

基于绿色荧光蛋白观察的花粉介导转化泡桐初探

杨利艳¹, 冉 慧¹, 乔白露¹, 孙 毅^{2,3}

(1. 山西师范大学 生命科学学院, 山西 临汾 041004; 2. 山西省农业科学院 生物技术研究中心, 山西 太原 030031;

3. 农业部黄土高原作物基因资源与种质创制重点实验室, 山西 太原 030031)

摘 要:以泡桐花粉为受体,在超声波的作用下将含有绿色荧光蛋白(GFP)基因的质粒与花粉共处理,利用荧光显微镜对 GFP 基因在花粉粒及花粉管中的表达进行了示踪观察。结果表明:100 g/L 的蔗糖溶液是泡桐花粉较适宜的体外培养液;花粉粒有较强烈的自发荧光,因此不能根据花粉粒荧光来确定 GFP 基因是否表达;处理组花粉管较对照呈现强烈的绿色荧光,表明 GFP 基因在花粉管中表达。该试验首次利用泡桐花粉对 GFP 基因的表达观察,初步证明了这一转基因方法对泡桐花粉转化的可行性。

关键词:泡桐;超声波;花粉介导转化;绿色荧光蛋白(GFP)

中图分类号:S 792.43 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)09-0117-04

泡桐(*Paulownia*)属玄参科(Scrophulariaceae)泡桐属多年生落叶乔木,是我国重要的速生用材和庭院绿化树种。大力发展泡桐对改善生态环境、缓解目前我国木材短缺局面和提高农民生活水平具有重要的意义。然而,泡桐生产中存在的丛枝病发生严重和低干大冠等问题一直没有解决,究其原因在很大程度上与现有泡桐遗传背景窄、种质资源匮乏,利用传统的育种方法很难培育出性状良好的新品种密切相关。

利用植物转基因技术进行泡桐的遗传改良有重要的发展前景^[1],但传统的转基因方法—农杆菌介导法和基因枪法都需要建立再生体系。多年来,科技工作者对泡桐离体植株再生及其影响因素进行了大量的研究^[2-9],但由于再生体系有很强的基因型依赖性,这意味着不同的基因型需要建立不同的再生体系,且泡桐是木本植物,在组织培养过程中存在着易褐化、再生苗难获得等问题。因此,采用操作简单、可以避免繁冗复杂的再生过程的转基因方法对加速培育泡桐优良品种意义重大。

孙毅等^[10]提出了“超声波处理花粉介导植物基因转

化方法”,Wang 等^[11]首次报道用超声波处理花粉成功地获得了转基因玉米,用该方法获得的转基因高粱(*Sorghum bicolor* Moench)^[12]、油菜(*Brassica campestris*)^[13]等相继问世。超声波处理花粉介导植物转基因方法成功地实现了借助花粉作为载体对外源基因的转化,避免了繁冗复杂的植物组织培养过程,并且是具有我国自主知识产权的转基因技术,已引起了很多研究者的兴趣^[14]。泡桐花粉比较多,适于进行花粉介导法转化外源基因,但目前采用该方法对泡桐进行基因转化的研究还是空白。GFP(green fluorescent protein)基因是转基因研究中备受青睐的报告基因,其表达产物—绿色荧光蛋白在蓝光激发下发出绿色荧光,可直接被观察到而不需要破坏植物的组织,因此利用 GFP 对外源基因的表达途径进行示踪有很大的优越性。该试验在优化泡桐花粉体外培养条件的基础上,通过超声波处理花粉介导植物基因转化方法对泡桐花粉进行 GFP 基因转化,旨在借助对 GFP 基因的观察为转化泡桐提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试植物兰考泡桐(*P. elongate*)种植于山西师范大学校园内。大肠杆菌菌株为 DH5a,内含质粒 pLM01,由美国爱荷华州立大学植物转基因中心 Kan Wang 教授馈赠。质粒图谱如图 1(超声波仪: BILON-650Y,上海勃朗)。

1.2 试验方法

1.2.1 菌株的活化与培养 配制 LB 液体及固体培养基(酵母粉 5 g/L,蛋白胨粉 10 g/L,NaCl 10 g/L,琼脂粉 12 g/L),调 pH 7.5,高压蒸汽灭菌,于超净工作台上加

第一作者简介:杨利艳(1972-),女,博士,副教授,现主要从事植物基因工程等研究工作。E-mail:yangswallow163@163.com.

责任作者:孙毅(1953-),男,博士,研究员,现主要从事植物育种及基因工程等研究工作。E-mail:sunyi692003@163.com.

基金项目:山西省回国留学人员科研资助项目(2011-061);国家农业部转基因生物新品种培育重大专项资助项目(2013ZX08003-001);国家自然科学基金资助项目(31240081);山西省科技攻关资助项目(20110311009)。

收稿日期:2013-12-13

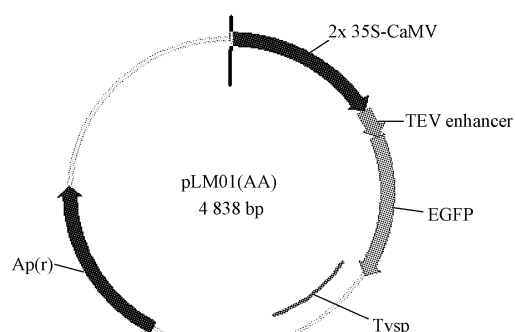


图1 pLM01 质粒图谱

注:质粒中含有增强的 GFP 基因(EGFP),其启动子和终止子分别为 2×35S CaMV 及 Tvsp,增强子为 TEV,质粒的筛选标记为 Ampicillin 抗性基因。

Fig. 1 Map of pLM01

Note: The EGFP gene with 2× CaMV 35S promoter (35S) and a tobacco etch virus 5' untranslated region (TEV) and a soybean vegetative storage protein terminator (Tvsp); Ampicillin (Apr)-resistant marker gene for bacterial selection.

入抗生素 Ampicillin,使其终浓度为 50 mg/L,用无菌接种针从培养皿上挑取大肠杆菌于 LB 固体培养基,37℃ 过夜培养至长出单菌落,挑单菌落接种于 LB 液体培养基中,37℃,250 r/min,振荡培养。

1.2.2 质粒 DNA 的提取 碱裂解法提取质粒 DNA^[15],并采用琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.3 泡桐花粉体外培养液筛选 培养基中硼酸 500 mg/L,氯化钙 250 mg/L,蔗糖分别为 50、100、150 g/L,具体配比见表 1。将花粉悬浮于装有 10 mL 不同培养液的锥形瓶中,保鲜膜封口,置于振荡培养箱中,75 r/min,25℃ 培养,每隔 0.5 h 观察 1 次,直到 2 次测定的萌发率基本相同时为止。每个处理在显微镜下观察 5 个玻片,每个玻片观察 100 粒花粉,统计其萌发率。萌发率=发芽的花粉粒数/花粉粒总数×100%(以花粉管长度超过花粉粒直径作为萌发标准)。

1.2.4 超声波处理泡桐花粉转化 GFP 基因 泡桐花粉的采集:于开花期(4月)的早晨 7:00~9:00 收集新鲜的花朵,轻轻敲打花瓣收集花粉,为防止花粉吸水降低活力,于收集的花粉中加入硅胶颗粒干燥剂(蓝色颗粒),置于 4℃ 冰箱中保存待用。花粉的超声波处理:取 0.2 g 花粉悬浮于 20 mL 已筛选出的花粉培养液中,进行第 1 次超声波处理。随后将溶解于双蒸水中的质粒 DNA 加于花粉悬浮液,混匀,进行第 2 次超声波处理。为防止超声波处理时因温度过高而导致花粉失活,可将花粉悬浮液置于碎冰上。该试验以加入质粒 DNA 的花粉为处理组,以未加质粒的花粉为对照组。通过前期对超声波处理参数的筛选,课题组采用超声波处理参数为 200 W,处理时间 7 s,间隙时间 10 s,处理次数 8 次。

1.2.5 GFP 基因表达的观察 对 GFP 基因表达的观察采用荧光显微镜(U-LH100HG,OLMPUS),用蓝光激发,激发波长为 495 nm。GFP 基因在花粉粒及花粉管中表达的观察:将超声波处理后的花粉悬浮液置于振荡培养箱中,75 r/min,25℃ 培养,每隔 0.5 h 取材 1 次,用滴管吸取少量置于载玻片上制作临时装片,荧光显微镜下观察并拍照。

1.3 数据分析

试验数据为平均值±标准差,差异显著性分析采用 SPSS 10.0 软件 One-Way ANOVA 方法。

2 结果与分析

2.1 泡桐花粉体外培养液筛选

由表 1 可知,泡桐花粉在蔗糖浓度为 100 g/L 的培养液中萌发率最高,分别较蔗糖为 50、150 g/L 的培养液高 3.1%、20.5%,是较适的泡桐花粉体外培养液,其萌发率显著高于蔗糖 150 g/L 的培养液($P<0.05$),但与含 50 g/L 的蔗糖培养液差异不显著($P>0.05$)。

表 1 泡桐花粉在不同培养液中的萌发

Table 1 The *in vitro* pollen germination of *Paulownia* in various solutions

培养液 Solution	蔗糖 Sucrose /g·L ⁻¹	硼酸 H ₃ BO ₃ /mg·L ⁻¹	氯化钙 CaCl ₂ /mg·L ⁻¹	萌发率 Germination rate /%
1	50	500	250	54.1±6.3 a
2	100	500	250	55.8±6.7 a
3	150	500	250	46.3±5.3 b

注:不同字母表示在 Duncan's 多重比较 5% 显著水平上差异显著。

Note: The different letters denote the significance of differences at the 5% level of Duncan's multiple comparison.

2.2 花粉介导转 GFP 基因的观察

2.2.1 GFP 基因在花粉粒中的表达观察 由图 2 可以看出,在蓝光激发下,加有 GFP 质粒的处理组与无质粒的对照组花粉粒均有较强的绿色荧光,且荧光强度无明显差异。为排除基因污染可能造成的假象,该试验对采集的泡桐花粉粒未经任何处理后直接液体培养观察,结果与图 2 相同。因此,认为不能通过对花粉粒绿色荧光的观察来确定是否为转化的花粉粒。

2.2.2 GFP 基因在泡桐花粉管中的表达 泡桐花粉在 2.5~3.0 h 后开始萌发,在液体培养时可见对照组花粉管在蓝光激发下无明显荧光(图 3A'),在白光下呈透明管状(图 3C');处理组中有花粉管在蓝光激发下呈较强烈的绿色荧光(图 3A),有些花粉管则与对照组相同,在蓝光激发下无明显荧光,但在白光下可见其管状花粉管(图 3C)。观察结果表明,处理组的部分花粉粒经超声波处理后,携带有 GFP 基因的质粒能够进入花粉粒中,并随着花粉的萌发在花粉管中表达。但由于花粉粒在蓝光激发下强烈的自发荧光的干扰,很难判断 GFP 基因是否在花粉粒中表达。

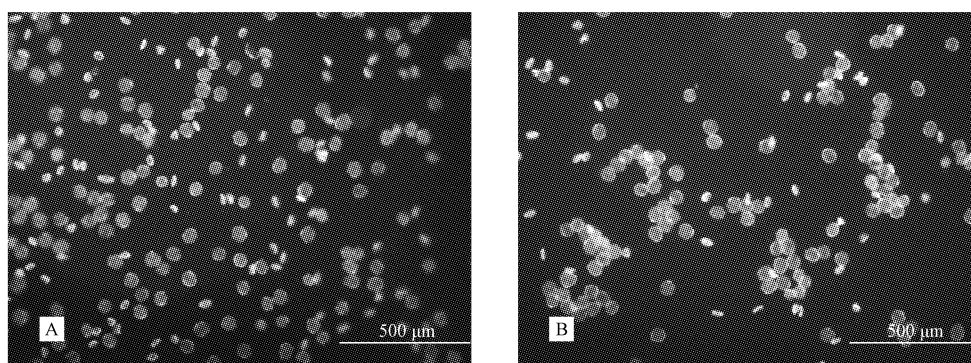


图2 不同处理下泡桐花粉粒的观察

注:A;蓝光激发下处理组泡桐花粉粒;B;蓝光激发下对照组泡桐花粉粒。拍照时均采用相同的曝光时间。

Fig. 2 The images of *Paulownia* pollen grain

Note; A; The image of treated *Paulownia* pollen grain under blue light; B; The image of control pollen grain under blue light. The pictures were taken with the same exposure time.

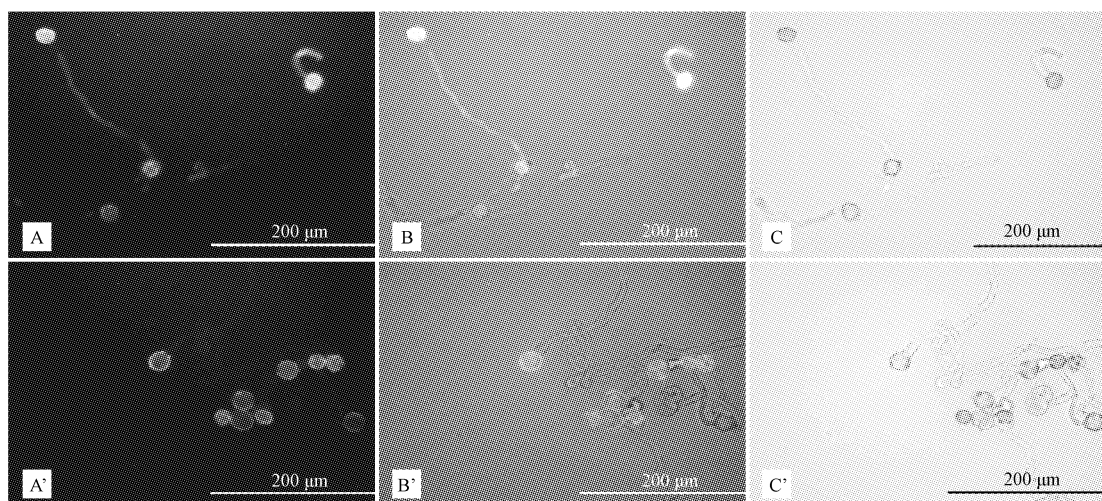


图3 GFP基因在泡桐花粉管中的表达

注:A、B、C分别为蓝色激发光、叠加光及白光下处理组泡桐花粉管;A'、B'、C'分别为相应的对照组泡桐花粉管。拍照时相应图像均采用相同的曝光时间。

Fig. 3 The expression of *GFP* gene in pollen tube of *Paulownia*

Note; A, B, C; Image of pollen tube from treatment group under blue light, combination of lights and white light, respectively; A', B', C'; Image of pollen tube from control group under blue light, combination of lights and white light, respectively. The corresponding pictures were taken with the same exposure time.

3 结论与讨论

泡桐花粉量大,适于进行花粉介导转基因方法操作。对泡桐花粉的形态观察可见其花粉粒上存在萌发孔^[16];Chen等^[17]研究表明,超声波的空化作用可促进外源基因对细胞的转化。在该试验中,第1次超声波处理的目的是使花粉粒表面的核酸酶失活,避免其对外源DNA的降解;第2次加入质粒DNA后进行超声波处理,目的在于使外源基因通过萌发孔进入花粉粒。这样,用转化的花粉粒进行人工授粉,就可借助泡桐自然的生殖系统完成外源基因与受体基因组的整合。

在利用花粉作为外源基因的载体进行转化时,最大限度地保证花粉的活力是提高花粉转化的前提。花粉萌发率是检测花粉活力的重要指标。空气湿度大时,花

粉很容易吸湿,在采集的花粉中加入硅胶颗粒干燥剂,保存于4℃冰箱中对维持花粉活力有很好的效果。筛选适宜的花粉体外培养液目的:一是在超声波处理时为花粉提供适宜的等渗溶液,避免其因溶液浓度过高失水或浓度低胀破而降低活力;二是在超声波处理后到授粉之间为花粉提供适宜的生长条件,最大可能地维持花粉的活力。适宜等渗溶液的筛选将为人工授粉提供参考,该研究表明,100 g/L的蔗糖溶液是维持泡桐花粉较高萌发率的等渗溶液。超声波处理参数是影响试验结果的重要因素,在超声波处理后,观察到有很多花粉粒破裂,花粉存活率降低意味着能够整合外源基因的花粉基数降低,因此在使用超声波处理花粉介导转基因方法时,寻找能提高外源基因的转化率又能降低花粉破裂率的

超声波处理参数是非常重要的。同时,该基因转化方法适用于花粉量大的植物。

该试验发现,泡桐花粉粒在蓝光激发下有较强的自发荧光(绿色),在对大量泡桐花粉粒观察的同时,还对其它植物材料如玉米、石榴花粉粒也进行了观察,结果发现都有类似的现象,因此,认为通过对花粉粒绿色荧光的观察来判断 *GFP* 基因是否在花粉粒中表达是不可靠的,因而对一些利用绿色荧光强弱来筛选转化花粉粒的报道表示质疑^[18]。在今后的研究中也可考虑采用诸如红色荧光蛋白基因等来进行观察。泡桐花粉管在蓝色激发光下无明显的自发绿色荧光,因此,借助对花粉管的观察可确定 *GFP* 基因表达与否,为防止由于采用不同曝光时间而造成的荧光强度的差异,在进行图像采集时,对处理组和对照组同一部位要采用相同的曝光时间。

该研究中,采用“超声波处理花粉介导植物基因转化方法”对泡桐花粉进行了 *GFP* 基因的转化,借助对 *GFP* 基因在花粉管中表达的观察首次为泡桐采用该基因转化方法提供了初步的研究。该研究旨在为泡桐及其它花粉量大的、难以建立再生体系的植物的遗传改造提供一条新的思路,从而推动我国乃至世界植物分子育种进程,加快培育更多的优良植物品种。

参考文献

- [1] 钟启宏,孔繁瑞,孙威,等.通过花粉管途径建立泡桐转化系统的初探[J].遗传,1994,16(6):16-19.
- [2] 施士争,倪善庆.泡桐组织培养系统性研究初探[J].江苏林业科技,1995,22(3):20-22.
- [3] Fan G Q, Zhai X Q, Zhai C J, et al. Callus induction from leaves of different *Paulownia* species and its plantlet regeneration[J]. Journal of Forestry Research, 2001, 12(4): 209-214.
- [4] 范国强,彭海风,翟晓巧,等.泡桐叶片蛋白质多态性及其聚类分析[J].植物学通报,2001,18(6):739-774.
- [5] 范国强,翟晓巧,蒋建平,等.不同种泡桐叶片愈伤组织诱导及其植株再生[J].林业科学,2002,38(1):29-35.
- [6] 范国强,翟晓巧,马新业.两种泡桐叶片体细胞胚胎发生及植株再生[J].核农学报,2005,19(4):274-278.
- [7] 范国强,董占强,李峰稳,等.光周期对泡桐叶片离体植株再生影响研究[J].西北植物学报,2007,27(1):104-109.
- [8] Kalaycioglu H, Deniz I, Hiziroglu S. Some of the properties of particle-board made from *Paulownia* [J]. Journal of Wood Science, 2005, 51: 410-414.
- [9] 刘飞,范国强,董占强.泡桐离体开花培养系统的建立[J].林业科学,2007,43(12):56-63.
- [10] 孙毅,王景雪,崔贵梅.超声波处理花粉介导植物基因转化方法[P].中国:ZL99121152.9,2006-03-29.
- [11] Wang J X, Sun Y, Cui G M, et al. Transgenic maize plants obtained by pollen-mediated transformation [J]. Acta Botanica Sinica, 2001, 43: 275-279.
- [12] Wang W Q, Wang J X, Yang C Q, et al. Pollen-mediated transformation of *Sorghum bicolor* plants [J]. Biotechnology Applied Biochemistry, 2007, 48: 79-83.
- [13] Wang J X, Li Y H, Liang C. Recovery of transgenic plants by pollen mediated transformation in *Brassica juncea* [J]. Transgenic Research, 2008, 17: 417-424.
- [14] Eapen S. Pollen grains as a target for introduction of foreign genes into plants: an assessment [J]. Physiology and Molecular Biology of Plants, 2011, 17: 1-8.
- [15] Sambrook J, Maniatis T, Fritsch E F. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd edition) [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [16] 陈志远.泡桐属(*Paulownia*)花粉形态学的初步研究[J].武汉植物学研究,1983,1(2):143-147.
- [17] Chen X, Equi R, Baxter H, et al. A high-throughput transient gene expression system for switchgrass (*Panicum virgatum* L.) seedlings [J]. Biotechnology for Biofuels, 2010, 3: 1-10.
- [18] Ottenschlager I, Barinova I, Voronon V, et al. Green fluorescent protein (GFP) as a marker during pollen development [J]. Transgenic Research, 1999, 4: 279-294.

Preliminary Study on *Paulownia* Transformation via Pollen-mediated Transformation Approach Based on GFP Observation

YANG Li-yan¹, RAN Hui¹, QIAO Bai-lu¹, SUN Yi^{2,3}

(1. College of Life Science, Shanxi Normal University, Linfen, Shanxi 041004; 2. Biotechnology Research Center, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Taiyuan, Shanxi 030031; 3. Key Laboratory of Crop Gene Resources and Germplasm Enhancement on Loess Plateau, Ministry of Agriculture, Taiyuan, Shanxi 030031)

Abstract: Taking *Paulownia* pollen as receptor, the fresh *Paulownia* pollen was treated under ultrasonication mixed with plasmid DNA harboring green fluorescence protein (*GFP*) gene, the expressions of *GFP* gene in pollen grains, pollen tubes were observed under a fluorescence microscope. The results showed that 100 g/L sucrose was the suitable concentration for *in vitro* pollen germination. Pollen grains had strong green autofluorescent background, so *GFP* gene was not a reliable reporter for tracing the transformation of exotic genes in pollen. Pollen tubes in the treatment group produced strong green fluorescence compared to the control which meant the *GFP* gene expression in pollen tubes. The present study preliminarily provided evidence for *Paulownia* genetic transformation via pollen-mediated transformation approach.

Key words: *Paulownia*; ultrasonication; pollen-mediated transformation; green fluorescence protein (GFP)