

新疆海岛棉的丛生芽诱导和茎尖遗传转化的研究

周小凤¹, 金双侠², 李翔², 李保成¹, 练文明³, 宁新柱¹, 刘丽¹

(1. 新疆农垦科学院棉花研究所, 石河子 832000; 2. 华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室, 武汉 430070; 3. 新疆兵团农一师农科所, 阿拉尔 843000)

摘要:以新疆海岛棉新海17号、新海14号、85H为材料,对海岛棉器官发生再生体系和遗传转化进行研究。结果表明:茎尖系统再生能力强,茎尖组培成苗率可达90.5%。在MSB5培养基中,6-BA浓度为0.5 mg·L⁻¹时,芽诱导率最高;但每个外植体的出芽数所需的最佳浓度是1.5 mg·L⁻¹;当浓度为2.0 mg·L⁻¹时,开始有抑制出芽的现象;每个外植体最多能诱导4个芽。用农杆菌介导法转化棉花的茎尖,对侵染的损伤和Kan的耐受能力强,对Kan棉花的茎尖选择压达100 mg·L⁻¹;抗性绿苗率可达88.9%。

关键词:海岛棉;丛生芽诱导;遗传转化

中图分类号:S562.035.3 **文献标识码:**A

文章编号:1002-7807(2009)-04-0324-06

Multiple-shoot Induction and Genetic Transformation of Island Cotton (*Gossypium barbadense* L.) in Xinjiang

ZHOU Xiao-feng¹, JIN Shuang-xia², LI Xiang², LI Bao-cheng¹, LIAN Wen-ming³, NING Xin-zhu¹, LIU Li¹

(1. Institute of Cotton, Xinjiang Academy of Agricultural Reclamation Sciences, Shihezi, Xinjiang 832000, China; 2. National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China; 3. Institute of Agriculture Sciences, Xinjiang Reclamation Second division, Alaer, Xinjiang 843000, China)

Abstracts: With three island cottons, Xinhai 17, Xinhai 14, 85H, shoot organogenesis and genetic transformation were studied in Xinjiang. The results were as follows: *in vitro* plant regeneration of meristem shoot tip is better, and the seedling rate of 90.5% was obtained. Frequency of inducing shoots reached maximum with 6-BA at 0.5 mg·L⁻¹; whereas number of budding shoots in per explant reached maximum with 6-BA at 1.5 mg·L⁻¹; plantlet from shoot apical meristem repressed with 6-BA at 2.0 mg·L⁻¹; The maximum budding shoots in per explant is four. Isolated meristem shoot tips infected with *Agrobacterium tumefaciens* have strong endurance on infected damage and kan, of which selective concentration reached 100 mg·L⁻¹. The rate of plantlet from infected shoot tips on selection medium reached to 88.9%.

Key words: island cotton; multiple-shoot inducement; genetic transformation

棉花的体细胞组织培养起步比较晚,一直被公认为是植株再生最困难的植物之一。Trolinder、陈志贤等用棉花体细胞培养模式品种 Coker 开始,先后进行多个品种体细胞培养并得到再生植

株^[1-2],且初步建立和完善了棉花体细胞胚胎发生和植株再生的研究试验体系^[3-6]。但棉花体细胞胚胎发生和植株再生仍限制了棉花遗传转化的发展。在我国生产上种植的棉花品种超过200个,

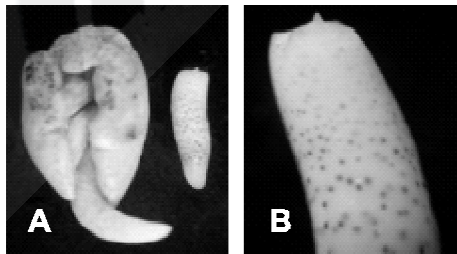
但其中绝大多数品种难以形成体细胞胚胎。虽然棉花体细胞胚产生的报道很多,但国内外对由海岛棉产生体细胞胚只有零星的报道,其中成功实现海岛棉体细胞再生的报道仅有几例。Sakhanokho 报道了以海岛棉(*G. barbadense* L.) Pima 为材料,实现了海岛棉的高频率胚性愈伤组织诱导和植株再生。由于试验品种单一,该试验是否适于其它海岛棉品种仍有待验证^[7]。因此海岛棉体细胞胚的产生和植株再生技术研究仍将是今后棉花组织培养研究的难点之一。离体培养再生植株是获得转基因棉花的重要方法之一,尽管转基因棉花商业化获得了成功,但是棉花的遗传转化和再生的研究仍然滞后于其它作物,这些问题主要是依赖基因型的再生、体细胞胚发生的效率和体细胞的变异。棉花生物技术的应用是对生产上应用的品种进行遗传转化和离体培养直接再生植株的重要途径。我国棉花大规模的遗传转化多数采用花粉管通道方法,少数用农杆菌介导转化法也仅是针对黄河流域的棉花品种或材料,对长江流域和新疆棉区的品种材料用农杆菌介导法转化成功的报道较少^[8]。海岛棉纤维品质优良,多用于纺织优质细纱;其抗病性突出,特别是具有抗棉花黄萎病的特点,是棉花品质改良、抗性遗传及杂种优势利用等研究重要的资源材料。以新疆育成的海岛棉品种的茎尖为材料,进行海岛棉器官发生再生体系研究的目的是探索棉花遗传转化新的技术途径。

表 1 培养基配方

Table 1 Composition of media

| 培养基 | 组 成 |
|-------------|--|
| 无菌苗萌发培养基 | 1/2MS 大量元素+葡萄糖 15 g · L ⁻¹ +0.25% Phytagel, pH 值 6.0 |
| 基本培养基 | MS 无机盐+B5 维生素, pH 值 5.85 |
| LB 培养基配方 | 胰化蛋白胨 10 g · L ⁻¹ +酵母提取物 5 g · L ⁻¹ +氯化钠 10 g · L ⁻¹ , pH 值 7.0 |
| MGL 液体培养基配方 | 胰化蛋白胨 5 g · L ⁻¹ +氯化钠 5 g · L ⁻¹ +MgSO ₄ · 7H ₂ O 0.1 g · L ⁻¹ +KH ₂ PO ₄ 0.25 g · L ⁻¹ +甘露醇 5 g · L ⁻¹ +甘氨酸 1.0 g · L ⁻¹ , pH 值 5.8 |

注:抗生素(卡那霉素、头孢霉素)采用 0.25 μm 滤膜过滤灭菌。



A 培养一天萌发的棉种 B 剥出的茎尖

图 2 萌发的棉花种子及剥离的茎尖

Fig. 2 Germinated seeds of cotton and its shoot-tip

1 材料和方法

1.1 试验材料

新疆海岛棉新海 17 号、85H 由新疆农垦科学院棉花所提供,新海 14 号由新疆兵团农一师农科所提供。农杆菌菌株 EHA105 由华中农业大学提供。质粒载体为 pB29K-B。该载体含卡拉霉素抗性基因 *nptII*, 由中国科学院微生物研究所提供,其 T-DNA 结构示意图如图 1 所示:

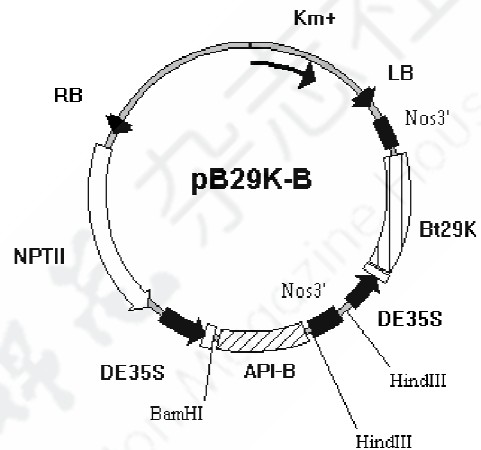


图 1 质粒载体 pB29K-B 结构图

Fig. 1 Schematic representation of T-DNA region in the plasmid vector pB29K-B

1.2 试验方法

1.2.1 培养基的配方组成。进行本研究的培养基配方组成见表 1。

1.2.2 茎尖外植体制备。剥取 1~2 d 苗龄的无菌苗的茎尖,在芽尖 0.5~0.8 cm 的下部下胚轴处切下作为外植体接种于培养基上,使其生长分化出苗^[9](图 2)。

1.2.3 不同浓度 6-BA 的组成。芽尖外植体接种在附加不同浓度 6-BA 的培养基上进行芽的诱导 45 d 后统计芽诱导率,每个外植体平均出芽数(表 2)。

1.2.4 茎尖遗传转化体系的建立。选取培养 2 d 无菌苗剥去子叶和切去靠下部的下胚轴,留取茎

尖附带 0.5 cm 的下胚轴,置于稀释好含有目的基因表达载体的根癌农杆菌菌液中轻轻摇动 3~5 min,滤去菌液,用镊子取出茎尖,置于滤纸上吸去附着的菌液。将侵染过的茎尖,接种到 MK3 (MSB+1.5 mg · L⁻¹ 6-BA)培养基上,在 22℃ 条件下,黑暗共培养时间分别为 2、3、4、5 d。将经过共培养的棉花茎尖切段,转移到选择培养基 (MSB+ 1.5 mg · L⁻¹ 6-BA+ 100 mg · L⁻¹ Kan+ 600 mg · L⁻¹ Cef) 上诱导出芽。温度为 (28 ± 1)℃,每天光照 12 h,光照强度为 2000 lx。40 d 后统计,考察指标为抗性绿苗率。分化出的芽,转入 1/2MSB 培养基中,抑菌剂 Cef 浓度适当递减 (所有操作都在无菌的条件下进行)。提取棉花基因组 DNA 进行抗性丛生芽的 PCR 检测^[9]。

表 2 诱导茎尖丛生芽培养基激素组成

Table 2 Hormones combination on multiple-shoots induction media

| 处理 代号 | 基本 培养基 | 激素/(mg · L ⁻¹) | | |
|----------|-----------|----------------------------|-----|------|
| | | IBA | NAA | 6-BA |
| MK0 | MSB5 | - | - | - |
| MK1 | MSB5 | - | - | 0.5 |
| MK2 | MSB5 | - | - | 1.0 |
| MK3 | MSB5 | - | - | 1.5 |
| MK4 | MSB5 | - | - | 2.0 |
| MK5 | MSB5 | - | - | 2.5 |
| MK6 | MSB5 | - | 0.5 | 1.5 |
| MK7 | MSB5 | - | 1.0 | 1.5 |
| MK8 | MSB5 | - | 2.0 | 1.5 |
| MK9 | MSB5 | 0.5 | - | 1.5 |
| MK10 | MSB5 | 2.0 | - | 1.5 |

表 3 不同浓度 6-BA 对茎尖丛生芽的影响

Table 3 Effect of concentration of 6-BA on multiple-shoots induction

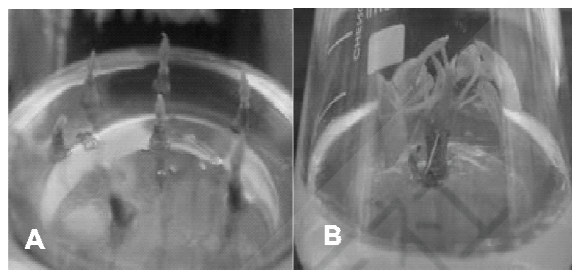
| 培养基 编号 | 6-BA /(mg · L ⁻¹) | 芽诱导 率/% | 每个外植体 平均出芽数/个 |
|-----------|----------------------------------|------------|------------------|
| MK 0 | MSB | 89.5 | 1.0 |
| MK 1 | MSB+0.5 | 94.7 | 2.6 |
| MK 2 | MSB+1.0 | 73.7 | 2.5 |
| MK 3 | MSB+1.5 | 90.5 | 2.9 |
| MK 4 | MSB+2.0 | 78.9 | 2.9 |
| MK 5 | MSB+2.5 | 73.7 | 2.0 |

2 结果与分析

2.1 添加 6-BA 对茎尖多芽启动的影响

茎尖培养丛生芽,当浓度为 0.5 mg · L⁻¹,芽诱导率最高,但每个外植体的出芽数所需的最佳浓度是 1.5 mg · L⁻¹,当浓度为 2.0 mg · L⁻¹时,开始有抑制出芽的现象,芽的生长较为缓慢,芽诱导率和每个外植体的出芽数都有所下降。再提高浓度出芽率就会下降,同时畸形芽的频率升高。

长时间在高浓度 6-BA 培养基中,也会造成畸形苗。与不加激素的对照比较发现,不加激素出芽最快,但不会出现丛生芽(表 3)。



△:培养 6 d 的茎尖 B:2 个月后的茎尖丛生芽

图 3 新海 14 号茎尖培养

Fig. 3 Multiple-shoot induction of cotton

2.2 添加植物生长素 NAA 对茎尖多芽启动的影响

添加 NAA 发现,茎尖对 NAA 的浓度十分敏感,在浓度为 0.5 mg · L⁻¹时,出芽就受到抑制。随着浓度的增加出芽数下降,当浓度为 2.0 mg · L⁻¹时,已不能诱导丛生芽(表 4)。从表中看出 NAA 对海岛棉的茎尖诱导作用不明显,不能促进多芽再生。

表 4 不同组合 6-BA 和 NAA 对茎尖丛生芽的影响

Table 4 The effects of five different kinds of disposals on multiple-shoot induction

| 培养基 编号 | 6-BA /(mg · L ⁻¹) | NAA /(mg · L ⁻¹) | 芽诱导 率/% | 每个外植体 平均出芽数/个 |
|-----------|----------------------------------|---------------------------------|------------|------------------|
| MK 0 | MSB | 0 | 89.5 | 1.0 |
| MK 3 | MSB+1.5 | 0 | 90.5 | 2.9 |
| MK 6 | MSB+1.5 | 0.5 | 57.9 | 1.4 |
| MK 7 | MSB+1.5 | 1.0 | 52.6 | 1.2 |
| MK 8 | MSB+1.5 | 2.0 | 52.6 | 1.0 |

2.3 添加植物生长素 IBA 对茎尖多芽启动的影响

添加 IBA 发现,茎尖培养初期,生物学下端膨大明显,出芽的速度较不加 IBA 的慢。同时,随着 IBA 浓度的增加,芽诱导率和每个外植体出芽数呈现下降趋势(表 5)。说明 IBA 在海岛棉茎尖多芽诱导中起负作用。但在出芽之后,添加适当的 IBA 可以促进根的萌发。

表 5 不同组合 IBA 和 6-BA 对茎尖丛生芽的影响

Table 5 The effects of four different kinds of disposals on multiple-shoot induction

| 培养基 编号 | 6-BA /(mg · L ⁻¹) | IBA /(mg · L ⁻¹) | 芽诱导 率/% | 每个外植体 平均出芽数/个 |
|-----------|----------------------------------|---------------------------------|------------|------------------|
| MK 0 | MSB | 0 | 89.5 | 1.0 |
| MK 3 | MSB+1.5 | 0 | 90.5 | 2.9 |
| MK 9 | MSB+1.5 | 0.5 | 78.9 | 1.4 |
| MK 10 | MSB+1.5 | 2.0 | 71.4 | 1.0 |

2.4 下胚轴长度对茎尖培养效果的影响

下胚轴保留 2~4 mm 的茎尖分生组织,在茎尖成苗培养基上易于诱导出愈伤组织,而其生长成植株的能力则降低,且形成的小植株的长势较差;若下胚轴保留长度在 8 mm 以上时,在茎尖分生组织的生长过程中,下胚轴还将伸长 1 倍左右,不利于芽的生长;下胚轴长度保留 5~7 mm 时茎尖成苗的能力最高,茎尖生长良好,部分材料从下胚轴上直接长根,成苗频率较高。因此,以后试验采取下胚轴长度为 5~7 mm 进行研究。

2.5 共培养时间的影响

通过改变茎尖共培养的天数发现,共培养 3 天的抗性绿苗率为 88.9%,每个外植体的出芽数为 2.2 个,为最高。培养时间再延长,抗性绿苗率反而下降,同时每个外植体的出芽数也有所下降。说明茎尖共培养 3 d 为最佳(表 6,图 4)。

表 6 共培养时间对茎尖转化的影响

Table 6 The effects of different kinds of disposals on multiple-shoots inducement

| 共培养 天数/d | 抗性芽 诱导率/% | 每个外植体平 均出芽数/个 |
|-------------|--------------|------------------|
| 2 | 53.3 | 2.0 |
| 3 | 88.9 | 2.2 |
| 4 | 85.2 | 1.9 |
| 5 | 59.7 | 2.1 |

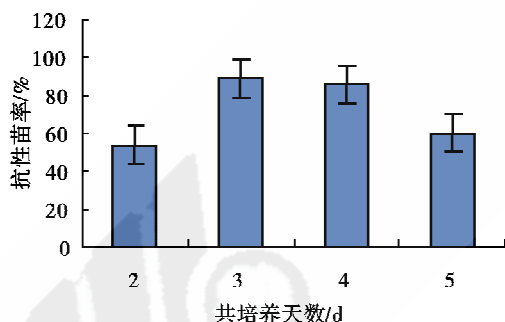


图 4 共培养时间对抗性芽诱导率的影响

Fig. 4 The impacts of co-cultured period of time of disposals on multiple-shoot inducement

2.6 6-BA 的培养时间对丛生芽的影响

6-BA 能使茎尖产生丛生芽,但长时间在 6-BA 的培养基中反而会抑制丛生芽的生长,试验发现,以一个月的效果最好。超过一个月,不仅丛生芽的数量下降,外植体褐化严重,而且畸形苗的比例增加(图 5)。

2.7 转基因植株的 PCR 检测

选取筛选 2 个月的丛生芽 12 株,进行 PCR 扩增。结果表明(图 6):PCR 扩增 10 个芽为阳性,再生丛生芽 83.3% 为转基因的芽。初步证实

了目的基因已插入到转化丛生芽的基因组中。进一步的分子鉴定及遗传学分析正在进行。

3 讨论

3.1 激素对茎尖丛生芽的影响

在海岛棉子叶节多芽诱导过程中,发现不加 6-BA 的 MSB 培养基可以诱导芽的产生,但不支持多芽的再生。而 6-BA 单独使用可诱导一定数量的芽再生,浓度为 $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,效果最好。当添加 NAA 和 IBA 时,芽的生长速度变慢,诱导效果反而比单独使用 6-BA 差,但后期添加 IBA 可以促进长根,可能使茎尖分生组织处于一个良好的生长环境中,有利于植株生长,最终提高其成苗率。

在棉花组织培养过程中都有畸形胚和畸形苗的产生,这些畸形体的普遍产生可能与棉花组织培养的周期比较长有关,还可能和外植体脱离母体及再分化过程中对外界培养条件敏感有关^[5,9]。本试验中,将茎尖长期培养在加 6-BA 的培养基或培养在高浓度的 6-BA 培养基中,易形成畸形苗。

3.2 影响农杆菌介导的茎尖遗传转化的因素

对于转化来说,只有处于感受态的植物细胞才具有接受转化的潜力。转化是发生在细胞分裂周期的 S 期(DNA 合成期),此时的细胞具有接受外源基因整合的能力。自从 McCabe 等用基因枪转化大豆茎尖分生组织获得成功以来,对于采用茎尖作为转化的受体系统日趋重视。已经有许多利用根癌农杆菌介导法或基因枪法自接转化茎尖分生组织或腋芽培养出了植株^[10-11]。茎尖培养时保留的下胚轴除了起支撑作用外,下胚轴内部产生的内源激素对茎尖的生长分化亦有较大影响。部分茎尖的下胚轴能在成苗培养基上直接长根,在实验中考虑到这一点并选择适当的培养条件就可能使茎尖分生组织处于一个良好的生长环境中,有利于植株生长,最终提高其成苗率。

本实验以新海 21 号、新海 14 号、85H 为茎尖作为转化受体,结果表明:茎尖系统再生能力强,茎尖培养成苗率最高可达 90.5%。用农杆菌介导法转化棉花的茎尖,抗性绿苗率最高为 88.9%;对侵染的损伤和 Kan 的耐受能力强,对 Kan 棉花的茎尖选择压达 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$;其转化成苗率较高,再生不经愈伤分化,成苗快,周期短,3~4 个月左右即可以得到 3~4 cm 的小植株。茎尖体系

进行培养成苗率不受基因型的控制。

茎尖分生组织本身结构的特殊性使其具有较强的生长潜能,使它的再生能力优于其它幼嫩的外植体,并能抵抗较高浓度的抗生素。因此,认为茎尖再生体系是较为理想的基因转化受体系统,但由于茎尖本身能够抵抗较强的抗生素,所以,实验中会见到“嵌合体”的现象。为此,需要对转化苗进行多次继代筛选,还可以通过对嵌合体植株枝条逐个检测、棉桃单收等措施来克服。

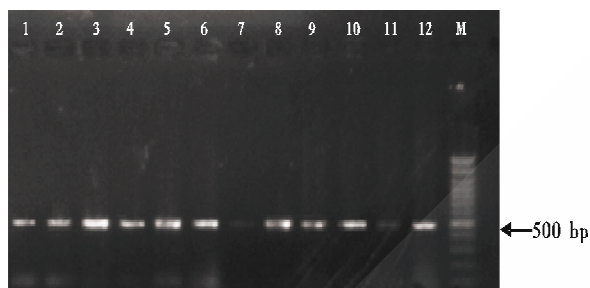
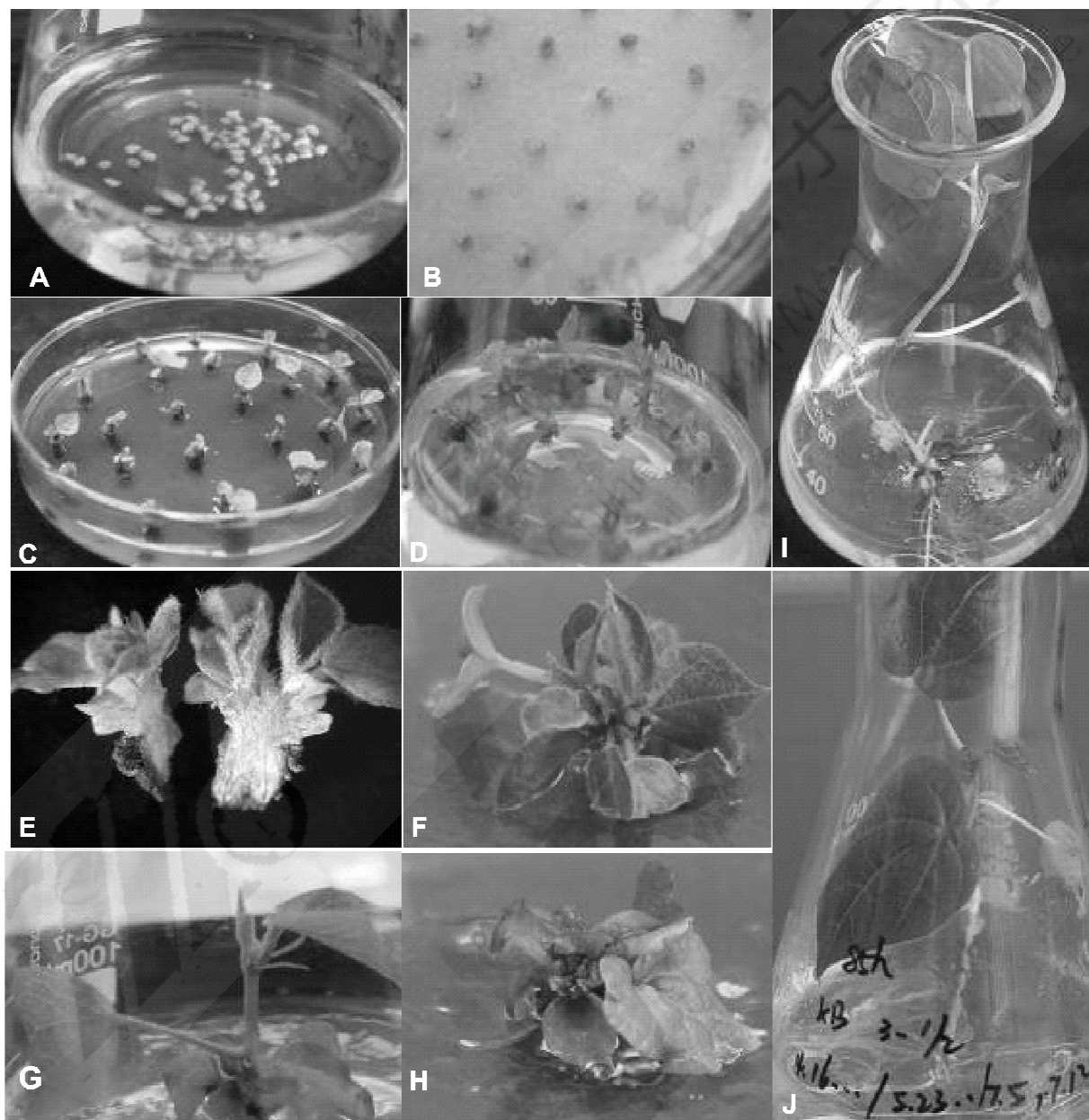


图6 部分转基因丛生芽的 PCR 检测结果

Fig. 6 PCR detection of putative transgenic multiple-shoot



A: 侵染茎尖切段; B: 共培养的茎尖切段; C, D: 抗性丛生芽的筛选; E: 丛生芽纵剖面图;
F: 经过 2 个月抗性筛选的丛生芽; G, I: 伸长的芽; H: 畸形丛生芽; J: 嫁接的棉苗。

图5 85H 茎尖为转化受体的遗传转化

Fig. 5 Multiple-shoot of cotton as explants for genetic transformation on '85H'

参考文献:

- [1] TROLINDER N L, Goodin J R. Somatic embryogenesis in cotton (*Gossypium*). I. Effects of explant and hormone regime [J]. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 1988(12):31-42.
- [2] 陈志贤, 李淑君, Trolinder N L, 等. 棉花细胞悬浮培养胚胎发生和植株再生某些特性的研究[J]. *中国农业科学*, 1987, 20 (5):6-11.
CHEN Zhi-xian, Li Shu-jun, Trolinder N L, et al. Study on some characteristic of cell suspension cultures and plant regeneration in cotton (*Gossypium*) [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 1987, 20 (5):6-11.
- [3] FINER J J. Plant regeneration from somatic embryogenic suspension cultures of cotton *Gossypium hirsutum* L. [J]. *Plant Cell Rep*, 1988, 8(10):586-589.
- [4] 张家明, 孙济中, 刘金兰, 等. 陆地棉体细胞植株再生及其移栽技术研究[J]. *作物学报*, 1994, 20(2):210-216.
ZHANG Jia-ming, Sun Ji-zhong, Liu Jin-lan, et al. Studies on plant regeneration from somatic cells and transferring technique of plantlets in upland cotton [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 1994, 20(2):210-216.
- [5] 张献龙, 孙济中, 刘金兰. 陆地棉体细胞胚胎发生与植株再生[J]. *遗传学报*, 1991, 18(5):461-467.
ZHANG Xian-long, Sun Ji-zhong, Liu Jin-lan. Somatic embryogenesis and plant regeneration in upland cotton [J]. *Acta Genetica Sinica*, 1991, 18(5):461-467.
- [6] 吴家和, 张献龙, 罗晓丽, 等. 两个陆地棉体细胞胚胎发生新品系的选育[J]. *棉花学报*, 2003, 15(4):254-256.
WU Jia-he, Zhang Xian-long, Luo Xiao-li, et al. Selection of somatic embryogenesis purer lines of two upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) cultivars [J]. *Cotton Science*, 2003, 15(4):254-256.
- [7] SAKHANOKHO H F, Zipt A, Rajasekaran K. Induction of highly embryogenic calli and plant regeneration in upland (*Gossypium hirsutum* L.) and Pima (*Gossypium barbadense* L.) cottons [J]. *Crop Sci*, 2001, 41: 1235-1240.
- [8] 贾新合, 赵国栋. 高新技术在棉花遗传育种中的应用及进展[J]. *江西棉花*, 2004, 26 (2):3-7.
JIA Xin-he, Zhao Guo-dong. Application and progress of utilizing high and new technique in cotton heredity breeding [J]. *Jiangxi Cotton*, 2004, 26 (2):3-7.
- [9] 金双侠. 棉花遗传转化体系的优化及突变体的创制[D]. 武汉:华中农业大学, 2006.
JIN Shuang-xia. Optimization of *Agrobacterium*-mediated transformation of cotton and the development of mutants [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2006.
- [10] 吴敬音. 棉属茎尖腋芽的离体培养[J]. *江苏农业学报*, 1990, 6 (2):22-26.
WU Jing-yin. Shoot apex and axillary bud culture of *Gossypium* spp [J]. *Jiangsu Agricultural Science*, 1990, 6 (2):22-26.
- [11] 王月芳, 奚元龄. 陆地棉茎尖培养再生植株[J]. *江苏农业学报*. 1986, 2(2):13-16.
WANG Yue-fang, Xi Yuan-ling. Culture of shoot apex of upland cotton [J]. *Jiangsu Agricultural Science*, 1986, 2(2):13-16. ●