



新疆陆地棉转雪莲 *XLPEBP* 基因抗寒性研究

周小云¹, 马盾^{1*}, 危小薇¹, 艾秀莲², 黄乐平¹

(1. 新疆农业科学院核技术生物技术研究所, 新疆农作物细胞工程重点实验室, 乌鲁木齐 830091; 2. 新疆农业科学院微生物研究所, 乌鲁木齐 830091)

摘要: 在环境气温骤降情况下, 研究了转雪莲 *XLPEBP* 基因陆地棉后代的抗寒性, 结果表明, 2 份转基因陆地棉后代 (T_2) 材料, 抗寒性显著高于对照材料, 其中的功能基因有一定的表达作用。

关键词: 花粉管; 雪莲; *XLPEBP* 基因; 棉花; 抗寒性

中图分类号: S562.035.3 文献标识码: A

文章编号: 1002-7807(2009)01-0064-03

The Responses of the Xinjiang Upland Cotton Transformed with *XLPEBP* Gene to Low Temperature

ZHOU Xiao-yun¹, MA Dun^{1*}, WEI Xiao-wei¹, AI Xiu-lian², HUANG Le-ping¹

(1. Institute of Nuclear and Biological Technology, Xinjiang Academy of Agricultural Sciences, Xinjiang Key Laboratory of Farm Corp Cell Engineering, Urumqi 830091, China; 2. Institute of Microbiology, Xinjiang Academy of Agricultural Sciences, Urumqi 830091, China)

Abstract: The responses of the Xinjiang upland cotton transformed with *XLPEBP* gene to low temperature were studied under air temperature suddenly falling situation. The results showed: the resistance to freeze injury in the offspring (T_2) of the cotton was stronger than the control, the *XLPEBP* gene showed its expression and function in the cotton.

Key words: pollen-tube pathway; *sasussured involucrate* Kar. et Kir; *XLPEBP*; cotton; cold tolerance

新疆属典型的大陆性气候, 春季气候多变。尤其是新疆北部, 倒春寒发生频繁, 导致棉花幼苗受到低温伤害, 每年平均造成几万公顷死苗和僵苗, 给棉花生产带来了严重损失^[1-2]。新疆农科院微生物研究所分离、克隆的雪莲 (*sasussured involucrate* Kar. et Kir) 拟磷脂酰乙醇胺结合蛋白 (phosphatidylethanolamine-binding protein, *XLPEBP*) 基因, 在低温诱导下有改变细胞质膜流动性作用^[3]。经农杆菌介导拟南芥鉴定证明, 该基因具有一定的抗寒(旱)作用。新疆农科院核技术生物技术研究所从 2005 年起, 通过花粉管通道法转化技术, 将雪莲拟磷脂酰乙醇胺结合蛋白基因 (*XLPEBP*) 导入棉花中, 获得转基因后代 (T_2) 植株。

1 材料和方法

1.1 材料

转 *XLPEBP* 基因陆地棉幼苗 2 份: 新陆早 17 号 (新 B 17) 转 *XLPEBP* 基因后代 (T_2) 192 株和石 K5 转 *XLPEBP* 基因后代 (T_2) 47 株。均种植在与大田气候环境相同的试验田中。

1.2 方法

1.2.1 天气情况及调查。 5 月 11 日, 寒流侵袭北疆, 气温从 25℃ 骤降到 6℃, 持续 1 d; 13 日寒流又侵袭, 气温降到 4℃, 持续 1 d。2 d 以后天气晴朗, 气温回升到了最高 25℃。此时, 幼苗叶片冷害表现明显。根据棉苗受冷害的程度, 设定相应的棉苗抗冷害标准, 对转 *XLPEBP* 基因的每

收稿日期: 2007-11-08

作者简介: 周小云 (1977-), 男, 硕士, 助研, xiaoyunzhou77@126.com; * 通讯作者, mudun12700@163.com

基金项目: 国家自然科学基金 (30160039), 新疆维吾尔自治区高技术研究与发展计划 (200511103)

株棉花幼苗(T_2)进行田间客观的抗冷害评价。

1.2.2 标记基因的田间筛选。转基因植株种植到第 2 代,仍然存在着遗传分离。对此,当棉苗(T_2)生长出 2 片真叶时,在幼嫩真叶上开始涂抹 Basta 除草剂,浓度为 0.025%,7 d 和 14 d 后分别再将遗漏或疑似的植株涂抹 1 次,共涂抹除草剂 3 次,最终筛选出抗除草剂幼苗,挂牌记录。

1.2.3 PCR 分析。经过田间筛选,取最终确定为抗除草剂(阴性反应)植株新长出的幼嫩叶片,按 CTAB 法提取总 DNA。根据 *XLPEBP* 基因序列,设计合成特异性的引物:

引物 1:5-CCA TCT CCA ACA ACC CAA-3';引物 2:5-GCC GCC AGT ACA AAA TCA A-3'。

以提取的总 DNA 为模板,加上 *XLPEBP* 引物、反应缓冲液、dNTP 和 Taq 酶后,进行 PCR 扩增。预变性 3 min,95°C 变性 30 s,54.7°C 复性 30 s,72°C 延伸 1 min,32 个循环后,72°C 再延伸 10 min。将扩增产物在 1% 琼脂糖凝胶上电泳并在凝胶成像仪上照相。PCR 分析重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 田间冷害调查

2007 年 4 月 23 日,将种子播种在试验田中,5 月 1 日开始出苗,当真叶开始露头,5 月 11 日和 13 日两次寒流侵袭北疆。本试验在这种情况下,对转雪莲抗寒基因棉花植株进行田间抗冷害调查。从表 1 分析:新陆早 17 号重度受害或中度受害的占 18%,对照高达 80%;石 K5 重度受害或中度受害的占 23%,对照高达 79%;新陆早 17 号轻度受害或没受害的占 82%,对照仅有 20%;石 K5 轻度受害或没受害的占 76%,对照仅有 21%。以上结果均差异明显。

2.2 田间标记基因(除草剂)植株的筛选

从幼苗长出第 2 片真叶开始,每隔 7 d,在新长出的幼嫩真叶上涂抹 0.025% Basta 除草剂,

经过 20 余天,共涂抹 3 次,筛选确定抗除草剂植株,两个(T_2)后代材料共获得 57 株抗除草剂植株。其中,子叶没有受冷害斑点的 37 株(新陆早 17 号 28 株,石 K5 9 株)材料均抗除草剂。

2.3 转基因植株后代的 PCR 检测分析

验证棉花后代中 *XLPEBP* 基因导入与否,将除草剂处理后表现抗性的 41 株棉株(包括子叶没有受害斑点的 37 株,编号 8 至 44)进一步进行分子检测:8 株未产生扩增片段,34 株抗性植株均产生了扩增片段(图 1)。

在寒流侵袭后,棉花两片子叶均没受害斑点又抗除草剂的 37 株植株中(编号 8 至 44)有 33 株产生了扩增片段,4 株未产生扩增片段。这 4 株未扩增出目标条带,可能是在 PCR 实验中 DNA 模板的质量直接影响 PCR 结果,在 DNA 提取中个别的模板 DNA 提取不理想。具体原因需要进一步研究。

3 小结与讨论

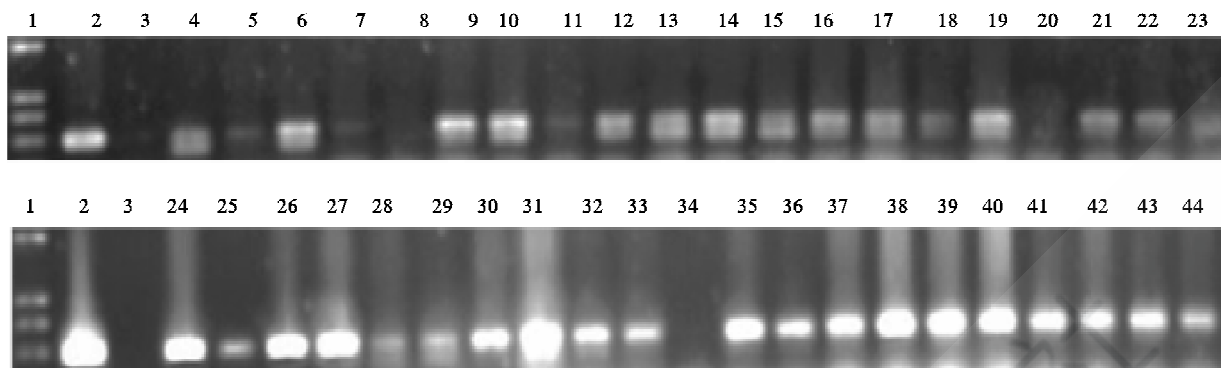
3.1 试验结果表明 *XLPEBP* 基因导入棉花植株体内后,种植到第 2 代(T_2)时,在自然环境条件下,转基因植株的抗冷害能力明显高于对照材料,功能基因有一定的表达作用。

3.2 倪万潮等^[4]提出,在转基因抗虫棉的研究中就可以直接鉴定转基因植株的抗虫性,来达到获得转基因植株的最终目的。而转基因抗病棉的鉴定则可以在人工病圃或天然病圃中直接进行转基因抗病性的筛选。这次直接利用自然环境对转抗寒基因的棉花筛选进行了一次尝试,初步证明是可行的,结果也是直接的。若在目标性状的鉴定顺序为标记基因到生物学,再进行目的基因及其表达的分子鉴定,这样可能对目的基因及其表达的分子鉴定带来更多的方便。本实验先直接针对目标性状的表现型测定,再进行标记基因鉴定,这样双重鉴定后,为目的基因及其表达的分子鉴定省去了大量的重复工作。

表 1 田间调查结果

Table 1 The results from the field

受害等级	调查情况	新 B 17		对照		石 K5		对照	
		株数	占总数 /%	株数	占总数 /%	株数	占总数 /%	株数	占总数 /%
4	两片子叶死亡(重度)	11	5.7	29	29	2	4.3	30	30
3	两片子叶斑点较多但未死亡(中度)	24	12.5	51	51	9	19.1	49	49
2	单片子叶有 2 斑点以上但子叶正常	86	44.8	20	20	14	29.8	21	21
1	子叶有 1~2 个斑点	43	22.4	0	0	13	27.7	0	0
0	没斑点	28	14.6	0	0	9	19.1	0	0



1. DL DNA maker; 2. pXLPEBP 质粒阳性对照; 3 为转化植株阴性对照; 4~44 除草剂抗性植株; 4, 6, 9, 10, 12~19, 21~33, 35~44 PCR 结果为阳性的植株。

图 1 XLPEBP 基因 PCR 扩增

Fig. 1 PCR analysis of transgenic plant

参考文献:

- [1] 龚双军, 李国英, 杨德松, 等. 不同棉花品种苗期抗寒性及其生理指标测定[J]. 中国棉花, 2005, 32(3): 16-17.
GONG Shuang-jun, Li Guo-ying, Yang De-song, et al. Different varieties of cotton seedling cold tolerance and physiological indicators [J]. China Cotton, 2005, 32(3): 16-17.
- [2] 卫秀英, 鲁玉贞, 单长卷. 不同棉花品种的抗低温性研究[J]. 安徽农业科学, 2006, 34(12): 2786-2787.
WEI Xiu-ying, Lu Yu-zhen, Shan Chang-juan. Study on the responses of the different cotton variety seedlings to low temperature[J]. Journal of Anhui Agri, 2006, 34(12): 2786-2787.
- [3] 吕秀娟, 危晓薇, 艾秀莲, 等. 新疆陆地棉转化雪莲 XLPEBP 基因的研究[J]. 新疆农业科学, 2007, 44(1): 47-49.
LÜ Xiu-juan, Wei Xiao-wei, Ai Xiu-lian, et al. Study on cotton cultivar transformed with XLPEBP gene in Xinjiang upland cotton[J]. Xinjiang Agricultural Sciences, 2007, 44(1): 47-49.
- [4] 倪万潮, 郭三堆, 贾士荣. 花粉管通道法介导的棉花遗传转化[J]. 中国农业科技导报, 2000, 2(2): 27-29.
NI Wan-chao, Guo San-wei, Jia Shi-rong. Cotton transformation with the pollen tube pathway[J]. Review of China Agricultural Science and Technology, 2000, 2(2): 27-29. ●