

# 潮霉素作为选择抗生素在农杆菌介导转化中的应用

罗晓丽, 肖娟丽, 张安红, 吴家和\*

(山西省农业科学院棉花研究所, 运城 044000)

## High Effective of Cotton Transformation via Hygromycin Resistant Selectable Marker

对以潮霉素为选择抗生素的棉花遗传转化中,不同棉花品种的下胚轴和胚性细胞的最适选择压及选择时间做了进一步的研究,并且对潮霉素作为选择剂的棉花转化植株进行 Southern blot 证实。

### 1 材料和方法

**1.1 棉花品种。**冀合 321、冀合 713、珂字 312 均是本实验室多年自交保纯的材料。外植体为这三个参试种的下胚轴和继代 10~15 d 后的胚性细胞。

**1.2 质粒、菌株以及培养。**质粒为 pCAMBIA 1301 含有 HPT 选择标记基因和 GUS 报告基因,两个基因均有 35S 启动子启动(图 1)。农杆菌菌株为 LBA4404。。

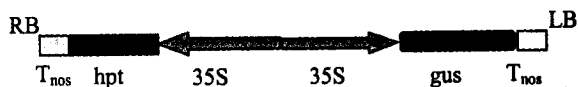


图 1 pCAMBIA 1301 质粒的 T-DNA 结构示意图

Fig.1 The sketch map of T-DNA of pCAMBIA 1301

**1.3 棉花外植体对潮霉素的敏感性。**对 3 个不同品种的两种外植体进行潮霉素敏感性实验,将潮霉素的浓度梯度设计为 6 个不同的处理( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ :0, 2.5, 5, 7.5, 10, 15),每个处理 3 个培养皿(直径 12 cm),每个培养皿放 10 个下胚轴或 10 块胚性细胞,重复 3 次。

**1.4 以潮霉素为抗性选择剂的棉花遗传转化。**在棉花外植体对潮霉素的敏感性实验的基础上,选用  $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  潮霉素作为棉花下胚轴外植体转化浓度,选用  $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  潮霉素作为棉花胚性细胞外植体转化浓度。具体转化方法和有关棉花组织培养方法参照陈志贤等的方法进行。

**1.5 抗性愈伤组织的 GUS 染色鉴定和转化再生植株的分子鉴定。**将分别从下胚轴和胚性细胞获得的抗潮霉素愈伤组织细胞进行 GUS 染色,抽取转化再生植株和未转化植株的总 DNA,PCR 分析:合成潮霉素特异引物进行扩增,片段大小为:760 bp。引物序列:正链,5'-ggacttcggggcagtcct-3';负链,5'-cgatgtaggagggcggtgg-3' Southern blot 分析:对利用 PCR 扩增方法获得潮霉素特异片段为探针, $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ -dCTP 标记。

**1.6 观察、计数和统计分析。**棉花外植体培养 4 周后进行第一次观察,统计外植体的启动率和胚性细胞的生长量,同时按原样继代,再过 4 周(8 周的外植体)以后进行第二次观察,统计外植体诱导出愈伤组织的死亡率和幸存愈伤组织的生长情况。

### 2 结果与分析

**2.1 不同棉花品种的下胚轴和胚性细胞对潮霉素的敏感性。**3 个参试种的下胚轴对潮霉素的敏感性存在差别,珂字 312 在愈伤组织的启动、诱导生长和诱导出的愈伤组织对潮霉素的忍耐程度均显著高于冀合 321 和冀合 713(表 1)。在  $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的潮霉素选择压下,冀合 321 和冀合 713 两个参试种有少量的愈伤组织被诱导出来,但是这些愈伤组织继代到同样的培养基中时,停止生长,8 周后本褐化死亡,而珂字 312 在这个浓度下仍有部分愈伤组织缓慢生长。因此,用潮霉素作为选择剂进行遗传转化时,不同棉花品种的下胚轴所需的浓度水平是不一样的,如冀合 321 和冀合 713 可选用  $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的潮霉素作选择浓度,而珂字 312 则需选用  $7.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  潮霉素作选择浓度。

表 1 3 个棉花品种的下胚轴对潮霉素的敏感性

Table 1 Hypocotyls of three cotton varieties as explants are different tolerant to hygromycin

潮霉素含量/(mg·L <sup>-1</sup> )		0	2.5	5	7.5	10	15
下胚轴愈伤组织 启动率/%	冀合 321	100.0	100.0	94.4	27.8	18.9	0
	冀合 713	100.0	100.0	96.7	32.2	20.0	0.0
	珂字 312	100.0	100.0	100.0	35.6	16.7	0.0
出愈率/%	冀合 321	97.8	83.3	13.3	5.6	0.0	0
	冀合 713	95.6	86.7	18.9	7.8	0.0	0
	珂字 312	100	95.6	33.3*	15.6	2.2	0
愈伤组织死亡率 /%	冀合 321	0.0	88.0	91.7	100.0	/	/
	冀合 713	0.0	84.6	94.1	100.0	/	/
	珂字 312	0.0	75.6*	83.3*	92.9	100.0	/

注:1. 培养 4 周后下胚轴有明显膨大或带有愈伤组织的外植体称为启动率;2. 培养 4 周后愈伤组织大于 3 mm 的称为诱导出愈率;3. 培养 8 周后统计的褐化死亡的愈伤组织比率; \* 显著水平 0.05。

同样三个参试种的胚性细胞对潮霉素的敏感性也存在差别,珂字 312 的初生愈伤组织对潮霉素的忍耐程度均显著高于冀合 321 和冀合 713 (表 2)。在 7.5 mg·L<sup>-1</sup> 时,三个参试种的愈伤组织有少量生长,但继代到同浓度的潮霉素培养基中时,停止生长,8 周后冀合 321 和冀合 713 的胚

性细胞大部分褐化死亡,而珂字 312 的胚性细胞仍然在缓慢生长。因此,利用潮霉素作为选择剂进行棉花胚性细胞遗传转化时,冀合 321 和冀合 713 的选择浓度应为 7.5 mg·L<sup>-1</sup>,珂字 312 的潮霉素选择浓度应高于 10 mg·L<sup>-1</sup>。

表 2 3 个棉花品种的胚性细胞对潮霉素的敏感性

Table 2 Embryogenic cell of three cotton varieties as explants are different tolerant to hygromycin

潮霉素含量/(mg·L <sup>-1</sup> )		0	2.5	5	7.5	10	15
愈伤组织生长量 <sup>1</sup> /mg	冀合 321	428	416	265	114	54	24
	冀合 713	459	425	258	98	32	30
	珂字 312	615	487	341*	183	67	31
愈伤组织死亡率 <sup>2</sup> /%	冀合 321	0	11.1	64.4	78.9	97.8	100
	冀合 713	0	10.0	67.8	82.2	98.9	100
	珂字 312	0	6.7	45.6*	68.9*	93.3	100

注:1. 培养 4 周后初生的新愈伤组织进行称重量,每个处理随机取三块愈伤组织进行称重;2. 培养 8 周后,新生愈伤组织褐化死亡的比率; \* 表示;F 测验 0.05 显著水平。

2.2 胚性愈伤组织的 HPT 抗性和 GUS 活性及其植株再生。感染后的棉花下胚轴在含 5 mg·L<sup>-1</sup> HPT 的选择培养基诱导愈伤组织,4 周后把愈伤组织继代在含有相同抗生素水平的增殖培养基,继续正常生长的称为 HPT 抗性愈伤组织。珂字 312 的抗性愈伤组织的比率明显大于冀合 321 和冀合 713 (表 3),可见珂字 312 的下胚轴对 HPT 的耐受性高于其他两个品种。为了进一步确定诱导的愈伤组织是否为转化的愈伤组织,

GUS 染色检测的结果和 HPT 抗性的比率一致。利用胚性细胞作外植体进行遗传转化,其 HPT 抗性愈伤组织的比率和 GUS 阳性的比率明显小于下胚轴作外植体,但是大部分愈伤组织均能分化再生植株,冀合 321、冀合 713 和珂字 312 三个参试种的愈伤组织再生率分别达到 88.3%、96.7% 和 98.0%;而下胚轴作外植体的其再生率仅为 8.0%、11.3% 和 18.0%。

表 3 潮霉素筛选外植体诱导的愈伤组织的 HPT 和 GUS 的阳性率和植株再生效率

Table 3 The efficiency of transformation regeneration plants and the rate of positive embryogenic calli by HPT screening and GUS staining

品种		愈伤组 织/块	HPT <sup>+</sup> 愈伤组 织比率/%	GUS <sup>+</sup> 愈伤组 织比率/%	获得再生植株的愈 伤组织比率/%
冀合 321	下胚轴	150	91.3	90.7	8.0
	胚性细胞	60	78.3	78.3	88.3
冀合 713	下胚轴	80	92.5	91.3	11.3
	胚性细胞	30	73.3	73.3	96.7
珂字 312	下胚轴	100	71.0	68.0	18.0
	胚性细胞	50	64.0	64.0	98.0

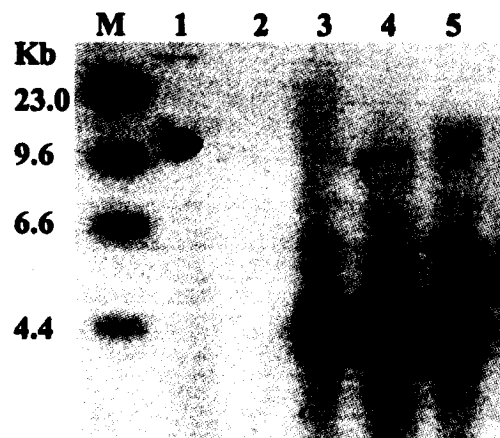
2.3 转化再生棉花植株的分子生物学鉴定。对当年移栽成活的 128 株转基因再生株进行 HPT 基因的 PCR 扩增,其中有 116 株呈 PCR 阳性(图 2)。选取 35 株 PCR 阳性再生植株,进行 Southern blot 分析(图 3),其中单拷贝的转化植株占 68.7%,两个拷贝以上的占 31.3%。说明利用潮霉素作选择剂进行农杆菌介导转化,主要以单拷贝插入为主,这和用卡那霉素作选择剂的结果一样的。



M. 1Kb 分子量标尺;1~7. 转基因植株;8. 未转基因植株;9. pCAMBIA 1301 质粒

图 2 转基因植株的 PCR 检测

Fig. 2 PCR detection of transformation regeneration plants



M. 分子量标尺;1. 质粒;2. 未转化植株;3~5. 转基因植株

图 3 转基因植株中 HPT 基因的 Southern blot 检测

Fig. 3 Southern blot analysis of transformation plants