

# 授粉方式对小麦花粉管通道转化效果的研究

宋笑明, 谷运红, 洪爱俊, 苏张磊, 秦广雍

(郑州大学离子束生物工程重点实验室 郑州 450052)

**摘要:** 研究了花粉管通道转化技术中, 自花授粉后滴注外源 DNA 和去雄后再实施人工授粉并滴注外源 DNA 两种操作方法对转化效果的影响, 对小麦花粉管通道转化的有效实施提供依据. 结果表明, 从结实率和转化率两方面分析, 去雄后再实施人工授粉并滴注外源 DNA 比自花授粉后滴注外源 DNA 有明显优势.

**关键词:** 花粉管通道转化; 自花授粉; 人工授粉; 结实率; 转化率

**中图分类号:** S 336

**文章编号:** 1671-6841(2009)01-0120-05

## 0 引言

小麦是我国种植面积最大的农作物, 关于通过花粉管通道法导入外源 DNA 的研究、育种以及创造新的种质资源等已有多篇报道<sup>[1-2]</sup>. 花粉管通道法经过 20 多年的发展, 各方面的技术细节已经比较完善, 但其转化成功率往往受各种实验条件的影响比较大. 就目前研究现状来看, 花粉管通道法介导小麦遗传转化在提高转化成功率上有很大优势. 外源 DNA 转化归纳起来主要有两种操作技术, 一是自花授粉后导入<sup>[3-5]</sup>, 将供体总 DNA 片段在受体自花授粉后适当的时期滴注在柱头上, 使能沿着花粉管通道进入胚囊, 实际应用时一般先切除柱头; 二是开花前去除雄蕊<sup>[6-7]</sup>, 受体植株正常花粉授粉后适当时期将外源 DNA 滴注在柱头上或用携带外源 DNA 的花粉进行授粉, 使外源 DNA 进入胚囊. 研究了小麦花粉管通道转化操作技术中自花授粉后滴注外源 DNA 和去雄后再实施人工授粉并滴注外源 DNA 两种操作方法对转化效果的影响, 对小麦花粉管通道转化的有效实施提供依据.

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

花粉管通道转化的受体材料为实验室选育的小麦稳定品系 1565, 1662, 1230, 1559, 1145, 凡 1, 凡 3 等, 还有河南省审定小麦品种“温 19”.

作为花粉管通道转化的供体材料 DNA 有红芒麦、燕麦、小麦品种“远丰 998”、六倍体小黑麦、玉米、谷子等材料的全基因组 DNA 和质粒 PBI 1301.

2005 年转化组合(格式: 受体材料名称/供体 DNA 来源材料名称): 1565/红芒麦, 1662/燕麦, 1230/远丰 998, 1559/六倍体小黑麦, 1145/PBI 1301.

2006 年转化组合(格式同上): 温 19/PBI 1301, 温 19/TE, 温 19/(燕麦+PBI 1301)(供体中的“燕麦+PBI 1301”表示燕麦的 DNA 和质粒 PBI 1301 的 DNA 等量混合, 其他类同), 温 19/燕麦, 温 19/(玉米+PBI 1301), 温 19/玉米, 温 19/(谷子+PBI 1301), 温 19/谷子, 凡 1/PBI 1301, 凡 1/TE, 凡 1/(谷子+PBI 1301), 凡 1/谷子, 凡 3/PBI 1301, 凡 3/TE, 凡 3/(玉米+PBI 1301), 凡 3/玉米.

质粒 PBI 1301 长 11 837 bp, 能够在植物细胞中表达, 其中含有 GUS 报告基因, 物理图谱如图 1 所示.

收稿日期: 2008-09-05; 修回日期: 2008-12-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目, 编号 10505018.

作者简介: 宋笑明(1982-), 男, 硕士, 主要从事小麦花粉管通道转化研究; 通讯联系人: 谷运红(1976-), 女, 副教授, 主要从事生物物理研究, E-mail: guyunhong@zzu.edu.cn.

### 1.2 转化方法

1.2.1 自花授粉的花粉管通道转化法 对 2005 年的实验材料进行花粉管通道转化时,采用自花授粉后滴注外源 DNA 的方法,在小麦开花 1 h 后,其受精过程已经完成,花粉管通道基本形成,此时开始进行实验操作<sup>[8]</sup>.

用剪刀剪去小麦颖壳的  $\frac{1}{3} \sim \frac{1}{2}$ ,用微量注射器将供体 DNA 小心滴注在柱头上,每朵小花滴注量为 10  $\mu\text{L}$ .供体 DNA 浓度为 200 g/L.

1.2.2 人工授粉的花粉管通道转化法 对 2006 年的实验材料进行花粉管通道转化时,先去掉雄蕊,后进行人工受体植株正常花粉授粉.授粉 1 h 后对授过粉的穗子开始滴注 DNA 溶液,每一个小花的柱头上滴加 10  $\mu\text{L}$  DNA 溶液.

### 1.3 后代材料的种植

2006 年转化的实验材料一部分后代和 2005 年的后代材料(除 1145/PBI 1301 以外),均种植于温县农科所大田中,点播,株距 10 cm,行距 25 cm,正常施肥,杀虫,浇灌,保持水分充足.2005 年实验材料 1145/PBI 1301 和 2006 年转化的实验材料的另一部分后代种植于实验室楼顶实验盆中,株距 10 cm,行距 20 cm.

### 1.4 供体 DNA 的制备

质粒 DNA 采用碱法大量提取<sup>[9]</sup>,植物全基因组 DNA 采用王关林的方法<sup>[10]</sup>.

### 1.5 GUS 组织化学染色方法

采集待测植株新鲜叶片,用湿润酒精棉擦拭干净,剪碎后放入 0.5 mL Eppendorf 管中,加入 100  $\mu\text{L}$  GUS 染色液<sup>[11]</sup>,完全淹没住叶片.打开管盖在真空干燥箱中抽真空 5 min(抽去组织中的气泡),缓慢充气后,取出 Eppendorf 管,封闭管口,37  $^{\circ}\text{C}$  保温过夜.染色完毕后脱色,吸去 Eppendorf 管中的染色液,加入 90%乙醇,每小时换一次脱色液,直至脱去叶片的绿色为止.

### 1.6 PCR 分析

引物(上海生工合成)序列如下:

引物序列 1:5'-ggg ATC CAT CgC AgC gTA ATg-3',

引物序列 2:5'-gCC gAC AgC AgC AgT TTC ATC-3'.

实验采用 30  $\mu\text{L}$  PCR 扩增体系:灭菌双蒸水 13  $\mu\text{L}$ ,10 $\times$ PCR Buffer 3  $\mu\text{L}$ ,10 $\times$ MgCl<sub>2</sub> 3  $\mu\text{L}$ ,2 mmol/L dNTP 3  $\mu\text{L}$ ,引物 1(10  $\mu\text{mol/L}$ )3  $\mu\text{L}$ ,引物 2(10  $\mu\text{mol/L}$ )3  $\mu\text{L}$ ,Taq DNA 聚合酶 0.5  $\mu\text{L}$ .设置阴性对照和阳性对照.扩增程序为:94  $^{\circ}\text{C}$  2 min,(94  $^{\circ}\text{C}$  45 s,55  $^{\circ}\text{C}$  45 s,72  $^{\circ}\text{C}$  1 min)共 30 个循环,72  $^{\circ}\text{C}$  10 min,4  $^{\circ}\text{C}$  保存.用 1%的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增结果.

## 2 结果与分析

### 2.1 不同脱色方法对脱色效果的影响

采用 3 种脱色方法分别考察脱色效果:a)将染色后的叶片放入 70%的乙醇溶液中脱色 1 h,再按顺序放入 80%、90%、100%的乙醇溶液中逐步脱色各 1 h,直至脱去叶片绿色为止.b)将染色后的叶片放入 80%的乙醇溶液中脱色,每小时换一次脱色液,至脱去叶片绿色为止.c)将染色后的叶片放入 90%的乙醇溶液中脱色,每小时换一次脱色液,至脱去叶片绿色为止.脱色效果显示,采用 c)方法的 90%乙醇脱色快并且脱色较干净,因此后面实验均采用 90%乙醇脱色.

### 2.2 两种转化方法对 M<sub>0</sub> 代结实率、成株率的影响

2005 年采用自花授粉的转化法,有 5 种组合(表 1),平均结实率为 43.9%,平均成株率为 56.0%.

2006 年采用了人工授粉的转化法,有 17 种组合(表 2),平均结实率为 65.5%,平均成株率为 73.6%.

相比之下,人工授粉转化法比自花授粉转化法的结实率由 43.9%提高到 65.5%,差异达显著水平( $P=$

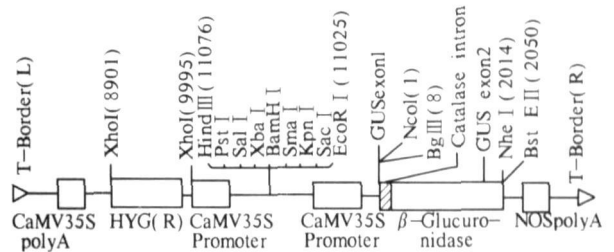


图 1 质粒 PBI 1301 的物理图谱

Fig.1 Physical map of PBI 1301

0.016),提示人工授粉转化法可显著提高结实率.人工授粉转化法比自花授粉转化法的成株率由56.0%提高到73.6%,差异不显著( $P=0.23$ ),提示不同的转化方法对已结实种子的成株率无明显影响.

为了获得较多的转化株,首先要保证通过这种转化方法能得到足够的群体,从而可在里面筛选转化株.从结实率的比较结果可以看出,人工授粉转化法与自花授粉转化法相比,结实率显著提高.

表1 自花授粉的转化法对  $M_0$  代结实率和成株率的统计分析

Tab.1  $M_0$  bearing rate and alive plant rate in self-pollination

受体	供体	转化小花数	结实数	结实率/%	成株数	成株率/%
1565	红芒麦	213	117	54.9	78	66.7
1662	燕麦 404	228	116	50.9	69	59.5
1230	远丰 998	174	75	43.1	57	76.0
1559	小黑麦	207	92	44.4	53	57.6
1145	PBI 1301	340	89	26.2	18	20.2
平均		—	—	43.9	—	56.0

### 2.3 两种转化法的分子检测结果

对供体含有 PBI 1301 的转化后代进行分子检测,考察两种方法的转化效果.

**2.3.1 自花授粉转化方法的分子检测结果** 2005 年的转化组合 1145/PBI 1301(表 1),  $M_0$  代得到 18 株植株,分别编号 1~18,种植于实验室楼顶试验盆中,于幼苗期分别提取单株的基因组 DNA 作 PCR 分析.其中 15 号植株经检测呈阳性(图 2,图中 M 指示 DNA 分子标记,1 指示阴性对照,2 指示阳性对照,3 指示 15 号植株,4 指示不含 DNA 的空白对照),其他植株呈阴性.转化率为 1.1%(转化率=检测到阳性的植株数/检测的总植株数).

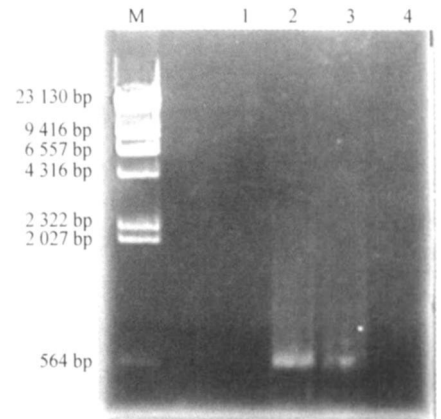


图2 15号植株的PCR检测呈阳性

Fig.2 The 15th plant test positive by PCR

表2 人工授粉的转化法对  $M_0$  代结实率和成株率的统计分析

Tab.2  $M_0$  bearing rate and alive plant rate in artificial pollination

受体	供体	转化小花数	结实数	结实率/%	成株数	成株率/%
温 19	PBI 1301	70	18	25.7	18	100
温 19	TE	109	48	44.0	38	83.7
温 19	PD	322	271	84.2	222	81.9
温 19	燕麦+PBI 1301	403	255	63.3	201	78.8
温 19	燕麦	462	339	73.4	297	87.6
温 19	玉米+PBI 1301	58	47	81.0	37	78.7
温 19	玉米	51	43	84.3	36	83.7
温 19	谷子+PBI 1301	24	20	83.3	16	80.0
温 19	谷子	28	22	78.6	14	63.6
凡 1	PBI 1301	247	68	27.5	48	70.6
凡 1	TE	22	16	72.7	9	56.3
凡 1	谷子+PBI 1301	530	378	71.3	213	56.3
凡 1	谷子	473	396	83.7	48	70.6
凡 3	PBI 1301	154	41	26.6	29	70.7
凡 3	TE	56	42	75.0	16	38.1
凡 3	玉米+PBI 1301	513	308	60.0	213	69.2
凡 3	玉米	506	402	79.4	324	80.6
平均		—	—	65.5	—	73.6

**2.3.2 人工授粉转化方法的分子检测结果** 2006年的转化供体中含有PBI 1301且做遗传检测分析的有7个组合(表2),分别是温19/(燕麦+PBI 1301)、温19/(玉米+PBI 1301)、温19/(谷子+PBI 1301)、凡1/PBI 1301、凡1/(谷子+PBI 1301)、凡3/PBI 1301、凡3/(玉米+PBI 1301),以上各组合分别种植50,15,5,20,45,5,50粒(共190粒),种植于实验室楼顶试验盆中,并对各个组合的植株编号。

由于植株较多,先用GUS组织化学染色进行初筛,然后进行PCR分析。于幼苗期分别取叶片做GUS组织化学染色检测,其中检测到出现蓝色斑点的有编号12-2(凡1/PBI 1301)、25-3(凡3/PBI 1301)、36-3(温19/(谷子+PBI 1301))共三株(图3),提取该三株的叶片DNA做PCR检测呈现阳性(图4,其中M指示DNA分子标记,1指示阴性对照,2指示阳性对照,3指示小麦DNA,4指示不含DNA的空白对照),进一步证明PBI 1301确实转化到该受体中,转化率为1.5%,比自花授粉方法的转化率略高。

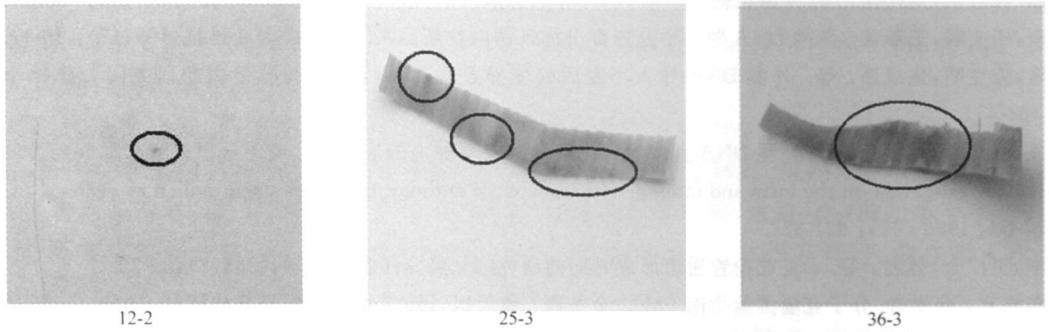


图3 GUS染色的叶片显示蓝色斑点

Fig. 3 GUS staining leaves showed blue spots

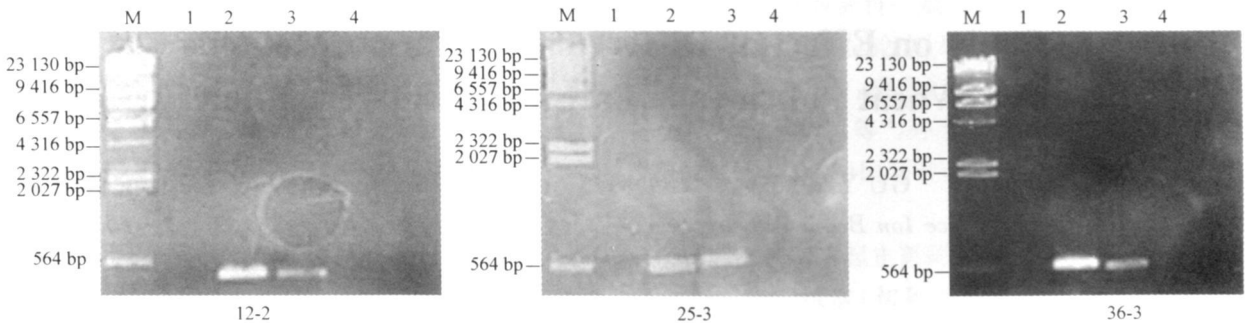


图4 GUS染色显示蓝色的三个植株叶片DNA经PCR检测呈阳性

Fig. 4 Blue DNA of the three leaves of plants through GUS staining test positive by PCR

### 3 讨论

结实率是衡量转化效果的指标之一,相对高的结实率就存在更高的成功转化的可能性。实验结果显示人工授粉转化法可显著提高结实率,并且不同转化方法对成株率的影响不明显。经当代PCR分子检测可知,人工授粉转化法的转化率比自花授粉的方法略高。可能的原因是自花授粉时,小麦同一个穗上的小花开花时间各不相同,导致在滴注时有些小花的花粉管通道还未形成或者已经关闭,使结实率和转化率下降。而人工授粉后在合适的时间进行滴注,各小花中的花粉管通道状态比较一致,使得转化容易成功,结实率和转化的成功率较高。

对于转化受体只有PBI 1301时,两种方法的结实率都非常低,在25.7%~27.5%之间,远远低于供体中含有其他DNA的结实率。推测可能是质粒的提取过程中遗留的有机物会对小麦的受精过程产生影响,因此在质粒的提取过程中要尽量把有机物去除干净。

利用结实率和转化率衡量了自花授粉和人工授粉两种操作技术对小麦花粉管通道转化效果的影响,结

果显示人工授粉法要好于自花授粉法,但是在本实验中转化效率均不是很高,未达到报道所述较高的转化率,提示在小麦花粉管通道转化中还有其他很多因素会对转化效果产生影响,并且研究掌握这些因素对转化效果的影响可能会更大程度地发掘提高花粉管通道的转化效率。

## 参考文献:

- [1] 孙德全,孙光祖,李忠杰,等. 利用花粉管通道导入平阳霉素对小麦诱变效果的研究[J]. 核农学通报,1997,18(1): 8-10.
- [2] 周春江,葛荣朝,赵宝存,等. 利用花粉管通道法将兔防御素 NP-1 基因导入小麦的研究[J]. 华北农学报,2007,22(2): 26-28.
- [3] 黄骏麒,钱思颖,刘桂铿,等. 外源抗枯萎病棉 DNA 导入感病棉的抗性转移[J]. 中国农业科学,1986,19(3): 32-36.
- [4] 倪建福,周文麟,王亚馥. 高粱 DNA 导入小麦选育出抗条锈白粒新品系[J]. 甘肃农业科技,1994(7): 10-11.
- [5] 王亚馥,陈克明,焦成瑾,等. 外源 DNA 导入小麦后的变异系生物学特性及胚乳蛋白的研究[J]. 作物学报,1995,21(4): 404-411.
- [6] 刘根齐,张孔湘,林世兰,等. 外源 DNA 直接导入小麦及其在育种上的应用[J]. 遗传学报,1994,21(6): 463-467.
- [7] Hess D. Investigation on the infra and interspecific transfer of anthocyanin genes using pollen as vectors[J]. Z Pflanzenphysiol Bd, 1980 (98): 321-327.
- [8] 黄景华,王广金,孙岩,等. 小麦花粉管通道形成时期的研究[J]. 黑龙江农业科学,2004(2): 20-22.
- [9] 萨姆布鲁克,弗里奇. 分子克隆实验指南 [M]. 金冬雁,黎孟枫,译. 2 版. 北京:科学出版社,1992.
- [10] 王美林,方宏筠. 植物基因工程 [M]. 2 版. 北京:科学出版社,2002.
- [11] Richard A J, Tony A K, Michael W B. GUS fusion:  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants[J]. EMBO J, 1987,6(3):3901-3907.

## Study on Effect of Different Pollination Methods on Wheat Pollen-tube Pathway Transformation

SONG Xiao-ming, GU Yun-hong, HONG Ai-jun, SU Zhang-lei, QIN Guang-yong  
(Henan Province Ion Beam Bio-engineering Key Laboratory, Zhengzhou University,  
Zhengzhou 450052, China)

**Abstract:** Effect of self-pollination and artificial pollination on wheat pollen-tube pathway transformation is studied. It can provide evidence for wheat pollen-tube pathway effective transformation. The result shows that artificial pollination has obvious dominance than self-pollination with checking in bearing rate and transformation rate.

**Key words:** pollen-tube pathway transformation; self-pollination; artificial pollination; bearing rate; transformation rate