

以茎尖分生组织为受体用农杆菌介导法转化激发子基因 *pemG1* 棉花植株的获得

徐大伟^{1,2}, 邱德文², 檀根甲¹, 李森¹, 曾洪梅²

(¹安徽农业大学植物保护学院, 合肥 230036;

²中国农业科学院植物保护研究所/农业部生物防治重点开放实验室, 北京 100081)

摘要:为了解决棉花常规遗传育种周期长, 农杆菌介导的转化下胚轴再生难, 转化率低, 胚变异率高等难题。通过改善茎尖的遗传转化, 利用农杆菌介导法转化棉花茎尖, 试图缩短转化周期, 获得转化苗。构建了稻瘟菌激发子基因 *pemG1* 的植物表达载体 pCAMBIA2300-*pemG1*, 分别以‘珂字312’、‘中棉24’棉花茎尖分生组织作为外植体, 摸索无菌苗的最佳培养方案, 确定最佳共培养温度、共培养时间及卡那霉素筛选浓度。经过共培养, 茎尖在诱导芽培养基上诱导生芽, 从不同浓度的 BAP 和 NAA 生长激素的组合中, 最终确定 0.1 mg/L 的 BAP 和 NAA 最适合芽的诱导; 经过 2 个月的继代培养, 在含有 GA₃ 的茎增殖培养基上完成茎的增殖和延伸; 切取幼芽并使其在含有 0.1 mg/L 的 IBA 生根培养基中生根; 生根的抗性植株移栽到温室中成苗, 获得了 T₀ 代转基因株系 4 株。进行了转 *pemG1* 阳性植株的初步验证。

关键词:棉花; 茎尖; 激发子基因 *pemG1*; 农杆菌介导

中图分类号: Q37

文献标志码: A

论文编号: 2011-0451

Agrobacterium-mediated Transformation of Shoot Apex of Cotton and Production of Transgenic Plants Carrying Elicitor Gene *pemG1*

Xu Dawei^{1,2}, Qiu Dewen², Tan Genjia¹, Li Miao¹, Zeng Hongmei²

(¹College of Plant Protection, Anhui Agricultural University, Hefei 230036;

²Key Laboratory for Biological Control of Ministry of Agriculture, Institute of Plant Protection/
Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081)

Abstract: In order to solve the long cycle of conventional breeding of cotton and the difficult regeneration, the low conversion rate and high rate of embryo variability in agrobacterium-mediated transformation of hypocotyl of cotton. Agrobacterium-mediated transformation using cotton tip as explants, by improving the genetic transformation of the tip, try to shorten the conversion period and get into seedlings. The fungal elicitor gene *pemG1* was cloned from *Magnaporthe grisea* and its plant expression vector pCAMBIA2300-*pemG1* was constructed. The apical meristems of cotton cultivar ‘Coker312’ and ‘CCRI24’ were used as explants for agrobacterium-mediated transformation. The optimum co-culture temperature, incubation time and the concentration of kanamycin were determined. The 0.1 mg/L of BAP and NAA was selected as the best concentration for bud induction. After subculture for two months, the stem was transferred to the medium containing GA₃ for proliferation and elongation, and then to the medium containing 0.1 mg/L of IBA for rooting. Finally, the resistant plants were transplanted in the greenhouse and 4 transgenic plants were acquired by preliminary molecular verification.

Key words: cotton; apical meristem; elicitor gene *pemG1*; agrobacterium-mediated

基金项目:国家转基因生物新品种培育重大专项(2008ZX08010-004)。

第一作者简介:徐大伟,男,1985年出生,安徽合肥人,在读硕士,从事分子生物学方面的研究。通信地址:100081 北京市中关村南大街12号中国农业科学院植物保护研究所, Tel: 010-82109571, E-mail: xudawei8507@qq.com。

通讯作者:曾洪梅,女,1966年出生,四川内江人,研究员,研究方向:从事生物化学与分子生物学研究。通信地址:100081 北京市中关村南大街12号中国农业科学院植物保护研究所, Tel: 010-82105928, E-mail: hmzeng@caas.net.cn。

收稿日期:2011-02-25, **修回日期:**2011-05-29。

0 引言

棉花是世界上重要的经济作物,是纤维的重要来源,也是重要的油料作物。中国是棉花的主要产区,在中国国民经济中棉花占有十分重要的地位。常规育种对中国棉花产业的发展作出了卓越的贡献,但近年来,常规育种在解决棉花抗病、抗虫、纤维品质改良、抗旱等方面遇到了巨大的挑战^[1]。化学农药防治虽然有效,但是长期使用化学农药带来了严重的环境污染,也使害虫产生了抗药性。近年来,科学家致力于用生物技术来改良棉花的性状,自从1987年Umbeck等^[2]首次报道了利用农杆菌介导法将 *NPT II* 基因和 *CAT* 基因导入陆地棉种‘珂字312’中以来,棉花基因工程研究取得了迅速进展,并已经大规模商业化生产,获得了巨大的社会经济效益。

目前棉花转基因方法主要有农杆菌介导法、基因枪法和花粉管通道法^[3];转化受体有愈伤组织、悬浮细胞、原生质体、茎尖分生组织、植株子房等。由于农杆菌介导法具有转化率高、遗传稳定等优点,因此为多数实验室所采用;但是采用农杆菌介导法进行转化时通常都选择下胚轴作为外植体,一般都需要经过离体培养再生植株的过程,试验周期长,且受到基因型限制,只有少数品种的离体培养材料能再生植株^[4],而且体胚发生率、畸形胚频率很高,正常成苗数少^[5];基因枪转化方法是由美国Cornell大学的Sanford等发明的,它是借助高速的金属微粒将外源基因导入细胞的一种转化技术,通过将目的基因包被在微小的金粒或钨粒表面,然后使金属微粒高速射入受体组织或细胞,微粒上的外源DNA整合到植物基因组中,并得到表达,从而实现目的基因的转化^[6-7]。花粉管通道法是由中国科学家周光宇先生首先提出的,它是在利用植物授粉后的一定时间内,将外源目的基因经过花粉管通道导入胚囊,然后利用转化株具有对卡那霉素抗性来初步筛选阳性株^[8]。然而,近年来,国内外也有关于利用茎尖分生组织作为外植体、用农杆菌介导或者基因枪轰击的棉花转基因的报道^[9],它的优点是无需进行植株的再生,绕开了漫长的组织培养过程,避免了在组织培养过程中出现的胚性细胞的变异,而且它不受受体基因型的限制,周期短^[10-12]。

来自稻瘟菌的激发子 *pemG1* 能诱导植物体自身的免疫反应,提高植物抗病性^[13-15]。由此构建了激发子基因 *pemG1* 的植物表达载体,利用农杆菌介导法转化棉花‘珂字312’和‘中棉24’的茎尖,优化遗传转化条件,获得抗性植株,为研究转激发子基因棉花奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 材料 ‘珂字312’(Coker312)由中国农科院植保所药物工程组保存,‘中棉24’(CCRI24)中国农业科学院棉花研究所刘传亮研究员赠送,根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) LBA4404 由中国农科院植保所药物工程组保存,植物表达载体 pCAMBIA2300 由中国农科院植保所药物工程组保存。

1.1.2 植物生长调节剂 6-BA(6-苄基腺嘌呤)、KT(激动素)、IAA(吲哚乙酸)、2,4-D(2,4-二氯苯氧乙酸)、IBA(脱落酸)、GA₃(赤霉素)和NAA(α -萘乙酸)、植物凝胶(Phytigel)和AS(乙酰丁香酮)均购自Sigma公司;所用羧苄青霉素(Car)和卡那霉素(Km)均购自Amresco公司;其余国产和进口试剂均为分析级产品。植物基因组提取试剂盒、植物RNA提取试剂盒购自北京天根公司。

1.2 pCAMBIA2300-*pemG1* 植物表达载体的构建及根癌农杆菌的转化

在 *pemG1* 的两端分别设计含酶切位点 Xba I 和 Pst I 的引物:

P1: 5'-GCTCTAGAATGAGCGCAGTTGTG-3'

P2: 5'-TACTGCAGCTAGCTGCTGCCA-3'

PCR 扩增 *pemG1*, 然后将 *pemG1* 克隆至 pCAMBIA2300 的相应位点,构建植物表达载体 pCAMBIA2300-*pemG1*;用冻融法转化根癌农杆菌,获得阳性单克隆;菌体用 LB(含 50 mg/L 卡那霉素, 50 mg/L 硫酸链霉素)液体培养基培养至 OD₆₀₀ 值为 0.4~0.6, 待用。

1.3 试验方法

1.3.1 无菌苗的培养 选取颗粒饱满的‘珂字312’(Coker312)和‘中棉24’(CCRI24),棉种用浓硫酸脱绒,自来水冲洗掉种子表面残留的硫酸,选取下沉种子,晾干备用^[16]。选取4种不同的消毒方法对棉花种子消毒,进行无菌苗的培养。

方法A:棉花种子不去壳,70%乙醇浸泡1 min,无菌水漂洗;2.5%的NaClO溶液浸泡30 min,无菌水漂洗,无菌滤纸吸干,播种于MSB培养基(表1)。

方法B:棉花种子不去壳,70%乙醇浸泡1 min,无菌水漂洗,0.1%的HgCl₂溶液浸泡30 min,无菌水漂洗种子,无菌滤纸吸干,播种于MSB培养基。

方法C:70%乙醇浸泡1 min,无菌水漂洗;2.5%的NaClO溶液浸泡30 min,无菌水漂洗并浸泡种子过夜后去壳;2.5%的NaClO溶液10 min,漂洗种子,无菌滤纸吸干,播种于MSB培养基。

方法D: 70%乙醇浸泡1 min, 无菌水漂洗; 0.1%的HgCl₂溶液浸泡30 min, 无菌水漂洗并浸泡种子过夜后去壳; 0.1%的HgCl₂溶液浸泡种子8 min, 无菌水漂洗种子, 无菌滤纸吸干, 播种于MSB培养基。

以上种子均在28℃、2000 lx、光周期14 h/24 h条件下培养无菌苗。

1.3.2 农杆菌菌液浓度的选择和农杆菌侵染时间的选择 于28℃培养农杆菌, 取不同浓度的农杆菌菌液(*OD*₆₀₀值分别为0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.6)侵染‘珂字312’和‘中棉24’棉花茎尖, 一个月后统计不同浓度的农杆菌菌液对茎尖的转化效率。再用合适的农杆菌菌液侵染‘珂字312’和‘中棉24’棉花茎尖5 min、10 min、15 min、20 min、30 min, 检测农杆菌侵染茎尖不同时间对‘珂字312’和‘中棉24’棉花茎尖的转化率。

1.3.3 共培养温度和时间的选择 茎尖经农杆菌侵染后, 放置在共培养基上培养, 设置19℃、21℃、23℃、25℃和28℃5个共培养温度, 共培养时间12 h、24 h、

36 h、48 h、60 h和72 h, 30天后统计出芽情况和农杆菌污染情况, 以确定最佳共培养温度和时间。

1.3.4 卡那霉素筛选浓度的确定 ‘珂字312’和‘中棉24’分别在含0、25、50、75、100、150 mg/L芽诱导培养基上面培养, 一个月后统计成苗数, 以确定最佳卡那霉素筛选浓度。

1.3.5 农杆菌转化外植体及植株继代 选取7~10天左右上述条件下的无菌苗, 在无菌条件下先切去2片子叶, 然后用灭菌的解剖刀分离茎尖^[17], 用*OD*₆₀₀为0.8的农杆菌侵染15 min后, 茎尖用灭菌吸水纸吸干放在无激素的MS₀中黑暗条件下共培养2天。共培养后, 茎尖用无菌蒸馏水冲洗, 用灭菌滤纸吸干后放到MS₁诱导芽培养基培养基上诱导嫩芽的形成, 经过一个月左右的继代, 再放到MS₂芽增殖培养基中继代2~3次。然后切取幼芽放到生根培养基MS₃上诱导生根。具体培养基见(表1)所示。

1.3.6 转*pemGI*植株的获得 经过幼芽的形成, 芽的增

表1 各时期培养基组成成分

时期	培养基	培养基成分	天数/d
无菌苗栽培	MSB	MS+3%葡萄糖+0.15%植物凝胶	7~10
共培养	MS ₀	MSB+VB ₃ +乙酰丁香酮	2
芽诱导	MS ₁	MSB+VB ₃ +6-BA+NAA+75 mg/L卡那霉素+500 mg/L羧苄青霉素	35
芽增殖	MS ₂	MS ₁ +1.0 mg/L GA ₃	60~75
根的诱导	MS ₃	MSB+NAA+75 mg/L卡那霉素+75 mg/L羧苄青霉素	20

殖, 根的诱导, 得到生根的幼苗, 移栽到含有蛭石的营养土中生长。

1.3.7 抗性植株分子检测

(1)PCR验证阳性株。用天根植物基因组提取试剂盒提取抗性苗基因组DNA, 用*pemGI*两边引物P1、P2, PCR扩增检测阳性植株; 同时, 在pCAMBIA2300中以NPT II序列设计PCR引物: P3: 5'-ATGATTGAACAAGATGGATTGCACG-3', P4: 5'-TCAGAAGAACTCGTCAAGAAGGCGA-3', PCR扩增检测阳性株。将检测为阳性株的PCR扩增产物克隆至T载体, 送交Invitrogen公司测序。

(2)RT-PCR验证。分别用盖宁植物RNA提取试剂盒提取PCR阳性株和对照植株的棉花总RNA, 反转录得到cDNA, 选取*pemGI*片段中的400 bp设计引物P5: 5' -AACGCTGCTGCTGCTGGTTCTCGCC-3' , P6: 5' -CACTCCTTCTTGAGCTTGGTGCCCT-3' , 进行RT-PCR验证。

2 结果与分析

2.1 无菌苗培养方案的确定

此试验用A、B、C、D4种方法培养无菌苗。其中方法A和方法B种子萌发率较高, 分别达到95%和90%(如表2所示), 但个别种子消毒不彻底, 培养瓶中

表2 不同无菌苗培养方法种子萌发率及污染情况

无菌苗培养方法	珂字312		中棉24	
	萌发率/%	幼苗污染情况	萌发率/%	幼苗污染情况
A	95	污染严重	95	污染严重
B	90	污染严重	90	污染较重
C	39	基本不污染	35	不污染
D	75	基本不污染	70	基本不污染

真菌污染情况严重;方法C虽然没有污染但是萌发率太低,可能是萌发受到消毒剂的影响所致;方法D消毒效果最好,所得到的幼苗最适合作为农杆菌侵染的外植体。因而选取方法D消毒外植体。

2.2 农杆菌最佳浓度和侵染时间的确定

试验设置了几种不同 OD_{600} 值的农杆菌侵染‘珂字

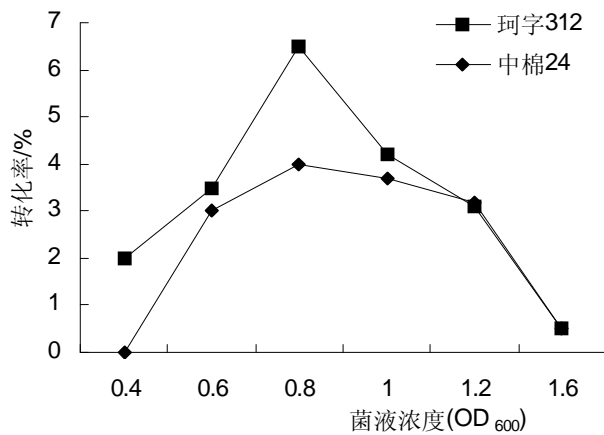


图1 不同浓度农杆菌转化‘珂字312’和‘中棉24’棉花茎尖的转化率

312’和‘中棉24’棉花茎尖,经过一个月统计生长情况。如图1所示,菌液 OD_{600} 值为0.8时转化率最高,因此,以下试验选用 OD_{600} 值为0.8的农杆菌进行。试验还设置了农杆菌侵染‘珂字312’和‘中棉24’棉花茎尖5 min、10 min、15 min、20 min、30 min共5个处理,统计棉花转化效率,如图2所示,结果农杆菌侵染‘珂字312’

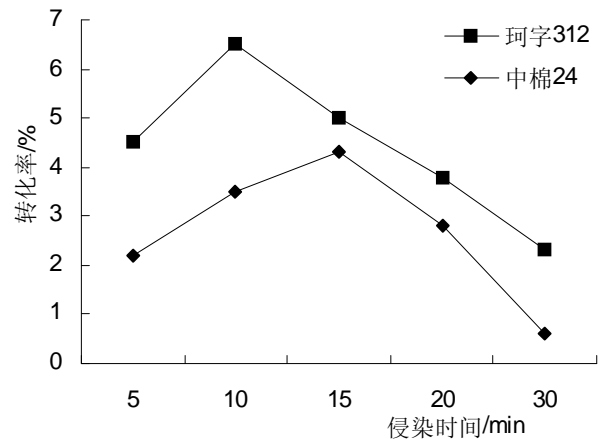


图2 不同侵染时间转化‘珂字312’和‘中棉24’棉花茎尖的转化率

茎尖10 min效果最好。

2.3 最佳共培养时间的确定

此试验设置了共培养12 h、24 h、36 h、48 h、60 h、72 h共6个处理,由不同共培养时间培养棉花茎尖,最后统计成苗率,如图3所示,结果共培养时间48 h时成苗率最高,因而选取48 h作为最佳共培养时间。

2.4 最佳共培养温度的确定

由于共培养的温度对农杆菌后期培养至关重要,影响到其污染程度,由此设置了共培养温度为19℃、21℃、23℃、25℃、28℃,共5个温度,最后统计在这一系列温度培养下茎尖幼芽出芽百分率和农杆菌污染情况(表3)。结果表明,共培养温度为21℃时最适,此条件下农杆菌污染较少,而且出芽率最高。

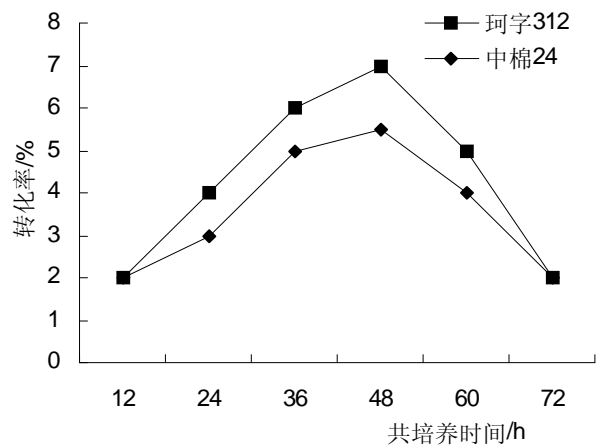


图3 不同共培养时间转化‘珂字312’和‘中棉24’棉花茎尖的转化率

表3 共培养温度对茎尖出芽率和农杆菌污染情况

共培养温度/℃	珂字312		中棉24	
	茎尖幼芽出芽率/%	茎尖污染情况	茎尖幼芽出芽率/%	茎尖污染情况
19	64	基本无污染	62	基本无污染
21	81	污染较少	85	污染较少
23	39	污染较多	40	污染较多
25	35	污染多	35	污染多
28	17	严重污染,抗生素无法抑制	12	严重污染,抗生素无法抑制

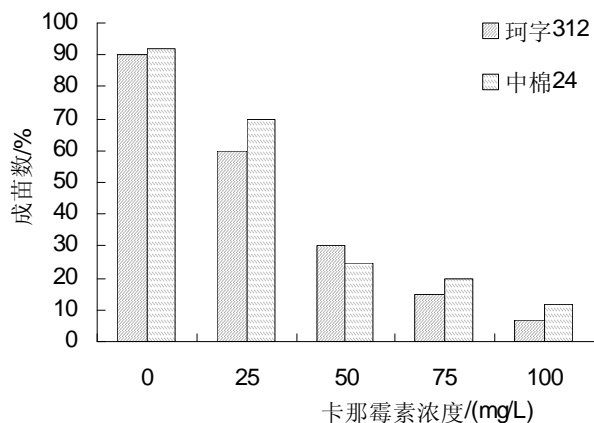


图4 不同浓度卡那霉素筛选‘珂字312’和‘中棉24’棉花茎尖

2.5 最适卡那霉素浓度的确定

为了确定最佳卡那霉素筛选浓度,棉花茎尖经0、25、50、75、100 mg/L浓度的卡那霉素筛选,如图4所示。浓度太低,虽然成苗率高但是转化效率低;筛选浓度太高,会影响苗的正常生长。得到最佳筛选浓度为50 mg/L,筛选效果最好而且不会影响外植体的正常生长。

2.6 抗性苗的获得

在前人茎尖培养方法文献^[6,10,17]报道的基础上,改变了芽诱导培养基、芽增殖培养基中激素6-BA和NAA浓度的比例,得到用0.1 mg/L的6-BA和NAA的成苗百分比最高,可达95%(表4)。

表4 不同浓度的6-BA和NAA组合所得到的成苗率

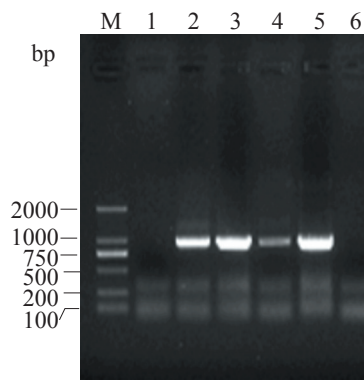
6-BA浓度/(mg/L)	NAA浓度/%		
	0.05 mg/L	0.1 mg/L	0.5 mg/L
0.05	55	65	70
0.1	55	95	80
0.5	50	80	70

棉花茎尖的培养过程经过共培养、幼芽的诱导、芽的增殖、根的诱导,最终得到抗性苗。

2.7 抗性株的分子鉴定

2.7.1 PCR检测阳性株 对获得的抗性苗进行PCR检测。以P1、P2引物,PCR扩增抗性株与对照株基因组DNA,抗性株2、3、4、5号能扩增出约960 bp的目的片段,为阳性株;抗性株1号为阴性株;未转化的对照株无此条带如图5所示。

再用pCAMBIA2300中的NPT II两边的引物P3和P4,PCR扩增检测1、2、3、4、5号抗性株,得到的结果和用P1和P2引物扩增的一致。

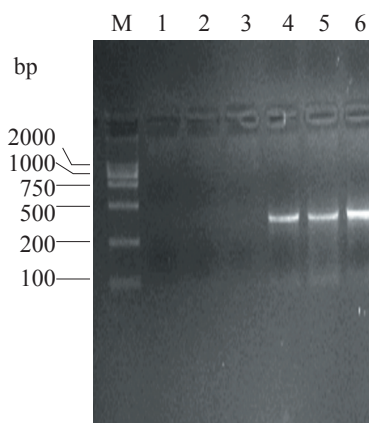


M: DL2000 Marker; 1~5: ‘中棉24’抗性株; 6: ‘中棉24’对照株

图5 PCR扩增棉花基因组中pemG1片段

把上述PCR检测为阳性的2号、3号、4号、5号株系的PCR产物克隆至相关载体,送交invitrogen公司测序,得到的结果和pemG1片段吻合。说明pemG1已整合到棉花基因组中。

2.7.2 RT-PCR检测阳性株 提取PCR阳性株2、3、4号和对照植株的棉花总RNA,反转录得到cDNA,用引物P5和P6进行RT-PCR检测,结果显示这3株阳性株均有400 bp的目的条带,而对照株没有此条带(图6)。说明整合到棉花基因组中的目的基因已经被转录。



M: DL2000 Marker; 1~3: ‘中棉24’对照株; 4~6: ‘中棉24’阳性株

图6 RT-PCR验证转基因阳性株

3 结论与讨论

在农杆菌转化棉花过程中有2个关键因素:(1)无菌苗的培养,得到没有污染的无菌苗是试验成败的关键,在无菌苗的培养中,由于消毒不够彻底,种壳中有可能带入真菌,在后来的继代培养中容易出现污染而导致试验失败。(2)共培养温度和时间的选择,农杆菌侵染棉花茎尖时有最佳的共培养温度和时间,不适的共培养温度和时间都可能导致侵染效率的下降和污染程度的上升。

传统的用下胚轴、胚性愈伤等作为外植体进行转化具有植株再生困难、基因型依赖性强、转化周期长及效率低等缺点,制约了棉花的遗传转化^[4-5]。‘珂字312’和‘中棉24’无菌苗茎尖作为外植体,避免了植株再生过程,克服了基因型限制。在相关文献报道基础上,通过改变继代培养基中生长激素的比例,改善了茎尖的转化;同时还通过比较无菌苗的消毒方法、农杆菌的感染浓度和感染时间、共培养时间、抗生素筛选浓度等,获得了针对‘珂字312’和‘中棉24’的农杆菌感染茎尖的最佳方案;棉花茎尖经过从幼芽诱导、增殖、根的诱导、成苗等过程,获得了抗性苗,并通过分子检测确定了阳性株。

尽管有报道认为茎尖分生组织不能作为外植体利用农杆菌介导转化,但是也没有直接的证据来支持这一观点^[9]。利用了棉花茎尖分生组织作为外植体、利用农杆菌介导得到阳性转基因植株。从试验时间上看,利用传统的胚性细胞转化需要8~12个月才能获得转化植株,还要反复的回交才能得到想要的农艺性状^[18]。而笔者在研究中所采用的方法,可以在3~4个月从共培养到获得抗性株,为在较短时间内获得有商业价值的转基因植株奠定了基础。

参考文献

- [1] 贾世荣,郭三堆,安道昌.转基因棉花[M].北京:科学出版社,2001:93.
- [2] Umbeck P, Johnson G, Barton K, et al. Genetically transformed cotton(*Gossypium hirsutum* L.) plants[J]. Nature Biotechnology, 1987,5:263-266.
- [3] 刘方,王坤波,宋国立.中国棉花转基因研究与应用[J].棉花学报, 2002,14(4):249-253.
- [4] Sunilkumar G, Rathore K S. Transgenic cotton: factors influencing Agrobacterium-mediated transformation and regeneration[J]. Molecular Breeding,2001,8(1):37-52.
- [5] Stelly D M, Altman D W, Kohel R J, et al. Cytogenetic abnormalities of cotton somaclones from callus cultures[J]. Genome,1989,32(5):762-770.
- [6] McCabe D E, Martinell B J. Transformation of elite cotton cultivars via particle bombardment of meristems[J]. Nature Biotechnology, 1993,11:596-598.
- [7] Finer J J, McMullen M D. Transformation of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) via particle bombardment[J]. Plant Cell Reports,1990,8(10):886-889.
- [8] Zhou G, Weng J, Zeng Y, et al. Introduction of exogenous DNA into cotton embryos[J]. Meth Enzymol,1983,101:433-481.
- [9] Gould J, Banister S, Hasegawa O, et al. Regeneration of *Gossypium hirsutum* and *G. barbadense* from shoot apex tissue for transformation[J]. Plant Cell Rep,1991,10(1):12-16.
- [10] Saeed N A, Zafar Y, Malik K A. A simple procedure of *Gossypium meristem* shoot tip culture[J]. Plant Cell, Tissue and Organ culture, 1997,51(3):201-207.
- [11] Bajaj Y P S. Biotechnology in agriculture and forestry (Cotton)[M]. Berlin:Springer,1998:40
- [12] Zapata C, Srivatanakul M, Park S H, et al. Improvements in shoot apex regeneration of two fiber crops: cotton and kenaf[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture,1999,56(3):185-191.
- [13] Qiu D W, Mao J J, Yang X F, et al. Expression of an elicitor-encoding gene from *Magnaporthe grisea* enhances resistance against blast disease in transgenic rice[J]. Plant Cell Reports,2009,28(6):925-933.
- [14] Yao Q, Yang X F, Qiu D W, et al. Expression of a *Magnaporthe grisea* elicitor and its biological function in activating resistance in rice[J]. Rice Science,2007,14(002):149-156.
- [15] Mao J J, Qiu D W, Yang X F, et al. Expression of protein elicitor-encoding gene *pemG1* in tobacco(*Nicotiana tabacum* cv. *Samsun NN*) plants and enhancement of resistance to TMV[J]. Acta Agronomica Sinica,2008,34(12):2070-2076.
- [16] 崔正鹏,张晓洁,辛承松,等.不同脱绒方式对棉种发芽出苗的影响[J].中国棉花,2004,31(004):10-11.
- [17] Gould J H, Maria M C. Adaptation of cotton shoot apex culture to Agrobacterium-mediated transformation[J]. Plant Molecular Biology Reporter,1998,16(3):283-283.
- [18] Firoozabady E, DeBoer D L, Merlo D J, et al. Transformation of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) by *Agrobacterium tumefaciens* and regeneration of transgenic plants[J]. Plant Molecular Biology,1987, 10(2):105-116.