

## 棉花转基因材料的获得及主要农艺性状变异分析

刘方, 王坤波\*, 宋国立, 黎绍惠, 王春英, 张香娣, 王玉红, 胡育昌

(中国农业科学院棉花研究所, 农业部棉花遗传改良重点开放实验室, 河南 安阳 455000)

**摘要:**利用不同棉花受体材料进行花粉管通道法遗传转化研究。通过卡那霉素鉴定、抗虫性鉴定和 PCR 分子生物学鉴定, 证明已成功将 Bt 基因转化到泗棉 3 号、辽棉 15、中棉所 19、中棉所 29 母本、中棉所 35、中棉所 36 等棉花材料中。通过对转基因材料后代与非转基因材料的铃重、衣分和纤维品质等差异分析, 发现花粉管通道转基因后代材料存在广泛的变异。

**关键词:**棉花; 花粉管通道; 转基因; 遗传变异

中图分类号: S562.032 文献标识码: A

文章编号: 1002-7807(2009)01-0023-05

## Variations of Main Agronomic Traits in Transgenic Cotton (*Gossypium hirsutum* L.) Lines

LIU Fang, WANG Kun-bo\*, SONG Guo-li, LI Shao-hui, WANG Chun-ying, ZHANG Xiang-di, WANG Yu-hong, HU Yu-chang

(Cotton Research Institute, CAAS, Key Laboratory of Cotton Genetic Improvement, MOA, Anyang, Henan 455000, China)

**Abstract:** Different cotton lines have been studied in inheritance traits changing by pollen transgenic method. Bt gene has been successfully transformed into Simian 3, Liaomian 15, CCRI 19, CCRI 29, CCRI 35 and CCRI 36 cotton varieties by pollen transgenic method which was correspondingly confirmed by kanamycin judging, insect-resistance detecting, PCR verifying and southern blotting. The SAS analyses indicated that pollen transgenic cotton had large changing in inheritance characteristics with the boll weight, ginning outturn and fiber qualities.

**Key words:** cotton; pollen-tube pathway; transgenic; genetic variation

利用授粉后形成的花粉管通道将外源 DNA 导入植物胚囊的转化技术称为花粉管通道转化法<sup>[1-3]</sup>。1981 年黄骏麒等首次用此法将海岛棉 DNA 导入陆地棉引起性状变异<sup>[4-5]</sup>。1991 年谢道昕等用此法将目的基因——苏云金芽孢杆菌杀虫蛋白基因导入棉花获得转基因植株<sup>[6]</sup>。与农杆菌介导法相比, 花粉管通道法有效避开了植株再生的难题, 转化不受基因型控制, 操作简单, 转化成本低廉, 提供了创造新种质、拓宽基因库的新技术途径<sup>[7-10]</sup>。

转基因植株在抗虫的同时, 伴随着细胞遗传

等遗传基础的改变<sup>[11-12]</sup>, 表现出许多表型和农艺性状的改变<sup>[13-16]</sup>, 对转基因变异的研究具有重要的理论和现实意义。通过多年的研究, 利用海南冬季棉花生育特点, 利用花粉管通道与农杆菌介导转化方法获得了大批的转基因变异材料, 并且在田间农艺性状表现已经稳定。本试验通过对这些转基因材料的验证和部分变异性进行研究, 在对花粉管通道转基因材料进行系统总结的同时, 试图找出类似突变体并对其进行全面系统的调查, 为突变体的确定和功能基因的研究提供一定的理论基础。

收稿日期: 2008-03-28

作者简介: 刘方(1972-), 男, 副研究员, liufang@cricaas.com.cn; \* 通讯作者, wkbcri@cricaas.com.cn/wkbcri@hotmail.com

基金项目: “973”计划(2004CB117306), “十一五”国家科技支撑计划(2006BAD13B04-1-09)

## 1 材料和方法

### 1.1 受体材料

选取生产上较成熟的棉花品种泗棉 3 号、辽棉 15、中棉所 19、中棉所 29 母本、中棉所 35、中棉所 36 和优良品系 8101。通过花粉管通道法转化外源基因。

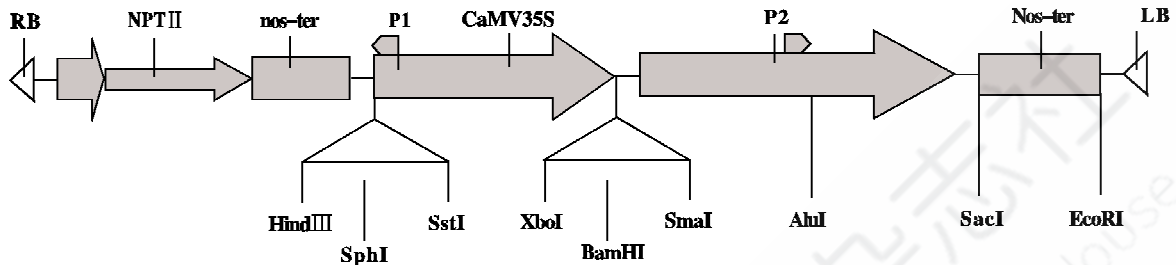


图 1 抗虫基因表达载体 pBI121 的 T-DNA 区结构图

Fig. 1 The T-DNA structure of plant expression vector pBI121 harboring insect-resistant genes

试验用 *E. coli* 菌株 DH5 $\alpha$  为本实验室保存。质粒提取筛选抗生素为卡那霉素(50 mg  $\cdot$  L $^{-1}$ )。

### 1.3 目的基因的转化

采用花粉管通道法,具体操作为:参照《分子克隆》(第三版)<sup>[17]</sup>的方法提取质粒。选取自交开花授粉后 18~24 h 的花进行花粉管注射,将目的质粒 DNA 注射进子房。涂抹保铃液以防止蕾铃脱落<sup>[18]</sup>。

### 1.4 转基因植株的鉴定

卡那霉素快速鉴定按照子叶期卡那霉素快速鉴定转基因棉花<sup>[19]</sup>的方法。生物抗性鉴定按照棉花抗棉铃虫性室内生物测定新方法<sup>[20]</sup>进行鉴定。PCR 检测参照改良 CTAB 法快速提取棉花 DNA<sup>[21]</sup>,选择对卡那霉素鉴定和生物鉴定均具有抗性的 T<sub>0</sub> 代植株进行 PCR 检测。目的基因 Bt 引物序列为:P1:5'-CCGGTGCTGGATTTGTGTTA-3', P2:5'-AATCCCGTATTGTACCAGCG-3',检测程序按照:94 $^{\circ}$ C 5 min;(94 $^{\circ}$ C 1 min, 58 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1.5 min)35 个循环;72 $^{\circ}$ C 5 min;4 $^{\circ}$ C 结束。Southern 杂交方法按照 Roche 公司的 DIG High Prime DNA/RNA Labeling and Detection Starter Kit I 试剂盒所提供的方法进行。

### 1.5 转基因后代材料的遗传变异分析

对转化成功的转基因材料连续多年种植,筛选田间性状稳定的株系进行遗传变异分析。泗棉 3 号、辽棉 15、中棉所 19、中棉所 29 母本、中棉所 35、中棉所 36 各选 5 个转基因株系与各自非转基因材料对比。8101 选取 14 个稳定株系与非转基因对照进行对比。田间试验设计采用随机区组

### 1.2 外源基因与菌株

选择标记基因为 NPTII,目的基因 Bt 为 CRYIA,基因由华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室张启发教授提供。基因表达载体 pBI121 的 T-DNA 区结构图如下:

法,3 个重复,每个小区 3 行,行长 7 m,行距 0.8 m,每行 30 株。随机收取棉株 50 铃进行考种,测定铃重、皮棉重、衣分等,并进行 5 指标纤维检测,应用 SAS 8.0 软件对标准差和变异系数进行单因素方差分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 转基因植株的获得

经过子叶期卡那霉素鉴定的植株,叶片在室内抗虫生物鉴定。发现正常叶片受棉铃虫危害较严重,而经转化的棉花叶片没有受到明显虫害。说明经过转基因的棉花表现出明显的棉铃虫生物抗性。

对 T<sub>0</sub> 转基因植株嫩叶提取基因组 DNA,根据目的基因 Bt 基因设计引物,进行 PCR 检测(图 2)。发现转基因植株和质粒 DNA 扩增出一条约 490 bp 的特异带,而作为阴性对照的未转化棉株的 DNA 无相应的扩增带。

采用 Roche 公司的 DIG High Prime DNA/RNA Labeling and Detection Starter Kit I 试剂盒,采用 *Hind*III 限制性内切酶酶切总 DNA 后,对 T<sub>0</sub> 转基因植株进行 Southern 杂交检测,发现其结果与 PCR 检测结果相同(图 3)。在 Bt 基因的分子杂交图中,质粒有 1 条 3.5 kb 左右的杂交条带,6 个转基因株系在 6.5~9.4 kb 之间有杂交条带,且拷贝数为 1~2 个。因而可以推断,外源基因已经完全整合到棉花基因组中。



1:阳性对照;2:阴性对照;3~8:转基因植株。

图 2 转基因植株 DNA 的 PCR 分析

Fig. 2 PCR analysis of genomic DNA from transgenic cotton plants



1:阴性对照;2:阳性对照;3~8:转基因植株。

图 3 转基因植株的 Southern 杂交分析

Fig. 3 Southern blotting analysis of genomic DNA from transgenic cotton plants

## 2.2 转基因后代材料的变异分析

通过连续 3 年田间鉴定和筛选,选取抗性稳定的转基因株系,进行材料变异分析研究。分别调查其 50 铃重、50 铃皮棉重、衣分、上半部平均长度、整齐度指数、麦克隆值、断裂比强度和伸长率,进行统计。对统计结果分别进行 SAS 变异系数和单因素方差分析。

**2.2.1 不同品种转基因遗传变异。**从表 1 中可以看出,转基因与相应的非转基因材料相比出现如下结果:对于 50 铃子棉重,泗棉 3 号、辽棉 15 差异显著,非转基因好于转基因,其它材料中棉所 35、中棉所 19、中棉所 36、中棉所 29 母本差异均不显著;50 铃皮棉重,中棉所 35 转基因明显优于非转基因,泗棉 3 号非转基因明显大于转基因,其它材料差异不显著;对于衣分,中棉所 19 和辽棉 15 转基因明显优于非转基因,泗棉 3 号和中棉所 36 非转基因明显高于转基因,中棉所 35、中棉所

29 母本差异不显著;对于上半部平均长度,除中棉所 29 母本转基因明显长于非转基因外,其它材料差异均不显著;整齐度指数,中棉所 19 非转基因高于转基因,泗棉 3 号转基因高于非转基因,其它差异不显著;麦克隆值,中棉所 19 和中棉所 29 母本转基因高于非转基因,泗棉 3 号非转基因高于转基因,其它材料差异不显著;断裂比强度泗棉 3 号、中棉所 29 母本差异显著,转基因高于非转基因,其它材料差异不显著;伸长率中棉所 35 转基因明显大于非转基因,中棉所 19、中棉所 29 母本非转基因明显大于转基因,其它材料差异不显著。

**2.2.2 同一品种或品系转基因后代的变异。**通过对优良品系 8101 不同转基因株系品系间变异分析,从表 2 可以看出品系间转基因与非转基因 50 铃子棉重、50 铃皮棉重、衣分、上半部平均长度、整齐度指数、麦克隆值、断裂比强度和伸长率

所有指标差异均极显著。说明同一转基因品种(品系)的高代材料性状间存在广泛的分离和遗传变异。

### 3 结论

不同品种的转基因植株均产生了广泛显著的变异,且比率很高。不同品种材料转基因后代性状变异效应不同,推测可能与其遗传背景和基因插入位点有关。同一品种的不同转基因后代也出现了广泛的分离和显著的变异,且变异似乎呈现

非规律性。原因可能是花粉管通道法外源基因的插入都是随机的,一个性状的改变,产生一系列生理的影响,引起其它性状的改变,从而导致了后代广泛非规律性变异。到目前为止,除质体转化以外,还没有一种技术能将外源基因整合到固定的基因座上,外源基因的插入整合过程中产生了一系列的连锁反应,有些基因超表达,有些基因被抑制,其共同作用的结果使控制多个性状的基因同时受到了影响,所以使得多个性状同时出现了变异。

表1 转基因株系与对照纤维品质的变异分析

Table 1 SAS analyses between difference transgenic varieties and CK

品种	50铃		50铃皮棉重		衣分		上半部平均长度		整齐度指数		麦克隆值		断裂比强度		伸长率	
	CV	Pr>F	CV	Pr>F	CV	Pr>F	CV	Pr>F	CV	Pr>F	CV	Pr>F	CV	Pr>F	CV	Pr>F
中棉所35	4.251	0.455	1.368	0.016	3.831	0.295	1.783	0.392	1.048	0.397	4.082	0.372	2.609	0.924	3.001	0.026
中棉所19	5.090	0.320	5.663	0.178	0.842	0.027	3.301	0.210	0.463	0.078	4.972	0.115	3.149	0.274	1.788	0.042
泗棉3号	4.947	0.038	5.256	0.004	2.319	0.001	3.686	0.220	0.918	0.024	3.063	0.003	1.834	0.001	4.435	0.045
中棉所36	4.341	0.039	4.645	0.239	0.980	0.0002	3.533	0.134	1.189	0.124	5.565	0.085	6.607	0.564	12.220	0.802
中棉所20母本	6.967	0.289	10.214	0.257	4.034	0.241	1.123	0.077	1.612	0.481	0.836	0.022	3.061	0.124	4.727	0.068
辽棉15	4.108	0.099	3.847	0.229	1.815	0.095	2.088	0.304	1.087	0.458	3.188	0.181	1.545	0.359	1.894	0.172

注:CV为变异系数,Pr>F为差异显著程度。

表2 转基因株系间的纤维品质变异分析

Table 2 SAS analyses between transgenic lines and CK

品种	50铃		50铃皮棉重		衣分		上半部平均长度		整齐度指数		麦克隆值		断裂比强度		伸长率	
	CV	Pr>F	CV	Pr>F	CV	Pr>F	CV	Pr>F	CV	Pr>F	CV	Pr>F	CV	Pr>F	CV	Pr>F
	4.079	0.0001	4.164	0.0001	1.530	0.0001	2.751	0.0001	1.152	0.0048	3.107	0.0001	3.382	0.0001	6.410	0.0001

注:CV为变异系数,Pr>F为差异显著程度。

#### 参考文献:

- [1] 翁坚,沈慰芳,王自芬,等.外源DNA导入棉花的分子验证[J].生物化学与生物物理学学报,1984,16(3):325-327.  
WENG Jian, Shen Wei-fang, Wang Zi-fen, et al. A molecular demonstration of the introduction into cotton embryos of exogenous DNA[J]. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 1984, 16(3): 325-327.
- [2] ZHOU Guang-yu, Weng Jian, Zeng Yi, et al. Introduction of exogenous DNA into cotton embryos several species[J]. Methods in Enzymology, 1983, 91(1): 433-481.
- [3] 周光宇,翁坚,樊蓁蓁,等.农业分子育种-授粉后外源DNA导入植物技术[J].中国农业科学,1988,21(3):1-6.  
ZHOU Guang-yu, Weng Jian, Gong Zhen-zhen, et al. Molecular breeding of agriculture for introducing exogenous DNA into plants after pollination[J]. Sci-

entia Agricultura Sinica, 1988, 21(3): 1-6.

- [4] 黄骏麒,钱思颖,刘桂玲,等.外源海岛棉DNA导致陆地棉性状变异[J].遗传学报,1981,8(1):56-62.  
HUANG Jun-qi, Qian Si-ying, Liu Gui-ling, et al. Variations in the characters of upland cotton (*Gossypium hirsutum*) induced by exotic DNA of Sea-island cotton (*Gossypium barbadense*) [J]. Acta Genetica Sinica, 1981, 8(1): 56-62.
- [5] 黄骏麒,钱思颖,刘桂玲,等.外源海岛棉DNA诱导中棉性状的变异[J].江苏农业科学,1982,11:18-20.  
HUANG Jun-qi, Qian Si-ying, Liu Gui-ling, et al. Variations in the characters of *Gossypium arboreum* race sinense (*Gossypium arboreum* L.) induced by exotic DNA of Sea-island cotton (*Gossypium barbadense*) [J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 1982, 11: 18-20.
- [6] 谢道昕,范云六,倪万潮,等.苏云金芽孢杆菌杀虫晶体蛋白基因导入棉花获得转基因棉株[J].中国科学: B辑,1991(4):367-373.  
XIE Dao-xin, Fan Yun-liu, Ni Wan-chao, et al.

- Transgenic cotton plant resulting from introduction of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein gene [J]. *Science in China; B Series*, 1991(4): 367-373.
- [7] 郝秀英, 孟庆玉, 李仁敬, 等. 用花粉管通道法将外源 DNA 导入新疆棉花初探[J]. *新疆农业科学*, 1996(2):9.  
HAO Xiu-ying, Meng Qing-yu, Li Ren-jing, et al. Studies on introduction of exogenous DNA into cotton plants by pollen-tube pathway[J]. *Xinjiang Agricultural Sciences*, 1996(2): 9.
- [8] 李付广, 刘传亮. 生物技术在棉花育种中的应用[J]. *棉花学报*, 2007, 19(5):362-368.  
LI Fu-guang, Liu Chuan-liang. Applications of biotechnology on the cotton breeding[J]. *Cotton Science*, 2007, 19(5): 362-368.
- [9] 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.  
LIU Fang, Wang Kun-bo, Song Guo-li. Application and advances in study on the improvement of cotton transgene in China[J]. *Cotton Science*, 2002, 14(4): 249-253.
- [10] 马 盾, 黄乐平, 黄全生, 等. 花粉管通道法在棉花转基因上的应用[J]. *新疆农业科学*, 2003, 41(1):29-30.  
MA Dun, Huang Le-ping, Huang Quan-sheng, et al. Application of pollen tube pass method to transgenic technology of cotton[J]. *Xinjiang Agricultural Sciences*, 2003, 41(1): 29-30.
- [11] 邓德旺, 郭三堆, 杨志民, 等. 棉花花粉管通道法转基因的分子细胞学机理研究[C]//21 世纪农业生物技术展望论坛文集. 1999:63.  
DENG De-wang, Guo San-dui, Yang Zhi-min, et al. Study on cytological mechanism of pollen tube pathway of cotton transgenic[C]// Outlook forum on the 21 century agricultural biotechnology. 1999:63.
- [12] 王坤波, 宋国立, 李付广, 等. 转基因棉花早代材料细胞学变异研究[J]. *棉花学报*, 2001, 13(2):70-73.  
WANG Kun-bo, Song Guo-li, Li Fu-guang, et al. Study on cytological variation for early generation of transgenic cotton[J]. *Cotton Science*, 2001, 13(2): 70-73.
- [13] 张宝红, 郭腾龙, 王清连. 转基因棉花的遗传研究[J]. *生命科学研究*, 2000, 4(2):136-142.  
ZHANG Bao-hong, Guo Teng-long, Wang Qing-lian. Inheritance and segregation of transgenic cotton [J]. *Life Science Research*, 2000, 4(2): 136-142.
- [14] 康保珊, 张 锐, 潘登奎, 等. 转基因双价抗虫棉中 *Cry1Ac* 基因与 *CpTI* 基因的共表达[J]. *棉花学报*, 2005, 17(3):131-136.  
KANG Bao-shan, Zhang Rui, Pan Deng-kui, et al. Synchronous expression of the *Cry1Ac* and *CpTI* genes in transgenic cotton [J]. *Cotton Science*, 2005, 17(3): 131-136.
- [15] 郭金英, 郭旺珍, 朱协飞, 等. 转 *Bt* + *Sck* 棉花的分子检测及其农艺性状分析[J]. *南京农业大学学报*, 2007, 30(3):16-20.  
GUO Jin-ying, Guo Wang-zhen, Zhu Xie-fei, et al. Molecular detection and analysis of agronomic traits of transgenic cotton lines with *Bt* + *Sck* genes[J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2007, 30(3): 16-20.
- [16] 刘冬梅, 武芝霞, 刘传亮, 等. 花粉管通道法获得棉花转基因株系主要农艺性状变异分析[J]. *棉花学报*, 2007, 19(6):450-454.  
LIU Dong-mei, Wu Zhi-xia, Liu Chuan-liang, et al. Variations of main agronomic traits in transgenic cotton (*Gossypium hirsutum* L.) lines transformed by pollen-tube pathway method [J]. *Cotton Science*, 2007, 19(6): 450-454.
- [17] 黄培堂. 分子克隆实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 2002:32-36.  
HUANG Pei-tang. Molecular cloning experiment guide[M]. Beijing: Science Press, 2002: 32-36.
- [18] 刘 方, 黎绍惠, 宋国立, 等. 棉花花粉管通道转基因自交方法改进[J]. *中国棉花*, 2003, 30(12):33.  
LIU Fang, Li Shao-hui, Song Guo-li, et al. Improvement of self-crossing pollen tube pathway transgenic method of cotton [J]. *China Cotton*, 2003, 30(12): 33.
- [19] 王坤波, 张香娣, 刘 方, 等. 子叶期卡那霉素快速鉴定转基因棉花[J]. *中国棉花*, 2001, 28(2):20-21.  
WANG Kun-bo, Zhang Xiang-di, Liu Fang, et al. Rapid selection of transgenic cotton plants with kanamycin at cotyledon stage[J]. *China Cotton*, 2001, 28(2): 20-21.
- [20] 马丽华, 李春花. 棉花抗棉铃虫室内生物测定新方法[J]. *中国棉花*, 1998, 25(7):27.  
MA Li-hua, Li Chun-hua. New bioassay methods on resistance cotton bollworm in room condition [J]. *China Cotton*, 1998, 25(7): 27.
- [21] 宋国立, 崔荣霞, 王坤波, 等. 改良 CTAB 法快速提取棉花 DNA[J]. *棉花学报*, 1998, 10(5):273-275.  
SONG Guo-li, Cui Rong-xia, Wang Kun-bo, et al. A rapid improved CTAB method for extraction of cotton genomic DNA[J]. *Cotton Science*, 1998, 10(5): 273-275. ●