红色, 成簇下垂, 是常见的观叶观花植物。Xu Q L 等^[5]利用农杆菌介导的叶盘转化法将 *PttKNI* 基因导入到斑叶竹节秋海棠中观察发现, 该基因在斑叶竹节秋海棠中的过表达导致了珊瑚状、具异源小叶、具异常叶序和杯状叶型等表型的产生, 为新品种的选育提供了可能。在上述研究的基础上, 该试验进一步研究了 *PttKNI* 基因在竹节海棠中过表达所引起的叶型变化, 并对其进行了初步的分析。

1 材料与方法

1.1 试验材料

斑叶竹节秋海棠幼苗购自于兰州市花卉市场。

1.2 试验方法

1.2.1 表现型观察 转 *PttKNI* 基因竹节海棠按照 Xu Q L 等^[5]方法获得并由实验室保存。对各个时期的野生型和转基因植株仔细观察比较, 并用 Canon Powershot A610 相机照相, 用 Photoshop CS2 进行处理排版。

1.2.2 石蜡切片 取野生型及转基因型叶片, 用 FAA(3.7% 甲醛, 5% 乙酸, 70% 乙醇) 固定 24 h 以上, 4℃ 保存。按照郑国锷等^[6]方法, 将固定过的叶片经梯度乙醇脱水后转入 0.1% 番红染液, 整体染色 40 h。用蒸馏水冲洗至无浮色后经梯度乙醇, 各级 1 h, 再经过

第一作者简介:徐全乐(1980-),男,在读博士,讲师,现主要从事植物分子生物学的研究工作。E-mail: xuql03@163.com。

责任作者:王崇英(1956-),女,硕士,教授,博士生导师,现主要从事植物分子细胞生物学的研究工作。E-mail: wangcy@lzu.edu.cn。

基金项目:西安市市容园林局基金资助项目(XA081023);甘肃省自然科学基金资助项目(0803RJZA034);西北农林科技大学人才专项资金资助项目(Z111020912)。

收稿日期:2011-08-03

1/2 二甲苯和二甲苯各 1 h 脱水后,用 1/3 二甲苯 + 2/3 蜡在 37℃ 下浸蜡 40 h,换纯蜡 3 次,每次 1 h 后用纯蜡进行包埋。旋转式切片机(AO 820, USA)切片,厚度为 8 μm ;用粘片剂粘片后进行染色。脱蜡、复水至 95%乙醇时,用 0.1%固绿染色;再经脱水、透明后用加拿大树胶封藏。用 Motic B5 professional series 显微镜观察并照相。

1.2.3 扫描电镜 取野生型与转基因型竹节海棠叶片,清洗干净,用 3%戊二醛(Sigma, pH 7.2 磷酸缓冲液配置)固定 4~12 h 后,梯度浓度乙醇 50%-70%-83%-95%-100%(2 次)干燥,每级 5 min;再用乙酸乙酯置换 5 min,CO₂临界点干燥仪干燥;然后在 60 倍解剖镜下将干燥好的样品贴在样品台上,喷镀。SEM (JEOL1600, Japan)扫描电镜观察,照相。

2 结果与分析

利用农杆菌介导的遗传转化法对斑叶竹节秋海棠进行遗传转化后,从抗性愈伤组织中共分化出 168 株再生植株。其中 72 株表现出与野生型相似的表型,即具有 1 条明显的主茎,叶全缘,卵圆形,基部不对称,呈互生叶序;叶片的近轴面分布白色斑点(图 1A)。其余 96 株则呈现不同的表型变化,Xu Q L 等^[5]根据转基因植株株型的变化将其划分为 4 种类型:珊瑚状株型、异源小叶型、异常叶序型和杯状叶型。后期观察发现,还有一类矮小簇生型植株,其主茎退化,叶片簇生且变小(图 1B);而杯状叶往往只出现在转化植株的局部(图 1C)。所以,以株型变化为标准应将转基因斑叶竹节秋海棠划分为珊瑚状株型、异源小叶型、异常叶序型和矮小簇生型。

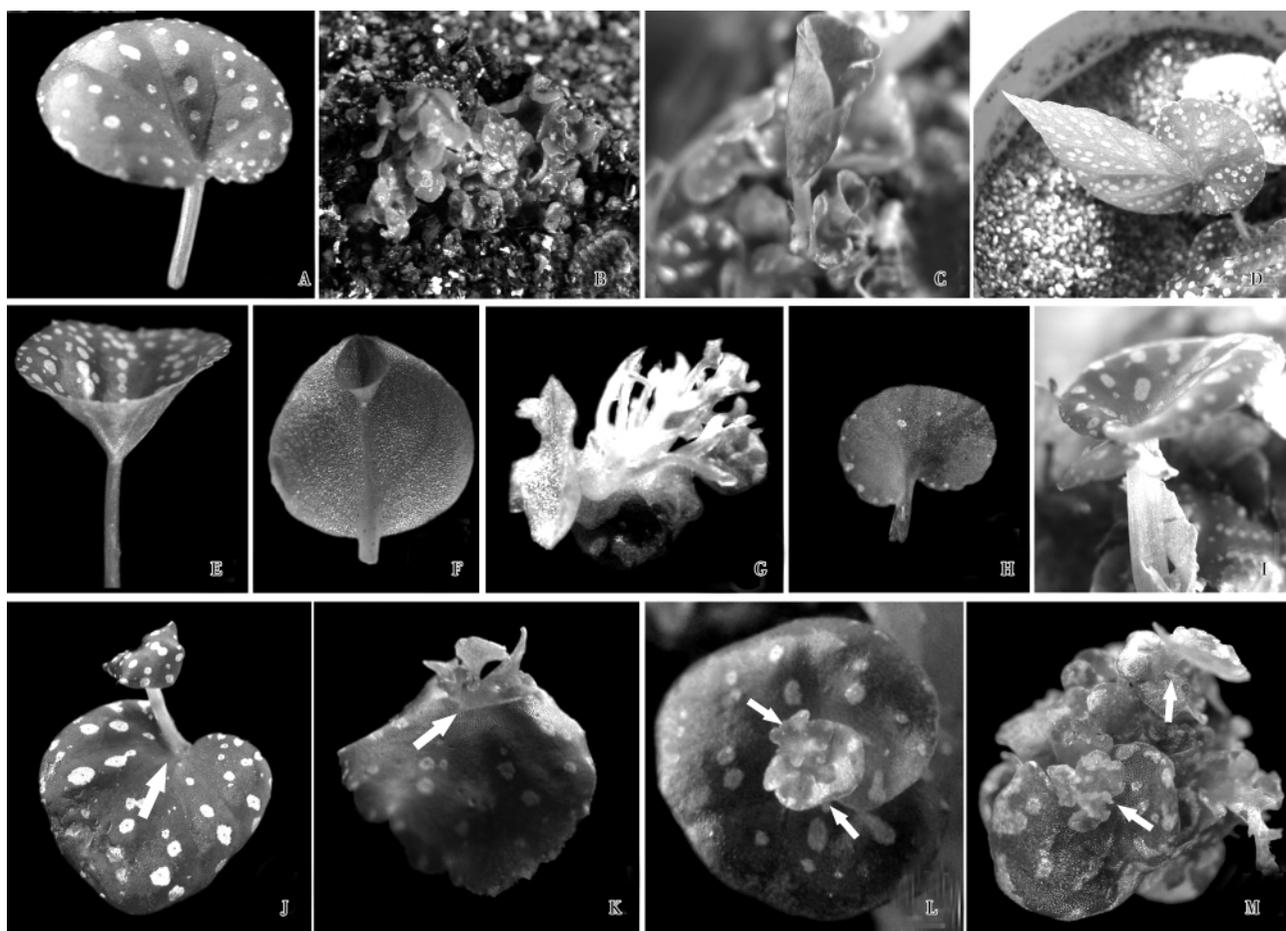


图 1 转 *PttKN1* 基因斑叶竹节秋海棠叶片的形态变化

Fig. 1 Altered leaf morphology generated by overexpression of *PttKN1* gene in *Begonia maculata*

注:A.野生型叶片;B~M.转基因植株的形态变化;B.矮小簇生型植株,具小叶;C.具杯状叶的转基因植株;D.缺刻叶;E.杯状叶;F.叶片的背轴面发生卷曲,形成杯状结构;G.枝状叶;H.叶片近轴面斑点减少;I.叶柄融合;J~M.异源小叶(箭头所示);J.叶片基部形成单独的异源叶片;K.叶片基部形成异源芽;L.叶片中心形成异源小叶,小叶上又形成新的异源小叶;M.较多叶片上形成异源小叶。

Note: A: Leaf of wild type plant; B~M. Morphology changes of transgenic plants; B. Dwarfish and fascicular plant with little leaves; C. Transgenic plant with several cup-shaped leaves; D. Lobed leaf; E. Cup-shaped leaf; F. Leaf curled at abaxial side; G. Coral-like leaf; H. Spots of the leaf reduced on adaxial side; I. Petioles fused; J~M. Ectopic leaflets (arrows); J. Single leaf formed at the base of leaf; K. Adventitious buds formed at the base of leaf; L. Ectopic foliole formed at the centre of leaf surface and new leaflets formed on ectopic foliole again; M. Ectopic leaflets formed on many leaves.

除上述株型变化外,约 60%的转基因植株只在局部发生各种叶片形态的改变(表 1)。包括裂片叶(图 1D)、杯状叶(图 1E)、在叶片的背轴面上发生卷曲形成杯状结构(图 1F)、枝状叶(图 1G)、叶面近轴面白色斑点减少(图 1H)、叶柄发生融合(图 1I)等。还有一些叶片的表面发现有异源小叶或异源芽的形成(图 1J~M),这些小叶大多在叶片基部、靠近中脉的部位形成,具有一个单独的异源小叶(图 1J)或者异源的簇生芽(图 1K);在有的小叶表面,甚至还可以再形成异源的小叶(图 1L~M,箭头所示)。这些小叶通常都是卷曲的,部分还具有不确定的叶片背腹性。上述转基因植

株的叶型改变在野生型和组培苗中都未曾观察到。

在改变的叶片形态中,以枝状叶和异源小叶的出现频率最高。以异源小叶制作横向石蜡切片,观察发现,在野生型叶片的横切切片中,其表皮细胞呈规则的四边形或多边形,排列整齐;且主脉明显,远轴面微有隆起(图 2A)。在转基因植株叶片的横切中,其结构明显和野生型不同,主要表现为叶片扭曲,无明显主脉,背腹面不易区分(图 2B~D);表皮细胞较小,呈不规则圆形或三角形;细胞排列紊乱,较紧密(图 2B)和异源分生组织(图 2C)或异源细胞团的产生(图 2D)。

表 1 *PttKNI* 基因过表达植株的叶型变化情况

Table 1 Leaf morphology changes in the *PttKNI* gene overexpressed plants

叶型 Leaf morphology	矮牵牛 <i>Petunia hybrida</i>	烟草 Tobacco	鸡冠花 Cockscomb	香石竹 Carnation	斑叶竹节秋海棠 <i>Begonia maculata</i>
缺刻叶 Lobed leaf	Y	Y	Y	N	Y
叶片变小/变窄 Decrescent or narrowed leaf	Y	Y	Y	Y	Y
杯状叶 Cup-shaped leaf	N	Y	N	N	Y
枝状叶 Coral like leaf	N	N	N	N	Y
叶表面凹凸不平 Accented leaf surface	Y	Y	N	N	Y
叶片皱缩/扭曲 Crimped or distorted leaf	Y	Y	Y	N	Y
叶片颜色改变 Altered leaf color	N	N	N	N	Y
叶柄异常 Abnormal petiole	Y	Y	Y	N	Y
叶序异常 Abnormal phyllotaxy	Y	Y	N	Y	Y
叶脉脉序紊乱 Disorganized venations	Y	Y	ND	ND	Y
细胞形状异常 Changed cellular shape	Y	Y	Y	ND	Y
异源分生组织 Ectopic meristem	Y	Y	ND	ND	Y

注:Y-有,N-没有,ND-未检测。

Notes: Y=yes, N=no, ND-not done.

扫描电镜分析发现,野生型叶片的表面平坦光滑,细胞大小相似,呈多边形规则排列(图 2E)。而异源小叶型叶片的近轴面凹凸不平,具有许多大小和形状不同的突起,细胞的形状和排列极度不规则,并且有若干异源叶形成(图 2F,箭头所示);这些异源叶片比较肥厚,有明显的表皮毛(图 2F),小叶的表面具有不规则的突起(图 2G),在这些小叶的基部或中心部位,通常可以见到一些不规则结构(图 2H),这些不规则结构可以发育为新的异源小叶。

3 讨论

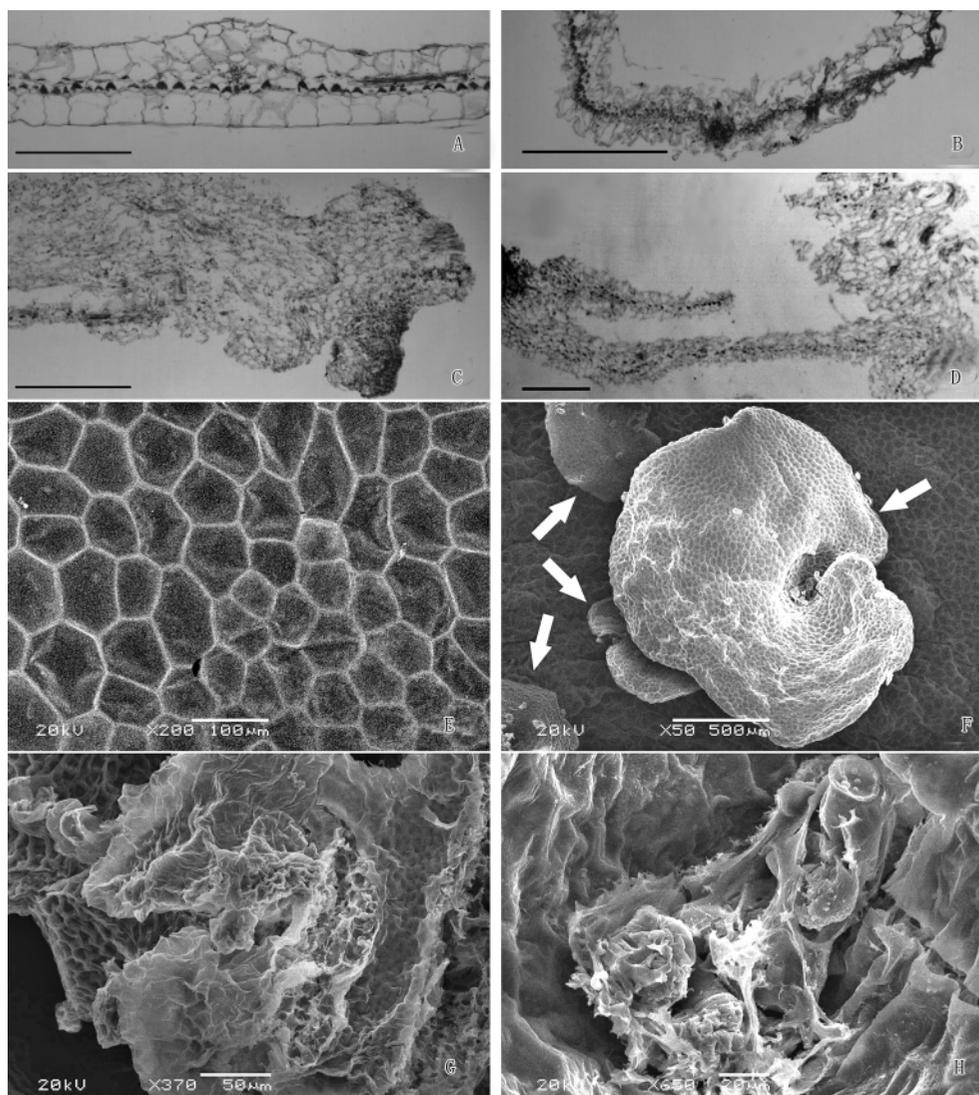
PttKNI 基因在矮牵牛、烟草、鸡冠花、香石竹和斑叶竹节秋海棠植株中的过表达都可以引起叶型的明显改变(表 1),典型的表型包括缺刻叶、叶面皱缩、叶面积改变、叶柄异常、叶序改变等;同时,还伴有细胞形态异常和异源分生组织的产生。除了上述典型表型以外,*PttKNI* 基因过表达斑叶竹节秋海棠植株还包括叶色的改变和枝状叶的产生。

KNOXI 基因在拟南芥^[7]、烟草^[8]、番茄^[9]和矮牵牛^[1]等多种模式植物中的异位表达均涉及植株局部或整体形态的变化,却罕有色泽的变化。Hu X 等^[1]在 *PttKNI* 基因过表达矮牵牛中报道了花色的改变,并认为这种改变是由于影响了 GA 在花冠中的分布造成

的。徐全乐等在 *PttKNI* 基因过表达红叶甜菜和彩叶草中也发现了植株叶色的改变(待发表)。

枝状叶型与反义 *LePHAN* 转基因番茄的表型十分相似。*PHAN(PHANTASTICA)* 是从金鱼草中发现的一类具有 MYB 结构域的转录因子家族^[10]。*PHAN* 基因的缺失突变体近轴区减小,表型严重的突变体甚至完全丧失其近轴区并且形成呈辐射状排列的针状叶;该表型的出现与 *LePHAN* 的表达量与定位有关;原位杂交的结果显示,具有针状叶的植株中并没有 *LePHAN* 基因的转录^[9]。这也暗示 *PttKNI* 基因在叶片的腹背轴调控中起一定作用。

虽然已有很多关于转基因植株叶片表面产生异源分生组织的报道^[1,7,11-12],但是像斑叶竹节秋海棠这种在异源小叶上产生新的异源小叶的转基因植株不仅在 *KNOXI* 的转基因植株中没有发现,在其它基因的转基因植株中也未见报道^[5];这说明从杂交杨形成层中分离出来的 *PttKN1* 基因可能具有更强的分生组织起始和维持活性。现已发现,*KNOXI* 基因在植物生长发育的各个阶段均对顶端分生组织和侧生分生组织的起始和维持起作用,这一作用可能是通过调节细胞分裂素和赤霉素等激素水平的变化,进而调控分生组织区域细胞的未分化状态来完成的^[13-14]。

图2 野生型和转 *PttKNI* 基因斑叶竹节秋海棠叶片的结构分析Fig. 2 Structural analysis with leaf of wild type and transgenic *Begonia maculata*

注: A~D 叶片石蜡切片横切; A. 野生型叶片; B~D. 转基因叶片; B. 叶片弯曲, 无明显主脉, 不易区分背腹面; 表皮细胞较小, 呈不规则圆形或三角形; 细胞排列紊乱, 较紧密; C. 形成的异源分生组织; D. 形成的异源细胞团. 标尺 = 100 μm . E, H. 扫描电镜分析; E. 野生型叶片; F~H 异源小叶型叶片; F 叶片的表面有异源叶片的形成 (箭头所示); G 异源小叶表面的不规则突起; H. 小叶的基部或中心部位的不规则结构。

Note: A~D. Paraffin sections of the leaf; A. the leaf of wild type plant showed polygonous cell organized regularly and clear mainvein bulged on the abaxial side; B~D. transgenic plants; B. The transformats showed distorted leaf morphology, unclear mainvein, indistinguishable abaxial and adaxial side, disordered cellular organization; C. ectopic meristem formed on the leaf surface; D. Added cell groups. Bars = 100 μm . E~H. Analysis of scanning electron micrographs; E. the leaf of wild type showed smooth surface and regular cell organization; F~H. the transformats with ectopic foliole; F. ectopic leaflet formed (arrows); G. accidented leaf surface; H. Irregular cell organization and ectopic meristemoid.

总之, *PttKNI* 基因在斑叶竹节秋海棠中的过表达导致了大量的叶型改变, 为花卉新品种的选育奠定了良好的基础。这些多效性的表型说明, *PttKNI* 基因参与了叶片发育的 3 个主要过程即叶原基的起始, 叶片背腹轴的建立和叶片的延展^[15-17]。遗传分析也发现, *KNOXI* 基因在叶片的发育中起关键作用^[18]。*KNOXI* 基因过表达植株大都表现为细胞分裂素水平升高^[12, 19]、赤霉素水平降低^[19-21]; 生长素也与 *KNOXI* 基因的表达具有拮抗作用^[22]。因此, 可能是 *PttKNI*

基因的过表达影响了转基因斑叶竹节秋海棠植株的内源激素平衡而引起诸多的叶型改变。但 *PttKNI* 基因如何影响各种激素水平, 还需进一步研究。

参考文献

- [1] Hu X, Wu Q F, Xie Y H, et al. Ectopic expression of the *PttKNI* gene induces alterations in the morphology of the leaves and flowers in *Petunia hybrida* Vilm[J]. J Integr Plant Biol, 2005, 47: 1153-1158.
- [2] Meng L S, Song J P, Sun S B, et al. The ectopic expression of *PttKNI* gene causes pleiotropic alternation of morphology in transgenic

- carnation(*Dianthus caryophyllus* L.) [J]. *Acta Physiol Plant*, 2009, 31: 1155-1164.
- [3] 丁伟乔,徐全乐,蒲帆,等. *PttKN1* 基因异位表达对烟草叶片形态的影响[J]. *西北植物学报*, 2008, 28(3): 440-446.
- [4] Meng L S, Ding W Q, Hu X, et al. Transformation of *PttKNI* gene to cockscomb[J]. *Acta Physiol Plant*, 2009, 31: 683-691.
- [5] Xu Q L, Dong J L, Gao N, et al. Transgenic lines of *Begonia maculata* generated by ectopic expression of *PttKN1*[J]. *Biologia*, 2011, 66(2): 251-257.
- [6] 郑国锴,谷祝平. *生物显微技术*[M]. 北京:高等教育出版社, 1993: 39-85.
- [7] Chuck G, Lincoln C, Hake S. *KNAT1* induces lobed leaves with ectopic meristems when overexpressed in *Arabidopsis*[J]. *Plant Cell*, 1996, 8: 1277-1289.
- [8] Nishimura A, Tamaoki M, Sakamoto T, et al. Over-expressed of tobacco *knotted1*-type class 1 genes alters various leaf morphology[J]. *Plant Cell Physiol*, 2000, 41: 583-590.
- [9] Kim M, Mc Cormick S, Timmermans M, et al. The expression domain of *PHANTASTICA* determines leaflet placement in compound leaves[J]. *Nature*, 2003, 424: 438-443.
- [10] Waites R, Selvadurai H N, Oliver I R, et al. The *Phantastica* gene encodes a MYB transcription factor involved in growth and dorsoventrality of lateral organs in *Antirrhinum*[J]. *Cell*, 1998, 93: 779-789.
- [11] Sinha N, Williams R E, Hake S. Overexpression of the maize homeobox gene, *KNOTTED-1*, cause a switch from determinate to indeterminate cell fates[J]. *Genes Dev*, 1993, 7: 787-795.
- [12] Lincoln C, Long J, Yamaguchi J, et al. A knotted-like homeobox gene in *Arabidopsis* is expressed in the vegetative meristem and dramatically alters leaf morphology when overexpressed in transgenic plants [J]. *Plant Cell*, 1994, 6: 1859-1876.
- [13] Jasinski S, Piazza P, Craft J, et al. *KNOX* action in *Arabidopsis* is mediated by coordinate regulation of cytokinin and gibberellins activities[J]. *Curr Biol*, 2006, 15: 1560-1565.
- [14] Sakamoto T, Sakakibara H, Kojima M, et al. Ectopic expression of *KNOX* homeodomain protein induces expression of cytokinin biosynthesis gene in rice[J]. *Plant Physiol*, 2006, 142: 54-62.
- [15] Steeves T A, Sussex I M. "Patterns in Plant Development", 2nd ed. [M]. Cambridge: Cambridge University Press, 1989.
- [16] Smith L G, Hake S. The initiation and determination of leaves[J]. *Plant Cell*, 1992, 4: 1017-1027.
- [17] Tsukaya H. Leaf morphogenesis: genetic regulations for length, width and size of leaves[J]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso*, 2002, 47: 1576-1580.
- [18] Kidner C A, Timmermans M C. Mixing and matching pathways in leaf polarity[J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2007, 10: 13-20.
- [19] Kusaba S, Fukumoto M, Honda C, et al. Decreased GA1 content caused by the overexpression of *OSH1* is accompanied by suppression of GA 20-oxidase gene expression[J]. *Plant Physiol*, 1998, 117: 1179-1184.
- [20] Tanaka-Ueguchi M, Itoh H, Oyama N, et al. Over-expression of a tobacco homeobox gene, *NTH15*, decreases the expression of a gibberellin biosynthetic gene encoding GA 20-oxidase[J]. *Plant J*, 1998, 5: 391-400.
- [21] Sakamoto T, Kamiya N, Ueguchi-Tanaka M, et al. *KNOX* homeodomain protein directly suppresses the expression of a gibberellin biosynthetic gene in the tobacco shoot apical meristem[J]. *Genes Dev*, 2001, 15: 581-590.
- [22] Reinhard D, Mandel T, Kuhlemeier C. Auxin Regulates the Initiation and Radial Position of Plant[J]. *Plant Cell*, 2000, 12: 507-518.

Altered Leaf Morphology Generated by Overexpression of *PttKNI* Gene in *Begonia maculata*

XU Quan-le^{1,2}, XIE Ya-hong³, DONG Jiang-ling², RUAN Mei-yu², HU Xin¹, WANG Chong-ying²

(1. College of Life Sciences, Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling, Shaanxi 712100; 2. Institute of Cell Biology, School of Life Science, Lanzhou University, Lanzhou, Gansu 730000; 3. Xi'an Institute of Garden, Xi'an, Shaanxi 710065)

Abstract: By the method of phenotype observation, paraffin microtomy, scanning electron microscopy(sem) on the leaf were observed. Total 168 transgenic plantlets of *Begonia maculate* Raddi were differentiated from calli that possess kanamycin resistance originated from gene transformation using leafdisc method mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. The results showed that among them, 72 showed normal as the wild plant and 96 showed different morphologic alterations, such as coral-like plant, ectopic foliole plant, phyllotaxy-irregular plant and dwarfish and fascicular plant, etc. Except for the changes in plant architecture as the above, transgenic plants about 60% showed only leaf morphology altered partly in entire plantlet. Paraffin sections of the wild type plant showed that it had polygonous cell organized regularly and clear mainvein bulged on the abaxial side, while the transformats of the leaf holds ectopic buds showed distorted leaf morphology, unclear mainvein, indistinguishable abaxial and adaxial side, disordered cellular organization and ectopic meristem formed on the leaf surface. Scanning electron micrographs of the leaf surface of the wild type showed smooth surface and regular cell organization, while the transgenic plants holds ectopic buds showed accidented leaf surface, irregular cell organization and ectopic meristemoid.

Key words: *Begonia maculate* Raddi; *PttKNI* gene; transformation; ectopic meristem