

35SP-rolB 基因在棉花转基因系基因组中转录稳定性研究

曹燕燕^{1,2}, 李志辉², 郭春强², 靳巧玲², 刘欢乐¹, 姚明镜¹, 杨业华¹

(1. 华中农业大学 植物科技学院, 湖北 武汉 430070; 2. 漯河市农业科学院, 河南 漯河 462300)

摘要: 以 8 个 T7 代的棉花 35SP-rolB 转基因系为材料, 通过提取转基因株系及对照植株叶片总 DNA 和总 RNA, 对各个转基因株系分别进行 PCR 检测和 Northern 杂交, 研究转基因的遗传稳定性和转录稳定性。结果表明, 35SP-rolB 目的基因和 NPT II 选择标记基因在经过对转基因系的连续多代定向选择后, 在各个转基因系基因组中都能够稳定遗传和高效转录, 说明针对强生根、早发、抗旱等特殊性状进行定向选择是保持 rolB 转基因系遗传稳定性和转基因表达稳定性的有效途径。

关键词: 陆地棉; 35SP-rolB 基因; Northern 杂交; 转基因表达

中图分类号: S562 文献标识码: A 文章编号: 1004-3268(2011)07-0044-04

Transcriptional Stability of 35SP-rolB Gene in Transgenic Cotton (*Gossypium hirsutum* L.) Genome

CAO Yanyan^{1,2}, LI Zhihui², GUO Chunqiang², JIN Qiaoling²,
LIU Huanle¹, YAO Mingjing¹, YANG Yehua¹

(1. College of Plant Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;
2. Luohe Academy of Agricultural Sciences, Luohe 462300, China)

Abstract: Eight 35SP-rolB transgenic lines of T7 generation of upland cotton were applied to analyze the stabilities of transgenic inheritance and transcription. Total DNA and RNA were prepared from the leaf extracts of the rolB transgenic lines and the control, and the result was verified by PCR amplification and Northern hybridization. The results showed that the 35SP-rolB gene and the NPT II selection marker in the genomes of transgenic lines, which were selected for seven successive generations based on the specific traits of strong rooting ability, decrepitude resistance and rapid recovery after seedling transplantation, behaved stable inheritance and transcription in all eight transgenic lines. The results also demonstrated that the orientated selection at toward target traits is an efficient way in keeping the genetic stability of the transgenic lines and the expressional stability of the 35SP-rolB transgene.

Key words: Upland cotton; 35SP-rolB gene; Northern blotting; Transgene expression

棉花是一种根系再生能力差, 移栽成活困难的重要农业经济作物。生产上常采用营养钵育苗移栽和地膜覆盖技术, 以解决棉花移栽成活困难的问题, 使棉花生育期提前。

发根农杆菌(*Agricbacterium rhizogens*)Ri质粒上含有诱发毛根形成的基因(rooting loci, rol)即rol基因^[1-3], 将Ri质粒上单个rolB基因或几个rol基因导入植物基因组均能提高植物的生根能力^[3-8]。

我们曾报道过将源于发根农杆菌的人工重组生根基因(35SP-rolB 基因)转移到陆地棉栽培品种中, 获得了具有生根能力强、抗旱衰的棉花转基因系^[5]。针对 rolB 转基因系的强生根能力、早发、耐旱、抗旱衰特征, 进行了多代定向选择, 获得了一系列性状稳定、丰产、优质的棉花转基因系^[9~11]。为此, 以前期获得的 35SP-rolB 转基因系棉花 T7 代为材料, 对各个转基因系进行了分子检测、转基因表达稳定性研究, 以期为培育出根系发育强壮、易于移栽成活、早发而不早衰、高产优质的转基因棉花新品种提供优良的种质材料, 并为棉花工厂化育苗提供理论支撑。

1 材料和方法

1.1 试验材料

从 2000 年获得的 23 个 rolB 转基因系中选用了 8 个 35SP-rolB 转基因系的 T7 代作为研究转基因表达稳定性的材料, 其编号分别为 7343、7014、7344、7031、7349、7346、7348 和 7013。以农杆菌介导的遗传转化受体品种 4105(华抗棉 1 号)为对照材料。对于这些转基因系的获得和分子生物学鉴定, Liu 等已作了报道^[12], 它们均表现出强生根能力、早发、耐旱、抗旱衰特征, 是一组针对目标性状进行了多代定向选择的株系。各转基因系基因组中 T-DNA 的结构如图 1 所示。



图 1 T-DNA 的结构示意

1.2 棉花总 DNA 的提取及 PCR 检测

根据 Permingeat 等^[13]改进的 CTAB 法从棉花幼叶中抽提总 DNA。采用 PCR 技术快速鉴定目标转基因在高世代转基因系基因组中的稳定情况, 转化选择标记 NPT II 基因的引物序列为: 5'-T GCGAAT CGGGAGCGGCGATACCG-3' 和 5'-TGGGCACAAACAGACAATCGGCTGC-3'; rolB 基因的引物序列为: 5'-GTCTGCTATCATCCTCCTATGT-3' 和 5'-CTTCAGGTTACTGCA GCAG-3'。扩增程序为先在 94℃下变性 5 min, 然后 94℃变性 1 min, 55℃复性 45 s, 72℃延伸 90 s, 共计 32 个循环, 最后在 72℃下延伸 10 min。反应产物最后用于凝胶电泳。

1.3 棉花基因组总 RNA 的抽提和 Northern 杂交

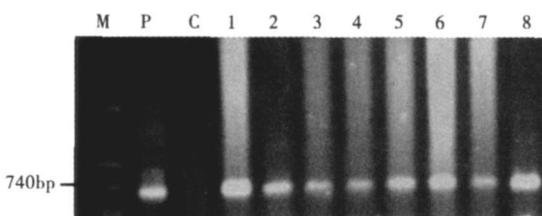
取棉花幼嫩叶片或幼茎来抽提植物总 RNA^[7], 每样品取 20~30 μg 总 RNA, 加入 DEPC-ddH₂O,

使总体积到 10 μL, 再加入 8 μL 样品缓冲液和 2 μL RNA 上样缓冲液, 轻轻混匀; 于 65℃水浴 10 min, 置冰上速冷后上样。然后在含有甲醛的 1.5% 琼脂糖凝胶上以 3V/cm 电压电泳 3~4 h。电泳结束后按照一般程序进行 Northern 杂交^[14]。分子杂交试验中所用探针分别为 NPT II 和 rolB 基因的 PCR 扩增片断。

2 结果与分析

2.1 转基因植株的 PCR 检测结果

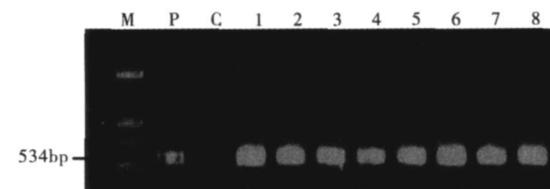
对外源基因包括转化选择标记 NPT II 基因和 rolB 目的基因在棉花转基因系基因组中的遗传稳定性作了 PCR 快速检测, 图 2 是用 NPT II 基因序列设计的特异引物进行 PCR 扩增的结果。由图 2 可知, 质粒 DNA 扩增出 1 条大小约 740bp 的特异带, 泳道 1~8 显示各个转基因系也扩增出同样大小的目标带, 而作为阴性对照的非转基因系则无相应的扩增带。



M. DL2000 的分子量标准; P. 质粒; C. 阴性对照 4105 (华抗棉 1 号); 1~8 分别为转基因系 7343、7014、7344、7031、7349、7346、7348、7013

图 2 转 35SP-rolB 基因系基因组 DNA 的 PCR 扩增结果(NPT II 引物)

同样, 利用 rolB 基因的特异引物进行 PCR 扩增如图 3 所示, 质粒 DNA 扩增出 1 条约 534bp 大小的特异带, 各个转基因系也扩增出同样大小的目标带, 而作为阴性对照的非转基因系则无相应的 PCR 片段。



M. DL2000 的分子量标准; P. 质粒; C: 阴性对照 4105; 1~8 分别为转基因系 7343、7014、7344、7031、7349、7346、7348 和 7013

图 3 转 35SP-rolB 基因系基因组 DNA 的 PCR 扩增结果(rolB 引物)

由于在检测到 NPT II 基因的转基因系中同时也检测到 rolB 基因, 表明 T-DNA 在 T7 代转基因系基因组中的传递是高度稳定的, 并没有因世代延

伸发生缺失而导致转基因丢失。

2.2 Northern 杂交分析

虽然 *rolB* 目的基因和转化选择标记 *NPT II* 基因在转基因系基因组中保持了高度的遗传稳定性, 但各个外源基因在棉花转基因系基因组中能否正常表达需做进一步研究。转基因的转录稳定性是反映基因表达稳定性的重要指标, 本研究分别以 *NPT II* 和 *rolB* 的 PCR 片断为探针进行 Northern 杂交, 结果表明, 所有 8 个转基因系都呈现出杂交阳性带, 其中 4 个转基因系即 7031、7349、7343 和 7344 的杂交结果分别见图 4 和图 5。图 4 和图 5 的杂交结果表明, 外源基因特别是 *rolB* 目的基因在棉花基因组中的转录是高度稳定的, 再结合在田间对转基因系典型形态特征的观察, 进一步说明 *35SP-rolB* 基因在棉花基因组中的表达具有很高的稳定性。

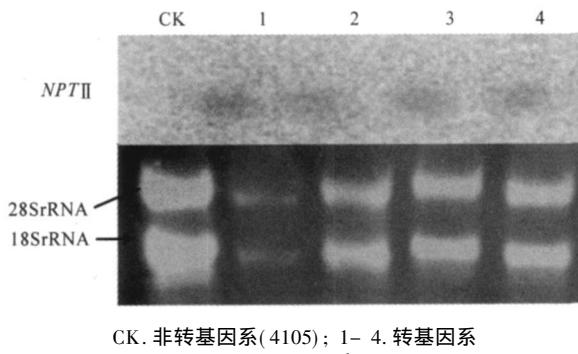


图 4 棉花转基因系的 Northern 杂交检测(*NPTII*引物)

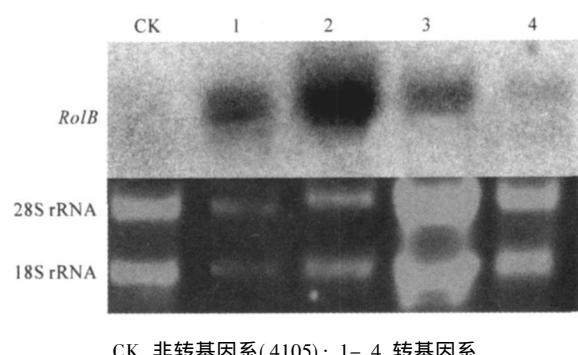


图 5 棉花转基因系的 Northern 杂交检测(*rolB* 引物)

3 讨论

影响转基因表达稳定性的因素主要有转基因沉默或丢失、甲基化、拷贝数、基因重组、在受体植物基因组中的插入位点以及与内源基因的同源性等^[3, 6, 17]。侯磊等^[10]在研究根癌农杆菌介导的水稻遗传转化中存在的问题时, 发现转基因植株在连续的世代中目的基因约有一半失活或沉默, 而且很难

进行高水平表达。有关 *rolB* 基因表达沉默的报道较少, 在拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 中, 根据 Christoph^[8] 等报道, *rolB* 转基因的表达沉默是一种减数分裂后的可逆现象, 主要表现在转录后水平上的沉默。在幼苗阶段, *rolB* 转基因表达水平很高, 但在以后的发育阶段中, 则表现出无规律的沉默, 且沉默状态一直保持稳定。在下一个世代的幼苗阶段, 又可重启 *rolB* 基因表达。*rolB* 基因表达的沉默过程受植物基因组中 2 个修饰座位的影响, 这 2 个基因影响 *rolB* 基因沉默发生的频率和发生的时间。虽然本研究只对 *35SP-rolB* 转基因系进行了遗传稳定性和转录稳定性分析, 但根据对由 *rolB* 基因决定的性状如强生根、耐旱、抗旱衰、巨大铃等(有关资料另行报道)推测, 目的基因在棉花基因组中表达是正常的。对于在棉花中 *rolB* 基因表达是否会发生在转录后沉默以及基因表达沉默的概率如何等尚需要做进一步研究。

rolB 基因为一种受生长素诱导和调节表达的基因^[5, 16], 其主要功能是促进不定根的形成^[2, 4, 9], 但有某些研究显示 *rolB* 产物可促进芽的形成^[1]。在甜菜 (*Beta vulgaris*) 中, 转化和非转化的根系之间, 细胞内游离的 IAA 的水平差异很大^[20], 这种差异可能反映了用于调节 *rolB* 基因表达后剩余 IAA 的水平。在棉花转基因系中, *rolB* 基因表达也会影响细胞内游离 IAA 的水平以及其他几种激素的代谢水平(资料另行报道), 可能各种激素之间的自然平衡关系的改变是导致 *35SP-rolB* 转基因系的根系发育旺盛的主要原因之一。

在山葡萄 (*Vitis amurensis*) 中^[11], *rolB* 基因促进一种重要的抗菌、保健成分白藜芦醇在转化体中合成的产量, *rolB* 基因通过有选择性地提高苯丙氨酸解氨酶 (PAL) 和 1, 2-二苯乙烯合成酶 (STS) 基因家族中各别成员的表达水平, 从而提高白藜芦醇的合成水平。在棉花转基因系中, *rolB* 基因是否通过同样的机制调节其他基因的表达水平, 从而使 *rolB* 转基因系表现出早发、抗旱衰特性尚有待深入研究。

参考文献:

- [1] Altamura M D, Angeli S, Capitani F. The protein of *rolB* gene enhances shoot formation in tobacco leaf explants and thin cell layers from plants in different physiological state [J]. Experimental Botany, 1998, 49: 1139-1146.
- [2] Altamura M M, Capitani F, Gazzola L, et al. The plant

- oncogene *rolB* stimulates the formation of flower and root meristems in tobacco thin cell layers[J]. *New Phytologist*, 1994, 126(2): 283-293.
- [3] Bellincampi D, Cardarelli M, Zaghi D, et al. Oligogalacturonides prevent rhizogenesis in *rolB*-transformed tobacco explants by inhibiting auxin induced expression of the *rolB* gene[J]. *Plant Cell*, 1996, 8: 477-487.
- [4] Capone I, Cardarelli M, Trovato M, et al. Upstream non coding region which confers polar expression to R1 plasmid root inducing gene *rolB*[J]. *Mol Gen Genet*, 1989, 216: 239-244.
- [5] Chichiricci G, Costantino P, Spano L. Expression of the *rolB* Oncogene from *Agrobacterium rhizogenes* during Zygotic Embryogenesis in Tobacco[J]. *Plant Cell Physiol*, 1992, 33(7): 827-832.
- [6] Choi H W, Lemaux P G, Cho M J. Long term stability of transgene expression driven by barley endosperm specific hordein promoters in transgenic barley[J]. *Plant Cell Reports*, 2003, 22(10): 1007-1003-0630-9.
- [7] Chirgwin J M, Mac Donald R. Isolation of the total RNA from plants[J]. *Biochemistry*, 1979, 18: 5294-5299.
- [8] Christoph D, Jeff S. Identification of plant genetic loci involved in a posttranscriptional mechanism for meiotically reversible transgene silencing[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91: 5538-5542.
- [9] Dai W-H, Cheng Z-M, Sargent W A, et al. Expression of the *rolB* gene enhances adventitious root formation in hardwood cuttings of aspen, in vitro cellular and developmental biology[J]. *Plant*, 2004, 40(4): 366-370.
- [10] Hou L, Xiao Y H, Li X B, et al. The cDNA-AFLP differential display in developing anthers between cotton male sterile and fertile Line of "Dong A"[J]. *Journal of Genetics and Genomics*, 2002, 29(4): 359-363.
- [11] Kiselev K V, Dubrovina A S, Bulgakov V P. Phenylalanine ammonia lyase and stilbene synthase gene expression in *rolB* transgenic cell cultures of *Vitis amurensis*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, 82(4): 647-655.
- [12] Liu H Y, Yang Y-H, Wu Z B, et al. Introduction of *rol* genes into cotton (*Gossypium hirsutum* L.) genome and effects of transgene expression on the plant development[J]. *Agricultural Sciences in China*, 2004, 3(10): 728-737.
- [13] Permingeat H R, Romagnoli M V, Vallejos R H. A simple method for isolating high yield and quality DNA from cotton (*Gossypium hirsutum* L.) leaves[J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1998, 16: 1-6.
- [14] Sambrook J, Russell D W. *Molecular cloning: a laboratory manual*[M]. 3rd Edn. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2002.
- [15] Schmülling T, Röhrlig H, Pilz S, et al. Restoration of fertility by antisense RNA in genetically engineered male sterile tobacco plants[J]. *Mol Gen Genet*, 1993, 237: 385-394.
- [16] Sedira M, Butler E, Gallagher T, et al. Verification of auxin induced gene expression during adventitious rooting in *rolB*-transformed and untransformed apple Jork 9[J]. *Plant Science*, 2005, 168(5): 1193-1198.
- [17] Stam M, Mol J N M, Kooter J M. The silence of genes in transgenic plants[J]. *Ann Bot*, 1997, 79: 3-12.
- [18] Van der Salm T P M, Van der Toorn C J G, Hanisch ten Cate C H, et al. Introduction of *rol* genes transformed plants of *Rosa hybrida* L. and characterization of their rooting ability[J]. *Molecular Breeding*, 1997, 3: 39-47.
- [19] White F F, Taylor B H, Huffman G A, et al. Molecular and genetic analysis of the transferred DNA regions of the root inducing plasmid of *Agrobacterium rhizogenes*[J]. *J Bacteriol*, 1985, 164: 33-44.
- [20] Xing T E, Blumwald D, Zhang Y, et al. Auxin levels and auxin binding protein availability in *rolB* transformed *Beta vulgaris* cells[J]. *Biologia Plantarum*, 1996, 38(3): 351-362.