



专题与述评

以棉花茎尖分生组织为受体进行基因枪轰击转化的研究

王省芬, 迟吉娜, 马峙英

(河北农业大学, 河北省作物种质资源重点实验室, 河北 保定 071001)

摘要:以棉花茎尖分生组织为受体进行基因枪遗传转化, 在不受宿主基因型范围和操作时间的限制等方面优于农杆菌介导法和花粉管通道技术。影响棉花茎尖分生组织基因枪遗传转化率的因素较为复杂, 轰击前, 外植体制备需考虑茎尖分生组织的取材时间、下胚轴保留的长度、外源生长调节剂及活性炭的使用量, 以保证其正常生长; 轰击后, 抗生素筛选的浓度、筛选培养基的转换时间和抗性苗的壮苗也会影响转化效率; 此外, DNA 和钨粉或金粉的质量、基因枪参数及操作等对转化效果都有一定的作用。除对影响茎尖分生组织基因枪转化率的因素分析以外, 还对近年来在棉花茎尖分生组织遗传转化中的最新动态进行了综述, 并对目前存在的问题加以讨论。

关键词:棉花; 基因枪轰击; 遗传转化; 茎尖分生组织; 植株再生

中图分类号: S562.035.03 **文献标识码:** A

文章编号: 1002-7807(2006)01-0053-05

Advances on Genetic Transformation of Cotton Shoot Apical Meristem via Gene-gun Bombardment

WANG Xing-fen, CHI Ji-na, MA Zhi-ying

(Agricultural University of Hebei, Key Laboratory of Crop Germplasm Resources of Hebei, Baoding 071001, China)

Abstract: Genetic transformation of cotton shoot apical meristem via gene-gun bombardment is advantageous over *Agrobacterium*-mediated transformation and pollen-tube pathway in the genotype-independent and time-consuming. There are many factors affecting the shoot-apex transformation. Before shooting, preparation of explants is important for normal growth. The time of cutting apical meristem, the remained length of hypocotyls, the usage content of exogenous hormones or active carbon must be considered. After shooting, the selected concentration of antibiotics, the period of media transition and seedling rejuvenated influenced the efficiency of shoot-apex method. Moreover, some physical factors were also essential to transformation, such as the quality of DNA and tungsten or gold powder, bonding of DNA, the parameters and manipulations of particle gun. Some factors were analyzed affecting the transformation efficiency of cotton shoot apical meristem via gene-gun bombardment, and the latest development in cotton genetic transformation of the shoot apical meristem were reviewed. In the paper, The existing problems on the method of transformation were also discussed.

Key words: cotton; particle bombardment; genetic transformation; shoot apical meristem; plant regeneration

收稿日期: 2005-09-21 作者简介: 王省芬(1970-), 女, 博士, 教授, xfwang@xinhuanet.com

基金项目: 河北省科技厅博士基金项目(04547001D-2); 河北农业大学博士人员科研资助项目

1 前言

自从1990年基因枪轰击转化用于棉花基因工程以来,国内外的一些研究者已用基因枪转化法将外源基因转入棉花的胚性悬浮系^[1-3]和茎尖组织中,并获得了抗性植株,有的还需要进行基因检测和大田试验,以进一步证实其遗传稳定性。棉花茎尖分生组织是一群有分生能力的细胞,能很快分化生长再生成完整植株。以茎尖分生组织为外植体作为基因枪轰击转化的受体,是通过器官发生途径再生出完整植株的遗传转化方法,此方法最大的优点是克服了农杆菌宿主专一的限制,无基因型限制,技术直接,再生周期短,遗传变异率低。所以,茎尖分生组织再生培养技术结合微粒轰击法可以构成一个较好的转基因体系,但影响棉花茎尖分生组织基因枪轰击转化率的因素较为复杂,转化效率还有待提高。本文就影响棉花茎尖分生组织基因枪轰击转化的因素作一综述,以为该方法的有效应用提供参考。

2 研究现状

2.1 轰击前茎尖分生组织培养对基因枪轰击转化的影响

茎尖分生组织的制备是基因枪轰击转化的第一环节。选择合适的取材时间不但可提高茎尖分生组织剥取的质量,还能加快剥取的速度。茎尖分生组织的剥取与操作者的技术水平和熟练程度有关,但种子发芽后生长天数不同的无菌苗,其发育状态存在很大差异,茎尖分生组织剥离的难易

程度也不同。子叶半展平、胚轴为绿色、胚轴与胚根长约2~3 cm时,对茎尖分生组织的制备较容易操作,且茎尖分生组织的再生率可高达60%以上^[4]。无菌苗培养40~60 h,子叶半张开,胚轴3 cm时取材较易操作^[5]。利用单纯生长点和带2个叶原基的生长点的外植体均可获得较高的转化率^[6],也有些研究者使用萌发1.5 d以内的茎尖^[7]和萌发3 d的茎尖为外植体^[8-9]。不同研究者得出的结论有所不同,这可能与其选用品种及种子的发育状态有关。

为便于基因枪操作,制备茎尖分生组织时必须保留部分下胚轴,但其保留长度对茎尖分生组织再生及转化效率均有一定影响。下胚轴长度保留5~7 mm时再生频率较高,但在每次更换培养基时,需将所保留的下胚轴褐化部分切除^[4,8,10]。而有的学者认为留取下胚轴的长短对茎尖的存活率无明显影响,而选择压的有效性和茎尖的充分暴露才是重要的^[7]。

外源生长调节剂对茎尖分生组织的培养也有一定的影响。最初的离体培养中,在培养基中附加低剂量的生长调节剂或不加任何生长调节剂,对分生组织的生长没有明显的影响,且不加任何生长调节剂的优于加生长调节剂的培养基,即外源生长调节剂对棉花茎尖体外发育不是必不可少的^[5,9,11-13]。这可能是由于茎尖所带的下胚轴的内源激素已可以满足茎尖分生组织的生长需要。而对于缺乏根系的茎尖培养来说,细胞分裂素是首选的附加成分,BA对茎尖的生长有利^[7]。分

表1 外源生长调节剂在棉花茎尖培养中的作用

Table 1 Function of plant hormones in the culture of the shoot apical meristem in cotton

基因型	基本结论
Pima S-6	无激素的培养基优于加 IAA 和 KT 的培养基 ^[13]
中棉所 12	低浓度的 IAA 和 KT 的添加有利于芽的增殖和生长 ^[11]
中棉所 12、中棉所 16、泗棉 3 号、江苏棉 3118、泗棉 2 号、鲁棉 6 号	生长素高于细胞分裂素的配比有利于提高幼枝生长速度和生根能力 ^[10]
华棉 101、鄂棉 1 号、鄂荆 1 号、珂字 201	IAA 0.1~0.5 mg·L ⁻¹ 与 KT 0.1~0.5 mg·L ⁻¹ 是较好的激素组合 ^[19]
中棉所 12、中棉所 16、鲁棉 6 号	生长素含量高于细胞分裂素的配比有利于提高幼枝生长速度和生根能力 ^[4]
浙 506、泗棉 3 号、珂字 312、Pima3-33、米奴非 10、吉扎 68	细胞分裂素对茎尖发育有促进作用,0.01~0.1 mg·L ⁻¹ IBA 为最佳浓度 ^[20]
有色棉棕 9801、绿 9904	IAA 0.1~0.5 mg·L ⁻¹ 与 KT 0.1~0.5 mg·L ⁻¹ 是较好的激素组合 ^[21]
川棉 239、川棉 45	由附加 0.1 mg·L ⁻¹ BA,到附加 1.0 g·L ⁻¹ 活性炭,再到附加 0.1 mg·L ⁻¹ IBA+0.1 mg·L ⁻¹ IAA 的培养基培养效果好 ^[7]
中棉所 19、中棉所 24、中棉所 27	不加激素的培养基优于加激素的培养基 ^[5]
中棉所 12、中棉所 13、中棉所 17、中棉所 19、中棉所 24、中棉所 27、鲁棉 6 号	不加激素的培养基优于加激素的培养基 ^[6]
转基因陆地棉 33B	无激素的培养基优于加激素的培养基,一定量的 IAA 对茎尖生长有利 ^[8]
中棉所 19、中棉所 24、珂字 201、珂字 312	不加激素的培养基较好,后期加入 0.01~0.05 mg·L ⁻¹ IAA 和 KT,利于诱导生根 ^[9]

生组织长成幼株以后的培养程序与茎尖的离体培养程序相同。对此阶段外源生长调节剂的作用,不同研究者的结论不同,可能与其研究中选用的品种不同有关(表 1)。

在培养基中加入活性炭能使茎尖迅速萌动和生长,其原因可能是活性炭能够吸收外植体切口渗出的酚类物质,减少褐化外植体的数目,并且可使培养基成为一个类似自然环境中土壤的黑暗条件,利于根系发生,提高了外植体存活率^[5]。活性炭的使用量一般以 $0.1 \sim 1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 为宜^[5,9,11],但若活性炭应用于筛选期,则可能会吸附部分抗生素,导致假阳性偏高,使转化周期延长。

另外,茎尖外植体的来源也是影响再生效率的因素之一。国外很多学者认为来自于子叶节、第一叶、第二叶的茎尖要好于顶芽^[14-18],可在 6 周至 3 个月内得到再生植株。

2.2 轰击后的筛选培养对基因枪轰击转化的影响

抗生素的浓度梯度是轰击后筛选的重要因素。目前多用卡那霉素作为筛选抗生素,其临界上限值的确定以对照植株死亡率 100% 或明显抑制生长为标准。在含卡那霉素的筛选培养基上,转化株可正常生长,而非转化株和对照株则不能正常生长,出现白化、落叶、枯萎现象,最终死亡。当筛选培养基中卡那霉素的浓度梯度不同时,其筛选效果明显不同。一般选择临界下限为 $60 \sim 70 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,上限为 $80 \sim 100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

在卡那霉素浓度梯度筛选过程中,筛选培养基的转换时间对遗传转化有一定影响。间隔时间过长会因卡那霉素效价下降而出现筛选不严密,使假阳性的频率增大;间隔时间过短,则因频繁转换而增加再生幼苗受伤机会和不必要的工作量。在筛选过程中每隔 7~15 d 转换一次培养基(抗菌素浓度增加一个梯度)比较适宜^[4,6,9]。

当茎尖分生组织达到其临界抗生素浓度值时,将抗性植株转至生根培养基中壮苗,之后茎段处长出新根,成为完整植株。要保持抗性植株的纯度,还需在壮苗培养基中加入临界上限浓度的卡那霉素,否则在长时间继代过程中,转入的外源基因有可能丢失^[5]。而用 *bar* 基因为选择标记,在 Bialaphos 筛选实验中以 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 作为有效选择压力^[8]。

茎尖的恢复时间不同,对基因枪轰击转化有一定影响。当茎尖分生组织在恢复培养基上长成肉眼可见、明显长大的绿色芽点时,将其转移到筛

选培养基上较适宜^[4-5,10]。也有研究认为基因枪轰击后延迟 7 d 筛选,对茎尖转化较好^[8]。

2.3 影响基因枪遗传转化的其它因素

基因型对棉花茎尖基因枪轰击转化的影响,不同的研究者得出的结论有所不同。有的研究者认为基因型及品种对茎尖分生组织的植株再生无明显影响^[10],而有的则认为由于茎尖分生组织再生频率存在差异,不同基因型棉花品种转化效果有所不同^[4]。

抗生素筛选方式对棉花茎尖基因枪轰击转化也有一定的影响。恢复后的茎尖分生组织逐步转接于卡那霉素浓度 $60, 70, 80, 90 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 梯度培养基上的梯度筛选法优于直接转接于卡那霉素浓度 $90 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 培养基的直接筛选法^[5]。有的研究者认为卡那霉素进行 $65, 80, 90$ 及 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 以上的 4 次筛选法不但转化率高,在不同材料间转化率差别不大,而且还可以降低工作量^[6]。也有用 $50, 60, 70, 80, 90, 100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的梯度筛选法的,继代时间为 10 d 左右^[9]。总之,梯度筛选法优于直接筛选法,但不同研究者所使用的筛选梯度有所不同,可能与其选用的品种不同有关。

除此之外,DNA 和钨粉或金粉的质量、基因枪参数及操作等对转化效果都有一定的作用^[22],在转基因试验中都要予以足够的重视。目前在水稻、小麦、谷子、玉米等禾谷类作物^[23]基因枪轰击转化在此方面报道较多。在棉花茎尖基因枪转化的研究中对金粉的用量、DNA 沉淀剂、DNA 纯度、基因枪的轰击参数(如粒子速度、入射浓度、阻挡板至样品室高度及轰击次数等)影响基因枪介导转化率的因素也有一些报道^[1,3,6,7,9,24]。

茎尖再生植株生根问题在一定程度上也制约了转化效率,且生根率受到基因型的影响^[13,25],基因型依赖性生根问题是制约茎尖植株再生效率的潜在因素^[2]。目前,利用嫁接技术基本可以解决这一问题^[25-27]。

2.4 转化成效

目前国内外很多学者进行了棉花茎尖分生组织基因枪轰击转化方面的研究,并取得了一定的成果(表 2)。

3 展望

棉花茎尖分生组织用于基因枪轰击转化,一般仅用 1.5~4 个月即可得到转基因植株,是一种较好的遗传转化体系。但茎尖分生组织的基因枪

轰击转化也存在着外源基因整合位点较多、转化效率偏低、存在假阳性和嵌合体及转入的外源基

因遗传稳定性差等问题^[30,31],这些还有待于进一步研究和解决。

表 2 棉花茎尖分生组织的基因枪轰击转化

Table 2 Genetic transformation via gene-gun bombardment in the shoot apical meristem of cotton

外源基因	转化结果	基因检测	基因型
GUS	获得抗性植株,转化率为 0.027%~0.22% ^[28]	Southern 杂交	Deltapine 90、Deltapine 50、PimaS-6
NPTII	获得抗性植株,转化率为 3.30%~4.10% ^[10]	无核酸和蛋白质检测	中棉所 12、中棉所 16、泗棉 3 号、泗棉 2 号、江苏棉 3118、鲁棉 6 号
NPTII	获得抗性植株,转化率为 0.885%~3.54% ^[24]	Western-blot analysis	<i>Gossypium hirsutum</i>
<i>CpTI</i> 、 <i>NPTII</i>	获得抗性植株 ^[4]	无核酸和蛋白质检测	中棉所 12、中棉所 16、鲁棉 6 号
<i>GLU-CHI</i> 、 <i>NPTII</i>	获得抗性植株,转化率为 7.89% ^[7]	PCR	川棉 239、川棉 45
<i>NPTII</i>	获得抗性植株,转化率为 29.16% ^[29]	核酸和蛋白质检测	NHH-44、DCH-32
<i>Bt+CpTI</i>	获得抗性植株,转化率为 0.54% ^[5]	PCR	中棉所 19、中棉所 24、中棉所 27
<i>Bt + CpTI + GNA</i> 、 <i>Bt+CpTI</i>	获得抗性植株,转化率为 4.7%~9.4% ^[6]	PCR、ELISA	中棉所 12、中棉所 13、中棉所 17、中棉所 19、中棉所 24、中棉所 27、鲁棉 6 号
<i>ADF3</i>	获得抗性植株,转化率为 0.01875% ^[12]	Southern 杂交	海岛棉新海 5、16、17、19
GNA	获得抗性植株,转化率为 2.5% ^[8]	无核酸和蛋白质检测	转基因陆地棉 33B
<i>Bt+CpTI</i>	获得抗性植株,转化率为 0.65% ^[9]	PCR	中棉所 19、中棉所 24、珂字 201、珂字 312

在棉花茎尖分生组织的基因枪轰击转化研究过程中,还需要进一步探索转化效率提高的途径。子叶节、初生叶和再生叶较顶端分生组织更敏感,利用外源激素调控可使其产生 3.4~8.3 个茎尖,用多茎尖诱导法可在一定程度上提高基因枪的转化效率^[14]。另外,转化率是基因枪轰击过程中一系列综合因素的最终结果,因此,要提高转化率必须使各培养阶段的参数达到最优化,即建立一个良好的转化再生体系。

此外,要进一步探索降低嵌合体数量的方法。基因枪轰击时金属粒子进入茎尖 L2 和 L3 层后,可直接产生转化细胞;而若进入 L1 层,则仅表皮细胞发生转化,不能遗传给后代。基因枪转化法对茎尖分生组织的转化常限于表皮细胞的变化,当微粒轰击茎尖分生组织时,只有少数表层细胞被转化,而多数细胞未被转化^[10]。Spilt-meristems 法^[2],即劈开分生组织以暴露出 L2 层,增加 L2 和 L3 层被转化的机会,可以在一定程度上解决嵌合体的问题,但这一方法对操作技术要求极高。目前多是采用加强筛选压力和延长筛选时间,保证转化的组织真正含有外源基因,以减少嵌合体的数量。目前利用嫁接技术已经基本解决了再生植株移栽这一难题,但嫁接后可能会改变转

化植株的部分生理及遗传指标^[8],有关问题需要进一步研究。

深入研究外植体轰击前后的生物学变化,如信号转导通路的变化、细胞转化和再生感受态细胞的制备、外源 DNA 转入细胞后的命运等问题,将有助于利用合理的信号转导途径制备细胞转化和再生感受态,控制外源 DNA 正常表达。只有有效地控制转基因过程,才能提高再生转基因个体的比例。

农杆菌介导法和基因枪转化法都存在一定的缺点,将两者结合应用,优势互补,或者借鉴其它作物的经验,利用物理与化学转化相结合的方法,提高基因枪轰击转化效率,都是值得进一步研究的内容。

参考文献:

- [1] FINER J J, McMullen M D. Transformation of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) via particle bombardment [J]. Plant Cell Reports, 1990, 8(10): 586-589.
- [2] WILKINS T A, Rajasekaran K, Anderson D M. Cotton biotechnology [J]. Critical Review in Plant Sciences, 2000, 19(6): 511-550.

- [3] RAJASEKARAN K, Hudspeth R L, Cary J W, et al. High-frequency stable transformation of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) by particle bombardment of embryogenic cell suspension cultures [J]. *Plant Cell Reports*, 2000, 19(6): 539-545.
- [4] 朱卫民, 吴敬音, 余建明, 等. 棉花茎尖分生组织在微粒轰击法基因转化中的应用[J]. *江苏农业学报*, 1998, 14(2): 74-79.
- [5] 于 娅, 刘传亮, 马峙英, 等. 适于基因枪转化的棉花茎尖培养及筛选体系初探[J]. *棉花学报*, 2003, 15(5): 274-278.
- [6] 刘传亮, 于 娅, 王玉芬, 等. 棉花基因枪茎尖转化研究[J]. *棉花学报*, 2003, 15(6): 361-366.
- [7] 张 浩. 棉花茎尖基因枪-农杆菌转化体系的建立和 *GLU-CHI* 基因的导入[D]. 西南农业大学硕士学位论文, 2002.
- [8] 罗小敏. 棉花组织培养与雪花莲凝集素基因转化[D]. 河北大学硕士学位论文, 2004.
- [9] 耿立召. 棉花基因枪遗传转化体系建立[D]. 中国农业科学院硕士学位论文, 2004.
- [10] 吴敬音, 朱卫民, 余建明, 等. 陆地棉 (*Gossypium hirsutum* L.) 茎尖分生组织培养及其在基因导入上的应用[J]. *棉花学报*, 1994, 6(2): 89-92.
- [11] 张宝红, 李秀兰. 棉花茎端培养植株再生[J]. *莱阳农学院学报*, 1993, 10(4): 283-285.
- [12] 黄全生, 刘 霞, 王义琴, 等. 基因枪轰击法将蜘蛛丝蛋白基因 (*ADF3*) 转入海岛棉的研究[J]. *新疆农业科学*, 2004, 41(4): 248-250.
- [13] GOULD J, Banister S, Hasegawa O, et al. Regeneration of *Gossypium hirsutum* and *G. barbadense* from shoot apex tissues for transformation [J]. *Plant Cell Reports*, 1991, 10(1): 12-16.
- [14] AGRAWAL D C, Banerjee A K, Kolala R R, et al. In vitro induction of multiple shoots and plant regeneration in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) [J]. *Plant Cell Reports*, 1997, 16(9): 647-652.
- [15] GUPTA S K, Srivastava A K, Singh P K, et al. In vitro proliferation of shoots and regeneration of cotton [J]. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 1997, 51(3): 149-152.
- [16] SAEED N A, Zafar Y, Malik K A. A simple procedure of *Gossypium* meristem shoot tip culture[J]. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 1997, 51(3): 201-207.
- [17] HEMPHILL J K, Maier C G A, Chapman K D. Rapid *in-vitro* plant regeneration of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) [J]. *Plant Cell Reports*, 1998, 17(4): 273-278.
- [18] MORRE J L, Permingeat H R, Romagnoli M V, et al. Multiple shoot induction and plant regeneration from embryonic axes of cotton [J]. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 1998, 54(3): 131-136.
- [19] 张献龙, 林双龙, 吕复兵, 等. 陆地棉微茎尖培养影响因素的研究[J]. *华中农业大学学报*, 1996, 15(3): 210-214.
- [20] 丁世萍. 激素对陆地棉和海岛棉茎尖培养的影响[J]. *浙江农业大学学报(农业与生命科学版)*, 2001, 27(5): 508-512.
- [21] 王冬梅, 孟庆玉, 李建平, 等. 有色棉茎尖培养初探[J]. *中国棉花*, 2002, 29(2): 25-26.
- [22] 耿立召, 李付广, 刘传亮, 等. 影响基因枪轰击转化棉花胚性愈伤的因素初探[J]. *棉花学报*, 2004, 16(6): 352-356.
- [23] 任春梅, 高必达, 何迎春. 基因枪转化技术及其在禾谷类作物遗传转化中的应用[J]. *生物学杂志*, 2001, 18(4): 29-32.
- [24] CARYL A C, Junmin L, Jeffery W, et al. A procedure for biolistic transformation and regeneration of transgenic cotton from meristematic tissue [J]. *Plant Molecular Report*, 1995, 13(1): 31-37.
- [25] LOU J H, Gould J H. In vitro shoot-tip grafting improves recovery of cotton plants from culture [J]. *Plant Cell Tissue and Organs Culture*, 1999, 57(3): 211-213.
- [26] 王 伟, 陈宛新, 朱 祯, 等. 转基因棉花高效定植方法的研究[J]. *植物学报*, 1999, 41(10): 1072-1075.
- [27] 朱生伟, 孙敬三. 陆地棉体细胞再生植株速成法[J]. *科学通报*, 2000, 45(9): 909-912.
- [28] MCCABE D E, Martinell B J. Transformation of elite cotton cultivar via particle bombardment of meristems [J]. *Bio-technology*, 1993, 11(5): 596-598.
- [29] BANERJEE A K, Agrawal D C, Nalawade S M, et al. Transient expression of beta-glucuronidase in embryo axes of cotton by *Agrobacterium* and particle bombardment Methods [J]. *Biologia Plantarum*, 2002, 45(3): 359-365.
- [30] 于 娅, 刘传亮, 马峙英, 等. 基因枪转化技术在棉花遗传转化上的应用[J]. *棉花学报*, 2003, 15(4): 243-247.
- [31] 李 晓. 棉花基因转化的研究及其在纤维品质改良中的应用[D]. 浙江大学硕士学位论文, 2002.