



## 提高棉花花粉管通道技术转化率的研究

李 静, 韩秀兰, 沈法富\*, 刘 莲  
(山东农业大学农学院, 泰安 271018)

**摘要:**利用花粉管通道技术将含有 IPT 基因的双元表达载体质粒 pBG121 导入不同的陆地棉品种(中棉所 10 号、中棉所 24 和中棉所 36)中,采取正交试验设计,探讨基因型、导入时间、导入 DNA 的浓度和化学诱变剂的浓度对棉花转化率的影响,筛选出了适宜提高棉花花粉管通道技术转化率的方法。应用结果表明,改进方法的转化率比传统的方法提高两倍。

**关键词:**棉花;花粉管通道法;转化率

中图分类号:S562.035.3 文献标识码:A

文章编号:1002-7807(2005)02-0067-05

### Study on Promoting the Rate of Pollen-tube Pathway Transformation in Cotton

LI Jing , HAN Xiu-lan , SHEN Fa-fu\* , LIU Lian

(Department of Agronomy, Shandong Agriculture University , Tai'an 271018, China)

**Abstract:** The plant bivalent expression vector pBG121 carried IPT gene was transformed into different cotton cultivars (CCRI 10, CCRI 24, CCRI 36) using pollen-tube pathway method. Through orthogonal experiment, we discussed the effects of genotype, introduction time (after pollination), DNA concentration and EMS concentration on transformation rate in cotton. The orders of importance on the transformation rate was: EMS concentration > acceptor genotype > DNA concentration > introducing time. Correlated with transformation rate, the acceptor genotype and the EMS concentration had significant differences between different treatments; the DNA concentration and the introducing time didn't make significant differences among different treatments. So an optimal condition, in which the transformation rate was promoted, was obtained: the genotype was CCRI24, the DNA concentration was  $0.01 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , the EMS concentration was  $0.01 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , the introducing time was 36 hours after pollination. In order to verify the function of the senescence-inhibition chimeric gene and the optimal transformation condition that was screened, we selected CARI10 as the acceptor genotype, introduced  $0.01 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  DNA and  $0.01 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  EMS at 36 hours after pollination. Another treatment (CK) was the same as above except EMS. The CK had buffer of the same volume as EMS in optimal condition. The applied result showed that compared with the CK, the transformation rate of optimal condition enhances two times.

**Key words:** cotton; pollen-tube pathway; transformation rate

棉花的花器官大、花期长且组织培养受基因型的限制,因此利用花粉管通道技术进行遗传转化在棉花中研究的早。目前利用该技术已将 Bt 杀虫毒蛋白基因、几丁质酶基因和葡萄糖氧化酶基因等导入不同的棉花品种中,并且选育出了生

产上大面积应用的棉花品种。但是,由于影响棉花花粉管通道技术的因素多,导致该技术的转化率低且不稳定(在棉花中的转化率为 1%左右)。提高棉花花粉管通道技术的转化率是棉花遗传转化研究急需解决的问题之一。

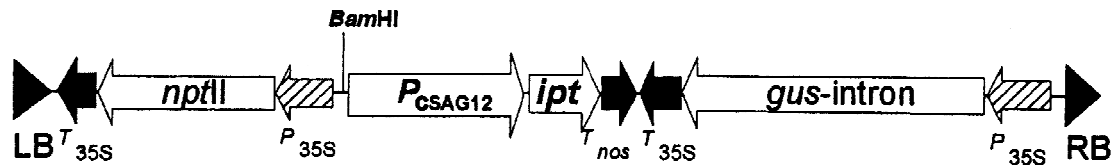
进行棉花合子化学诱变的研究时,利用花粉管通道技术将低浓度的化学诱变剂和 DNA 溶液导入棉花中,结果发现变异体的频率提高<sup>[1]</sup>。为此,本研究采取正交试验设计,探讨受体基因型、导入 DNA 浓度、导入化学诱变剂浓度和导入时间对棉花花粉管通道技术转化率的影响,以期筛选出提高棉花花粉管通道技术转化率的方法。

## 1 材料和方法

### 1.1 供试材料

1.1.1 棉花品种。陆地棉(*Gossypium hirsutum* L.)品种:中棉所 10 号、中棉所 24 和中棉所 36,由中国农业科学院棉花研究所短季棉育种课题组惠赠。

1.1.2 菌株和载体。质粒为 pBG121,由中国农



$P_{CSAG12}$ :棉花衰老特异启动子;ipt,异戊烯基转移酶编码序列; $P_{35S}$ :CaMV 35S RNA 启动子; $T_{35S}$ :CaMV 35S RNA 的终止子; $nptII$ ,新霉素磷酸转移酶基因; $gus$ : $\beta$ -葡萄糖醛酸糖苷酶基因; $T_{nos}$ ,胭脂碱合成酶基因的终止子

图 1 抑制衰老的嵌合基因结构图

Fig. 1 Construction of the senescence-inhibition chimeric gene

业科学院棉花研究所和山东农业大学联合构建,结构如图 1。

### 1.2 试验方法

1.2.1 质粒 DNA 的提取。参见文献[2],提取后在 0.8%的琼脂糖胶上电泳,检测质粒 DNA 的纯度和浓度,并将质粒 DNA 用 TE 稀释到  $1\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。根据实验的需要,使用时分别稀释至  $0.01\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $0.03\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  和  $0.06\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

1.2.1 EMS 溶液的配制。甲基磺酸乙酯(ethyl methane sulfonate,简称 EMS)为 Sigma 公司产品,用磷酸缓冲液配成  $1\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  的母液,过滤灭菌,4℃保存。

1.2.3 DNA 的导入技术。2002 年,选择棉花的中部果枝第一和第二果节位花朵作为注射对象,开花前一天下午去雄,第二天上午 8 点开始授粉,授粉后根据试验方案,在不同时间、利用不同的浓度进行导入,EMS 溶液和 DNA 溶液一起混合注射至棉花的子房中,每种溶液的体积各  $10\ \mu\text{l}$ 。注射后,在棉铃柄的基部涂抹  $40\ \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  的赤霉素溶液,同时摘除该果枝的顶心,以增加注射铃的成铃率,每个处理注射 300 朵花,收获时按照处理收获。2003 年,根据上一年筛选到的最佳导入方法,以中棉所 10 号作为受体,进行 DNA 的导入,除在开花的前一天下午进行扣线自交外,其余的方法同 2002 年,同时按照常规导入方法设对照。

1.2.4 转基因植株检测。卡那霉素田间筛选:收获的种子,按处理田间种植,在棉花的真叶期用

0.6%的卡那霉素涂抹第一或第二真叶,一周后观察,进行初步筛选。PCR 检测:对筛选到的卡那霉素抗性植株,根据  $nptII$ ,设计 PCR 引物,引物的序列为:5'-CGCATGATTGAACAAGATG-GAT-3' 和 5'-GTCCCCTCAGAAGAAGACTCGT-3'。PCR 扩增条件为:94℃预变性 5 min;94℃变性 30 s;52℃复性 30 s;72℃延伸 40 s,共 35 个循环;72℃延伸 5 min。扩增的产物在 0.8%的琼脂糖上电泳,溴化乙锭染色,紫外灯下检测、照相。根据扩增带的有无,确定获得的转基因株数,计算转化率。

1.2.5 统计分析。采用唐启义的 DPS 数据处理系统(2.0C)<sup>[3]</sup>进行分析。

### 1.3 试验设计

根据四种因子:基因型、DNA 的浓度、EMS 的浓度和导入时间(授粉后),分别选用三个水平,选用  $L_9(3^4)$  的正交表,试验因素水平见表 1,试验方案见表 2,试验重复 2 次。

## 2 结果与分析

### 2.1 转基因植株的鉴定

卡那霉素涂抹一周后,若植株的涂抹叶片有黄色斑点,表明该植株不抗卡那霉素,为非转基因植株;若没有黄色斑点,叶色正常,则该植株抗卡那霉素,为转基因植株。为进一步验证卡那霉素的筛选结果,进行特异引物 PCR,有目的基因条带的为转基因植株;没有目的基因条带的为非转基因植株,图 2 为部分转基因植株的 PCR 图谱。

表 1 试验因素水平

Table 1 Levels and factors of the extraction techniques

水平	A 基因型	B DNA 的浓度/(g·L <sup>-1</sup> )	C EMS 的浓度/(g·L <sup>-1</sup> )	D 导入时间(授粉后)/h
1	中棉所 10 号	0.01	0.00	12
2	中棉所 24	0.03	0.01	24
3	中棉所 36	0.06	0.05	36

表 2 试验方案和结果

Table 2 Arrangement and result of orthogonal test

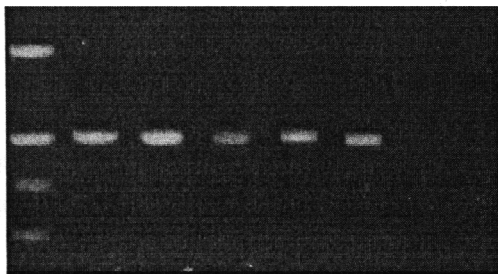
处理	A 基因型	B DNA 的浓度 /(g·L <sup>-1</sup> )	C EMS 浓度 /(g·L <sup>-1</sup> )	D 导入时间(授粉后)/h	阳性株数/株		转化率/%		均值
					重复		重复		
					1	2	1	2	
1	1	1	1	1	4(606)	6(608)	0.66	0.99	0.83
2	1	2	2	2	8(606)	7(625)	1.32	1.12	1.22
3	1	3	3	3	3(600)	4(606)	0.50	0.66	0.58
4	2	1	2	3	13(605)	15(605)	2.15	2.48	2.32
5	2	2	3	1	6(608)	8(611)	0.99	1.31	1.15
6	2	3	1	2	9(604)	7(619)	1.49	1.13	1.31
7	3	1	3	2	4(597)	6(618)	0.67	0.97	0.82
8	3	2	1	3	6(600)	5(602)	1.00	0.83	0.92
9	3	3	2	1	6(625)	10(606)	0.96	1.65	1.31

注:各个处理均导入 300 朵花,所获得的种子全部播种于田间,然后对所有出苗的棉株进行检测。

利用上述方法,对各处理的植株进行鉴定,根据转化总株数,计算转化率(表 2)。

2.32%。

利用随机区组模型进行方差分析表明,EMS 的浓度和受体基因型对转化率的影响达到极显著水平(显著性检验 P 值分别为:0.175%, 0.124%),而导入 DNA 的浓度和时间对转化率的影响差异不显著(显著性检验 P 值分别为:18.622%, 41.268%)。说明在利用花粉管通道技术进行基因转化时,EMS 的浓度和受体棉花的基因型对转化率的影响较大,而导入 DNA 的浓度和导入时间对转化率的影响较小,所选用的三种类型的基因型都获得了转基因植株,但各类型的转化率不同。对不同基因型差异显著性 LSR 检验(表 4)表明:中棉所 24 获转化率最高,其次为中棉所 36,最后为中棉所 10 号;中棉所 24 与中棉所 36、中棉所 10 号的差异达极显著水平,中棉所 10 号和中棉所 36 的差异不显著。这说明利用花粉管通道技术进行遗传转化时,转化率受到棉花的基因型影响,不同受体基因型的转化率不同。同样对导入 DNA 的浓度各水平间差异显著性 LSR 检验表明:不同的导入 DNA 浓度间差异不显著,这说明在本试验 DNA 的浓度范围内,DNA 的浓度对转化率影响较小。对导入 EMS 的浓度各水平间差异显著性 LSR 检验表明:0.01g·L<sup>-1</sup> EMS 处理与 0 g·L<sup>-1</sup>、0.05 g·L<sup>-1</sup> EMS 的差异



1 DNA Marker(DL 2000);2. pBG121 质粒;3-6 转基因植株;7. 未转基因对照

图 2 转基因植株的 PCR 检测

Fig. 2 PCR of transgenic plants

## 2.2 处理水平和处理组合的选优

利用 DPS 数据处理系统对各处理进行分析<sup>[3]</sup>,根据表 3 极差分析可以得出,各因素对转化率的重要性顺序为:EMS 的浓度>基因型>导入 DNA 浓度>导入时间,若在限定的时间内提高转化率,可按照此顺序进行深入研究,见效最快。从表 3 中的均值可以看出:处理组合 A<sub>2</sub>B<sub>1</sub>C<sub>2</sub>D<sub>3</sub>(基因型为中棉所 24,导入质粒 DNA 的浓度为 0.01 g·L<sup>-1</sup>,EMS 的浓度为 0.01 g·L<sup>-1</sup>,授粉后 36 h 导入)即试验中处理 4 的转化率最高,达到

表3 正交试验极差分析结果  
Table 3 Result of variance analysis of orthogonal test

处理		A	B	C	D
		基因型	DNA 的浓度/(g · L <sup>-1</sup> )	EMS 的浓度/g · L <sup>-1</sup>	导入时间(授粉后)/h
总	X <sub>1</sub>	5.25	7.92	6.10	6.56
	X <sub>2</sub>	9.55	6.57	9.68	6.70
和	X <sub>3</sub>	6.08	6.39	5.10	7.62
均	X <sub>1</sub>	0.875	1.320	1.017	1.093
	X <sub>2</sub>	1.592	1.095	1.613	1.117
值	X <sub>3</sub>	1.013	1.065	0.850	1.270
极差	R	0.717	0.255	0.763	0.177
调整	R	0.645	-0.230	0.688	0.159

达到极显著水平,而 0 g · L<sup>-1</sup> 和 0.05 g · L<sup>-1</sup> EMS 的处理差异不显著。这说明 EMS 浓度对转化率的影响较大,以 EMS 浓度 0.01 g · L<sup>-1</sup> 较适宜,当达到 0.05 g · L<sup>-1</sup> 时,转化率反而降低。对导入的

时间各水平间差异显著性 LSR 检验表明:导入时间的各水平间差异不显著,这说明在本试验导入的时间范围内,导入时间对转化率的影响较小。

表4 单因素的 Duncan's 新复极差测验多重比较

Table 4 The Duncan's LSR of single factor

处理	A			B			C			D		
	均值	5%显著水平	1%显著水平	均值	5%显著水平	1%显著水平	均值	5%显著水平	1%显著水平	均值	5%显著水平	1%显著水平
X <sub>1</sub>	0.88	b	B	1.32	a	A	1.02	b	B	1.09	A	A
X <sub>2</sub>	1.59	a	A	1.10	a	A	1.61	a	A	1.12	A	A
X <sub>3</sub>	1.01	b	B	1.07	a	A	0.85	b	B	1.27	A	A

注:α=2 时,LSR<sub>0.05</sub>=0.314, SLSR<sub>0.01</sub>=0.457; α=3 时,LSR<sub>0.05</sub>=0.327, LSR<sub>0.01</sub>=0.482

对各处理进行差异显著性 LSR 检验(表 5): 处理 4(中棉所 24、0.01 g · L<sup>-1</sup> 的 DNA 浓度、0.01 g · L<sup>-1</sup> 的 EMS 浓度、授粉后 36 小时导入)的转化率与其他处理达到极显著差异。

### 2.3 提高花粉管通道技术转化率优选组合的验证

进一步试验选取的处理要综合考虑基因的作用和实际操作过程:由于导入的是棉花抗早衰的基因,所以在选取基因型时,为验证导入基因的功能,应以早衰的中棉所 10 号作为受体。由于棉花自花授粉 24 h 后,有明显的形态差异,且为上午,便于操作;同时导入时间的各水平间差异不显著,所以应取授粉后 24 h 作为导入时间。其它因素水平的选取按照优选组合而定。因此,下一年试验的处理为:棉花的基因型为中棉所 10 号,导入 DNA 和 EMS 的浓度均为 0.01 g · L<sup>-1</sup>,导入时间为授粉后 24 h。

以中棉所 10 号作为受体,在棉花自花授粉 24 h 后,选用 0.01 g · L<sup>-1</sup> 的 DNA 溶液进行导入,优选组合同时导入 0.01 g · L<sup>-1</sup> 的 EMS 液,对照导入同体积的缓冲液。每个处理导入棉花 450 朵花,收获的种子在田间接处理种植,经过卡那霉素

初步筛选和 PCR 进一步验证:常规导入的转化率

表5 处理间的 Duncan's 新复极差测验多重比较

Table 5 The Duncan's LSR between treatment

处理	平均	5%显著水平	1%显著水平
4	2.315	a	A
6	1.310	b	B
9	1.305	b	B
2	1.220	b	B
5	1.150	bc	B
8	0.915	bc	B
1	0.825	bc	B
7	0.820	bc	B
3	0.580	c	B

为 0.62%,优选组合的转化率为 1.94%,优选组合的转化率比常规导入方法提高了两倍多。

### 3 讨论

花粉管通道技术操作方便、速度快、费用低。但其转化率受较多因素影响,偏低且不稳定<sup>[4]</sup>。因此,寻找影响转化率的主要因素是该技术应用

的关键。本试验通过正交设计(2次重复,18次试验),探讨了基因型、DNA浓度、EMS浓度和导入时间四个因素三个水平对转化率的影响。试验结果统计分析表明:1)在本试验设计的导入DNA浓度和导入时间范围内,该二因素对转化率的影响不显著,说明:在棉花自花授粉24h后导入 $0.01\sim 0.05\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的DNA是可行的。2)试验所利用的三个棉花品种均获得转基因植株,说明:利用该技术进行棉花遗传转化没有基因型的限制,但是不同基因型间的转化率却差异显著,这表明不同的遗传背景影响外缘基因的整合。3)本试验经过选优,确定导入DNA的溶液中含有低浓度的EMS可以提高棉花花粉管通道技术的转化率,高浓度的EMS对提高转化率效果不明显。

经过两年的试验证明:同一基因型棉花,同一浓度的DNA溶液,同一时间导入,导入液中含有低浓度的EMS比不含EMS的常规导入方法,在转化率上可提高2倍多。低浓度的EMS提高转化率的可能原因:一方面,化学诱变剂EMS可能

抑制受体棉花胚囊细胞内限制性内切酶活性,使外缘基因整合到受体染色体的机率增加;另一方面,EMS可能对受体棉花的DNA造成损伤,受体棉花在进行基因组修复时,有利于外缘基因的整合。关于导入DNA溶液中EMS浓度和作用机理有待进一步探讨。

#### 参考文献:

- [1] 沈法富,于元杰,尹承俭. 棉花合子期化学诱变获得的早熟品系及其RAPD分析[J]. 遗传学报,1999,26(2):174-178.
- [2] 萨姆布鲁克J,弗里奇EF,曼尼阿蒂斯T. 分子克隆实验指南[M]. 北京:科学出版社,1998. 309.
- [3] 唐启义,冯明光. 实用统计分析与计算处理平台[M]. 北京:中国农业出版社,1997.
- [4] LUO Z X, WU R. A simple method for the transformation of rice via the pollen-tube pathway[J]. Plant Mol Bio Rep, 1988,6(3):165-174. ●