

SNAC1 基因作为筛选标记基因用于棉花的遗传转化

李雪林^{1,2}, 刘冠泽¹, 聂以春¹, 郭小平¹, 张献龙^{1*}

(1.华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室,武汉 430070;2.河南科技大学农学院,洛阳 471003)

摘要:以 SNAC1 基因作为筛选标记基因,NaCl 作为筛选剂,通过农杆菌介导法将 SNAC1 和 GUS 基因导入棉花细胞并得到胚性愈伤组织。经过 PCR 检测证实,外源基因已经整合到棉花基因组中,GUS 染色证明 GUS 基因得到表达。研究了 NaCl 作为棉花转化细胞的筛选剂在农杆菌介导转化中的应用浓度及方法,即 NaCl 的筛选浓度在 1.1%~1.5%(W/V)之间,在愈伤组织诱导初期适当低一点,随着愈伤组织的生长而加大筛选浓度。由于 NaCl 不利于胚的分化,经过 2~3 次继代筛选后要及时去除 NaCl 以促进胚的分化。

关键词:棉花;转化;SNAC1 基因;NaCl

中图分类号:S562.035 **文献标识码:**A

文章编号:1002-7807(2010)01-0036-06

Application of SNAC1 Gene as a Selection Marker Gene for Cotton (*Gossypium hirsutum* L.) Transformation

LI Xue-lin^{1,2}, LIU Guan-ze¹, NIE Yi-chun¹, GUO Xiao-ping¹, ZHANG Xian-long^{1*}

(1.National Key Lab of Crop Genetic and Improvement, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China; 2.College of Agriculture, Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471003, China)

Abstract: Employing SNAC1 gene as a selection marker gene and NaCl as a selection agent, SNAC1 and GUS genes were introduced into cotton genome via *Agrobacterium*. Transgenic calli were confirmed by PCR analysis, and expression of the GUS gene was showed with GUS staining. The concentration and method for employing NaCl as a selection agent had been studied. The reasonable selection concentration of NaCl should be 1.1%~1.5%(W/V). The start concentration of NaCl in callus induction medium should be lower and the concentration increased as calli proliferated. Because NaCl is not beneficial for embryo differentiation and development, NaCl should be removed from the culture medium after the calli were subcultured for 2~3 times.

Key words: cotton; transformation; SNAC1 gene; NaCl

随着植物基因工程的研究取得巨大进展,利用基因工程对植物进行遗传改良获得了很大的成功。但是,植物遗传转化过程中关键的一步是要有特定的标记筛选出细胞或植株^[1]。因此,在植物遗传转化过程中一些筛选剂如抗生素或除草剂被用来杀死非转化的细胞或植株。由于这些筛选剂对植物没有专一性,科学家就从其它生物中克隆到能够分解抗生素或除草剂的基因即筛选标记基因。目的基因和筛选标记基因一同导入到植物基因组中去,然后针对筛选标记基因选择合

适的筛选剂来区分转化和非转化体,转基因植株再生后标记基因便不再有用^[2]。截至目前,用于植物遗传转化的筛选标记基因有 50 多种,而这些筛选标记基因大多是抗抗生素基因或者是抗除草剂基因^[1]。在作物遗传转化中,为避免以抗生素与除草剂作为筛选剂的转化系统所产生的副作用对环境生态和人类健康带来潜在的影响,一些以环境友好型的物质如甘露糖等为筛选剂的转化系统便应运而生^[3-4]。

SNAC1(stress-induced NAC 1)基因是从水稻

收稿日期:2008-11-13

作者简介:李雪林(1976-),讲师,博士研究生,xuelin@webmail.hzau.edu.cn;* 通讯作者,xlzhang@mail.hzau.edu.cn.

基金项目:国家高技术研究发展计划项目(2006AA00105)和国家棉花产业创新体系

中克隆出的具有抗逆性转录因子^[6]。在非生物逆境胁迫下如干旱、盐渍, SNAC1 基因的表达可以提高水稻的抗逆性如耐旱、耐盐等。与传统标记基因相比, SNAC1 基因用于植物的遗传转化筛选具有较高的安全性。为了开发出新型的筛选标记基因, 本实验以棉花为对象, 利用 SNAC1 基因能提高植物耐盐性的特性^[6], 以 NaCl 作为筛选剂研究 SNAC1 作为筛选标记基因的可行性, 为进一步在棉花的遗传转化中应用打下基础。

1 材料和方法

1.1 外植体

供试材料为陆地棉品系 YZ1。YZ1 种子剥壳经 0.1% (W/V) 的 HgCl₂ 灭菌后接种于无菌苗培养基(1/2 MS 大量元素 +30 g·L⁻¹ 葡萄糖)上进行萌发。无菌苗的培养方法参照金双侠的方法^[7], 取其 5~7 d 苗龄的下胚轴切段作为外植体。

1.2 菌株和质粒

用于转化的质粒为 pCAMBIA 1301S, 该片段含有 35 S 启动子分别驱动的 SNAC1 基因和 GUS 报告基因, 其结构如图 1。以农杆菌菌株 LBA4404 作为载体, 菌液的制备方法参照金双侠的方法^[7]。

1.3 NaCl 筛选压力的选择

对 5~7 d 苗龄棉花下胚轴耐盐测试的愈伤组织诱导培养基为: MS 无机盐 + 维生素 B₅+30 g·L⁻¹ 葡萄糖, 附加 0.1 mg·L⁻¹ 2,4-D 和 0.1 mg·L⁻¹ Kinetin。在此培养条件下添加不同浓度的 NaCl (表 1) 进行耐盐筛选。按照金双侠的方法^[7]准备下

胚轴切段, 然后接种到上述不同 NaCl 浓度的培养基上诱导愈伤组织。每个处理 3 个培养皿, 每皿接种 20~30 个下胚轴切段, 同时对每皿的外植体称重。外植体培养 30 d 后统计每皿的外植体出愈率(下胚轴两端膨大诱导出愈伤)、存活率(下胚轴无褐化死亡)和鲜重, 根据愈伤组织的诱导产生和生长情况(愈伤组织增重)来确定 NaCl 的筛选压力。

1.4 转化方法

取培养 5~7 d 的棉花下胚轴进行切段, 然后利用农杆菌 LBA4404 菌液 (OD 约 0.5) 进行侵染, 侵染后的下胚轴共培养 2 d 后转到筛选培养基上进行筛选^[8]。筛选培养基成分为愈伤组织诱导培养基中加入不同浓度的 NaCl, 另外附加 400 mg·L⁻¹ 的头孢霉素。筛选培养每 30 d 继代一次, 继代 2 次后去除头孢霉素。愈伤组织长出胚性愈伤组织后转入分化培养基 (MS 无机盐 + 维生素 B₅+30 g·L⁻¹ 葡萄糖, 附加 0.5 mg·L⁻¹ IBA 和 0.15 mg·L⁻¹ Kinetin)。

1.5 转基因愈伤组织的 GUS 染色和 PCR 检测

在愈伤组织继代 2 次后, 从不同外植体诱导分化出的耐盐转基因愈伤组织中随机取样, 于离心管中进行 GUS 染色。另外, 继代 3 次后取 0.5 g 左右的愈伤组织于室温下研磨匀浆, 利用 CTAB—氯仿: 异戊醇提取 DNA 并对其纯化^[9]。利用 SNAC1 基因特异引物 (F: 5'-AGCGA-GAAGCAAGCAAGAAGCG-3'; R: 5'-ACAGCAC-CCAATCATCCAACCT-3') 进行扩增检测, PCR 条件参照文献[10]。

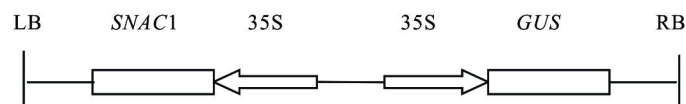


图 1 含有 SNAC1 和 GUS 基因的 1301S 载体图谱

Fig. 1 Vector map of 1301S with SNAC1 and GUS genes

表 1 棉花下胚轴对 NaCl 的耐性反应

Table 1 Response of cotton hypocotyls to NaCl

培养基编号	NaCl 浓度 /%	存活率 /%	启动率 /%
MS0	0.0	100.0	100.0
MS1	0.9	100.0	96.7
MS2	1.1	98.3	63.2
MS3	1.5	85.7	32.9
MS4	1.9	21.6	6.9

1.6 棉花非转基因胚性愈伤与转基因阳性胚性愈伤的耐盐性实验

以分化培养基为基础,加入 NaCl 使其浓度为 0.9% (W/V), 接种 0.2 g 左右的非转基因胚性愈伤组织和转基因阳性胚性愈伤组织, 培养 7 d 后统计愈伤组织的鲜重及生长状态。

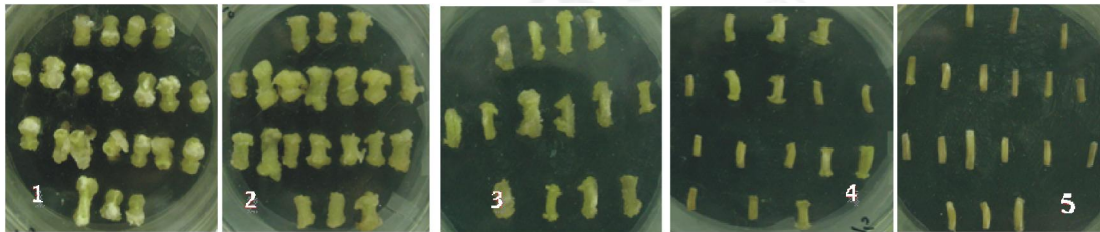
2 结果与分析

2.1 外植体对 NaCl 的耐性

棉花下胚轴外植体对 NaCl 的耐性实验结果(表 1)说明,下胚轴作为外植体在含有 NaCl 的培养基上被诱导产生愈伤组织的能力受到抑制。但适量的 NaCl 并不影响下胚轴愈伤组织的诱导。棉花对盐胁迫耐性相对其它植物高一些^[1],所以在 NaCl 浓度为 0.9% (W/V) 时近 96% 的外植体能启动愈伤组织诱导。这表明该浓度的 NaCl 对外植体起不到抑制愈伤组织诱导的作用,不能用

作筛选剂量。在 NaCl 浓度为 1.1% (W/V) 时,下胚轴可以诱导出愈伤组织,但高于 1.5% (W/V) 后,下胚轴受到严重抑制,几乎无法长出愈伤,而且大部分外植体已经受到盐渍而死亡(图 2)。这主要是因为过量的盐会造成植物细胞早期水分亏缺,降低了植物的吸水能力而影响细胞生长,当累积的量过高时对植物细胞造成毒性作用使细胞死亡^[2]。

由图 3 可以看出,本实验在添加 NaCl (0.9%) 的 MS1 培养基上 90% 以上的外植体能诱导出愈伤组织且生长较快,表明该浓度的 NaCl 对愈伤组织的抑制不明显。当培养基中添加 NaCl 浓度达到 1.1% (W/V) 后诱导出的愈伤组织生长变慢,浓度超过 1.5% (W/V) 时外植体诱导愈伤组织的能力受到严重抑制。这些结果表明农杆菌侵染处理后 1.1%~1.5% (W/V) 的 NaCl 是初始筛选外植体诱导愈伤组织能力的适宜浓度。



1, 2, 3, 4 和 5 分别为 CK 以及盐浓度为 0.9%, 1.1%, 1.5% 和 1.9% 时下胚轴培养 30 d 后的愈伤组织生长状态。

图 2 NaCl 浓度对棉花下胚轴诱导愈伤组织能力的影响

Fig. 2 Effect of NaCl concentration on callus induction for cotton hypocotyls

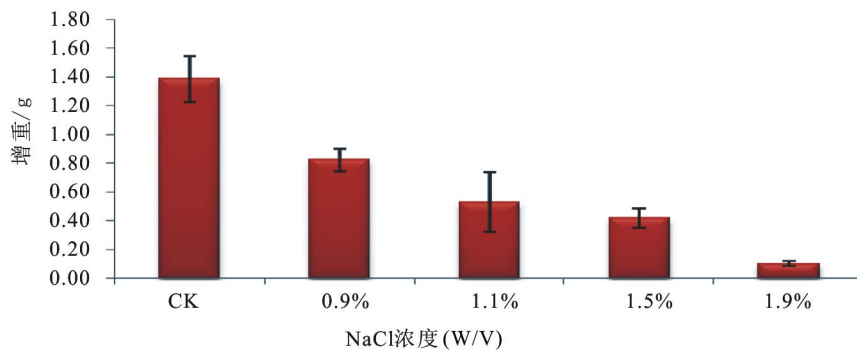


图 3 盐胁迫下棉花下胚轴诱导愈伤组织的生长(培养 30 d)

Fig. 3 Growth of cotton hypocotyls under NaCl stress (30 d)

2.2 NaCl 浓度与转化率

愈伤组织经过 NaCl 筛选继代 2 次后(60 d), 利用 GUS 染色检测了转化率与 NaCl 筛选浓度的关系(表 2)。需要说明的是,几乎所有的愈伤组织在刚诱导出来时都是嵌合体,所谓转化率是指

转基因愈伤组织块 GUS 染色阳性占下胚轴诱导出愈伤组织块的比例。从结果来看,NaCl 浓度为 1.9% (W/V) 时转化率最低,原因是外植体很难诱导出愈伤组织。另外,高浓度的 NaCl 对转基因愈伤组织生长有抑制作用,使其生长不好,呈水渍

表 2 NaCl 浓度与转化率的关系

Table 2 Effect of NaCl concentration on transformation efficiency

NaCl 浓度(W/V)/%	存活率 /%	启动率 /%	转化率 /%	愈伤组织状态
MS1(0.9)	98.4	90.5	31	++
MS2(1.1)	94.4	71.4	56	+++
MS3(1.5)	86.1	52.8	22	+
MS4(1.9)	56.9	28.5	10	+

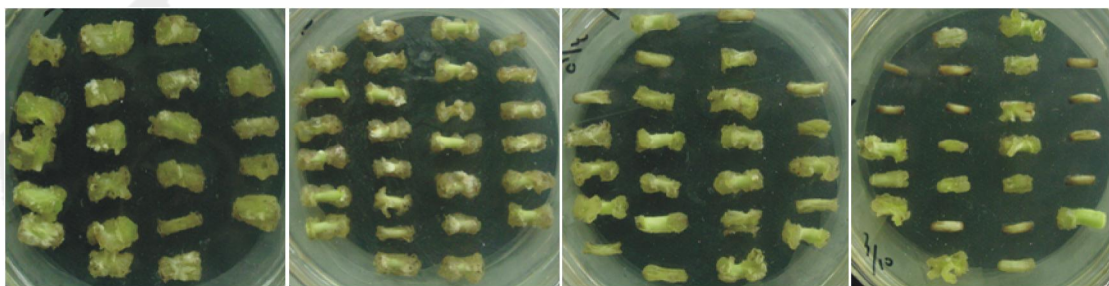
注:“+”、“++”、“+++”分别表示愈伤组织为水渍状、泥状、灰色泥状。

状。NaCl 浓度为 0.9% (W/V) 时转化率并不是最高,可能是非转化的愈伤生长过快影响了转化愈伤的生长。在 NaCl 浓度 1.1% (W/V) 时转化率达到 56%。在不同浓度 NaCl 的筛选下(筛选 30 d),农杆菌侵染的下胚轴诱导出的愈伤组织状态(泥状、灰白色泥状和水渍状)也不相同。在 1.1% 的 NaCl 筛选条件下,下胚轴诱导出的愈伤组织呈灰白色泥状(筛选 30 d),该状态与卡那霉素筛选下诱导出的愈伤组织相近。因此,根据转化率与愈伤组织状态(图 4),1.1% (W/V) 可以作为棉花下胚轴转化比较适宜的初始筛选浓度,此时的转化率达到 50% 以上,且愈伤组织生长状态也比较好。

传统的棉花遗传转化经常使用 NPT II 作为筛选标记基因,利用卡那霉素进行筛选。本实验对卡那霉素筛选与 NaCl 筛选进行了比较(表 3)。从表中可以看出,相对卡那霉素筛选来说,NaCl 筛选尽管抗性愈伤比率较高,但转化率(阳性愈

伤组织)稍低。这可能是卡那霉素抑制非转化细胞蛋白质合成而杀死细胞,而 NaCl 则是通过细胞渗透势及细胞累积 Na^+ 产生毒害而抑制细胞生长的,因此 NaCl 对细胞的毒杀作用没有 Kan 效果明显。另外,利用 NaCl 筛选时愈伤组织分化成胚的时间较长,这可能与其抑制胚分化有关。

研究发现,下胚轴诱导出的愈伤组织对筛选剂的抗性高于外植体,为了从嵌合的细胞团中筛选出较纯合的转基因愈伤组织,继代培养基中 NaCl 浓度提高到 1.5% (W/V),这种逐步提高筛选浓度的筛选方法类似于水稻转化^[6]。另外,即使在较低浓度的 NaCl 培养基上愈伤组织也很难分化。这说明转化愈伤组织虽然可以在含有 NaCl 培养基上生长,但对胚的分化却有抑制作用。因此,在愈伤组织诱导培养基上继代筛选 2~3 次后,要去除 NaCl 筛选剂。愈伤组织分化后转到分化培养基上进行培养和再生。



从左至右,NaCl 浓度分别为 0.9%、1.1%、1.5% 和 1.9%。

图 4 盐筛选转化 SNAC1 基因的下胚轴愈伤组织生长状态(30 d)

Fig. 4 Growth of calli from hypocotyls under salt selection (30 d)

表 3 NaCl 与 Kan 作为筛选剂对棉花转化影响的比较

Table 3 Effects of NaCl and Kan as selection agent on cotton transformation

筛选剂	接种外植体数	抗性愈伤	转化率 /%	分化时间 /d
Kan(50 mg·L ⁻¹)	100	56	85	60~90
NaCl(11 g·L ⁻¹)	100	75	56	>90

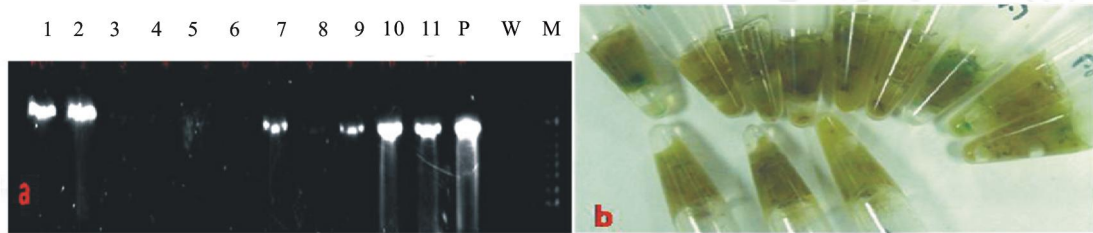
2.3 转基因愈伤组织的 GUS 染色和 PCR 检测

随机从 12 个转基因耐盐细胞系中取样进行 GUS 染色,并提取 DNA。PCR 检测表明,50% 以上的转化愈伤能扩增出大小为 509 bp 的 *SNAC1* 基因的特异条带(图 5-a)。另外,7 个愈伤组织的 GUS 染色明显(图 5-b),转化率为 58%,这和 PCR 的结果基本一致。这说明 *SNAC1* 基因已经转入棉花基因组中,而对再生植株的进一步分子鉴定需在随后的实验中继续进行。

2.4 棉花转基因愈伤耐盐性实验

为了进一步证明 *SNAC1* 基因作为筛选标记

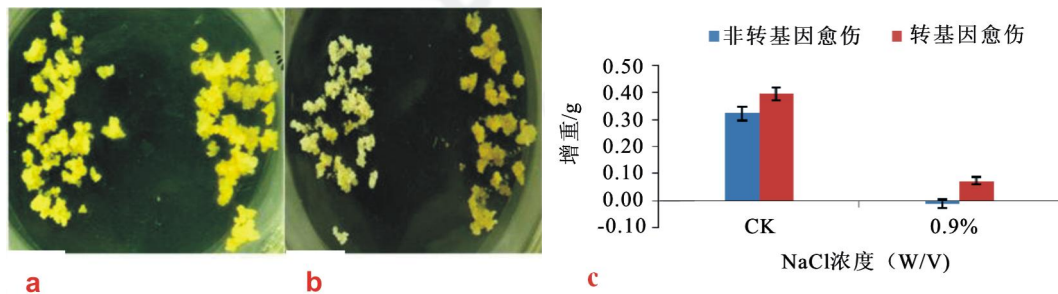
基因已导入到棉花愈伤组织中,对获得的转化胚性愈伤组织(GUS 染色阳性)和非转化的胚性愈伤组织进行了耐盐性实验。实验结果表明,在正常培养条件下,转基因和非转基因愈伤的生长状态和生长速度没有很大的差别(图 6-a, c);但是在 NaCl 胁迫下(0.9%, W/V),非转化的胚性愈伤组织逐渐失水发白死亡而出现负增长,而转化的阳性胚性愈伤则仍然呈黄色且在含 0.9% NaCl 的分化培养基上生长速度明显强于非转基因胚性愈伤(图 6-b, c)。



泳道 1~11:转基因愈伤;P:质粒;W:水;M:marker.

图 5 转化愈伤组织的 PCR 检测(a)和 GUS 染色(b)

Fig. 5 PCR analysis (a) and GUS staining (b) for putative transgenic calli



非转基因(左)和转基因(右)愈伤组织在正常(a)及盐胁迫(b)培养基上的生长(7 d)以及正常和盐胁迫下的愈伤组织增重(c)(7 d)。

图 6 棉花转基因愈伤的耐盐性

Fig. 6 Tolerance to salt of transgenic calli of cotton

3 讨论与结论

3.1 关于 NaCl 筛选体系的应用价值

以 NaCl 作为转基因细胞的筛选剂在植物上还没有应用,本文以农杆菌介导转化棉花下胚轴进行了初步研究。同棉花遗传转化上应用较多的卡那霉素筛选剂相比,NaCl 作为筛选剂与其有不同的地方。例如,NaCl 存在时诱导出来的愈伤组织对筛选剂的抗性提高,因此继代培养基中的浓度要提高;NaCl 对胚的分化有抑制作用,在胚分化阶段要及时撤掉筛选剂。但 NaCl 作为遗传转

化的筛选剂还是有其优点,如应用比较方便,特别是利用花粉管通道法转化棉花,获得的种质进行盐筛选比较简单。与此同时,*SNAC1* 基因与其它筛选标记基因(抗生素与抗除草剂)相比,不会对环境及生物产生危害。另外,*SNAC1* 基因本身就是抗逆的功能基因,在筛选后植物可以利用其增强抗逆性而不会像其它筛选标记基因那样产生冗余。

3.2 关于 NaCl 筛选步骤

与其它筛选剂直接杀死或者“饿死”细胞相比,盐筛选主要利用高浓度的 NaCl 对细胞渗透

胁迫,以及 Na^+ 对细胞产生离子胁迫即离子毒害作用^[2]。另外 Na^+ 又是细胞必需的盐离子,较低浓度的 NaCl 对棉花愈伤组织生长有促进作用^[1]。因此, NaCl 筛选没有其它筛选剂作用效果迅速,同时筛选时间与步骤也不尽相同。

从实验结果来看,棉花愈伤组织的耐盐性比其它作物强,这与前人研究一致^[1]。在本研究中,棉花下胚轴诱导分化出愈伤组织的初始 NaCl 浓度为 1.1%,但此时分化出的愈伤组织已对 NaCl 的耐性有所提高。因此,在随后的抗性愈伤组织继代筛选过程中需要适当提高 NaCl 的浓度以提高筛选效果。另外在实验中还发现 NaCl 对非胚性愈伤组织分化成胚性愈伤组织有抑制,这就要求在今后的试验中设计更多的浓度梯度、转化共培养时间和筛选方式来确定最佳的转化筛选体系,完善以 NaCl 为筛选剂的筛选系统在棉花遗传转化上的应用。

致谢:

华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室熊立仲教授、胡红红博士提供 *SNAC1* 基因的超表达载体。

参考文献:

- [1] BRIAN M, Sylvia M. Selectable marker genes in transgenic plants: applications, alternatives and biosafety [J]. *Journal of Biotechnology*, 2004, 107: 193-232.
- [2] HOLGER P. Removing selectable marker genes: taking shortcut [J]. *Trends in Plant Sci*, 2000, 5 (7): 273-2742.
- [3] MARINA S, Rody S, Michael G W, et al. An efficient mannose selection protocol for tomato that has no adverse effect on the ploidy level of transgenic plants[J]. *Plant Cell Rep*, 2004, 23: 236-245.
- [4] 岳建雄, 孟钊红, 张炼辉, 等. 以甘露糖作为筛选剂的棉花遗传转化[J]. *棉花学报*, 2005, 17 (1): 3-7.
- YUE Jian-xiong, Meng Zhao-hong, Zhang Lian-hui, et al. Cotton transformation with mannose as selective agent [J]. *Cotton Science*, 2005, 17(1): 3-7.
- [5] HU Hong-hong, Dai Ming-qiu, Yao Jia-ling, et al. Overexpressing a NAM, ATAF, and CUC (NAC) transcription factor enhances drought resistance and salt tolerance in rice [J]. *Proc Nat Acad Sci*, 2006, 103 (35): 12987-12992.
- [6] 胡红红. 水稻逆境相关转录因子的分离和功能鉴定[D]. 武汉: 华中农业大学, 2006.
- HU Hong-hong. Isolation and functional characterization of rice stress-related transcription factor[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2006.
- [7] 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.
- [8] JIN Shuang-xia, Zhang Xian-long, Liang Shao-guang, et al. Factors affecting transformation efficiency of embryogenic callus of upland cotton (*Gossypium hirsutum*) with *Agrobacterium tumefaciens* [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2005, 81 (2): 229-237.
- [9] 马 轩, 杜雄明. 提取棉花基因组 DNA 的一点探讨[J]. *棉花学报*, 2004, 16 (1): 40-43.
- MA Xuan, Du Xiong-ming. Preliminary study on the methods of extracting cotton genomic DNA[J]. *Cotton Science*, 2004, 16 (1): 40-43.
- [10] 朱龙付, 涂礼莉, 曾范昌, 等. 一种适合于 cDNA 文库构建的高质量棉花 RNA 的简单抽提法[J]. *作物学报*, 2005, 31 (12): 1657-1659.
- ZHU Long-fu, Tu Li-li, Zeng Fan-chang, et al. An improved simple protocol for isolation of high quality RNA from *Gossypium spp.* suitable for cDNA library construction[J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2005, 31 (12): 1657-1659.
- [11] 李付广, 李秀兰, 李凤莲, 等. 盐胁迫对陆地棉愈伤组织的影响[J]. *棉花学报*, 1994, 6 (1): 37-40.
- LI Fu-guang, Li Xiu-lan, Li Feng-lian, et al. The effect of salinity stress on somatic cell of cotton (*G. hirsutum* L.)[J]. *Cotton Science*, 1994, 6 (1): 37-40.
- [12] PARIDA A K, Das A B. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review[J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2005, 60 (3): 324-349. ●