DOI:10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2012.01.009



# 蛋白激发子基因 peaT1 转基因棉花的获得及初步鉴定

唐宏琨 曾洪梅 杨秀芬 李国媛 盛德鹏 袁京京 邱德文
（中国农业科学院植物保护研究所 生物防治农业部重点开放实验室，北京 100081）

**摘 要：** 将来源于极细链格孢菌的蛋白激发子基因 peaT1 克隆到植物表达载体 pCAMBIA2300 上，成功构建了含有增强子和多联终止子的植物表达载体 pCAMBIA2300-G4AS-peaT1。通过花粉管通道法转化棉花，经卡那霉素抗性筛选、PCR 和 RT-PCR 检测获得一株转基因棉花植株，其植株茎粗和成铃数均高于非转基因对照株。

**关键词：** 蛋白激发子 peaT1 花粉管通道 棉花

# Identification of Transgenic Cotton with a Protein Elicitor-encoding Gene peaT1

Tang Hongkun Zeng Hongmei Yang Xiufen Li Guoyuan Sheng Depeng Yuan Jingjing Qiu Dewen
（*Key Laboratory for Biological Control of Ministry of Agriculture, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing* 100081）

**Abstract:** The protein elicitor-encoding gene peaT1 obtained from *Alternaria tenuissima* was inserted to pCAMBIA2300 to construct the plant expressive vector pCAMBIA2300-G4AS-peaT1 which contains enhancer and poly-terminator. Then, the resulting vector was transferred into cotton by pollen-tube pathway method. The positive transgenic line was screened with kanamycin resistance,PCR, and RT-PCR. The resultant plant got more cotton bolls and the stem diameter was higher compared with the control.

**Key words:** Protein elicitor peaT1 Pollen tube pathway Cotton

自 1987 年美国 Agracetus 公司获得了首例转 Bt 基因的抗虫棉以来，棉花的转基因研究迅速发展，我国成为继美国之后第二个拥有自主知识产权并成功研制抗虫棉的国家。中国农业部于 1997 年批准了转基因棉花的商业化种植，我国转基因棉花已占棉花种植面积的 60% 以上，产生了显著的经济、生态和社会效益。花粉管通道法是我国科学家周光宇首先提出的一种植物转基因技术，由于其简单易行，具有不依赖植物组织培养、纯合速度快、变异广泛，以及供受体植物范围广等优点，已被国内近百家实验室大量应用，并在水稻、棉花、小麦、大豆及玉米等多种作物中获得新品种或品系[1,2]。棉花因花器大和繁殖系数高，更适合采用花粉管通道法进行外源 DNA 导入，而且可避开植株再生的障碍，该项技术已越来越多地用于棉花抗病抗虫的新品种培育[3,4]。

激发子是一类能够诱导植物产生防卫反应的信号分子，在植物与病原菌的互作中起重要作用。当诱导抗性的蛋白激发子与植物接触后，作用于植物表面受体，激发植物体内信号传导，诱导植物产生乙烯、水杨酸、茉莉酸、植保素和病程相关蛋白等，调节植物的新陈代谢，激活植物的免疫系统和生长系统，最终表现为植物抗病虫能力的提高和增产[5-7]。目前已有关于蛋白激发子转基因植物的报道并展现出较好的应用前景[8-10]。PeaT1 是一种从极细链格孢菌（*Alternaria tenuissima*）中分离出来的蛋白激发子，具有诱导多种植物产生系统抗性，促进植物生长，改善作物品质等功能[11-13]。在大肠杆菌和毕赤酵母

收稿日期：2011-06-08
基金项目：转基因重大专项（2008ZX08010-004, 2009EX08001-018B）
作者简介：唐宏琨，博士，研究方向：蛋白激发子基因转化植物；E-mail:thk03@sina.com
通讯作者：邱德文，研究员，研究方向：新型蛋白生物农药；E-mail:qiudewen@caas.net.cn

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

中表达的 PeaT1 蛋白仍具有诱导抗旱、促进根系生长等生物活性[14,15]，本研究利用花粉管通道法开展激发子基因 peaT1 的转基因棉花研究，为获得抗病虫、高产优质的棉花品种提供新材料。

## 1　材料与方法

### 1.1　材料

蛋白激发子基因 peaT1 是本实验室科研人员从极细链格孢菌克隆获得的（GenBank 登录号为 EF030819）；含有增强子和多联终止子序列的中间载体 pG4AS-cup 由中国生物技术所郭三堆研究员惠赠；植物表达载体 pCAMBIA2300 本实验室保存；基因转化受体棉花品种湘杂 F15 由湖南省棉花科学研究所提供。

Ex*Taq* DNA 聚合酶、$T_4$ DNA 连接酶、限制性内切酶、DNA Marker、pMD18-T Simple 测序载体和 DNA 片段回收试剂盒均购自大连 TaKaRa 公司；大肠杆菌感受态细胞 DH5α 和反转录试剂盒 EasyScript First-Strand cDNA Synthesis SuperMix 购自北京全式金生物技术有限公司；柱式植物 RNAout 试剂盒购自天恩泽生物公司；高纯度质粒大提试剂盒购自天根生化科技有限公司；卡那霉素购自 AMRESCO 公司；其他化学试剂为国产分析纯产品。

### 1.2　方法

1.2.1　植物表达载体构建及制备　设计引物扩增蛋白激发子 peaT1 全长基因，上游引物 P1-peaT1:5′-TACTGCAGATGGCCAACCCCCGCATTGAAGAG-3′，下游引物 P2-peaT1: 5′-CGCTCGAGCTATATGCTCAGCGCCATGATGGA-3′。上下游引物分别设置 *Pst* Ⅰ和 *Xho* Ⅰ酶切位点，并用 *Pst* Ⅰ和 *Xho* Ⅰ分别双酶切 PCR 扩增产物的重组质粒和中间载体 pG4AS-cup，将回收的目的片段连接构建中间载体 pG4AS-peaT1。用 *Hin*d Ⅲ和 *Eco*R Ⅰ分别双酶切 pG4AS-peaT1 和 pCAMBIA2300，分别回收目的片段连接构建植物表达载体 pCAMBIA2300-G4AS-peaT1，PCR 检测目的基因是否成功插入表达载体中。

参照全式金感受态细胞 DH5α 热激转化方法，将植物表达载体 pCAMBIA2300-G4AS-peaT1 转化大肠杆菌感受态细胞 DH5α，参照天根生化高纯度质粒大提试剂盒方法大量提取质粒，测量 $OD_{260}$ 值，根据 $OD_{260}$=1.0 相当于 DNA 50 mg/mL 计算质粒浓度，将质粒浓度稀释到 20 μg/mL 备用。

1.2.2　花粉管通道法转化棉花　选择第二天即将开放的花蕾进行自交，从第 2 果台至第 6 果台中选择开花 20 h 左右、花冠颜色呈浅粉色的花朵作为转基因操作的对象。用左手食指与中指夹住花柄底端，并用拇指、食指及中指固定在花萼部分，使整朵花不会由于用力而折断，然后用右手指尖将花冠自子房基部拉脱，抹平花柱，使柱头在子房上部形成一个平整的界面。使用 50 μL 微量注射器从抹平花柱处沿子房的纵轴方向进针，先进入到约子房长度的 2/3 处，然后再退至约 1/3 处开始注射，质粒浓度 20 μg/mL，注射量为 10 μL，注射时注意不要损伤幼嫩子房的表皮层。注射完成后，在铃柄的基部涂抹 40 mg/L 的赤霉素溶液，摘除该花所在果枝的顶心和该果枝上的其他幼蕾，以防止注射铃脱落，挂牌标记，注意预防受体材料病虫害[16]。

1.2.3　转基因棉花的筛选

1.2.3.1　卡那霉素抗性连续筛选　将部分收获的棉花种子在北京进行田间种植，种植密度为 25 棵 /$m^2$。待棉苗第二片真叶展开时进行卡那霉素的第一次筛选，检测浓度为 2 500 mg/L，一周后观察结果。拔除卡那霉素呈阳性即叶片表面出现黄色斑点的棉株，剩余的棉株进行下一轮检测，后三轮浓度分别为 2 500 mg/L、3 000 mg/L 和 4 000 mg/L，将卡那霉素检测呈阴性的棉株挂牌标记。

1.2.3.2　PCR 检测　取卡那霉素检测呈阴性的棉株幼嫩叶片，参照 CTAB 法提取叶片总 DNA，设计如下引物进行 PCR 检测目的基因 peaT1 和标记基因 *npt* Ⅱ。引物分别为：

P3-peaT1：5′-ATGGCCAACCCCCGCATTGAAGAGC-3′；P4-peaT1：5′-CTATATGCTCAGCGCCATGATGGAG-3′；P5-npt Ⅱ：5′-ATGATTGAACAAGATGGATTGCACG-3′；P6-npt Ⅱ：5′-TCAGAAGAACTCGTCAAGAAGGCGA-3′。

1.2.3.3　RT-PCR 检测　参照天恩泽柱式植物 RNAout 试剂盒方法，提取经 PCR 检测呈阳性棉花植株叶片总 RNA，反转录合成 cDNA，进行 RT-PCR 检测。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

1.2.4 转基因植株性状统计

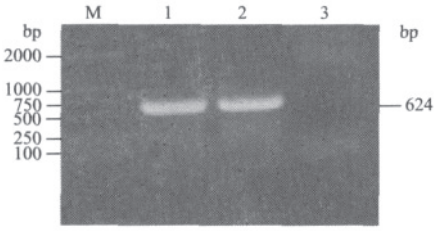
1.2.4.1 植株茎粗 分别测量挂牌标记的2号转基因棉花植株和20株无卡那抗性对照棉株的茎粗，测量地上部分主茎距地面5 cm处的外茎粗，每株测量3次取其平均值，最后计算20株平均值。

1.2.4.2 成铃数 分别统计挂牌标记的2号转基因棉株和20株无卡那抗性对照棉株的成铃数，并计算对照株成铃数平均值。

## 2 结果

### 2.1 植物表达载体的构建及制备

回收经*Hin*d Ⅲ和*Eco*R Ⅰ分别双酶切的中间载体pG4AS-peaT1和pCAMBIA2300目的片段，连接构建的植物表达载体命名为pCAMBIA2300-G4AS-peaT1，该载体含有增强子元件和多联终止密码子序列的表达盒。PCR检测扩增出大小为624 bp的目的片段，如图1所示，表明目的基因peaT1已成功插入植物表达载体中。质粒pCAMBIA2300-G4AS-peaT1转化感受态细胞DH5α后，经天根高纯度质粒大提试剂盒制备了大量含有目的基因peaT1的表达载体质粒，将质粒浓度稀释到20 μg/mL以备转化棉花。




M. DNA Marker; 1. 载体；2. 阳性对照；3. 空白对照

**图1 构建载体的PCR鉴定**

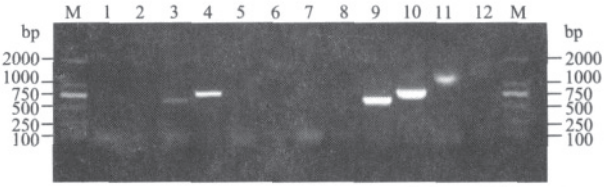
### 2.2 花粉管通道法转化棉花

冬季在海南三亚共转化约8 000朵花，成铃率19.8%，共收获种子2.05 kg。注射目的基因后立即在铃柄基部涂抹40 mg/L的赤霉素溶液，且摘除该花所在果枝的顶心和其他幼蕾，保证了成铃个数。

### 2.3 转基因棉花的筛选

2.3.1 卡那霉素抗性筛选 取收获的部分种子在北京种植，共成苗1 852株，经4次卡那霉素连续筛选，共得到3株卡那霉素抗性棉苗。

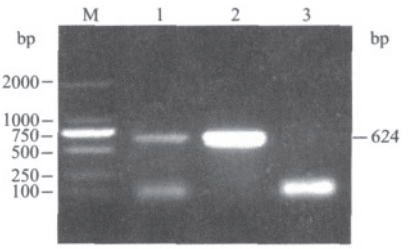
2.3.2 PCR检测 以提取的3株卡那霉素抗性棉花叶片总DNA为模板，设计的两对引物进行PCR检测。结果（图2）显示，2号植株可以扩增出与目的基因peaT1和标记基因npt Ⅱ大小一致的条带。1号植株、3号植株、对照株和空白对照均未扩增出条带，质粒阳性对照条带明显。PCR检测结果表明标记的2号植株导入了目的基因peaT1，而1号和3号植株虽然表现出卡那霉素抗性，但并未扩增出相应条带。




M. DNA Marker; 1,2、3,4、5,6、7,8、9,10、11,12分别是1号株、2号株、3号株、野生株、阳性对照和空白对照扩增结果，奇数列是P3和P4扩增结果，偶数列是P5和P6扩增结果

**图2 转基因植株的PCR分析**

2.3.3 RT-PCR检测 从经PCR检测的阳性株叶片中提取总RNA，合成第一链cDNA，用引物P3和P4扩增第二链。结果（图3）显示，RT-PCR结果表明目的基因peaT1插入2号棉株基因组中，并成功实现转录。




M. DNA Marker; 1. 2号株；2. 阳性对照；3. 空白对照

**图3 2号棉株的RT-PCR鉴定**

### 2.4 转基因植株性状统计

2.4.1 茎粗 统计20株无卡那抗性对照株和2号转基因植株的茎粗，结果（图4）显示，2号棉株的外茎粗为2.42 cm，明显大于对照株的平均值1.41 cm，表明2号转基因阳性株的生长状况好于对照株。

2.4.2 成铃数 如图5所示，2号转基因棉株共形成棉铃33个，20株无卡那抗性对照株的成铃数平均值为8.1个，2号转基因棉株成铃数明显高于对照株。

## 3 讨论

虽然花粉管通道法受到棉花自然花期的限制，

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

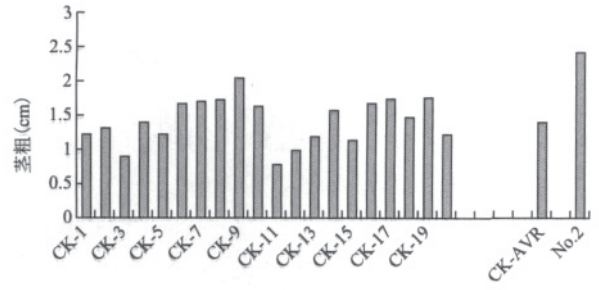



图 4　棉株茎粗分析

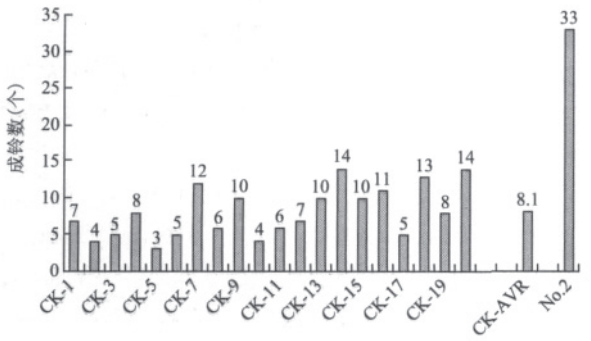



图 5　棉株成铃数分析

在田间操作易受自然环境影响，但与其他转基因技术比较，其操作简便易掌握且转化成本低，不受棉花基因型限制，可进行大规模转化。另外，花粉管通道法有效地利用了植物生殖受精过程，避开了组织培养植株再生的难题，可以直接获得转基因棉花种子。花粉管通道法运用中的主要问题是棉花成铃率较低，如何降低落铃数是保证转化率的关键。我们发现冬季在海南转化的成铃率高于夏季内地的转化，可能海南冬季温度和相对湿度适中，更有利于花粉管通道法转化。操作过程中除了要注意适当稀植、保证供体 DNA 的纯度和浓度、选择合适的花朵作为基因转化对象、注射时不要损伤子房外，还需谨记注射完成后在铃柄基部涂抹赤霉素溶液，并摘除该花所在果枝的顶心，促进营养集中，以降低落铃率[4]。

蛋白激发子能诱导植物产生抗性、促进植物生长的特点在生产实践中已得到了广泛的应用，其转基因植物的研究也取得了较大进展。马玲莉等[17]将 hrf2 基因导入油菜基因组中，转基因植株叶片上油菜菌核病菌菌丝的生长受到明显抑制。邵敏等[18]将来自水稻白叶枯病菌的 hrfAXoo 基因转化水稻，转基因水稻白叶枯病菌的生长受到明显抑制。蒋冬花[19, 20]将隐地蛋白 Cry 基因整合到烟草基因组中，抗病性检测结果表明转化植株对烟草黑胫病菌、赤星病菌和野火病菌的抗性均有提高。邱德文等[21]也报道了蛋白激发子基因 PemG1 转化水稻可以提高水稻抗病性、改善作物品质。本研究通过花粉管通道法得到的一株转基因阳性株，与对照棉株相比，不仅外径明显粗壮，且成铃个数较多，这与此前报道的蛋白激发子 PeaT1 能促进棉花生长、提高棉花产量相吻合[22]。初步推测蛋白激发子基因 peaT1 的表达可能启动了植物信号传导，激活了棉花生长系统从而表现出促进植物生长。本试验中对照株的成铃数明显少于转基因阳性株，且成铃数不多，主要是由于田间虫害严重，对照株棉花叶片被大量蚕食，影响了棉株的正常生长发育；而转基因阳性株棉花叶片生长正常，成铃数较多，表现出抗虫性（结果拟另文发表）。

本研究获得的转基因阳性材料较少，而且仅进行了 $T_1$ 代部分农艺性状的统计分析，还需要进一步分析转基因材料后代的遗传稳定性及铃重、衣指、子指、衣分和麦克隆值等多项指标，综合分析和验证转基因植株后代的抗病性和抗虫性，期望能从转基因后代中筛选出抗病虫、高产优质的棉花新品种。

## 参 考 文 献

[1]刘芳，袁英，高树仁，等．花粉管通道导入技术在农作物分子育种中的应用．农业与技术，2007, 27（4）: 41-43.

[2]常利芳，王立新，王省芬，等．花粉管通道转基因技术研究进展．河北农业科学，2003, 7（1）: 41-47.

[3]李静，韩秀兰，沈法富，等．提高棉花花粉管通道技术转化率的研究．棉花学报，2005, 17（2）: 67-71.

[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．中国农业科技导报，2000, 2（2）: 27-32.

[5]Chisholm ST, Coaker G, Day B, et al. Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. Cell, 2006, 124（4）: 803-814.

[6]Okinaka Y, Yang CH, Herman E, et al. The P34 syringolide elicitor receptor interacts with a soybean photorespiration enzyme, NADH-dependent hydroxypyruvate reductase. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2002, 15（12）: 1213-1218.

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

[7]Weinberger F. Pathogen-induced defense and innate immunity in macroalgae. Biological Bullutin, 2007, 213(3): 290-302.

[8]Kvitko BH, Ramos AR, Morello JE, et al. Identification of harpins in *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000, which are functionally similar to HrpK1 in promoting translocation of type III secretion system effectors. Journal of Bacteriology, 2007, 189(22): 8059-8072.

[9]Wang XY, Li M, Zhang JH, et al. Identification of a key functional region in harpins from *Xanthomonas* that suppresses protein aggregation and mediates harpin expression in *E. coli*..Molecular Biology Reports, 2007, 34(3): 189-198.

[10]Oh J, Kim JG, Jeon E, et al. Amyloidogenesis of type III-dependent harpins from plant pathogenic bacteria. Journal of Biological Chemistry, 2007,282(18): 13601-13609.

[11]赵明治, 杨秀芬, 张明, 等. 一种促进植物根系生长的极细链格孢菌蛋白质分离、纯化和生物功能. 中国生物防治, 2007, 23(2): 170-173.

[12]张志刚, 邱德文, 官春云, 等. 链格孢菌蛋白激发子对棉花主要性状及相关酶变化的研究. 棉花学报, 2008,20(3): 186-191.

[13]邱德文, 杨秀芬, 刘峥, 等. 植物激活蛋白对烟草抗病促生和品质的影响. 中国烟草学报, 2005,11(6): 33-36.

[14]刘权, 李广悦, 曾洪梅, 等. 微生物蛋白激发子 PeaT1 的获得及诱导水稻抗旱性的初步研究. 中国农业科技导报, 2009, 11(3): 51-55.

[15]刘延锋, 曾洪梅, 玉山江, 等. 极细链格孢菌 *peaT1* 基因在毕赤酵母中的表达与功能分析. 生物工程学报, 2009, 25(3): 413-417.

[16]马盾, 黄乐平, 黄全生, 等. 提高棉花花粉管通道法转化率的研究. 西北农业学报, 2005, 14(1): 10-12.

[17]马玲莉, 霍蓉, 高学文, 等. 转 harpinXooc 蛋白编码基因 hrf2 对油菜抗菌核病的影响. 中国农业科学, 2008, 41(6): 1655-1660.

[18]邵敏, 王金生. 转 hrfAXoo 基因水稻对白叶枯病的抗性. 南京农业大学学报, 2004, 27(4): 36-40.

[19]蒋冬花, 郭泽建, 郑重. 隐地蛋白(cryptogein)基因定点突变及其广谱抗病烟草转化植株的获得. 植物生理与分子生物学学报, 2002, 28(5): 399-406.

[20]蒋冬花, 郭泽建, 陈旭君, 等. 激发子隐地蛋白基因介导的烟草抗病性研究. 农业生物技术学报, 2003, 11(3): 299-304.

[21]Qiu DW, Mao JJ, Yang XF, Zeng HM. Expression of an elicitor-encoding gene from *Magnaporthe grisea* enhances resistance against blast disease in transgenic rice. Plant Cell Reports, 2009, 28(6): 925-933.

[22]张志刚, 官春云, 邱德文, 等. 细极链格孢菌蛋白激发子对棉株光和特性的影响. 湖南农业大学学报, 2008, 34(1): 1-4.

(责任编辑 狄艳红)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net