

高品质转野生荠菜凝集素基因棉花的获得

肖松华¹, 吴巧娟¹, 刘剑光¹, 狄佳春¹, 许乃银¹, 陈旭升¹, 柏立新²

(1. 江苏省农业科学院经济作物研究所, 南京 210014; 2. 江苏省农业科学院植物保护研究所)

摘要: 利用花粉管通道转基因技术, 将 DE35S 启动子驱动的野生荠菜凝集素 (WSA) 基因导入 10 个高品质棉花品种 (系)。所使用的转基因表达载体还含有选择标记基因 *NPTII* (卡那霉素抗性基因) 和 Ω 序列, 以利于转基因植株的筛选以及 WSA 基因的高效表达。对转化当代 3197 棵棉苗的检测结果表明, 4.88% 植株具有卡那霉素抗性 (Kan^+)。根据野生荠菜凝集素基因序列设计一对特异性引物, 对 156 个 Kan^+ 植株进行 PCR 检测, 筛选出 45 个转 WSA 基因棉花工程植株。45 个株系纤维品质测定结果表明, 获得了 9 个高品质转 WSA 基因棉花株系。并对植物基因工程研究中以 *NPTII* 作为标记基因的局限性以及一些转 WSA 基因棉花株系纤维强度变劣的原因进行了探讨。

关键词: 棉花; 基因工程; 野生荠菜凝集素基因; 纤维品质

中图分类号: S562.035.3 **文献标识码:** A

文章编号: 1002-7807(2005)06-0334-05

Transgenic Cotton (*Gossypium hirsutum* L.) Expressing Wild Shepherd's purse Agglutinin Gene with High Quality Fiber

XIAO Song-hua¹, WU Qiao-juan¹, LIU Jian-guang¹, DI Jia-chun¹, XU Nai-yin¹, CHEN Xu-sheng¹, BAI Li-xin²

(1. Institute of Industrial Crops, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China; 2. Institute of Plant Protection, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, China)

Abstract: Plant Lectins are proteins that bind reversibly to specific monoor oligosaccharides. It has a prospective use in Agriculture/Medicine et al, especially in plant anti-insect gene engineering. Aphid damage is one of the reasons to decrease the yield and quality of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). In order to improve the resistance to aphid, the gene engineering was carried out in this study in cotton. The wild shepherd's purse agglutinin gene (WSA) driven under DE35s promoter was introduced into ten cotton varieties with high quality fiber by pollen tube-mediated transformation. Pollen tube pathway is one kind of direct genetic transformation technique, using the plant fertilized eggs as the transgenic receptor. The technique has the advantages of no genotype limitation, no tissue culture, and easy operation for large scale of plant genetic transformation. For the convenience of screening transgenic plants and WSA gene expressing efficiently, the used transgenic expression vector also contains selected marker gene *NPTII* (kanamycin-resistant gene) and sequence of Ω . In order to identify the transgenic engineering plants effectively and simply, it is beneficial for the identification of transgenic engineering plants to use kanamycin-resistance as an indirect marker. Smearing a drop of 2000 mg · kg⁻¹ kanamycin solution with writing brush on one pairs of cotyledons and first neonate expanded leaves. All of leaves of non-transgenic plants showed apparent yellow patches whereas the leaves of the transgenic engineering ones maintain green without any symptoms. The identification for resistance to

收稿日期: 2005-02-07 **作者简介:** 肖松华(1964-), 男, 副研究员, 硕士

基金项目: 江苏省“十五”农业高技术项目(BG2002305)

kanamycin indicated that 4.88% plants have kanamycin-resistance (Kan^+) in 3197 cotton seedlings of the contemporary transformation generation. One pair of specific primers complementary to the functional sequence of WSA gene was designed, the fragment of expected DNA was about 290 bp in size. 45 trans-WSA gene plants were screened by PCR tests from 156 Kan^+ plants. These results indicate that the wild shepherd's purse agglutinin gene is possibly integrated into the genome of these transgenic engineering plants. Fiber quality identification indicated that 9 trans-WSA gene cotton lines were up to the standard of high quality fiber (2.5% span length ≥ 31 mm, strength ≥ 35 cN \cdot tex $^{-1}$, Micronaire value: 3.7~4.2) in these 45 transgenic lines. These 9 trans-WSA gene cotton lines with high quality fiber can be used in conventional breeding program. The limitation of using *NPT II* gene as selected marker gene in the plant gene engineering and the reasons for declination of fiber strength of transgenic cotton lines are also discussed.

Key words: cotton; gene engineering; wild shepherd's purse agglutinin gene; fiber quality

植物凝集素是一类具有高度特异性糖结合活性的蛋白,存在于许多植物的种子和营养器官中^[1]。凝集素在植物的防御反应中扮演着重要的角色,植食性昆虫消化道表皮膜的主要成分是糖蛋白,因而在肠的内表皮上有凝集素作用的结合位点。当凝集素随着食物进入昆虫肠道后,结合到这些糖蛋白的受体上,从而阻碍昆虫的生长发育,甚至杀死昆虫^[2-4]。

棉蚜属刺吸式害虫,苗期危害棉苗延缓棉株的生长发育进程,易产生无头苗;蕾铃期危害导致蕾铃大量脱落,使产量降低;吐絮期危害引起棉纤维含糖粘性,使棉花加工品质下降。因此干旱年份棉蚜的大量发生是影响棉花生产实现高产、优质的主要障碍因素。

由于植物凝集素广泛存在并且种类繁多,特别是它所具有的对多种单糖或寡聚糖的专一性结合能力,使其在植物抗棉蚜基因工程研究中具有较大的应用潜力。目前成功用于植物抗棉蚜基因工程的外源凝集素基因有:天南星凝集素、半夏凝

集素、雪花莲凝集素、豌豆凝集素和麦胚凝集素等基因^[5-9]。本研究采用花粉管通道法,将野生芥菜凝集素基因导入高品质棉花品种(系),通过基因工程改良棉花抗棉蚜性状,获得高品质转野生芥菜凝集素基因棉花新种质。

1 材料和方法

1.1 受体品种

受体品种共有 10 个,分别是:华棉 1 号、渝棉 1 号、盐抗 1 号选系、新 718 选系、2030 选系、华棉 2 号、苏优 035、苏优 040、苏优 096、苏优 032。种植密度为每公顷 3.60 万株,栽培管理措施与大田生产相同。

1.2 基因来源及表达载体

野生芥菜凝集素基因 WSA34 由武汉大学生命科学院提供,该基因是采用同源序列扩增法从野生芥菜基因组中克隆出,片段长度 966 bp,并以质粒 pBWSA34 作为表达载体(图 1)。

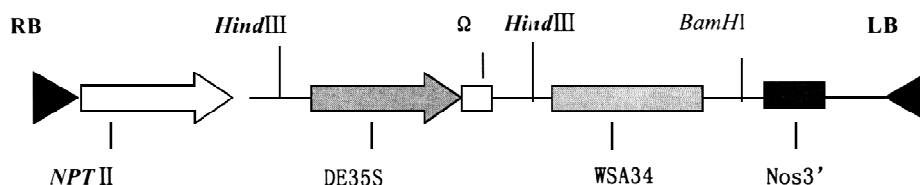


图 1 野生芥菜凝集素基因植物表达载体

Fig. 1 The plant expression vector containing the wild shepherd's purse agglutinin gene(WSA)

1.3 转基因技术

采用花粉管通道法进行目的基因的遗传转化。于棉花开花后 18~24 h,即雌雄配子刚完成受精过程,取棉株内围第 1~2 果节花冠鲜红的人工自交幼铃,除去花冠和花柱,将 10 μ l 质粒缓冲

液(0.02 g \cdot L $^{-1}$)用微量注射器从花柱横断面垂直注入子房,使质粒经过花粉管通道进入胚珠转化受精卵细胞。随即摘去果枝边心,并在铃柄基部环涂 50 mg \cdot L $^{-1}$ 赤霉素溶液,以提高被注射棉铃的成铃率。

1.4 卡那霉素抗性基因的检测

对转化当代(T_0)及转化一代(T_1)、二代(T_2)种子进行营养钵育苗。当棉苗普遍达一叶期时,在子叶和真叶表面用毛笔点涂 $2000 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 卡那霉素溶液,一周后观察叶面是否出现黄白斑,若不出现,表明该株棉苗含有卡那霉素抗性基因($NPT\text{II}$),若出现失绿斑,表明该幼苗不含有 $NPT\text{II}$ 基因。

1.5 转基因工程植株的分子检测

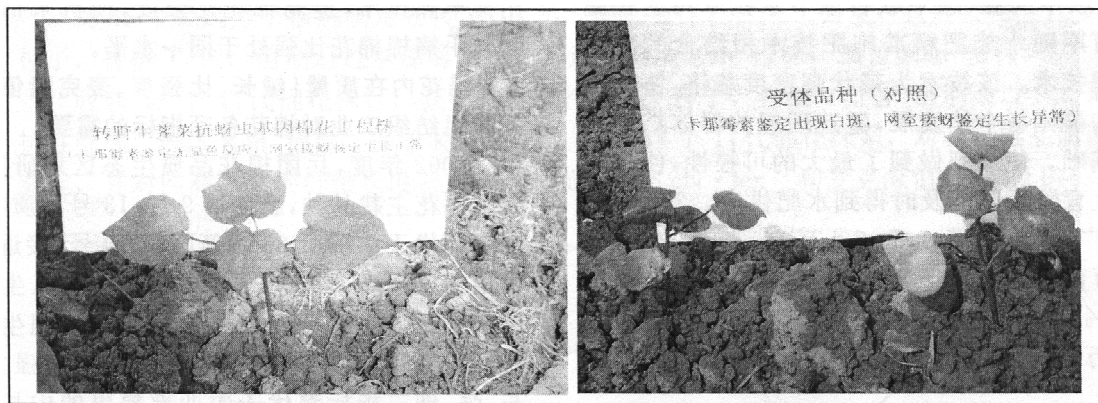
取 1 g 幼嫩的 Kan^+ 植株叶片,参照 Paterson 等^[10]建立的 CTAB 法,提取和纯化基因组 DNA。PCR 检测:取 $80 \sim 100 \text{ ng}$ 待测棉株 DNA 作模板,以 WSA 基因的一对特异性引物进行 PCR 扩增,正向引物序列为: $5' \text{-AGACAAGCGGCGCT-GAT-3'}$,反向引物序列为: $5' \text{-TCATTTTCGAAC-CCCAGAGTC-3'}$ 。PCR 反应条件为, 94°C 预变性 2 min ;进行 PCR 循环: 94°C 变性 30 s , 57°C 复性 30 s , 72°C 延伸 60 s ;循环 40 次后, 72°C 最后延伸 10 min 。 1.4% 琼脂糖凝胶电泳,EB 染色,UV 检测。

1.6 纤维品质测定

转 WSA 基因棉花株系的纤维品质性状,由农业部棉花品质监督检验测试中心测定。

2 结果与分析

2.1 卡那霉素抗性基因检测初步筛选转 WSA



左:转基因植株; 右:受体对照

图 2 $NPT\text{II}$ 基因在转基因植株中的表达

Fig. 2 The expression of kanamycin-resistant gene as selecting marker in WSA transgenic plants

2.2 转 WSA 基因工程植株的分子检测

由于 $NPT\text{II}$ 基因与 WSA 基因连接在一起导入棉花,并整合到染色体组中,通过卡那霉素抗性鉴定能够间接证明 WSA 基因的存在。但不能直接证明 WSA 基因已经整合到棉花染色体组

基因工程植株

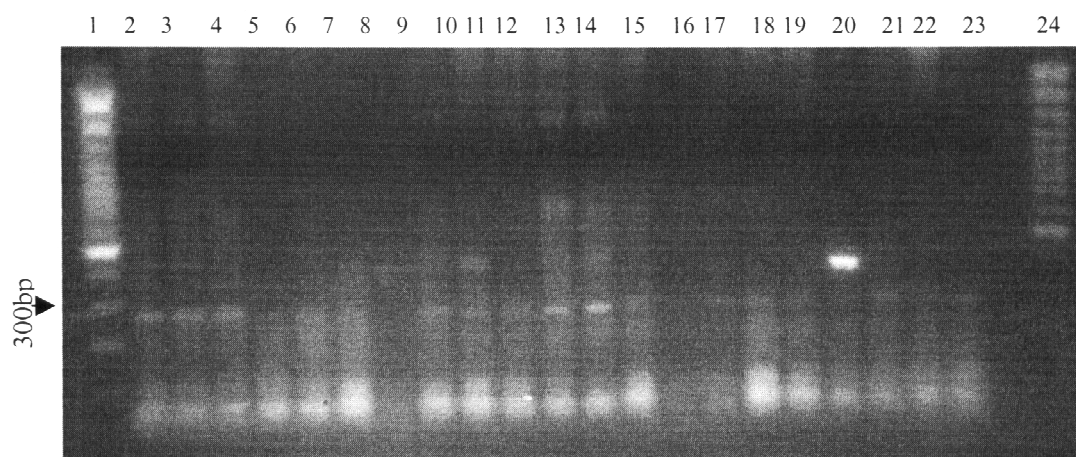
本研究使用的植物表达载体(图 1)中含有 $NPT\text{II}$ 基因,编码氨基糖苷-3'-磷酸转移酶,其活性是使氨基糖苷类抗生素如卡那霉素磷酸化而失活,转基因植株因含有 $NPT\text{II}$ 基因而表现出卡那霉素抗性。卡那霉素对非转基因植株的毒性机理是其与叶绿体和线粒体中的核糖体 30S 小亚基结合,影响 70S 起始复合物的形成,干扰细胞器中蛋白质的生物合成,导致植物细胞死亡^[11]。将 WSA 基因导入 10 个高品质棉花品种(系),对所收获的种子进行营养钵育苗,共成苗 3197 株。当第一片真叶展平时,在子叶和真叶表面点涂卡那霉素溶液,经过 $5 \sim 7 \text{ d}$ 组织化学反应,转基因植株的叶片保持绿色,表现出对卡那霉素的抗性,在 10 个转基因组合中共筛选出 156 个抗卡那霉素(Kan^+)植株;而受体对照和非转基因植株的叶片在点涂处出现黄白斑,最终形成枯死斑(图 2)。

在棉花基因工程研究中, $NPT\text{II}$ 基因作为选择标记已经得到广泛地利用。由于该基因容易鉴定,并且与目的基因表现为紧密连锁的遗传方式,能够通过 $NPT\text{II}$ 基因表达产物的检测追踪目的基因是否存在。在转 Bt 基因抗虫棉新品种选育和良种繁育过程中,以 $NPT\text{II}$ 基因作为标记基因,能够实现 Bt 基因的快速检测,从而提高育种工作效率。

中。因而根据 WSA 基因功能区两端的已知序列,设计一对特异性引物,对转基因植株基因组 DNA 进行 PCR 扩增及电泳分析,即可证明 WSA 基因是否已经导入棉花并整合到染色体组中。在 156 个 Kan^+ 单株中,45 个单株出现了与阳性对

照相同的特征带(图 3),其片段大小为 290 bp 左右,而 10 个受体品种 DNA 扩增产物中未出现这

一特征带。因而从分子水平上证明了获得 45 个转 WSA 基因棉花工程植株。



泳道 1、24:分子量标准;泳道 2:pBWSA34 质粒 DNA(阳性对照);泳道 8、15、23:受体品种 DNA(阴性对照);泳道 3~7、9~14、16~22:转 NPTII 基因抗蚜植株 DNA

图 3 转 WSA 基因棉花工程植株的 PCR 检测结果

Fig. 3 PCR analysis for the presence of the WSA gene in the aphid-resistant plants

2.3 转 WSA 基因棉花株系纤维品质分析

对 45 个经过分子检测确定为转 WSA 基因棉花植株进行人工自交,获得转化一代(T_1)种子。种植 T_1 代,苗期通过卡那霉素抗性筛选,淘汰 Kan^- 植株,保留 Kan^+ 植株。

收获 45 个 T_1 代棉花株行,获得转化二代(T_2)种子。种植 T_2 代,苗期通过卡那霉素抗性筛选,淘汰 Kan^- 植株,保留 Kan^+ 植株。收获 45 个 T_2 代棉花株系,对其纤维品质进行测定,并对照高品质棉纤维长度 ≥ 31 mm、强度 ≥ 35 cN \cdot tex $^{-1}$ 和麦克隆值 3.7~4.2 的标准,结果表明,有

9 个株系的三个主要纤维品质指标达到高品质棉标准(表 1),从而证实获得了 9 个高品质转 WSA 基因棉花株系。其余 36 个株系的纤维品质尤其是纤维强度未达到高品质棉标准,其原因可能与 WSA 基因插入位点不同有关。若 WSA 基因插入到高品质棉纤维强度主效 QTL 区域,引起控制该性状的主效基因发生突变,使纤维强度降低;若 WSA 基因插入到其他区域,控制纤维强度的主效基因保持不变,转 WSA 基因棉花株系纤维品质性状的表现与受体亲本相同。

表 1 转 WSA 基因棉花株系纤维品质测定结果(HVICC 校准水平)

Table 1 HVICC fiber quality data of WSA transgenic cotton lines

株系代码	纤维长度/mm	整齐度/%	比强度 /(cN \cdot tex $^{-1}$)	伸长率/%	麦克隆值
46002	33.9	85.8	36.8	7.0	3.8
46004	32.5	85.8	35.2	5.4	4.2
46008	31.8	86.3	39.5	6.3	4.2
46016	31.6	85.1	36.4	6.2	3.9
46028	31.7	84.6	36.5	6.6	3.8
46033	32.8	84.6	36.2	5.8	4.1
46034	32.9	85.5	36.9	5.4	4.0
46055	34.9	85.7	35.6	6.0	4.1
46060	32.6	83.2	37.2	5.6	4.1

3 讨论

3.1 卡那霉素抗性基因作为标记基因的局限性

目前在功能基因克隆过程中,由于卡那霉素抗性基因(*NPTII*基因)在植物体内容易检测,因而该基因作为标记基因在植物基因工程研究中得到广泛地应用^[5]。若受体品种是常规品种,利用卡那霉素显色反应能够有效鉴别转基因棉花与常规品种;若受体品种是转 Bt 基因棉花品种,且所转化的 Bt 基因调控序列中已经含有 *NPTII* 基因。再将连接着 *NPTII* 基因的 WSA 基因导入转 Bt 基因棉花品种,在转化当代(T_0)及其后代中,无法利用卡那霉素显色反应间接鉴定 WSA 基因的存在。因为 Bt 基因、WSA 基因分别连接着 *NPTII* 基因,点涂卡那霉素不出现黄斑,仅能表明被鉴定的棉株中可能含有 Bt 基因或 WSA 基因或两者兼有,并不能将棉花植株这三种类型(Bt、WSA、Bt+WSA)的基因拥有方式区别开来。

在本研究所引用的 10 个受体品种(系)中,盐抗 1 号选系、新 718 选系、2030 选系、华棉 2 号、苏优 032 等 5 个品系均为高品质转 Bt 基因棉花。在转 WSA 基因工程植株的标记基因检测过程中,从 10 个转基因组合 T_0 代中共筛选出 156 个 Kan^+ 植株,对这些 Kan^+ 植株进行分子检测,仅获得 45 个转 WSA 基因工程植株。卡那霉素抗性鉴定与分子检测结果不符合的原因是多数 Kan^+ 植株为转 Bt 基因棉花。抗生素类型很多,为了筛选的方便,在后续的转基因植物研究中可采用其它抗生素如潮霉素抗性基因(HPT)等作为标记基因,以提高筛选工作的效率。

3.2 转 WSA 基因棉花株系纤维品质变劣的原因

就纤维强度而言,10 个受体品种都超过 $35 \text{ cN} \cdot \text{tex}^{-1}$,而在 45 个经过分子检测确定为转 WSA 基因棉花株系中,仅有 9 个株系的纤维强度达到或超过 $35 \text{ cN} \cdot \text{tex}^{-1}$,另外 36 个株系纤维强度下降,其主要原因是 WSA 基因整合到棉花染色体组以后,由于整合位点发生的随机性,WSA 基因可能插入控制纤维强度主效 QTL 中,引起纤维强度主效基因发生变异;或者 WSA 基因插入控制纤维强度主效 QTL 的上游序列中,引起

移码突变,导致纤维品质变劣。

导致转 WSA 基因棉花株系纤维品质变劣的可能原因还包括天然异交引起的生物学混杂、机械混杂。但棉花的天然异交率较低,即使极少数转基因工程植株和转化一代发生了天然异交,其转化二代的纤维品质不可能大幅度下降。从转基因植株和转化一代收获的子棉是在严格控制条件下轧花,不可能发生机械混杂。多数转 WSA 基因棉花株系纤维品质变劣的原因有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 梁峰,常团结. 植物凝集素的研究进展[J]. 武汉大学学报,2002,48(2):232-238.
- [2] 周兆澜,朱 祯. 植物抗虫基因工程研究进展[J]. 生物工程进展,1994,14(4):18-24.
- [3] 王志斌,李学勇,郭三堆. 植物凝集素与抗虫基因工程[J]. 生物技术通报,1998,2:5-10.
- [4] 路子显,常团结,朱 祯. 植物外源凝集素及其在植物基因工程中的应用[J]. 生物工程进展,2002,22(2):3-9.
- [5] 孟玲,王利萍,何 微,等. 转基因抗虫棉的初选和抗虫鉴定(II)[J]. 新疆农业大学学报,2000,23(4):52-55.
- [6] 肖松华,刘剑光,黄骏麒,等. 转基因抗蚜虫棉花新种质的培育[J]. 中国棉花,2001,28(3):19-20.
- [7] 王冬梅,孙 严,孟庆玉,等. 新疆抗棉铃虫、蚜虫转基因棉花的初步筛选[J]. 新疆农业科学,2001,38(3):153-154.
- [8] 刘 志,郭旺珍,朱协飞,等. 转 Bt+GNA 双价基因抗虫棉花中抗虫基因及其抗虫性的遗传稳定性[J]. 作物学报,2004,30(1):6-10.
- [9] 肖松华,刘剑光,吴巧娟,等. 转外源凝集素基因棉花对棉蚜的抗性鉴定[J]. 棉花学报,2005,17(2):72-78.
- [10] PATERSON A H, Brubaker C L, Wendel J F. A rapid method for extraction of cotton (*Gossypium* spp.) genomic DNA suitable for RFLP and PCR analysis[J]. Plant Mol Biol Rep,1993,11:122-127.
- [11] 张震林,刘正奎,周宝良,等. 转兔角蛋白基因改良棉纤维品质研究[J]. 棉花学报,2004,16(2):72-76.

