

# 利用激光微束穿刺法 获得抗黄萎病转基因棉花的研究

刘桂珍<sup>1</sup> 蓝海燕<sup>2</sup> 田颖川<sup>3</sup> 李树诚<sup>4</sup> 乐锦华<sup>5</sup> 王兰岚<sup>1</sup> 陈正华<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 中国科学院遗传研究所 北京 100101;

<sup>2</sup> 新疆农科院经济作物研究所 乌鲁木齐 830000; <sup>3</sup> 中国科学院微生物研究所 北京 100080;

<sup>4</sup> 新疆维吾尔自治区种子总站 乌鲁木齐 830000; <sup>5</sup> 新疆石河子大学农学院 石河子 832003

**提要** 通过激光微束穿刺法,将 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶及几丁质酶基因双价植物表达载体 pBLGC 导入棉花幼胚。转化一代棉花幼苗用蘸根法进行抗黄萎病筛选,将存活的苗移入病圃进行了卡那霉素(Kan 1%)抗性测定。结果表明,在移栽的 29 株幼苗中,有 9 株表现出明显的 Kan 抗性,对 9 株抗 Kan 植株进行了 PCR 检测,结果显示,其中 7 株表现为阳性。病圃中的 T1 代转基因植株在经历了黄萎病发病高峰期后,7 株 PCR 阳性植株表现明显抗病,并已正常开花结铃,其他 T1 代植株及对照植株全部因后期发病死亡。这初步证明外源基因已整合到棉花基因组中,且使转基因植株对黄萎病表现出一定的抗性。

**关键词** 激光微束, $\beta$ -1,3-葡聚糖酶基因,几丁质酶基因,棉花幼胚,黄萎病

棉花是我国主要的经济作物,在国民经济中具有重要地位。棉花病害十分严重,尤其是黄、枯萎病等真菌性病害,严重影响着棉花的产量及品质。目前在生产中采取抗病品种与栽培措施相结合的方法以减轻危害,我国在抗枯萎病育种方面已取得显著成效。但由于缺乏黄萎病抗源,此方面的育种进展较慢。同时,由于黄、枯萎病菌不同,且致病机理复杂,使得兼抗黄、枯萎病为一体的品种更为少见(在我国黄、枯萎病常常混合发生)。利用基因工程技术将外源抗真菌病基因导入棉花为抗性育种提供了新途径。 $\beta$ -1,3-葡聚糖与几丁质为大多数真菌细胞壁的主要成分,它们可被 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶和几丁质酶水解,将这两种基因分别或同时导入烟草中均表现出较强的抗真菌性。但将其导入棉花中是否对黄、枯萎病有抑制作用至今还未见报道。

王兰岚、周奕华等采用激光微束穿刺法将外源基因导入小麦、百脉根、油菜、苹果等植物成功地获得转基因植株<sup>[1~4]</sup>。我们又利用激光微束穿刺法将含有 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶及几丁质酶基因的双价植物表达载体 pBLGC 成功地导入棉花幼胚获得转基因抗病棉。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

植物受体材料为棉花品种豫棉 9 号和南抗 2 号。

含 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶与几丁质酶基因的双价植物表达载体 pBLGC 由中国科学院遗传研究所与中国科学院微生物所共同构建(图 1)。

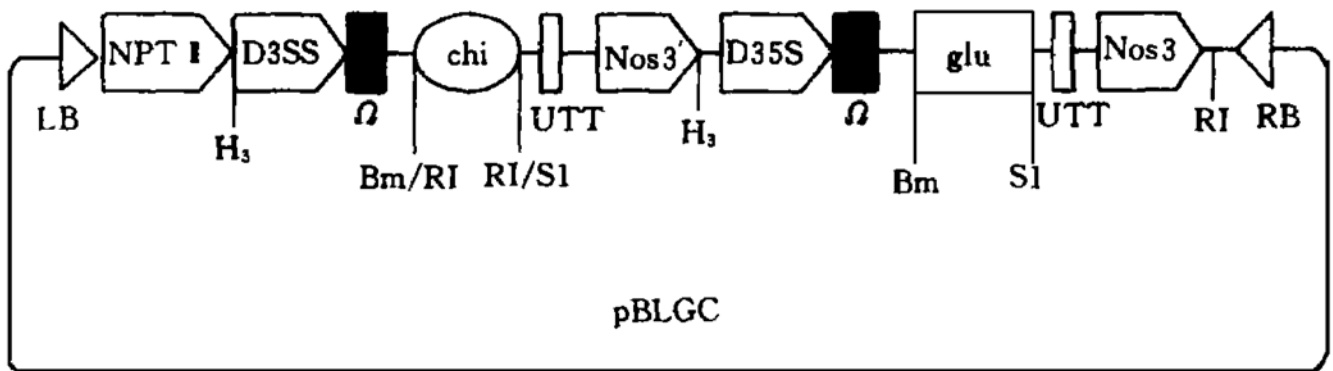


图 1 双价植物表达载体 pBLGC 的结构图

Fig.1 Structure of plant bivalent expression vector pBLGC

黄萎病菌 (*Verticillium albo-atrum*) 购自中国科学院微生物研究所。

## 1.2 PCR 引物

检测 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶 cDNA 引物:

5'端引物: 5' > GC GGATCC GACCATGG CTGCTATCACACTCC < 3'

3'端引物: 5' > CG GTCGAC CTCACATCTCACTTACGAGA < 3'

检测几丁质酶 cDNA 引物:

5'端(CaMV35S 启动子)引物: 5' > CTGACGTAAGGGATGACGC < 3'

3'端引物: 5' > GGGATGACAGTGTCCTGAG < 3'

参照分子克隆实验手册<sup>[5]</sup>进行质粒的大量制备。

## 1.3 激光照射前材料的预处理

摘取棉花授粉后 40~50 天的棉桃, 用 75% 酒精表面消毒 3~5 min, 然后在无菌条件下取出幼胚, 用高渗液浸泡幼胚 2~3 h。高渗液配制参考 Weber 等的方法<sup>[6]</sup>, 其成分是 10 mM Tris, pH 7.2, 0.7M 山梨糖醇。然后去掉高渗液, 加入新鲜的 MS 培养液洗一次, 置于 Rose 小室中, 加入 100  $\mu$ L 质粒 DNA (浓度为 100  $\mu$ g/mL), 封闭小室。

## 1.4 激光微束照射条件

照射所用激光微束仪由中国科学院遗传研究所和重庆京渝生物所共同研制。激光微束照射装置为 Nd-YAG 四倍频脉冲激光显微照射系统。输出波长有 1.06  $\mu$ m, 0.53  $\mu$ m, 0.35  $\mu$ m, 0.26  $\mu$ m。使用波长为 0.35  $\mu$ m, 脉宽为 15 ns 的激光照射, 输出能量大于 2 mJ。光斑直径为 0.5~1.0  $\mu$ m。激光照射具体操作参照文献[2]。

## 1.5 照射后材料的处理

激光照射的幼胚转入分化培养基: MS 基本培养基 + 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.5 mg/L + VB<sub>1</sub> 1.0 mg/L + KT 1.0 mg/L + 活性炭 2 g/L + 蔗糖 30 g/L + 琼脂 6.5 g/L, pH 5.8。在 25~26  $^{\circ}$ C 培养箱中暗培养 2~3 天, 然后转入光照培养室 (温度 25~28  $^{\circ}$ C, 光强 2000Lx, 每天光照时间 10~12 h), 待幼胚发育成正常的小苗后, 转入生根培养基诱导生根: MS 基本培养基 + 生根粉 1.0 mg/L + 活性炭 2.0 g/L + 蔗糖 30 g/L + 琼脂 6.5 g/L, pH 值 5.8。当小苗长至 4~5 cm 时, 选根系发达、健壮的棉苗移至花盆中。

## 1.6 转化子代棉的抗病鉴定

### 1.6.1 黄萎病菌的培养

在液体土豆培养基(PDA 培养基: 1000 mL 土豆提取液; 葡萄糖 20 g; 琼脂 20 g)中接入适量的菌体后, 25~28℃, 培养 8~10 天后, 加入原体积 1/5~1/4 的无菌水, 用玻璃棒将菌丝体搅碎后, 直接用于棉苗接菌。

### 1.6.2 棉苗蘸根接菌法

将塑料育苗袋所育棉苗底部的土稍抖去, 使其根系暴露, 并稍做伤根处理后, 在备好的菌液中浸泡约 1 min, 处理后的棉苗在 25~28℃ 的条件下培养, 注意保湿, 棉苗接菌约 10 天后观察记载。

### 1.6.3 抗 Kan 测定

用 1% 浓度的 Kan 溶液涂抹在棉株上层叶片上, 4~5 天后观察记录其颜色变化, 叶片无变化的为抗 Kan 植株, 而变黄或枯黄的则为不抗 Kan 植株。

## 1.7 棉花抗 Kan 转化植株的初步分子检测

### 1.7.1 棉花总 DNA 的微量提取

参照傅荣昭等<sup>[7]</sup>的方法稍有改进, 现将改进的部分具体介绍如下:

将所得 DNA 溶液再从 DNA 提取第二步开始(即加入 3 倍体积提取缓冲液), 重复全过程, 最后将 DNA 沉淀溶于 50 μL ddH<sub>2</sub>O, 置 -20℃ 备用。

### 1.7.2 抗 Kan 转化植株的 PCR 检测

取制备的总 DNA 100~500 ng, 分别对 β-1, 3-葡聚糖酶及几丁质酶基因进行检测, 用标准程序进行 PCR 扩增, 具体扩增条件为: (1) 94℃ 预变性 3 min; (2) 94℃ 变性 1 min, 55℃ 复性 1 min, 72℃ 延伸 1 min, 循环 30 次; (3) 72℃ 延伸 10 min。反应总体积 20 μL, 反应结束后, 取 10 μL PCR 产物, 进行琼脂糖凝胶电泳。

## 2 实验结果与分析

### 2.1 T1 代棉花转化植株的抗 Kan 测定及抗病筛选

利用激光微束穿刺法对棉花品种豫棉 9 号和南抗 2 号进行双价植物表达载体的转化。收获转化当代植株的种子, 在苗期进行蘸根接菌(黄萎病菌)。处理后的棉苗在 25~28℃ 的条件下培养, 注意保湿, 棉苗接菌约 10 天后开始发病。感病植株表现出明显的黄萎病症状(图 2)。将感病较轻和未感病的棉苗移至病圃继续筛选, 并在此过程中对这些植株进行 Kan 抗性测定。结果表明, 在移栽的 29 株幼苗中, 有 9 株表现出明显的 Kan 抗性, 其中 7 株正常开花结实, 而对照则无存活苗, 或即使能存活也表现异常, 不结实(图 3), 最终发病死亡。最后收获病圃中 7 株抗病植株的种子(表 1)。

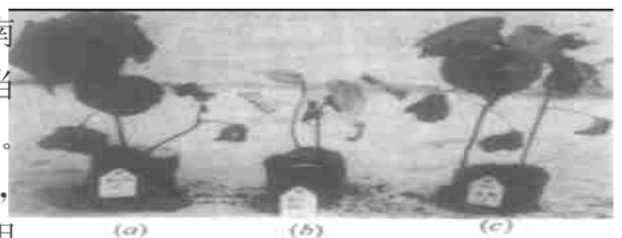


图 2 蘸根法接种黄萎菌 *Verticillium dahliae* 后 T1 代棉苗生长情况

(a), (c) 转基因抗病棉苗; (b) 非转基因感病棉苗

Fig.2 Growing state of T1 generation cotton seedlings after fungal challenge of *V. Dahliae*

(a), (c) fungal resistant plantlets of cotton;

(b) susceptible plantlet

表 1 T1 代转化植株抗病鉴定结果

Table 1 Results of anti-fungal assay of T1 generation cotton plants

Variety	No. of seedlings treating with <i>V. dahliae</i>	No. of transplant seedlings	No. of survival of anti-fungal plants
Yu Mian No.9 CK	24	5	0
Yu Mian No.9 transformed plants	50	11	3
Nan Kang No.2 CK	18	2	0
Nan Kang No.2 transformed plants	47	18	4

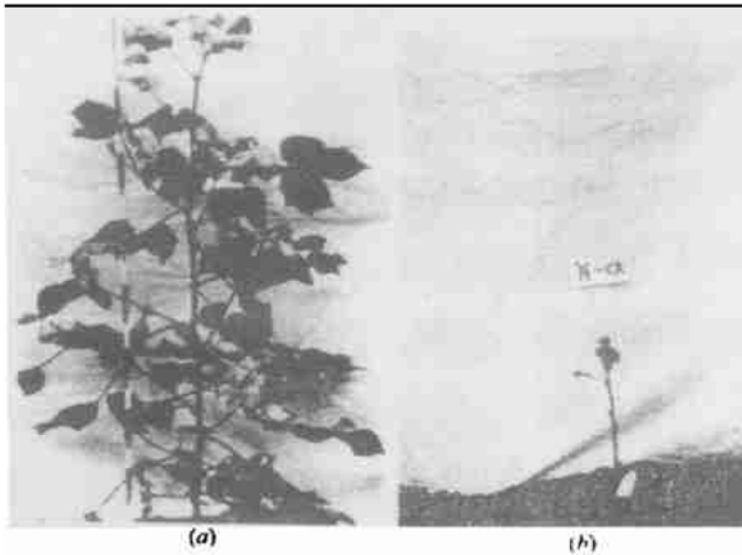


图 3 T1 代转化植株在病圃中正常开花结实  
(a) 转基因植株; (b) 非转基因植株(对照)

Fig.3 T1 generation plant flowering and bearing fruits normally in disease-inducing-plot  
(a) transformant; (b) CK

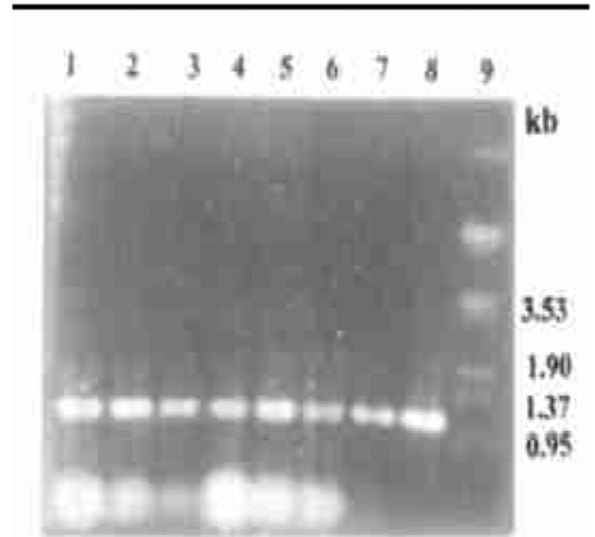


图 4 T1 代转基因棉的  $\beta$ -1,3-葡聚糖酶基因 PCR 检测的电泳结果

1~7: 抗 Kan-转基因植株; 8: 阳性对照;  
9:  $\lambda$ DNA 的 HindIII/EcoRI 消化片段

Fig.4 PCR result of  $\beta$ -1,3-glucanase gene of T1 generation transgenic cotton  
1, 7: Kan-resistant plants; 8: positive control;  
9:  $\lambda$ DNA digestion with HindIII/EcoRI

## 2.2 T1 代抗 Kan 棉苗的 PCR 检测

将 T1 代 9 株抗 Kan 植株用  $\beta$ -1,3-葡聚糖酶基因进行 PCR 检测。结果有 7 株表现出阳性反应(图 4),并在黄萎病圃中表现明显的抗病性。初步说明外源基因已整合到棉花基因组中。

## 3 讨 论

### 3.1 以棉花幼胚为受体的试验体系

本试验结果表明:以棉花幼胚(选用棉花授粉后 40~50 天的幼胚)为受体,采用激光微束穿刺法导入外源基因是可行的。我们曾经用棉花种胚作受体,采用激光微束穿刺法导入外源基因未获得转基因棉花植株。

### 3.2 对激光微束穿刺法将外源基因导入棉花的评估

Weber 等用荧光标记外源 DNA,证明激光微束能够将外源 DNA 导入植物细胞内,甚至能够导入细胞器叶绿体中,从而显示一个新的植物转化途径。而本实验证明采用激光微束穿刺法能够将外源 DNA 导入棉花幼胚。相对于农杆菌介导法而言,该方法具有简单、易行的特点。农杆菌介导法获得棉花再生植株很困难,同时农杆菌抑菌对棉花本身的伤害较大。而采

用激光微束穿刺法则避免了上述缺点。

黄、枯萎病一直是棉花生产中的主要病害, 土壤一旦带菌就很难根除, 因此成为棉花生产上的致命威胁。而目前棉花黄萎病还没有有效抗源。许多育种专家从多方面致力于此病的研究。基因工程技术在棉花上的应用目前已成为热点。但由于棉花再生相对困难, 因此这方面的进展较缓慢。我们利用激光微束穿刺法将抗真菌的葡聚糖酶及几丁质酶基因转化棉花幼胚, 经过病圃筛选及 PCR 检测已初步获得了抗黄萎病的植株, 并得到一批抗病植株的种子。从病圃筛选情况来看, 抗病效果是比较明显的, 这无疑将对棉花抗病育种起到较大的推动作用。

### 参 考 文 献

- 1 Wang Lanlan, Fu Rongzhao, Song Guiying *et al.*. Introduction of exogenous genes into wheat using puncture technique of microbeam laser. *Acta Genetica Sinica* (遗传学报), 1995, **22**(5): 394 ~ 399 (in Chinese)
- 2 Zhou Yihua, Han Liling, Wang Lanlan *et al.*. Introduction of gus gene into lotus and acquisition of transgenic plants via laser microbeam puncture. *Chinese J. Lasers* (中国激光), 1997, **A24**(4): 380 ~ 384 (in Chinese)
- 3 Chen Jun, Wang Lanlan, Liu Chengqing *et al.*. Studies on transformation of microspores of *Brassica napus* via laser microbeams puncture. *Acta Laser Biology Sinica* (激光生物学报), 1998, **7**(2): 103 ~ 107 (in Chinese)
- 4 Zhao Hui, Song Guiying, Zhang Guangzhong *et al.*. Studies on transformation of bean chitinase gene into apple rootstock (*Malus micromalus*). *Acta Laser Biology Sinica* (激光生物学报), 1998, **7**(3): 163 ~ 167 (in Chinese)
- 5 J. Sanbrock *et al.*. Molecular Cling (a laboratory manual), 1989, Cold Spring Harbor Lab. Press
- 6 G. Weber, S. Monajembashi, J. Wolffrum *et al.*. Genetic change include in higher plant cell by a laser microbeam. *Physiology Planlarum*, 1990, **79**: 190 ~ 193
- 7 Fu Rongzhong, Sun Yongru, Jia Shirong *et al.*. Experiment and Technology Manual of Plant Genetics. Beijing: Chinese Science and Technology Press, 1994. 132 (in Chinese)

## Studies on *Verticillium* and *Fusarium* Wilt Resistant Cotton Plants with Trangenesis by Laser Microbeam Puncture

Liu Guizhen<sup>1</sup> Lan Haiyan<sup>2</sup> Tian Yingchuan<sup>3</sup>  
Li Shucheng<sup>4</sup> Le Jinhua<sup>5</sup> Wang Lanlan<sup>1</sup> Chen Zhenghua<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Genetics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101*

<sup>2</sup>*Institute of Industrial Crops, Xinjiang Academy of Agricultural Sciences, Urumqi 830000*

<sup>3</sup>*Institute of Microbiology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080*

<sup>4</sup>*Xinjiang Vigur Autonomous Region Seed Company, Urumqi 830000*

<sup>5</sup>*Institute of Agronomy, Xinjiang Shihezi University, Shihezi 832003*

**Abstract** By the method of laser microbeam puncture, the maturing embryos of cotton were transformed with plant bivalent expression vector pBLGC including  $\beta$ -1, 3-glucanase and chitinase genes. Fungal challenge of T1 generation with *Verticillium albo-atrum* were carried out by dipping their roots into hyphal and spores solution. The survived T1 seedlings were subjected to Kan-resistant assay, and the results showed that 9 out of 29 T1 plants showed obvious Kanamycin resistance (Kan 1%). Upon PCR analysis, 7 out of 9 Kan-resistant plants produced a PCR fragment with expected size, indicating that they are probably transgenic. After T1 plants in disease-inducing plot were subjected to the period, in which the *Verticillium* wilt serious took place, 7 PCR positive plants showed obvious resistance to this fungus, at last, flowered and bore cotton bolls normally, while the other T1 plants and the non-transformants all died of infection. This result primarily suggested that the foreign genes had integrated in cotton genome, and the transgenic plants showed high resistance to *Verticillium* wilt.

**Key words** laser microbeam,  $\beta$ -1, 3-glucanase gene, chitinase gene, maturing embryos of cotton, *Verticillium* wilt