



以甘露糖作为筛选剂的棉花遗传转化

岳建雄¹, 孟钊红², 张炼辉³, 韩少杰¹, 林亲铁¹, 王巍¹

(1. 广东省工程技术研究所, 广州 510400; 2. 山西省农科院棉花研究所, 运城 044000; 3. 新加坡分子农业生物学院, 新加坡 117604)

摘要:以 pmi 基因作为筛选标记基因, 以甘露糖作为筛选剂, 通过农杆菌介导法将 GFP 基因导入棉花细胞并得到再生植株, 经过 PCR 检测、Southern 杂交证实外源基因已经整合到棉花基因组中, West blotting 与荧光显微镜检测证明 GFP 基因得到表达。本文研究讨论了甘露糖作为棉花转化细胞的筛选剂在农杆菌介导的转化中的应用浓度及方法, 即:甘露糖的筛选浓度在 30~50 g · L⁻¹ 之间, 在愈伤组织诱导初期适当低一点, 随着愈伤组织的生长而加大筛选浓度。由于甘露糖不利于再生胚的分化, 当愈伤组织转入分化培养基时, 要以葡萄糖代替甘露糖。

关键词:棉花; 转基因; 甘露糖

中图分类号: S562.035.3 **文献标识码:** A

文章编号: 1002-7807(2005)01-0003-05

Cotton Transformation with Mannose as Selective Agent

YUE Jian-xiong¹, MENG Zhao-hong², ZHANG Lian-hui³, HAN Shao-jie¹, LIN Qin-tie¹, WANG Wei¹

(1. Institute of Engineering and Technology, Guangdong province, Guangzhou 510400, China; 2. Institute of Cotton Research, Shanxi Academy of Agricultural Science Yun cheng 044000, China; 3. Institute of Molecular Agrobiolog 117604, Singapore)

Abstract Employing pmi as a selection marker gene and mannose as a selection agent, the GFP gene was transformed into cotton via agrobacterium and regeneration plants were acquired. Transgenic plants were confirmed by southern hybridization and PCR analysis, expression of the GFP gene was showed with fluorescence microscope and West blotting. The concentration and method for employing mannose as selection agent had been studied. The reasonable selection concentration of mannose should be 30~50 g · L⁻¹. The start concentration of mannose in callus-induced medium is less and the concentration increased as callus grow up. Because mannose is not beneficial for embryo differentiation and development, mannose will be replaced with glucose when the callus was transferred to differazation medium.

Key words : cotton; transgene; mannose

在作物的遗传转化中, 为避免以抗生素与除草剂作为筛选剂的转化系统所产生的副作用对环境生态和人类健康带来潜在的影响, 一些以甘露糖、木糖^[1]为筛选剂的转化系统应运而生。其原理是因这些糖类不被一般植物细胞吸收而使非转基因细胞的生长受阻, 使转基因细胞分离出来。由于这些糖类对生物细胞无害且易于被微生物分

解, 避免了抗生素的副作用。pmi 除了存在于少数豆科植物中外, 其它植物都没有^[2], 所以可作为筛选基因用于植物转化^[3]。此转化系统已在多种作物^[1,3-13]的转化中得到应用。本文报道了以甘露糖为筛选剂, 农杆菌介导法将外源基因导入棉花细胞得到再生植株, 并通过 Southern blotting 和 Western blotting 证明外源基因的表达。

收稿日期: 2004-09-27 **作者简介:** 岳建雄(1957-), 男, 副研究员, yuejx@tom.com

基金项目: 广东省科技厅特定任务项目

1 材料和方法

1.1 外植体

供试品种为珂 312, 取其 5 日苗龄的下胚轴作为外植体。无菌苗的培养方法同前^[15]。

1.2 菌株材料

用于转化的菌种有 2 种, 一种只有 PMI, 另一种除 PMI 外, 还连接有 GFP 基因用以观察愈伤组织的转化率, 都以 4404 菌株作为载体, 感染液的制备方法同前^[15]。

1.3 转化方法

转化方法同前^[15], 只在诱导与筛选培养基中以不同比例的甘露糖代替葡萄糖, 附加 500 mg · L⁻¹ 的头孢霉素。每 4 周继代一次, 继代 2 次以后, 去头孢。愈伤组织长到蚕豆大小时, 转入分化培养基 I (D₁), 成份: MS, 无 KT 与 2, 4-D, KNO₃ 加倍, 甘露糖含量按实验设计。D₁ 继代 3~4 次转入分化培养基 II (D₂: 以葡萄糖 30 g · L⁻¹ 代替甘露糖) 出现胚状体再转入出苗培养基(成分同前^[1]) 发育成再生小植株后, 移栽。

1.4 甘露糖筛选浓度的确定实验

按表 1 的处理配制培养基, 取下胚轴切段直接接种, 每处理 3 个培养皿, 重复 3 次。30 d 后统计出愈率。

1.5 转基因愈伤组织的 PCR 检测

该检测在愈伤组织于 D₁ 继代 1~2 次后, 经细菌培养确定没有残留农杆菌时进行。从不同外植体的愈伤组织中随机取样 0.5 g, 室温下匀浆, 提取并纯化 DNA 的方法同前述^[15], 以下列片断为引: F-Primer 5' GCCCGGAGATATCGTTTCACT 3', R-Primer 5' ACATCGCTTCGCCAGGGTTCAAT 3'。PCR 条件: 总 DNA 200~300 ng, 0.4 ng 引物 F-Primer 1 μl, R-Primer 1 μl, dNTP 0.5 μl, PCR buffer(10×) 5 μl, Q buffer(5×) 10 μl, Taq polymerase 0.5 μl。反应: 95℃ 4 min, 接着 30 个循环: 95℃ 40 s, 60℃ 40 s, 72℃ 40 s。最后 72℃ 延长 7 min。

1.6 棉花实生苗与转基因植株抗甘露糖生根实验

① 1/2 MS 无机盐, 分别加入 0, 5, 10, 20, 30 g · L⁻¹ 的甘露糖, 播种野生型的 C312。10 d 后根据根系发育情况以确定甘露糖最低浓度。② 以此最低浓度配制检测培养基, 将有明显的叶片及少许根系的再生植株转入以观察根系的发育情况并初步确定是否转基因。

1.7 再生植株的分子检测

PCR 检测分析: 从再生植株取幼嫩叶片, 按前法^[1] 提取并纯化 DNA, 以下同愈伤组织的 PCR 检测。

Southern blotting 分析: 用上述方法提取并纯化 DNA。取约 50 ng 的 DNA, 加入 BamH1 酶在 37℃ 酶切 5~8 h。以供体野生型作阴性对照, PMI 质粒 DNA 作阳性对照, 在电压 40V, 1.2% 琼脂糖凝胶电泳 15 h。电泳后将经过碱变性的 DNA 经毛细管法^[16] 从琼脂糖凝胶上转移到尼龙膜, 再与用 PMI 的 fragment 标记的探针杂交, 以下过程同前^[15]。

Western blotting 分析: 由 Syngenta 公司提供 PEC standard protean 与一抗 Goat anti-PEC, 二抗为 Sigma 公司生产的 anti-Goat IgG。其余试剂均来自 Bio-Rad 公司, 植物样品蛋白的提取及聚丙烯酰胺凝胶的方法参考分子克隆实验指南, 电转膜采用 Bio-Rad 生产的 Mini trans-blot electrophoretic transfer cell, 按其说明书进行。

2 结果与分析

2.1 外植体对甘露糖的抗性

棉花外植体对甘露糖的抗性实验结果(表 1) 说明下胚轴做为外植体在不含糖的培养基上不能被诱导产生愈伤组织。但只要少量的甘露糖即可启动愈伤组织的诱导; 在甘露糖浓度为 10 g · L⁻¹ 以下时对愈伤组织的诱导非但没有抑制作用, 反而有促进。只有浓度在 20 g · L⁻¹ 以上时, 才产生抑制作用。当浓度达到 90 g · L⁻¹ 时, 完全抑制愈伤组织的诱导与生长, 这明显高于甜菜^[11]、玉米^[5] 和木薯^[6-7] 等作物。根据报道^[14], 甘露糖进入植物细胞被转化为 6-磷酸甘露糖, 但 6-磷酸甘露糖不能被代谢而累积在细胞中, 当累积的量达到“抑制水平”就会对细胞生长产生抑制作用。

表 1 外植体对甘露糖的抗性反应

Table 1 Effect of mannose on callus induction

处理	甘露糖浓度 (g · L ⁻¹)	存活率 /%	启动率 /%
MS0	0	100	0
MS1	1	100	100
MS2	5	100	100
MS3	10	100	100
MS4	20	81	80
MS5	30	81	76
MS6	50	38.6	38
MS7	90	9.5	0

本实验中外植体在没有任何糖份的 MS₀ 上不能被诱导出愈伤组织,而当培养基中加入 1~10 g · L⁻¹ 甘露糖后却产生愈伤组织,说明低浓度的甘露糖可被棉花细胞所利用,或者说这样低浓度的培养基累积的 6-磷酸甘露糖不足以抑制愈伤组织的诱导。只有在 20 g · L⁻¹ 以上时,细胞中累积的

6-磷酸甘露糖才抑制愈伤组织的诱导,20 g · L⁻¹ 可能就是甘露糖对棉花细胞的“抑制水平”,超过“抑制水平”即受到抑制。其它作物转化中甘露糖含量异于棉花,说明不同植物的“抑制水平”具有差异。

表 2 甘露糖对愈伤组织诱导的毒性实验

Table 2 Toxicity test of mannose to the callus induce in cotton

处理	重复 I		重复 II		重复 III	
	CR/%	CW/g	CR/%	CW/g	CR/%	CW/g
M:0g G:30g.	100	23.34	100	13.80	100	15.61
M:10g G:20g.	100	19.83	100	12.69	100	16.28
M:20g G:10g.	100	24.11	100	15.59	100	16.95

注:CR:出愈率,CW:愈伤组织重量,M:甘露糖,G:葡萄糖

另外,甘露糖对愈伤组织诱导的毒性实验结果见表 2,在总浓度为 30 g · L⁻¹ 时,无论甘露糖与葡萄糖的比例是 1:2 还是 2:1,与纯葡萄糖相比,对愈伤组织的出愈率与重量没有明显的影响,

证明甘露糖对愈伤组织的诱导没有毒性。这与在木薯^[6-7]上的实验结果相同,但与玉米的实验结果却大相径庭,有的认为有毒^[9],有的认为无毒^[4],可能与外植体及转化方法等因素有关。

表 3 甘露糖浓度与转化率的关系

Table 3 Effect of mannose concentration on the cotton transformation

甘露糖含量 /(g · L ⁻¹)	启动率 /%	转化率 /%	总转化率 /%	转基因愈伤组织状态
CK(葡) 30	100	10	10	+
甘露糖 5	96	73	70	++
甘露糖 10	94	66	62	++
甘露糖 20	86	84	72	+++
甘露糖 30	70	81	57	++++
甘露糖 50	52	78	40	++
甘露糖 70	37	50	19	++
甘露糖 90	20	10	20	+

2.2 甘露糖浓度与转化率

甘露糖浓度对转化率的影响(表 3)。需要说明的是,几乎所有的愈伤组织在刚诱导出来时都是嵌合体,所谓转基因愈伤组织状态指的是在荧光显微镜下,整块愈伤组织中有荧光的部分所占比例。从结果看来,对照的转化率最低,90 g · L⁻¹ 甘露糖的转化率最高,但其启动率只有 20%,换句话说,在这样高的浓度下,大多数外植体诱导不出愈伤组织,只要长出来就肯定是转基因的了。但如此高浓度筛选剂的培养基,即使是转基因愈伤组织也是长不好的。所以,根据转化率与转基因愈伤组织状态,以 30 g · L⁻¹ 作为棉花转基因的最适筛选浓度。按照我们以前的经验,愈伤组织

对筛选剂的抗性高于外植体,为了从嵌合的细胞团中筛选出较纯合的转基因愈伤组织,继代培养基提高到 50 g · L⁻¹,这种逐步提高筛选浓度的筛选方法类似于水稻^[8]与甜菜^[11]的转化。

在此培养基上继代 3~4 次后,要用葡萄糖代替甘露糖。我们发现,即使在较低浓度的甘露糖培养基上,转基因愈伤组织也很难分化。说明转基因愈伤组织虽然可以利用甘露糖作为生长的炭源,但对胚的分化却不是最理想的。

2.3 转基因愈伤组织的 PCR 检测

随机从 12 个细胞系中采样提取 DNA,其中 7 个有明显的带(图 1),转化率为 58.3%。说明带有 pmi 基因已经转入转基因细胞系的基因组

中,也说明进一步筛选、淘汰非转化的细胞系很有必要。这个结论同玉米^[4]转化的结果相同。



图1 转化愈伤组织的 PCR 检测

Fig. 1 PCR analysis for putative transgenic callus

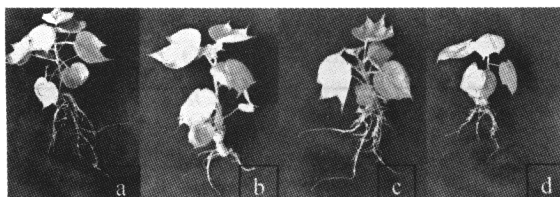
2.4 棉花根系对甘露糖的敏感性实验及对再生植株的检测

实验结果见表4。棉花须根系的发育远比愈伤组织对甘露糖更敏感,在 $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的浓度没有须根能长出来,这一浓度高于木薯($10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)。将待检植株移入此培养基后,再生植株根系的发育状况见图2。转基因植株的根部有很发达的须根系,而非转基因植株则没有,说明转基因植株可以利用甘露糖作为炭源和能源而正常生长,而非转基因植株的发育受到抑制,根系则首当其冲出现受害症状。

表4 甘露糖对棉花幼苗及根系发育的影响

Table 4 Effect of Mannose to Root development in Cotton

甘露糖 /($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	株高 / cm	根长 / cm	须根数 /个
0	6	6.3	20
5	3	5.8	9
10	3	4.5	3
20	2.5	2.0	0
30	2.2	1.8	0



(a 和 c 为转基因株, b 与 d 为非转基因株)

图2 甘露糖对 pmi 转基因植株的筛选作用

Fig. 2 Selective efficiency of mannose for transgenic plants with pmi gene

2.5 转基因植株的分子检测

转基因植株的 PCR 检测结果见图3,转基因植株有与阳性对照相同的带,阴性对照的野生型没有带出现。用 southern blotting 检测的结果见图4,从转基因植株检测到 pmi 基因的存在。用 pmi 探针杂交结果表明,转基因植株中至少插入1个基因的拷贝,有的有两个甚至3个。大部分的带都不在同一个位置,说明外源基因在植物基

因组的插入是随机的。此结果同棉花转化的其他方法结果相同,也同其它植物用甘露糖筛选的结果一样。

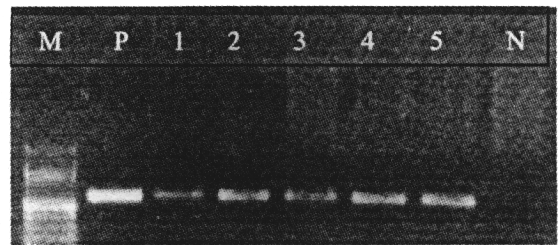


图3 转化植株 PCR 检测

Fig. 3 PCR analysis for putative transgenic plants

M + -- 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

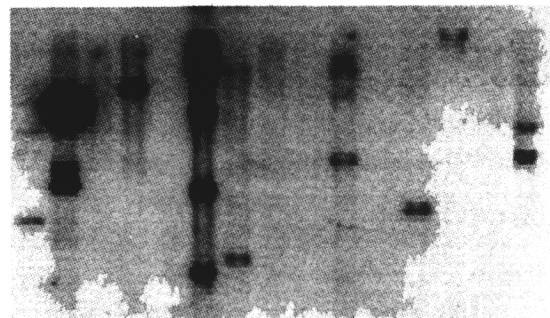


图4 转化植株的 Southern blots 检测

Fig. 4 Southern blots analysis for transgenic plants

2.6 转基因植株的 Western blotting 分析

如果说 PCR 与 southern blotting 只是证明外源基因插入植物基因组,那么 western blotting 则证实在外源基因的指导下合成了相应的蛋白质,说明外源基因得到表达(图5)。

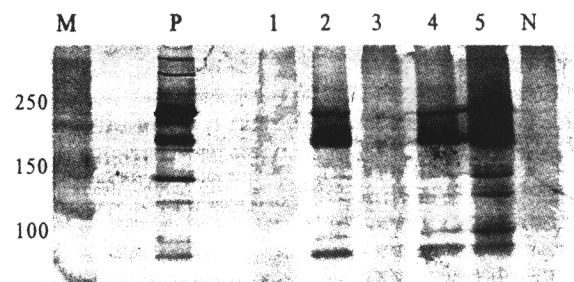


图5 转基因植株的 Wester blotting 检测

Fig. 5 Wester blotting analysis for the transgenic plants

3 小结与讨论

以甘露糖作为转基因细胞的筛选剂已在别的植物上得到应用,但在棉花上,本文是首次报道。同抗生素相比,第一个不同是筛选的机理不同。

正如所报道^[1]的,甘露糖的筛选机理通过“饿死”而不是“杀死”非转基因细胞来达到筛选目的的,因此,在筛选的过程中,外植体很少出现坏死,没有坏死细胞抑制转基因细胞生长的情况,从而促使转基因细胞快速增长。由筛选的机理而产生的第二个不同是筛选剂的用量不同,作为筛选剂的甘露糖浓度以 $g \cdot L^{-1}$ 计算,而抗生素类则以 $mg \cdot L^{-1}$ 计,相差千倍。这是因为甘露糖是作为转基因细胞的炭源和能源来筛选的,而抗生素则不是。相同点:1. 筛选剂存在时诱导出来的愈伤组织对筛选剂的抗性提高,因此继代培养基中的浓度要提高;2. 都对胚的分化有抑制作用,在胚分化阶段要及时撤掉筛选剂。

从实验结果看出,棉花转化所需要的甘露糖浓度同水稻^[8]相同,但比玉米^[5]甜菜^[11,13]高。在甜菜与木薯的转化中,筛选培养基还加入适量的蔗糖,但在棉花的转化中只加甘露糖即可。起始浓度必须在 $30 g \cdot L^{-1}$ 以上,继代培养的浓度还要适当提高。在玉米^[9]、水稻^[8]和木薯的转化中,愈伤组织的筛选可以在纯甘露糖的培养基上进行,但分化的时候要添加蔗糖,否则,再生率大大降低;同样,当棉花开始胚分化时,要以葡萄糖代替甘露糖才能使胚大量分化。不论转基因与否,再生植株都可以代谢甘露糖,但以 $20 g \cdot L^{-1}$ 为界限,能在含有 $20 g \cdot L^{-1}$ 以上的培养基上正常生长、根系发达的植株才可能是转基因植株。

参考文献:

- [1] JOERSBO M. Advances in the selection of transgenic plants using non-antibiotic marker genes[J]. *siogia plantarum*, 2001, 111: 269-272.
- [2] JANET Reed, Laura Privalle, Powell M L, et al. Phosphomannose isomerase: an efficient selectable marker for plant transformation[J]. *In vitro cell biol-Plant*, 2001, 37: 127-132
- [3] REED J N, Chang Y-F, McNamara D D, et al. High frequency transformation of wheat with the selectable marker mannose-6-phosphate isomerase (PMI) [M]. *In vitro*, 1999, 35: 57-A abstract P-1079.
- [4] WANG A S, Evans R A, Altendorf P R, et al. A mannose selection system for production of fertile transgenic maize plants from protoplasts[J]. *Plant Cell Reports* 2000, 19: 654-660.
- [5] NEROTTO D, Jolley M, Beer S, et al. The use of phosphomannose-isomerase as a selectable marker to recover transgenic maize plants (*Zea may L.*) via *Agrobacterium* transformation[J]. *Plant cell reports* 2000, 19: 798-803.
- [6] ZHANG P, Puonti-Kaerlas J. PIG-mediated cassava transformation using positive and negative selection [J]. *Plant cell reports*, 2000, 19: 1041-1048.
- [7] ZHANG P, Potrykus I, Johanna P K. Efficient production of transgenic cassava using negative and positive selection[J]. *Transgenic research*, 2000, 9: 405-415.
- [8] PAOLA Lucca, Xu dong Ye. Ingo Potrykus, Effective selection and regeneration of transgenic rice plants with mannose as selective agent[J]. *Molecular Breeding*, 2001, 7: 43-49.
- [9] WRIGHT M, Dawson J, Dunder E et al, Efficient biolistic transformation of maize (*Zea mays L.*) and wheat (*Triticum aestivum L.*) using the phosphomannose isomerase gene, *pmi*, as the selectable marker[J]. *Plant cell reports*, 2001, 20: 429-436.
- [10] JOERSBO M, Jorn D M, Janne B. Relationship between promoter strength and transformation frequencies using mannose selection for the production of transgenic sugar bee [J]. *Molecular Breeding*, 2000, 6: 207-213.
- [11] JOERSBO M, Iain D, Jette K, et al. Analysis of mannose selection used for transformation of sugar beet[J]. *Molecular Breeding*, 1998, 4: 111-117.
- [12] WANG Z B, Guo S D. Expressin of two insect-resistant genes *cryIA(b&c)*GNA in transgenic tobacco plants results in added protection sgainst both cotton bollworm and aphids[J]. *Chinese science bulletin*, 1999, 44(22): 2051-2058.
- [13] JOERSBO M, Petersen S G, Okkels F T, Parameters interacting with mannose selection employed for the production of transgenic sugar beet[J]. *Physiologia plantarum*, 1999, 105(1): 109-115.
- [14] SHEU-HWA C-S, Lewis D H, Walker DA. Stimulation of photosynthetic starch formation by sequestration of cytoplasmic orthophosphate[J]. *New phytologist*, 1975, 74: 383-392.
- [15] 岳建雄, 张慧军, 张炼辉. 以对潮霉素抗性为筛选标记的棉花遗传转化[J]. *棉花学报*, 2002, 14(4): 195-199.
- [16] SOUTHERN E M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis [J]. *J Mol Biol*, 1975, 98: 503. ●