

百合花粉管通道法遗传转化的研究

李 双,袁 霖,贾桂霞

(北京林业大学 园林学院/国家花卉工程技术研究中心,北京 100083)

摘要:为了提高百合花粉管通道法遗传转化效率,采用 pBI121-GFP-FT 载体,对外源基因携带形式、导入方式和导入时间进行了研究。对质粒和农杆菌两种形式携带的外源基因的研究结果表明:菌液形式携带外源基因有利于百合花粉管通道法遗传转化。采用切割柱头授粉后涂抹外源基因、常规授粉后涂抹外源基因以及子房注射外源基因 3 种导入方式进行百合遗传转化,结果表明常规授粉后涂抹外源基因更适宜百合花粉管通道法遗传转化。对授粉后 0 h 涂抹外源基因和授粉后延迟 3 h 涂抹外源基因 2 种处理进行比较研究,结果表明授粉后 0 h 涂抹外源基因更适宜于百合花粉管通道法遗传转化。将试验所得种子进行荧光观察,转基因植株有绿色荧光。PCR 检测结果表明 GFP-FT 基因已经整合到百合基因组中。

关键词:花粉管通道途径;绿色荧光蛋白(GFP);百合

中图分类号:S644

文献标识码:A

文章编号:1002-2767(2011)08-0015-04

随着分子生物学技术的发展,百合转基因受到世界花卉育种学家的普遍重视,并取得了一些可喜的成果,但大部分都是通过农杆菌介导法进行转化,其次是通过基因枪法和电击法进行转化,目前仅有 1 篇国内报道应用花粉管通道法进行百合的遗传转化^[1]。

花粉管通道技术是指利用植物授粉后所形成的天然花粉管通道(花粉引导组织)经珠心通道将外源 DNA 携带进入胚囊,转化受精卵或其前后的生殖细胞(精子、卵子),由于它们仍处于未形成细胞壁类似“原生质体”状态,并且正在进行活跃的 DNA 复制、分离和重组,所以很容易将外源 DNA 片段整合到受体基因组中,以达到遗传转化的目的^[2]。自从 1988 年 Luo 和 Wu^[3]首次报道用花粉管通道法将含报告基因的质粒 DNA 转入水稻,经 Southern 杂交和酶学测定证明,得到了外源基因整合并表达的转基因水稻植株,花粉管通道技术在水稻、小麦、玉米等多种单子叶植物获得广泛应用。

绿色荧光蛋白基因(green fluorescent protein, GFP)是从海洋动物水母(*Aequorea victoria*)体内克隆到的,试验证明它在原核及真核生物细胞中都能高效表达。由于植物材料中不存在这种来自水母的基因,所以是一种理想的活体荧光标记分子,该蛋白能够自身催化形成发光结构并在紫外或蓝光激发下发出绿色荧光,具有易于检测、荧光稳定、无毒害、可进行活细胞定时定位观察等优点,这些特性使 GFP 作为分子标记物在植物基因工程研究中受到重视并获得成功^[4-5]。黄国存等^[6]以 GFP 为标记用花粉管通道途径将外源 DNA 导入棉花,经荧光检测和分子杂交验证,得到了转基因植株,为花粉管通道转基因方法的可行性提供了直接可靠的细胞及分子生物学证据。

现利用带有 GFP 的外源基因载体 pBI121-GFP-FT,通过质粒和农杆菌两种形式携带的外源基因,比较分析外源基因不同携带形式对百合遗传转化的影响。采用切割柱头授粉后涂抹外源基因、常规授粉后涂抹外源基因以及子房注射外源基因 3 种方式,确定适宜的导入方式。在此基础上,采用常规授粉后 0 h 涂抹外源基因和授粉后延迟 3 h 涂抹外源基因 2 种处理,分析导入时间对百合遗传转化的影响,从而筛选出百合花粉管通道法遗传转化的适宜条件,以期对今后花粉管通道法在百合中的应用提供理论依据。

收稿日期:2011-05-17

基金项目:国家“863”计划资助项目(2008AA10Z156);“十一五”国家科技支撑计划资助项目(2009BADB8B04);北京市教育委员会产学研合作资助项目

第一作者简介:李双(1983-),女,辽宁省锦州市人,博士,从事花卉分子育种的研究。E-mail:liandshuang@163.com。

通讯作者:贾桂霞(1963-),女,内蒙古自治区磴口县人,博士,教授,从事园林植物遗传育种的研究。E-mail:gxjia@bjfu.edu.cn。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 采用东方百合杂交系栽培品种 Sunny、Alma Ata、Legend、Crystal Blanca、Sorbonne 和 LA 系列栽培品种 Fangio 和 Pirax 的开花植株作为百合遗传转化受体植物材料。

1.1.2 载体与菌株 试验用载体 pBI121-GFP-FT 由北京市农林科学院提供,植物表达载体 pBI121 连有 CaMV35S 启动子和终止子(NOS)。农杆菌菌株为根癌农杆菌 EHA105。

1.1.3 菌液与质粒制备 菌液制备:挑取单菌落于 5~10 mL 含卡那霉素 $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ + 利福平 $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 LB 液体培养基中, 28°C 、 $200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 下培养 18 h,按照 1:(50~100)的比例转接到含有相同抗生素的 LB 培养液中, 28°C 、 $200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 下培养,直至 OD_{600} 达 0.8~1.0。

质粒制备:按照 TIANGEN 高纯质粒大提试剂盒说明书进行质粒提取。

1.2 方法

选取开放 2~3 d 并分泌黏液的花朵,于 10:00~12:00 进行授粉并导入外源基因。

1.2.1 外源基因的携带方式 采用质粒和农杆菌两种形式携带的外源基因对百合进行遗传转化,通过统计百合结实子房数量,计算子房结实率,分析外源基因不同携带形式对百合遗传转化的影响。

1.2.2 外源基因导入方式的筛选 共 3 种方式:(1)切割柱头至子房上部 1 cm 后授粉并涂抹外源基因;(2)常规授粉后涂抹外源基因;(3)采用微量进样器将外源基因注射到子房($10 \sim 15 \mu\text{L}$),分析外源基因不同导入方式对百合遗传转化的影响。

1.2.3 外源基因导入时间的筛选 采用常规授粉后 0 h 涂抹外源基因和授粉后延迟 3 h 涂抹外源基因两种处理,分析外源基因不同导入时间对百合遗传转化的影响。

1.3 荧光观察

采用 LEICA MZ16F 体视荧光显微镜对转化所得百合种子进行荧光检测。

1.4 PCR 检测

将所得种子用 TIANGEN 植物基因组 DNA 提取试剂盒提取 DNA,根据 GFP-FT 基因序列设计引物进行 PCR 检测。上游引物:5'-TTC-CCGTGGCCTCAGTTT-3',下游引物 5'-AGT-TCACCTTGATGCCGTTC-3'。反应条件: 94°C 预变性 4 min, 94°C 变性 45 s, 55°C 退火 1 min, 72°C 延伸 1 min, 35 个循环,最后 72°C 延伸 10 min。

2 结果与分析

2.1 外源基因不同携带形式对百合结实的影响

将菌液和质粒两种形式携带的外源基因进行百合的遗传转化(见表 1)。

表 1 外源基因不同携带形式对百合结实的影响

品种	品系	外源 DNA 种类	处理数量/朵	结实子房数量/个	结实率/%
Sunny	东方	菌液	60	40	66.7
Sunny	东方	质粒	60	17	28.3

由表 1 可知,外源基因以菌液形式导入后,百合子房结实率明显高于以质粒形式导入的子房结实率,因此菌液形式携带外源基因更利于百合花粉管通道法外源基因的导入。

2.2 不同方法导入外源基因对百合结实情况的影响

采用农杆菌菌液形式携带外源基因,对切割柱头授粉后涂抹农杆菌菌液、常规授粉后涂抹农

杆菌菌液和子房注射农杆菌菌液 3 种外源基因导入方式进行进一步筛选(见表 2)。

由表 2 可以看出,虽然采用了 3 种导入方式,但对东方百合杂种系的 4 个品种进行遗传转化的结论是一致的,即只有常规授粉后涂抹农杆菌菌液处理方式得到果实,其余 2 种处理均没有结实。因此,常规授粉后涂抹农杆菌菌液利于百合花粉管通道法外源基因的导入。

表 2 不同方法处理对百合结实的影响

品种	切割柱头授粉后			常规接粉后			子房注射		
	授粉数量	结实子房数量	结实率	授粉数量	结实子房数量	结实率	授粉数量	结实子房数量	结实率
	/朵	/个	/%	/朵	/个	/%	/朵	/个	/%
Alma Ata	30	0	0	30	8	26.7	30	0	0
Sorbonne	30	0	0	30	12	40.0	30	0	0
Legend	30	0	0	30	17	56.7	30	0	0
CrystalBlanca	30	0	0	30	13	43.3	30	0	0

2.3 外源基因导入时间对百合结实的影响

试验采用 LA 系列的 2 个品种和东方百合杂种系的 1 个品种进行遗传转化,表 3 结果表明,无论是东方系列还是 LA 系列的百合,都是常规授

粉后 0 h 涂抹外源基因的结实情况好于授粉后延迟 3 h 涂抹外源基因,因此授粉后 0 h 涂抹外源基因更利于百合花粉管通道法外源基因的导入。

表 3 不同时间导入外源基因后百合结实情况

品种	品系	处理方法	处理数量/朵	结实子房数量/个	结实率/%
Fangio	LA	0 h	25	20	80.0
		延迟 3 h	25	11	44.0
Pirax	LA	0 h	30	7	23.3
		延迟 3 h	30	3	10.0
Legend	O	0 h	30	17	56.7
		延迟 3 h	30	5	16.7

2.4 百合种子 GFP 荧光观察

对试验所得的部分百合种子进行荧光观察,由图 1 可以看出,对照种子中未观察到荧光现象,而 Sunny 的转基因种子观察到荧光现象,证明外源基因已经整合到百合基因组中。

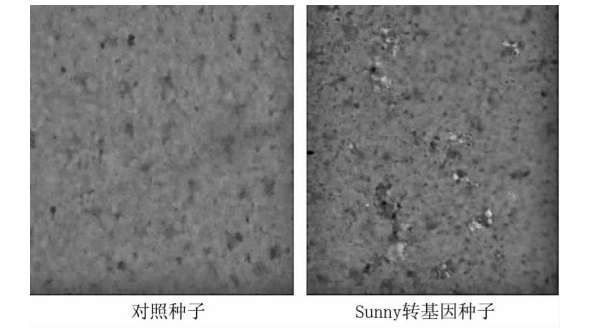


图 1 GFP 在百合种子中的表达情况

2.5 转基因植株的 PCR 检测

对 Sunny 种子进行 PCR 检测,由图 2 可知,8

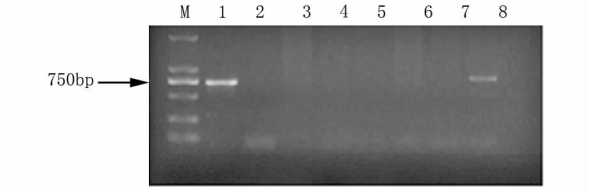


图 2 Sunny 种子 GFP-FT 的 PCR 检测

M:DL2000;1:阳性对照;2:阴性对照;3:ddH₂O; 4-8:Sunny 种子

号泳道(Sunny 种子)在 750 bp 处有条带,说明 GFP-FT 基因已经整合到 Sunny 基因组中。

3 结论与讨论

3.1 花粉管通道法在百合转基因中应用的可行性

目前,花粉管通道法在水稻、小麦、棉花、玉米、大豆等农作物及白菜、黄瓜、番茄等多种蔬菜作物上实现了外源基因的转移,获得了转基因植株,在分子育种领域取得了显著成果^[7-8]。而关于百合花粉管通道法应用报道仅有 1 篇^[1]。该试验采用带有荧光标记的载体 pBI121-GFP-FT 对百合进行花粉管通道法遗传转化,利用 GFP 对转化所得的种子进行荧光观察,发现其中部分有荧光现象,并通过 PCR 检测证实外源基因已经整合到植物基因组中,证明了花粉管通道法在百合转基因中是切实可行的。

3.2 影响百合花粉管通道法外源基因导入的因素

目前,应用花粉管通道法进行遗传转化时大部分采用质粒形式携带外源基因^[9]。李卉等^[10]采用质粒和农杆菌形式携带外源基因对大豆进行花粉管通道法遗传转化的过程中发现,以菌液形

式携带的外源基因可以进行遗传转化,但是以质粒形式转化的结实率和转化率要高于菌液形式。而该试验对农杆菌菌液和质粒 DNA 两种形式携带的外源基因进行比较研究的结果表明:以菌液形式携带外源基因进行百合花粉管通道法遗传转化是切实可行的,而且要优于质粒形式携带的外源基因,这与李卉等^[10]的研究结果有所不同,究其原因可能是物种间差异造成的,因为百合的花柱相对很长,从传粉至花粉管抵达子房大约4 d的时间^[11],在如此长的时间里,菌液形式防止了外源基因的分解,从而有利于百合的遗传转化。

在对外源基因导入方式进行研究时发现直接涂抹柱头授粉后涂抹外源基因更利于外源基因的导入,这与杜捷^[1]对兰州百合的研究结果基本一致。此外,关于外源基因导入时间这一因素对百合遗传转化的影响,认为授粉后 0 h 涂抹外源基因更利于百合花粉管通道法遗传转化,这与杜捷报道的授粉后 3 h 导入外源基因较适宜的结果有所不同,究其原因可能与父本花粉萌发特性以及品种间的差异性有关。

参考文献:

- [1] 杜捷. 兰州百合外源 DNA 花粉管通道法导入的初步研究[D]. 兰州:西北师范大学,2003.
- [2] 崔红,李朝霞,时向东,等. 花粉管通道法及其在烟草育种中的应用综述[J]. 烟草科技/栽培与调制,2003(3):34-36.
- [3] Luo Z X, Wu R. A simple method for the transformation of rice via the pollen tube pathway[J]. Plant Mol. Biol. Rep., 1988, 6(3):165-174.
- [4] Ishii M, Kunimura J S, Penna T C V, et al. Study on the thermal stability of green fluorescent protein(GFP) in glucose parenteral formulations[J]. International journal of Pharmaceutics, 2007, 7(1-2):109-117.
- [5] 张宁,侯喜林,余丽芸,等. 重组 GFP 干酪乳杆菌的构建及其在小鼠肠道内的定植分布[J]. 微生物学报, 2010, 50(9):1232-1238.
- [6] 黄国存,董越梅,孙敬三. 以 GFP 为标记用花粉管通道途径导入外源 DNA[J]. 科学通报, 1998, 43(23):2531-2534.
- [7] 曾君祉,吴有强,王东江,等. 花粉管通道(或运载)法转化的植株后代遗传表现及转化机理的探讨[J]. 科学通报, 1998, 43(6):561-566.
- [8] 谢道昕,范云六,倪万潮,等. 苏云金杆菌(*Bacillus thuringiensis*)杀虫晶体蛋白基因导入棉花获得转基因植株[J]. 中国科学(B 辑), 1991(4):367-373.
- [9] 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[J]. 农业与技术, 2007, 27(4):42-43.
- [10] 李卉,武天龙. CaCl₂ 诱导大豆花粉管通道农杆菌转基因研究[J]. 大豆科学, 2007, 26(1):55-59.
- [11] 刘春,穆鼎,明军,等. 百合种间杂交受精前障碍的研究[J]. 园艺学报, 2006, 33(3):653-656.

Study on the Pollen-tube Pathway Transformation in Lily

LI Shuang, YUAN Lin, JIA Gui-xia

(Landscape Architectural College of Beijing Forestry University/National Engineering Research Center for Floriculture, Beijing 100083)

Abstract: In order to improve transgenic efficiency, the expression vector pBI121-GFP-FT was transformed into lily using pollen-tube pathway method and the effects of exogenous vector type, introduction way and introduction time(after pollination) were discussed. The effects of *Agrobacterium* and plasmid were compared. The results showed that exogenous vector type of *Agrobacterium* was better for lily transformation. Three introduction methods were carried out, including cutting stigma pollination and conventional pollination followed by exogenous vector and injecting exogenous vector into ovary. The results indicated that smearing exogenous vector after conventional pollination was suitable for lily transformation. Different introduction times after pollination for 0 h and 3 h were considered, results indicated that 0 h was the optimization introduction time. The green fluorescence was observed in the seeds under fluorescent microscope. Results of PCR also proved that the GFP-FT gene had integrated into lily genome.

Key words: pollen-tube pathway; GFP; lily