

农杆菌真空渗透法转化棉花花粉的初步研究

张燕红^{1,2}, 黄乐平^{1*}, 周小云¹, 王冬梅¹

(1. 新疆农科院核生所, 乌鲁木齐 830091; 2. 新疆农业大学农学院, 乌鲁木齐 830052)

摘要:以陆地棉花粉为受体,利用农杆菌真空渗透法将外源 *Susy* 基因转入新陆早 19,对转化因素作了初步研究。结果表明,花粉在 45%蔗糖浓度的花粉悬浮液中能维持适当渗透压,破损率最低;在-80 Pa 压力下,菌液 OD₆₀₀ 值在 0.6~1.2 范围内,真空渗入时间在 15~25 min 内,能维持较低花粉破损率及较高瞬间转化率;对自然花粉、农杆菌浸染的花粉及农杆菌真空渗透的花粉,分别进行 GUS 瞬时检测,未抽真空的花粉未被染色,而辅助真空处理的花粉部分变成蓝色,后将其授粉于已去雄的柱头上,观察到花粉管的伸长,说明抽真空后部分花粉仍有活力。

关键词:农杆菌真空渗透法;陆地棉;花粉;转化

中图分类号:S562.035.03 **文献标识码:**A

文章编号:1002-7807(2008)05-0354-05

The Preliminary Study on Transformation of Cotton Pollen Using Agrobacterium-mediated Vacuum Infiltration

ZHANG Yan-hong^{1,2}, HUANG Le-ping^{1*}, ZHOU Xiao-yun¹, WANG Dong-mei¹

(1. Institute of Nuclear and Biological Technologies, Xinjiang Academy of Agricultural Sciences, Urumqi 830091, China; 2. College of Agronomy, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China)

Abstract: Upland cotton pollen as the receptor, Sucrose Synthase Gene (*Susy*) was transferred to Xinluzao19 by Agrobacterium-mediated vacuum infiltration, the suitable conditions of vacuum infiltration method were determined. The medium consisting of 45% (ρ) sucrose was suitable, could maintain a proper infiltration press and the lower exploded pollen rate. Under pressure of -80 Pa, OD₆₀₀ 0.6~1.2, in order to maintain the lower exploded pollen rate and higher transient transformation, the appropriate time of vacuum infiltration was 15~25 minutes. For the normal pollen, Agrobacterium infected and Agrobacterium-mediated vacuum infiltrated pollen, a transient GUS expression assay and the exploded pollen rate proved that the Agrobacterium-mediated vacuum infiltrated pollen became blue. Those activated pollen would be pollinated on the stigma emasculated, respectively. Result showed that pollen using Agrobacterium-mediated vacuum infiltration were activated and could germinate pollen tubes.

Key words: agrobacterium-mediated vacuum infiltration; upland cotton; pollen; transformation

自 Bechtold^[1]等建立了整株原位真空渗入遗传转化方法后,许多学者在拟南芥^[2]和芸薹属一些作物^[3]上进行了大胆尝试。抽真空浸染植株作为农杆菌介导遗传转化的一种辅助手段,在拟南芥、白菜、油菜等的遗传转化中应用广泛^[4-6],但都是以完整植物的花序为对象,对株型较大的棉花

来讲并不适合。而此后,有采用子叶(苦豆子^[7]和烟草^[8])为外植体进行真空渗入浸染的研究,显著提高了转化率;而以花粉为外植体,除国外的 Tjokrokusumo 等^[9]利用该法转化矮牵牛外,国内李晓等首次利用农杆菌真空渗透法转化棉花粉^[10-12],并获得转基因植株。由于该方法利用了

自然繁殖过程,又利用了 T-DNA 的整合特性,避免了组织培养受基因型限制的困难,同时也避免了花粉管通道法采用裸露 DNA 导致的转化频率低及整合机制不很明确等缺点,是棉花遗传转化中一种比较好的转化方法。该法使用真空渗透,与不使用相比可以更容易使农杆菌液渗入花粉,最终获得转基因棉花。但是,该方法在遗传转化中仍存在不少尚待改进的地方。本文以陆地棉花粉为研究对象,对农杆菌感染花粉转化过程中的花粉培养液、真空渗入时间、菌液浓度以及转化后花粉的活性和转化率等方面进行研究。

1 材料和方法

1.1 材料

供试材料为纯合的早熟陆地棉新陆早 19 号,种植在新疆农科院核技术生物技术研究所温室和玛纳斯生物技术育种基地。所用根癌农杆菌菌株 GV3101,菌株内含有 PCA2301 质粒,该载体带有一个 GUS 报告基因、卡那霉素抗性标记基因和外源基因蔗糖合成酶基因 *SuSy*。

1.2 方法

1.2.1 采集花粉时间。采集当天 12 h 开的新鲜受体材料的花粉,温室的花粉根据温室开花时间采集,置 4℃ 冰箱中备用。

1.2.2 花粉萌发培养基的配置。无机盐母液组成: 0.1% H_3BO_3 、0.3% $Ca(NO_3)_2$ 、0.2% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、0.1% KNO_3 。不同蔗糖浓度的培养基:取 10 mL 无机盐基液配成 100 mL 基本液体培养基,分别加入不同浓度的蔗糖处理,0%、10%、25%、35%、40%、45% 和 50%。

1.2.3 不同处理花粉生活力测定。用联苯胺-甲苯酚法测定花粉生活力^[19],将花粉浸泡在该溶液中 1 min 后再滴一滴 3% 的双氧水,3~5 min 后在显微镜下观察颜色。凡染色深且形态正常的花粉被视为有生活力的花粉,染色浅、无色或形态异常的花粉为弱生活力和无生活力的花粉。

1.2.4 农杆菌真空渗透转化棉花花粉。农杆菌用甘油管分装储存在 -20℃ 冰箱中,每次取一管活化,当菌液的 OD_{600} 值为 0.6~1.2,离心 ($5000 r \cdot \min^{-1}$, 5 min) 并收集菌体,重新悬浮于花粉萌发培养基中。收集新鲜花粉浸泡于该菌液中并抽真空 (压力: -80 Pa),不同时间处理,花粉浓度为 $100 g \cdot L^{-1}$,然后授粉于已去雄套袋隔离的柱头上(授粉期间可将其保存在 4℃ 冰箱中),继续套管隔离。

1.2.5 转化花粉的 GUS 瞬时表达检测。将抽完真空后的花粉悬浮液离心 ($3000 r \cdot \min^{-1}$, 3 min) 并

收集混有菌体的花粉,重新悬浮于加入不同蔗糖浓度处理的花粉萌发培养基中洗脱菌体,收集花粉,浸入适量 X-Gluc 溶液, 37℃ 过夜,然后在显微镜下观察,每处理重复 3 次,每次用移液枪吸取 30 μL 处理花粉悬浮液,统计被染成蓝色的花粉个数,以检测用农杆菌真空渗透转化棉花花粉的瞬时转化率,其中蓝色反应示为 GUS 基因在花粉中有表达。

1.2.6 花粉管在花柱中生长的观察。在盛花期,每天下午 6:00-10:00 当花冠呈黄绿色,并且显著地突出苞叶时开始去雄,将花冠连同雄蕊剥下,注意尽量不要破坏花萼,之后套上塑料吸管,并扎上标记毛线。次日 12:00 左右,待露水干后,花药开裂时,开始授粉,把采下的花冠下翻,露出雄蕊,将花粉涂抹在前日已去雄的雌蕊柱头上(CK1),另将浸过农杆菌的花粉(CK2)和浸菌并抽真空处理的花粉分别用毛笔涂抹于有不同标记毛线的柱头上。授粉后计时,在授粉后 4-7 h 内分别采摘(用刀片从花柱的下部切下)以上处理的棉花雌蕊柱头,并立即放入 FAA 固定液(50% 酒精 90 份、甲醛 5 份、冰醋酸 5 份)中固定 24 h 以上,采用常规石蜡切片法,用水溶性苯胺蓝染色,置于 Olympus MIC-D/DP01 显微镜观察花粉管伸长情况并照相。

2 结果与分析

2.1 不同蔗糖浓度花粉培养基对花粉破损的影响

本试验在无机盐母液的基础上,分别添加 0%~50% 不同蔗糖浓度的 7 个处理。结果表明,在不含蔗糖的花粉萌发培养液中,棉花花粉在培养液中的破损率为 52.4%,随着蔗糖浓度逐渐增加,花粉的破损率呈逐渐下降趋势,直到含 50% 的蔗糖时,破损率下降到 4.3%。因此,就破损率而言,当培养基中蔗糖浓度达 45% 时花粉破损率最低,说明 45% 的蔗糖溶液能保持渗透压的动态平衡,故能最大限度地保存花粉(图 1)。

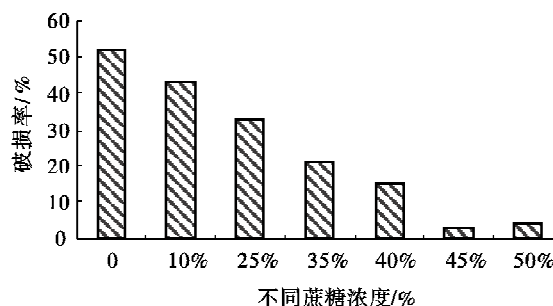


图 1 不同蔗糖浓度对花粉破损的影响

Fig. 1 Effect of different sucrose concentrations in medium on the exploded pollen rate

2.2 不同真空渗入时间对花粉的影响

将采集的新鲜花粉,浸泡在含有目的基因的GV3101农杆菌的花粉萌发培养液中,花粉浓度为 $100\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,进行抽真空,用联苯胺-甲萘酚法测定抽真空处理过的花粉。结果表明,抽真空对花粉的活性无大的影响,仅有少部分花粉染色较浅,形态小,失去活性。观察不同时间处理花粉发现,真空渗入时间的长短对花粉的破损有一定影响,在25 min内抽真空对花粉的破损相对较轻,破损率差异不显著,25 min后随着真空渗入时间的延长,花粉破损率逐渐升高,尤其30 min之后,花粉几乎全部破损,大量内容物溢出(图3箭头所示),悬浮液混浊,见图2和3。从图2中还可看出,蔗糖浓度在50%时花粉的破损率几乎在每个时间处理下都略高于45%的,表明在相同真空压力作用下,蔗糖浓度过高,可改变花粉的渗透压。本实验使用的真空泵压力为-80 Pa时,真空浸染花粉的时间在15~25 min内花粉的活性保持较好,且破损率也较低。

2.3 不同真空渗入时间及菌液浓度对花粉的GUS瞬间转化率的影响

我们将农杆菌真空渗透的花粉用X-Gluc溶液染色后,发现花粉粒部分变成蓝色,而只浸农杆菌的花粉却无变色的,说明抽真空产生的负压使质粒DNA吸附于花粉粒上并表达。因此,本试验对比不同农杆菌 OD_{600} 值和真空渗入时间对花粉GUS瞬时表达的影响。结果表明,随着菌液浓度的增加,转化率略呈增加的趋势,在 OD_{600} 为0.6 h,随着真空渗入时间的延长,花粉的瞬间转化逐渐升高;当为0.8时,变化同 OD_{600} 值为0.6,但到30 min时有所降低;当为1.2时,转化率增加不大,变化规律不明显(图4)。分析原因可能是,当菌液浓度低时,其不影响花粉悬浮液的渗透压,所以随时间的延长瞬间转化逐渐提高,而随时间的延长,花粉破损越来越多,从而影响其转化率。另外,GUS瞬时检测具有很大的随机性,所以不同时间处理或菌液浓度下,花粉的瞬间转化率有所不同。因此,在一定体积的容器中,菌液浓度较高时,并不意味着转化率也较高。

2.4 抽真空后花粉在柱头上的萌发

将抽真空20 min处理的花粉授于已去雄的新陆早19号棉花柱头上,用自然花粉(CK1)和只浸农杆菌而未抽真空的花粉(CK2)作为对照,将授粉后4-6 h的花柱切下,每处理随机选取50个花柱做石蜡切片及水溶性苯胺蓝染色观察。如图5箭头所示,自然授粉花柱中部花粉管多如雨点,

农杆菌浸染花粉和真空渗透花粉的花粉管稀少,分布不多,此结果与李晓研究结果相同^[12],说明抽真空处理棉花花粉,未破损的花粉仍有活性,经人工授粉,并能在柱头上萌发,验证了该方法转化棉花花粉的可行性。

3 结论与讨论

棉花花粉是带刺的厚壁花粉,花粉粒在水溶液介质中极易膨胀破裂而失去生活能力。选择含一定浓度溶质作为介质,才能维持花粉粒细胞正常的膨压,使质粒DNA吸附于花粉粒上并在柱头上正常萌发,因此,调节渗透压是棉花花粉萌发的先决条件。本研究筛选适合棉花花粉浸染的悬浮液,发现在45%蔗糖浓度的无机培养液中,花粉的完整性好;且在抽真空处理下,破损率较50%低。

于艳杰等用原位萌发法和联苯胺-甲萘酚法测定出的棉花自然花粉和抽真空花粉的活力相同^[14],表明抽真空处理不会影响花粉在柱头上的萌发和在花柱中的生长。通过本实验研究发现,真空渗透花粉经过GUS瞬时检测,部分花粉变为蓝色,说明质粒DNA已吸附于花粉上并表达。后将处理花粉授粉,可观察到萌发的少量花粉管,这与前人研究结果相符^[11],说明真空渗透转化花粉方法的可行性。但在实验中,花粉受长时间真空压力的作用,易破损。因此,为使花粉既保持完整又能渗入质粒,应当选择适当的时间范围,进行抽真空。在利用农杆菌介导的遗传转化时,菌的浓度在其对数生长期转化率高,但对于真空渗透转花粉来说, OD_{600} 值在0.6~1.2范围内,花粉的GUS瞬间转化差异无规律可寻,并有很大的随机性。

在农杆菌介导的真空渗透转化操作时,除花粉悬浮液、真空渗入时间和菌液浓度主要因素外,还受农杆菌的质量、花粉活力、授粉时间、天气及其受体材料的长势、去雄质量等因素的影响。因此,在真空渗透转化花粉时,要在晴朗天气进行,选择长势均匀的材料,不可过高或过矮,避免柱头的暴晒或阴蔽,操作时要谨慎细心,尽量避免因人因素和环境干扰而造成的畸形铃或结铃率低等,从而在一定程度上提高棉花花粉真空渗透的转化效率。

本研究通过对影响真空渗透转化陆地棉花粉条件的一年摸索,已基本筛选出适宜的转化条件,并收获大量种子,有待后期进行转化株的进一步分析研究。

参考文献:

- [1] BECHTOD N, Ellis J. In Planta Agrobacterium-mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plant[J]. CR Acad Sci Paris Life Sci, 1993, 316:1194-1199.
- [2] CECCHINE E, Gong Z H, Geri C, et al. Transgenic *Arabidopsis* lines expressing gene VI from cauliflower mosaic virus variants exhibit a range of symptom-like phenotype and accumulate inclusion bodies[J]. Mol Plant Microbe Interactions, 1997, 10: 1094-1101.
- [3] CAO Ming-qing, Liu Fan, Yao Lei, et al. Transformation of pakchou (*Brassica rapa* L. ssp. chinensis) by Agrobacterium infiltration[J]. Mol Breeding, 2002 (6): 67-72.
- [4] 巩振辉, Milner J J, 何玉科. 拟南芥基因转移新方法-真空渗入法的研究[J]. 西北植物学报, 1996, 16 (3): 277-283.
- [5] 曹传增, 刘凡, 赵泓, 等. 影响不结球白菜真空渗入转基因频率的几个因素[J]. 华北农学报, 2003, 18 (3): 35-38.
- [6] 张广辉, 巩振辉, 薛万新, 等. 大白菜和油菜真空渗入遗传转化法初报[J]. 西北农业大学学报, 1998, 26 (4): 1-4.
- [7] 赵东利, 张春广, 王新宇, 等. 发根农杆菌对苦豆子高频转化条件的优化[J]. 药物生物技术, 2002, 9(4): 220~223.
- [8] 刘巧真, 王永亮, 刘卫群, 等. 真空渗入浸染转化烟草的初步研究[J]. 河南农业科学, 1996, 3: 48-50.
- [9] TIOKROKUSUMO D, Heinlich T, Wylit S, et al. Vacuum infiltration of *Petunia hybrida* pollen with *Agrobacterium tumefaciens* to achieve plant transformation[J]. Plant Cell Reports, 2000, 19: 792-797.
- [10] 李晓, 王学德. 根癌农杆菌转化棉花花粉的研究[J]. 棉花学报, 2004, 16(6): 323-327.
- [11] 李晓, 王学德, 朱玉贤, 等. 农杆菌真空法转化花粉获得棉花转 *acsB* 基因植株[J]. 作物学报, 2002, 28 (5): 709-712.
- [12] LI Xiao, Wang Xue-de, Zhao Xiang-Qian, et al. Improvement of cotton fiber quality by transforming the *acsA* and *acsB* genes into *Gossypium hirsutum* L. by means of vacuum infiltration[J]. Plant Cell Reports, 2004, 22(9): 691-697.
- [13] 华中农学院黄冈分院棉麦组. 不同染色法测定棉花花粉生活力[J]. 遗传与育种, 1977(5): 35-36.
- [14] 于艳杰, 吴李君, 吴跃进, 等. 氮离子注入处理后的棉花花粉活力测定方法研究[J]. 棉花学报, 2007, 19(2): 102-105. ●