

抗草甘膦基因 *aroA* 转化陆地棉胚性愈伤组织的研究章郑专¹, 汤磊鹏¹, 王钰¹, 何军光², 蔡文珑², 戎均康¹, 李飞飞^{1*}

(1. 浙江农林大学农业与食品科学学院/浙江省农产品品质改良技术研究重点实验室, 浙江 临安 311300; 2. 浙江新安江化工集团股份有限公司, 浙江 建德 311600)

摘要: 为了建立以草甘膦为选择标记的农杆菌介导的棉花胚性愈伤组织转化体系, 本研究将草甘膦抗性基因 (*aroA*) 转化陆地棉 WC 和 YZ-1 的胚性愈伤组织, 分别以 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的草甘膦浓度作为选择压, 经过 2~3 轮筛选, 获得了抗性胚性愈伤组织, 诱导出胚状体并发育成苗。对 T_0 再生植株进行 PCR 及草甘膦抗性检测, 以 WC 和 YZ-1 为受体的转抗草甘膦基因 (*aroA*) 分别获得了 33 株和 10 株阳性植株, 转化效率分别为 82.5% 和 62.5%。该体系为棉花遗传转化提供了实验方法, 获得的抗草甘膦棉花为棉花育种提供种质资源; 同时抗除草剂基因还可以作为筛选标记与其它基因串联在一起转化棉花, 进行基因功能验证。

关键词: 草甘膦; *aroA* 基因; 胚性愈伤组织; 陆地棉; 农杆菌介导法转化

中图分类号: S562.035.3 **文献标志码:** A

文章编号: 1002-7807(2014)03-0237-07

Study on Transformation of Glyphosate-resistant Gene *aroA* into Embryogenic Calli of Upland Cotton via *Agrobacterium tumefaciens*Zhang Zhengzhan¹, Tang Leipeng¹, Wang Yu¹, He Junguang², Cai Wenlong², Rong Junkang¹, Li Feifei^{1*}

(1. School of Agriculture and Food Science, Zhejiang Agriculture and Forestry University / The Key Laboratory for Quality Improvement of Agricultural Products of Zhejiang Province, Lin'an, Zhejiang 311300, China; 2. Zhejiang Xin'an Chemical Industrial Group Co., Ltd, Jiande, Zhejiang 311600, China)

Abstract: For producing the glyphosate-resistant cotton plants, we developed an *Agrobacterium*-mediated transformation system from embryogenic calli (EC) in which glyphosate was used as a selective agent. In this study, glyphosate-resistant gene *aroA* was transformed to embryogenic calli (EC) of *Gossypium hirsutum* L. cv. WC and YZ-1. And the calli were transferred onto culture medium, respectively, with 5 and $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ glyphosate for selection. After two or three cycles of glyphosate-resistant screening, resistant EC was obtained and transgenic plantlets were regenerated from embryoid and grafted in greenhouse. Glyphosate-resistant positive plants were identified by PCR analysis and glyphosate-resistant screening. In this study, 33 and 10 glyphosate-resistant positive plants were obtained from WC and YZ-1, respectively, and the corresponding transformation efficiency was 82.5% and 62.5%. This transformation system provides not only an efficient method for cotton genetic transformation but also important germplasm resources for cotton breeding. Meanwhile, the selection marker gene *aroA* can be transformed into cotton genome together with other target gene for functional analysis.

Keywords: Glyphosate; *aroA* gene; embryogenic calli (EC); *Gossypium hirsutum* L.; *Agrobacterium*-mediated transformation

棉花在生长过程中经常受到多种生物胁迫和非生物胁迫危害, 杂草是生物危害中最严重的因子之一。棉田杂草不仅与棉花争夺水肥, 而且为病虫提供栖息地, 传播病虫害, 严重影响棉花生长, 造成棉花明显减产。草甘膦是具有高效、低

毒、低残留、无污染以及杂草不易产生抗性等优点的综合性能^[1], 因此, 广泛应用于玉米、大豆和棉花播种前或出苗后的田间定向处理^[2]。草甘膦专一性地抑制 5-烯醇丙酮莽草酸-3-磷酸合酶 (EPSP 合酶) 的活性, 阻断芳香族氨基酸和一些

收稿日期: 2013-07-03 **作者简介:** 章郑专(1991-), 男, 农学学士; * 通讯作者, lifei-fei@163.com

基金项目: 浙江省教育厅科研项目(Y201120618); 浙江农林大学科研启动项目(2009FR032); 农业部转基因重大专项(2009ZX05009-028B); 浙江省科技计划项目钱江人才计划(2010R10089); 浙江农林大学农业与食品科学学院大学生创新项目(20120112)

芳香化合物的生物合成,使芳香族氨基酸缺乏,蛋白质合成受阻,从而扰乱生物体的正常代谢而使其死亡^[3]。

美国孟山都公司在1997年首次推出抗除草剂棉花,将抗除草剂基因 *CP4-EPSPS* 通过农杆菌介导法转入珂字棉 312,使转基因棉花对草甘膦产生抗性;该基因只是作为目的基因,没有作为选择标记^[4],之后抗除草剂棉花在美国迅速推广种植。国内也开展了抗草甘膦基因转化棉花的研究,仅有少量的报道。谢龙旭等^[5]采用草甘膦转化陆地棉中棉所 35 下胚轴,获得抗性植株。赵福永等^[6]用草甘膦转化陆地棉栽培品种石远 321 的下胚轴,获得 38 株有 *aroAM12* 和 *Bts1m* 基因植株。他们都选用草甘膦作为选择标记,但是选择有效浓度不同,分别为 $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $13.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,即没有明确草甘膦选择转化棉花的有效浓度。本研究以陆地棉 WC 和 YZ-1 (本实验室已经成功获得通过组织培养再生的陆地棉材料)胚性愈伤组织作为受体,分别筛选出最适的草甘膦转化浓度,获得抗除草剂转基因棉花,建立了以胚性愈伤组织为受体、以抗草甘膦为选择标记的转化体系,对抗除草剂转基因棉花的培育具有极其重要的指导意义。

1 材料和方法

1.1 材料

陆地棉材料 WC (山西农科院棉花研究所吴慎杰提供)和 YZ-1(杭州师范大学孙玉强提供),具有草甘膦抗性的 pM3301UbiSpAro 载体和纯度为 99% 的草甘膦 (浙江新安化工提供),LBA4404 农杆菌菌株。

1.2 方法

1.2.1 载体构建。新安江化工提供的具有草甘膦抗性基因 *aroA* 的 pM3301UbiSpAro 表达载体 (图 1),将 ubi 启动子换成双子叶植物高效表达的 CaMV35s 启动子。用 *Hind*III 和 *Pst*I 进行酶切、连接和转化等,获得 T-DNA 区只有 CaMV 35s 启动 *aroA* 基因的植物表达载体。

1.2.2 陆地棉材料胚性愈伤组织的诱导。陆地棉种子 WC 和 YZ-1 表面消毒,获得无菌苗,选取下胚轴,放在愈伤组织诱导的培养基上[MS+0.1

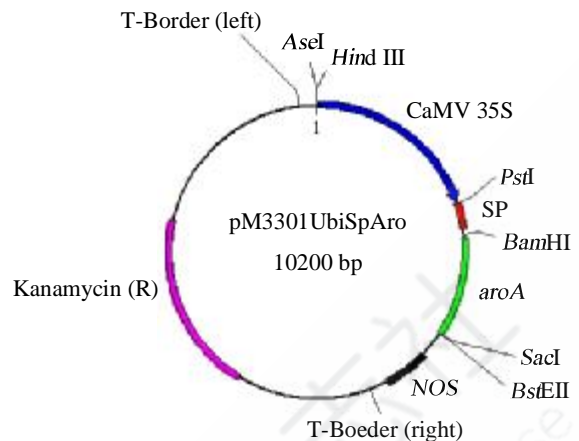


图 1 含有 *aroA* 基因的表达载体图

Fig. 1 Map of plasmid pM3301UbiSpAro vector holding *aroA* gene

$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-D+0.1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ KT+30 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 葡萄糖 + 2.0 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ phytigel+1.1 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ MgCl_2 (WC); MS+0.1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-D+0.2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IBA+0.1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ KT+30 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 葡萄糖 + 2.0 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ phytigel+1.1 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ MgCl_2 (YZ-1)]进行愈伤组织诱导。约 2 个月后,愈伤组织长至 3~5 mm 时转接到胚性愈伤组织诱导的培养基 (MS+30 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 葡萄糖 + 2.0 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ phytigel+1.1 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ MgCl_2 +1.9 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ KNO_3) 上, 2~3 个月诱导产生胚性愈伤组织;将胚性愈伤组织进一步增殖,待转化用。

1.2.3 草甘膦浓度筛选。将诱导获得的 WC 和 YZ-1 胚性愈伤组织接种在分别含有 2.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 15 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 草甘膦的胚性愈伤组织诱导培养基上,约 20 d 后,观察胚性愈伤组织的增殖数量和生理状态,选择合适浓度的草甘膦作为选择压。

1.2.4 草甘膦为筛选标记的棉花遗传转化体系。将含有 CaMV35s-*aroA* 基因载体的农杆菌菌液培养至 OD 值为 0.6~0.8,侵染陆地棉的胚性愈伤组织 20 min,期间不停晃动,用滤纸吸干多余的菌液,放在铺有滤纸的共培养培养基 MS1 (MS+0.1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-D+0.1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ KT+30 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 葡萄糖 + 2.5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ phytigel+1.1 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ MgCl_2 + 1.9 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ KNO_3 +500 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ cef+5~10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ glyphosate) 上暗培养 2 d,培养后的胚性愈伤组织用含有 500 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 头孢霉素的无菌水洗 2 次,用滤纸吸干水分,转接到抗性选择培养基 MS2 (MS+0.1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-D+0.1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ KT+30 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 葡萄糖 + 2.5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$

phytagel+1.1 g·L⁻¹ MgCl₂+1.9 mg·L⁻¹ KNO₃) 上筛选 2~3 次, 每 25 d 1 次。选择后转接在分化培养基 MS3 (MS-NH₄NO₃+0.5 mg·L⁻¹ 天冬酰胺 +1.0 mg·L⁻¹ 谷氨酰胺 +30 g·L⁻¹ 葡萄糖 +2.5 g·L⁻¹ phytagel+1.1 g·L⁻¹ MgCl₂) 上诱导胚状体的产生, 同时取一部分抗性愈伤组织提取 DNA, PCR (Polymerase chain reaction) 检测 *aroA* 基因, 淘汰没有目的片段的胚性愈伤组织。胚状体进一步发育, 长出真叶, 转接在生根培养基 MS4 (MS+1.0 mg·L⁻¹ NAA+30 g·L⁻¹ 葡萄糖 +2.5 g·L⁻¹ phytagel+1.1 g·L⁻¹ MgCl₂) 上, 使小苗长出大量的根。待小苗长到 4~5 片真叶, 温室嫁接成活。

1.2.5 PCR 分子检测。利用 CTAB 法提取抗性胚性愈伤组织和 T₀ 植株叶片的 DNA, 用 *aroA* 基因的引物 (F: ACCGCCTGCTACTTCCTGTCCC, R: TGTGGTCGTCGTGCGGGTTC) 进行 PCR 检测, 扩增的目的片段长度约为 400 bp。

1.2.6 T₀ 植株的田间草甘膦筛选。将阳性植株嫁接成活, 用浸泡有浓度分别为 0.5 g·L⁻¹、1 g·L⁻¹ 和 2 g·L⁻¹ 草甘膦的棉球蘸取对照和转基因植株展开的叶片, 5 d 后观察涂抹草甘膦的叶片颜色变化。

2 结果和分析

2.1 筛选出用做转化的草甘膦最适浓度

从 WC 和 YZ-1 下胚轴诱导出的胚性愈伤组织接种在含有 2.5 mg·L⁻¹、5 mg·L⁻¹、10 mg·L⁻¹ 和 15 mg·L⁻¹ 草甘膦 4 个浓度的培养基中, 每个浓度接 3 瓶, 每瓶取 3 个点接种愈伤组织, 20~25 d 后观察胚性愈伤组织的状态。如图 2 所示, YZ-1 的胚性愈伤组织在 2.5 mg·L⁻¹ 草甘膦可以大量增殖(图 2-A), 没有起到选择的效果; 在 5 mg·L⁻¹ 草甘膦的选择压下少部分胚性愈伤组织变褐(图 2-B), 大部分还能生长, 选择效力很低; 而在 15 mg·L⁻¹ 草甘膦的选择压下胚性愈伤组织全部变成黑褐色(图 2-D), 表明选择压过大; 在 10 mg·L⁻¹ 草甘膦培养基上胚性愈伤组织大部分变褐(图 2-C), 一少部分保持正常状态, 表明选择效果较好, 因此本实验选取 10 mg·L⁻¹ 草甘膦作为 Yz-1 的选择浓度。WC 的胚性愈伤组织在含 2.5 mg·L⁻¹ 草甘膦的培养基上均能正常生长(图 2-E), 没有

起到选择的作用; 在 10 mg·L⁻¹ 和 15 mg·L⁻¹ 草甘膦的培养基上愈伤组织基本变黑变褐(图 2-G 和 H), 表明选择压太大; 而在 5 mg·L⁻¹ 的草甘膦培养基上大部分愈伤组织变褐(图 2-F), 只有少部分还能继续生长, 达到选择效果, 说明 5 mg·L⁻¹ 草甘膦可以作为 WC 的选择浓度。

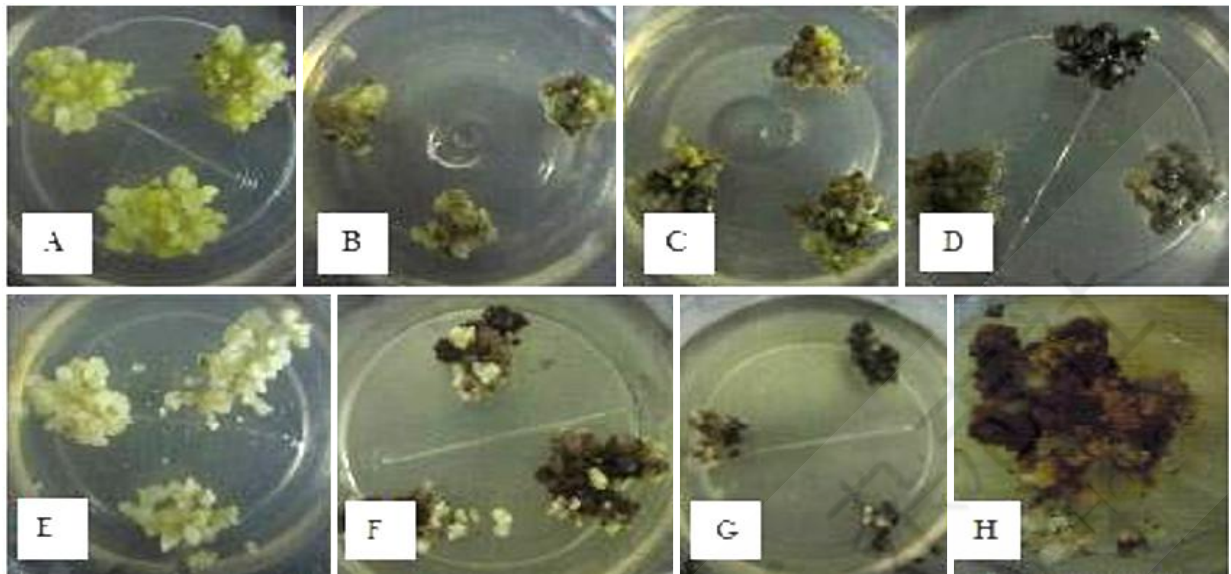
2.2 抗草甘膦 *aroA* 基因转化棉花和再生

用陆地棉材料 YZ-1 和 WC 中诱导获得的胚性愈伤组织作为受体, 利用农杆菌介导法转化 *aroA* 基因。图 3 是以 WC 的胚性愈伤组织为受体棉花转化再生过程。首先用农杆菌工程菌液侵染 WC 胚性愈伤组织(图 3-A), 共培养 2 d 后的胚性愈伤组织(图 3-B)接种在 MS2 培养基上, 经过 2 次抗性筛选(每继代 1 次 25 d), 胚性愈伤组织会发黑和褐化, 周边长出新的抗性愈伤组织(图 3-C); 挑取新生的胚性愈伤组织, 转接于铺有滤纸的 MS3 培养基上, 1~2 个月后出现胚状体(图 3-D)。这时把胚状体和胚性愈伤组织分离, 继代在 MS3 培养基上, 直到发育成小植株(图 3-E)。将长有真叶的小苗单独插入 MS4 培养基中, 使其长出大量的根(图 3-F), 供植株从培养基吸收营养。将 PCR 检测的阳性植株在温室嫁接, 通过精细管理使其成活(图 3-G)。

2.3 抗性愈伤组织和转基因植株的 PCR 检测

以 YZ-1 胚性愈伤组织为受体进行农杆菌转化, 2 轮抗性选择后, 获得 30 个转化的抗性愈伤组织系; 提取 DNA, 进行 *aroA* 基因扩增, 23 个胚性愈伤组织系能扩增出对应的条带, 转化效率为 82.5%, 说明 10 mg·L⁻¹ 草甘膦的选择压是可行的。以 WC 为受体转基因试验获得了 124 个转化的抗性愈伤组织系, PCR 检测发现 106 个愈伤组织系能扩增出对应条带, 18 个未扩增出条带, 阳性率为 85.5%, 以草甘膦 5 mg·L⁻¹ 作为选择浓度达到很好的效果。图 4 是 PCR 随机检测以 WC 为受体的 14 个愈伤组织系的结果, 7、8、9、13 和 16 泳道没有扩增出对应条带, 其它泳道均扩增出和阳性对照同一位置的条带, 初步证明目的基因已转入棉花的基因组中。

本实验以 YZ-1 为受体获得了 16 株转基因小苗, PCR 检测表明 10 株带有目的基因, 转化效率为 62.5%。以 WC 为受体获得了 40 株转基因

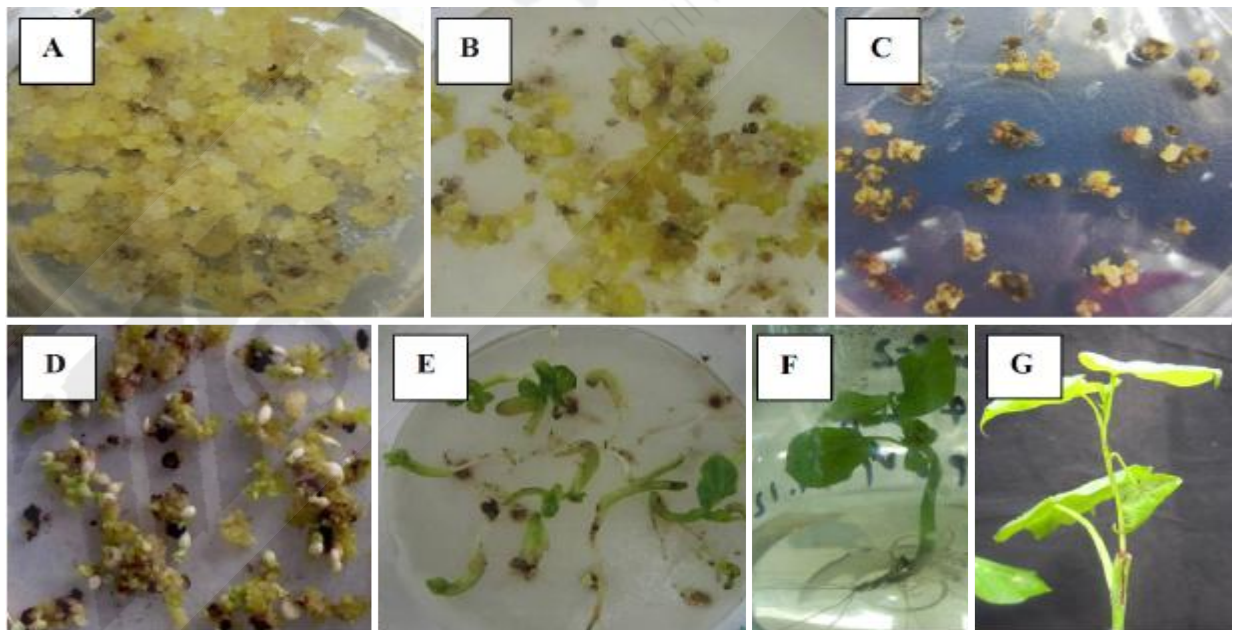


A, B, C and D: 分别是在 $2.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $5.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $15 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 草甘膦的培养基上培养 20 d 后 YZ-1 的胚性愈伤组织; E, F, G 和 H: 分别是在 $2.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $5.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $15 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 草甘膦的培养基上培养 20 d 后 WC 的胚性愈伤组织。

A, B, C and D: EC morphologies of YZ-1 cultured on mediums containing $2.5, 5.0, 10, 15 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ glyphosate, respectively; E, F, G and H: EC morphologies of WC cultured on medium with $2.5, 5.0, 10, 15 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ glyphosate, respectively.

图 2 含有不同浓度草甘膦的培养基上培养 20 d 后 YZ-1 和 WC 的胚性愈伤组织

Fig. 2 EC morphologies of cotton varieties YZ-1 and WC after cultured for 20 d on the medium containing different concentrations of glyphosate



A: 用于转化的 WC 胚性愈伤组织; B: 共培养 2 d 后的胚性愈伤组织; C: 三轮选择后的胚性愈伤组织; D: 由胚性愈伤组织产生的胚状体; E: 胚状体发育而成的幼苗; F: 再生小苗; G: 嫁接成活的植株。

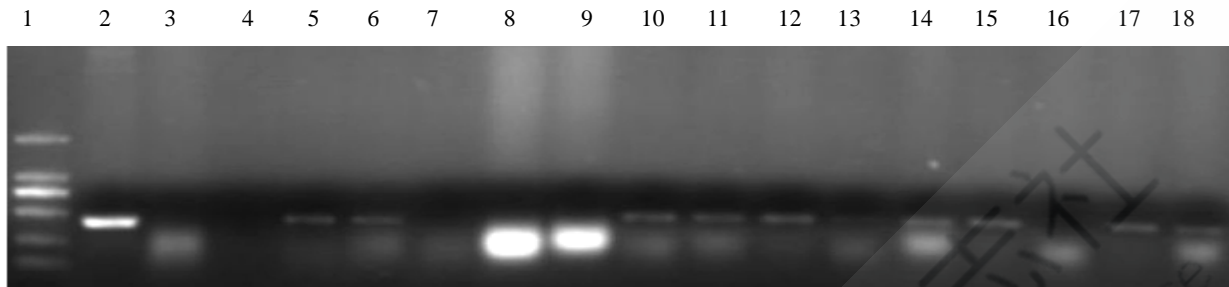
A: Embryogenic callus of WC for transformation; B: Embryogenic callus transformed for 2 d; C: Glyphosate-resistant EC after the three rounds of selection culture; D: A mass of embryos; E: Seedlings regenerated from a cluster of embryos; F: A regenerated plantlet; G: A grafted regenerated plant.

图 3 *aroA* 基因转化 WC 胚性愈伤组织的各个阶段

Fig. 3 The various stages of transforming *aroA* gene into embryogenic calli of WC

小苗,其中 33 株能扩增出目的基因条带,阳性率为 82.5%。图 5 是 WC 为受体的转基因小苗的 PCR 扩增结果,除 4、5、6 和 9 号植株没有扩增出

和阳性对照对应的条带,所检测的其他再生植株均为 PCR 阳性植株,该结果初步表明目的基因已经整合进这些植株的基因组。

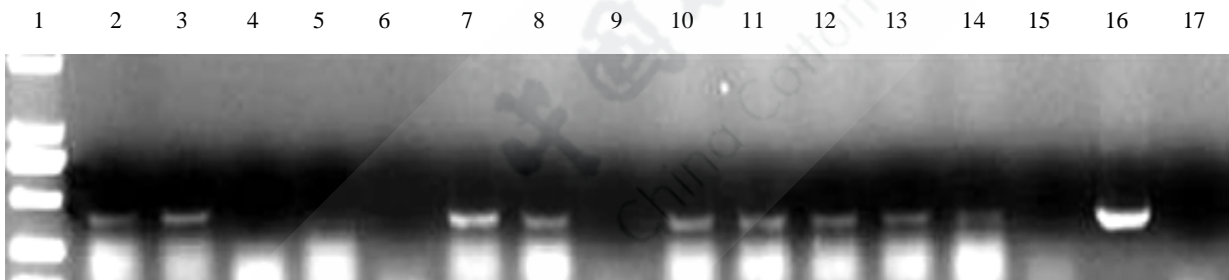


泳道 1:分子量标记 DL2000;泳道 2:是含有 *aroA* 基因的质粒,作为阳性对照;泳道 3:受体 WC 胚性愈伤组织,作为阴性对照;泳道 4:空白对照;泳道 5-18:检测的抗性愈伤组织。

Lane 1: Molecular weight markers DL2000; lane 2: The plasmid which contains *aroA* gene as the positive control; lane 3: Untransformed EC of WC as negative control; lane 4: Water as blank control; lanes 5-18: Transformed EC lines showing amplification of the 400 bp specific sequence of *aroA*.

图 4 对 WC 的抗性愈伤组织系进行 *aroA* 基因的 PCR 检测

Fig. 4 Detection of *aroA* gene in glyphosate-resistant EC lines by PCR analysis



泳道 1:分子量标记 DL2000;泳道 2-14:检测的转基因植株。泳道 2、3、7、8、10、11、12、13、14 是 *aroA* 基因的阳性株,泳道 4、5、6、9 没有扩增出目的片段;泳道 15:空白对照;泳道 16:含有 *aroA* 基因质粒(阳性对照);泳道 17:未转化植株(阴性对照)。

Lane 1: molecular weight markers DL2000; Lanes 2-14: The plants for detection. Lanes 2, 3, 7, 8, 10-14 showing positive plants for *aroA*, Lanes 4-6, 9 showing no amplified the target gene; Lane 15: water as blank control; Lane 16: The plasmid which contains *aroA* gene as the positive control; Lane 17: The untransformed plant as negative control.

图 5 转基因棉花 *aroA* 基因的 PCR 检测

Fig. 5 The PCR detection for *aroA* in transgenic plants

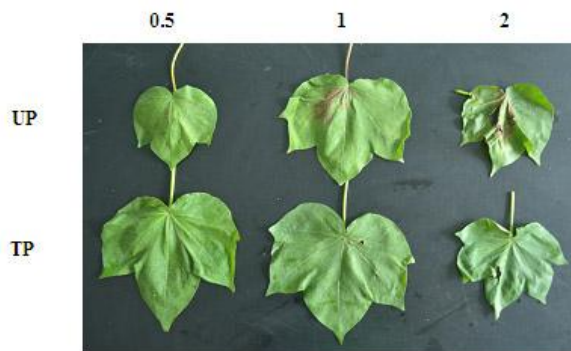
2.4 T_0 植株叶片的草甘膦抗性检测

将蘸有不同浓度草甘膦的棉球粘附在转基因棉花的叶片上,5 d 后,转基因和非转基因棉花出现了明显不同的反应。在低浓度($0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)草甘膦处理时,未转化棉株叶片上出现枯且褐色的斑点,在 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 草甘膦处理后,出现较大面积枯且褐色的斑,在高浓度 $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 草甘膦处理后大面积变枯且严重灼伤(图 6)。但转基因棉株叶片在 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 草甘膦处理后仍无变化(图 6),表明转基因棉花抗性提高了约 4 倍。

3 讨论

3.1 不同陆地棉品种胚性愈伤组织具有不同的草甘膦抗性

已有文献报道了将草甘膦抗性基因转入棉花的下胚轴,并获得抗草甘膦转基因棉花。如谢龙旭等^[9]采用 $60 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($10.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 草甘膦转化陆地棉中棉所 35 的下胚轴,获得了抗性植株。赵福永等^[6]用 $80 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($13.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 草甘膦转化陆地棉栽培品种石远 321 的下胚轴,获得 38



UP: 未转化植株叶片(对照); TP: 转基因植株。从左到右蘸取草甘膦的浓度分别是 0.5、1 和 2 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

UP: The leaves of untransformed plant; TP: The leaves of transgenic plant. The concentration of glyphosate dipped from left to right is 0.5, 1 and 2 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively.

图 6 转基因植株叶片的草甘膦抗性检测

Fig. 6 Glyphosate-resistant analysis of the leaves for transgenic plants

株转化有 *aroAM12* 和 *Bts1m* 基因的植株。他们用的草甘膦选择浓度略有不同。本实验发现不同陆地棉品种胚性愈伤组织对草甘膦具有明显不同的抗性。YZ-1 对草甘膦有较强的抗性, $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 草甘膦筛选时, 对转化后的愈伤组织选择效率最好, 为 82.5%, 转基因苗的阳性率为 62.5%; 而 WC 对草甘膦较为敏感, $5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 草甘膦的选择效果最好, 胚性愈伤组织的选择效率是 85.5%, 再生苗的阳性率为 82.5%。YZ-1 用的是 $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 草甘膦来进行筛选, 和谢龙旭等^[9]报道的草甘膦浓度基本相同; 而 WC 只用 $5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 也达到类似的选择效果。由此可见, 不同基因型的陆地棉品种对草甘膦具有明显不同的抗性 or 耐性。选取合适浓度的草甘膦进行选择, 是成功转化的关键之一。

3.2 以胚性愈伤组织作为转化受体的转基因棉花的变异

用农杆菌转化棉花胚性愈伤组织, 可以缩短转化周期, 减少工作量, 提高转化效率。一些研究者先后用农杆菌转化胚性愈伤获得转基因棉花^[7-11]; Jin Shuangxia 等^[12]以 YZ-1 胚性愈伤组织为受体, 对农杆菌转化棉花胚性愈伤转化效率的影响因素做了研究; Wu Shenjie 等^[13]选用泗棉 3 号胚性愈伤组织为受体, 对卡那霉素选择培养和再生方法做了优化, 提高了转化效率。但是他们

的再生植株变异率较高。本研究采用胚性愈伤组织作为转化受体, 为有效减少再生植株的变异率, 采取以下措施: (1) 缩短抗性选择时间, 加强选择强度。经过 2 次抗性选择, 每次约 25~30 d, WC 选 $5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的草甘膦、YZ-1 选 $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的草甘膦作为选择浓度。转化后的胚性愈伤组织经过 2 轮的抗性筛选, 经 PCR 检测发现胚性愈伤组织的阳性率均达 80% 以上, 已经达到了很好的选择效果; (2) 及时挑出最新诱导出的、有光泽、黄绿色、疏松、细颗粒状的胚性愈伤组织, 增殖一定数量, 用于转化; (3) 减少继代次数。从转化到获得再生苗用时 4~5 个月, 期间继代 5~6 次; (4) 胚状体到成苗这个阶段, 对培养瓶增加透气强度和培养基表面铺滤纸这两种胁迫进行了组合, 大大提高了再生的效率。最有效的是透气, 它对胚状体形成、成熟和萌发成苗均有促进效应, 研究表明透气强度 40%~65% 效果最为明显^[13]; 结合使用铺滤纸(图 3-D 和 E) 可以很好地减少或避免胚性愈伤到再生植株的一系列问题(如再生频率低、畸形胚、畸形苗和玻璃化等)。胚状体分化培养基上铺滤纸不仅可造成干旱胁迫^[14], 有利于胚性愈伤进一步分化成胚状体和胚状体的成熟, 而且还有利于生根和成苗。本实验统计发现再生植株的变异率低于 20%。为了进一步降低再生植株的变异率, 可以尝试选用高频率再生的陆地棉品系作为受体, 结合营养和微环境调节进行代谢胁迫, 来提高成胚频率和降低畸形胚频率。

4 结论

通过筛选草甘膦最适浓度, 利用 PCR 对抗性愈伤组织进行早期检测, 缩短抗性选择时间, 加强选择强度, 减少继代次数和结合代谢胁迫等手段, 成功建立了以抗草甘膦基因为选择标记的农杆菌介导棉花胚性愈伤组织高效转化体系, 整个转化周期 5~6 个月。经 PCR 及草甘膦抗性检测, 获得抗 $2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 草甘膦的 T_0 转基因植株, WC 和 YZ-1 的阳性率分别为 82.5% 和 62.5%。该体系为棉花遗传转化提供了试验方法, 得到的抗草甘膦棉花为棉花育种提供了种质资源, 同时使抗草甘膦基因作为选择标记基因与其他基因串连在一起转化棉花进行目的基因的功能验证成为可能。

参考文献:

- [1] Franz J E, Mao M K, Sikorski J A. Glyphosate: a unique global herbicide[M]. Washington DC, USA: American Chemical Society, 1997.
- [2] 任不凡, 雷崧僧. 草甘膦及研究进展[J]. 农药, 1998, 37(7): 1-3.
Ren Bufan, Lei Songseng. Glyphosate and its development [J]. Pesticide, 1998, 37(7): 1-3.
- [3] Padgett S R. In herbicide-resistant crops: Agricultural, environmental, economic, regulatory, and technical aspects [M]. Boca Raton, FL: CRC Press, 1996: 53.
- [4] Nida D L, Kolacz K H, Buehler R E, et al. Glyphosate-tolerant cotton: genetic characterization and protein expression[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1996, 44(7): 1960-1966.
- [5] 谢龙旭, 李云锋, 徐培林. 根癌农杆菌介导的转 *aroAM12* 基因棉花植株的草甘膦抗性[J]. 植物生理与分子生物学学报, 2004, 30(2): 173-178.
Xie Longxu, Li Yunfeng, Xu Peilin. Glyphosate-resistant cotton (*Gossypium hirsutum* L.) transformed with *aroAM12* gene via *Agrobacterium tumefaciens*[J]. Journal of Plant Physiology and Molecular Biology, 2004, 30(2): 173-178.
- [6] 赵福永, 谢龙旭, 田颖川, 等. 抗草甘膦基因 *aroAM12* 及抗虫基因 *Bt1m* 的转基因棉株[J]. 作物学报, 2005, 31(1): 108-113.
Zhao Fuyong, Xie Longxu, Tian Yingchuan, et al. Glyphosate-resistant and bollworm-resistant transgenic cotton plants with the *aroAM12* and *Bt1m* genes[J]. Acta Agronomica Sinica, 2005, 31(1): 108-113.
- [7] Satyavathi V, Prasad V, Gita Lakshmi B, et al. High efficiency transformation protocol for three Indian cotton varieties via *Agrobacterium tumefaciens*[J]. Plant Science, 2002, 162(2): 215-223.
- [8] 陈妹幼, 张献龙, 聂以春, 等. 陆地棉体细胞再生植株技术的改进研究[J]. 棉花学报, 2002, 14(6): 344-347.
Chen Meiyu, Zhang Xianlong, Nie Yichun, et al. Improvement of plant regeneration via somatic embryogenesis in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.)[J]. Cotton Science, 2002, 14(6): 344-347.
- [9] 陈妹幼, 聂以春, 张献龙. 转化棉花胚性愈伤可以有效缩短转基因周期[J]. 华中农业大学学报, 2002, 21(5): 406-408.
Chen Meiyu, Nie Yichun, Zhang Xianlong. A time-saving approach to genetic transformation in cotton by transforming embryogenic callus[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2002, 21(5): 406-408.
- [10] Leeavathi S, Sunnichan V, Kumria R, et al. A simple and rapid *Agrobacterium*-mediated transformation protocol for cotton (*Gossypium hirsutum* L.): embryogenic calli as a source to generate large numbers of transgenic plants[J]. Plant Cell Reports, 2004, 22(7): 465-470.
- [11] Han I. *Agrobacterium*-mediated transformation of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) via vacuum infiltration[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2004, 22(3): 279-288.
- [12] Jin Shuangxia, Zhang Xianlong, Liang Shaoguang, 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.
- [13] Wu Shenjie, Wang Haihai, Li Feifei, et al. Enhanced *Agrobacterium*-mediated transformation of embryogenic calli of upland cotton via efficient selection and timely subculture of somatic embryos[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2008, 26(3): 174-185.
- [14] Kumria R, Sunnichan V G, Das D K, et al. High frequency somatic embryo production and maturation into normal plants in cotton (*Gossypium hirsutum*) through metabolic stress[J]. Plant Cell Report, 2003, 21(7): 635-639. ●