

提高大豆花粉管通道技术的转化率研究^{*}

崔 岩¹ 杨庆凯¹ 周思军² 孔凡江¹

(1. 东北农业大学, 哈尔滨 150030; 2. 黑龙江省农业科学院, 哈尔滨 150086)

摘要 试验用荧光显微镜观察了大豆花粉的萌发、花粉管的延伸和进入子房的情况, 从形态学和解剖学角度分析了大豆采用花粉管通道技术转基因成功率低的原因, 并提出利用该技术进行转化的有利时间以提高转化率。

关键词 大豆 (*Glycine max*); 转基因; 花粉管通道技术

中图分类号 S 565.103.53 **文献标识码** A **文章编号** 1000-9841(2003)01-0075-03

0 前言

花粉管通道技术作为一种转基因方法, 在棉花、水稻、小麦等作物, 西红柿、甜菜等蔬菜上都有应用。在大豆上的应用也已经进行了许多的试验, 但由于大豆的花器小, 花粉管通道细, 以及闭花授粉等原因使得花粉管通道技术在大豆上的应用难度较大。本文利用荧光制片技术观察了大豆的花粉管在花柱及子房中延伸和分布的情况, 试图为花粉管通道技术在大豆上的应用, 技术改进提供参考。

1 材料与方法

1.1 受体材料

本试验所选择大豆为东农 594。

1.2 荧光显微制片法

1.2.1 取样: 在大豆开花期, 早晨 6—7 点之间, 温度 21℃, 湿度 75%。选取花瓣完全包于花萼中萼片之间尚未开出裂缝, 看不出花瓣颜色的花朵。一般取大豆植株中上部的花, 并且每个节上只保留符合上述条件的花, 除去不符合条件的花。在此节间挂上标签标明花朵数。从 7 时为起点以后每隔 1 小时取大豆已做标记的小花, 除去花萼、花瓣, 取出子房放于小瓶中。从早 7 点一直取到晚 5 点。每

次取样 30 个子房。

1.2.2 固定: 用 FAA (50% 或 70% 酒精 90 份、甲醛 5 份、冰醋酸 5 份) 固定 24 小时以上。

1.2.3 脱水: 用 60% 酒精→45% 酒精→20% 酒精脱水各 2—3 小时, 最后放入蒸馏水中保存。

1.2.4 软化: 倒掉蒸馏水, 加入 4% NaOH, 65℃ 水浴 30 分钟。

1.2.5 染色: 倒掉 NaOH, 用蒸馏水反复冲洗几次, 加入 1.5% ml 用 2% K₃PO₄ 配制的 0.1% 苯胺蓝染色液在 25℃ 温箱中, 染色 24 小时。

1.2.6 制片: 取出染色后的子房放于载玻片上, 滴一滴甘油, 盖上盖玻片, 轻轻按几下。

1.2.7 镜检、照相: 在荧光镜下观察, 并照相。

2 结果与分析

2.1 从图 2、图 3 可以看出, 随着大豆自花授粉时间的延长, 柱头上花粉萌发的数量增多。由此可知, 经转基因处理后, 大部分花死亡的原因应该是过早的切除柱头导致其他花粉粒不能继续萌发进入柱头, 花粉管数量少, 胚珠被受精的机会就少, 胚珠会因未被受精而死亡。所以转基因适宜时期的选择十分重要。

2.2 根据图 5、图 6、可以看出, 当大豆自花授粉 6 小时后, 花粉管已延伸进入子房腔, 沿着胎座的表面生长。胡适宜^[12]的报道, 当花粉管沿着胎座的生

* 收稿日期: 2002-02-23

项目来源: 国家转基因专项 J99-B-013 和 J00-B-003 招 5 的研究内容。

作者简介: 崔岩 (1973-), 女, 硕士, 从事大豆生物技术。

长达到胚珠基部时,就转而向着胚珠表面生长,当达到珠孔处,花粉管即进入珠孔。申家恒^[1]的报道,大豆自花授粉6小时后开始受精。因此,当大豆自花授粉6小时以后,花粉管已经延伸进入胚囊,花粉管通道已经打开,可以进行外源DNA的导入。

2.3 根据图7、图8、图9可以看出,随着授粉时间的延长,进入子房腔的花粉管的数量越来越多,从生物学角度来讲,这是为了增加受精的机会,是一种适应性的表现。从转基因试验的角度说,这会增加DNA进入胚珠的机会。

2.4 根据图10可以看出,虽然有许多的花粉管在向胚珠延伸,但由于种种原因一些花粉管延伸到一定程度就停止了延伸,因此,此时即使通道中有DNA也是不能转化成功的。

2.5 这里需要强调指出的是外源DNA是沿花粉管通道或传递组织,通过珠心进入胚囊,转化尚不具备正常细胞壁的卵、合子及早期的胚胎细胞。所以使用花粉管通道技术转基因时,要把握好时机,以大豆为例即:大豆自花授粉后6—32小时。这是一个较大的时间跨度,在这中间必然有一个最理想的时间,通过对1—10图的分析我们可以得出这样的结论。

总之,大豆利用花粉管通道法进行转基因转化率低(3%—8%之间)的原因有:1)大豆子房较小(0.5cm左右),花粉管非常细,花粉管通道也非常细,因此,DNA溶液很难渗入。2)大豆是闭花授粉的,这给控制导入时间带来一定的困难。3)时期选择不当及由某种原因使花粉管延伸到一定程度停止延伸。

所以花粉管数量的多少与转基因成功率的高低存在一定关系,花粉管数量多,DNA进入花柱的机会多,胚珠受精的机会多。由此设想如果将大豆利用花粉管通道法转基因的导入时间向后推1—2

个小时,即在大豆自花授粉8小时以后再进行外源DNA的导入(此时对应大豆花蕾形态应为:花冠等高于最高花萼)也许可以提高转化率。

参 考 文 献

- 1 申家恒. 大豆受精作用的研究[J]. 植物学报, 1983, 25(3): 213—218.
- 2 黄承彦, 颜廷进, 战名全, 等. 大豆自花授粉后外源DNA导入技术[J]. 山东农业科学, 1990, 5: 8—11.
- 3 龚葵葵, 沈慰芳, 周光宇, 等. 授粉后外源DNA导入植物技术—DNA通过花粉管通道进入胚囊[J]. 中国科学(B辑), 1988, 6月, 611—614.
- 4 陈启锋, 陈璋, 林学健, 等. 论DNA直接导入植物—一项育种新途径的建立与评述[J]. 福建农学院学报(自然科学学版), 1993, 22(1): 1—11.
- 5 董延瑜, 洪亚辉, 任春梅, 等. 后外源DNA导入技术在植物分子育种上的应用研究[J]. 湖南农学院学报, 1994, 20(6): 513—521.
- 6 徐明良, 杨金水, 葛扣麟, 等. 植物转基因的整合机制[J]. 植物生理学通讯, 1996, 32(3): 234—240.
- 7 雷勃钧, 尹光初, 卢翠华, 等. 外源DNA直接导入大豆的研究[J]. 大豆科学, 1991, 10(1): 58—62.
- 8 雷勃钧, 尹光初, 王树林, 等. 外源野生大豆DNA导入栽培大豆引起的变异[J]. 中国油料, 1989, (3): 11—13.
- 9 雷勃钧, 尹光初, 卢翠华, 等. 外源DNA导入大豆的适宜时期与相应方法[J]. 中国油料, 1991, (1): 88—89.
- 10 雷勃钧, 李希臣, 卢翠华, 等. 外源野生大豆DNA导入栽培大豆及RAPD分子验证[J]. 中国科学(B辑), 1994, 24(6): 596—601.
- 11 雷勃钧, 卢翠华, 钱华, 等. 导入外源总DNA获得优质高蛋白和双高新品系[J]. 大豆科学, 1995, 14(3): 203—208.
- 12 胡适宜, 申家恒. 棉花受精过程各阶段的持续时间的研究[J]. 北京大学学报(自然科学), 1980, (1): 75—87.
- 13 申家恒, 严国忠. 大豆自花授粉时花蕾形态特征的观察[J]. 中国油料, 1981, (3): 16—20.
- 14 赵丽梅, 刘德璞, 孙襄, 等. 外源DNA导入大豆获得一不育材料[J]. 大豆科学, 1995, 14(1): 83—87.
- 15 周光宇, 翁竖, 龚葵葵, 等. 农业分子育种—授粉后外源DNA导入植物技术[J]. 中国农业科学, 1988, 21(3): 1—6.

STUDY ON THE RAISE OF SOYBEAN RATE OF POLLEN TUBE PATHWAY

Cui Yan Yang Qingkai Zhou Sijun Kong Fanjiang

(Northeast Agricultural University Harbin 150030)

Abstract Germination of soybean pollen, extension of pollen tube and ovary were observed in the study. The reasons of the low successful rate of tube pathway transgene in soybean were analyzed from morphology anatomy, and propose the advantageous time to transform with this technology so as to improve the efficiency of transformation.

Key words Soybean (*Glycine max*); Transgene; Pollen tube pathway

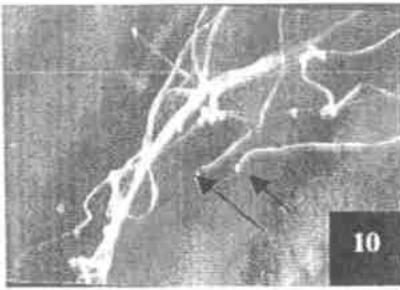
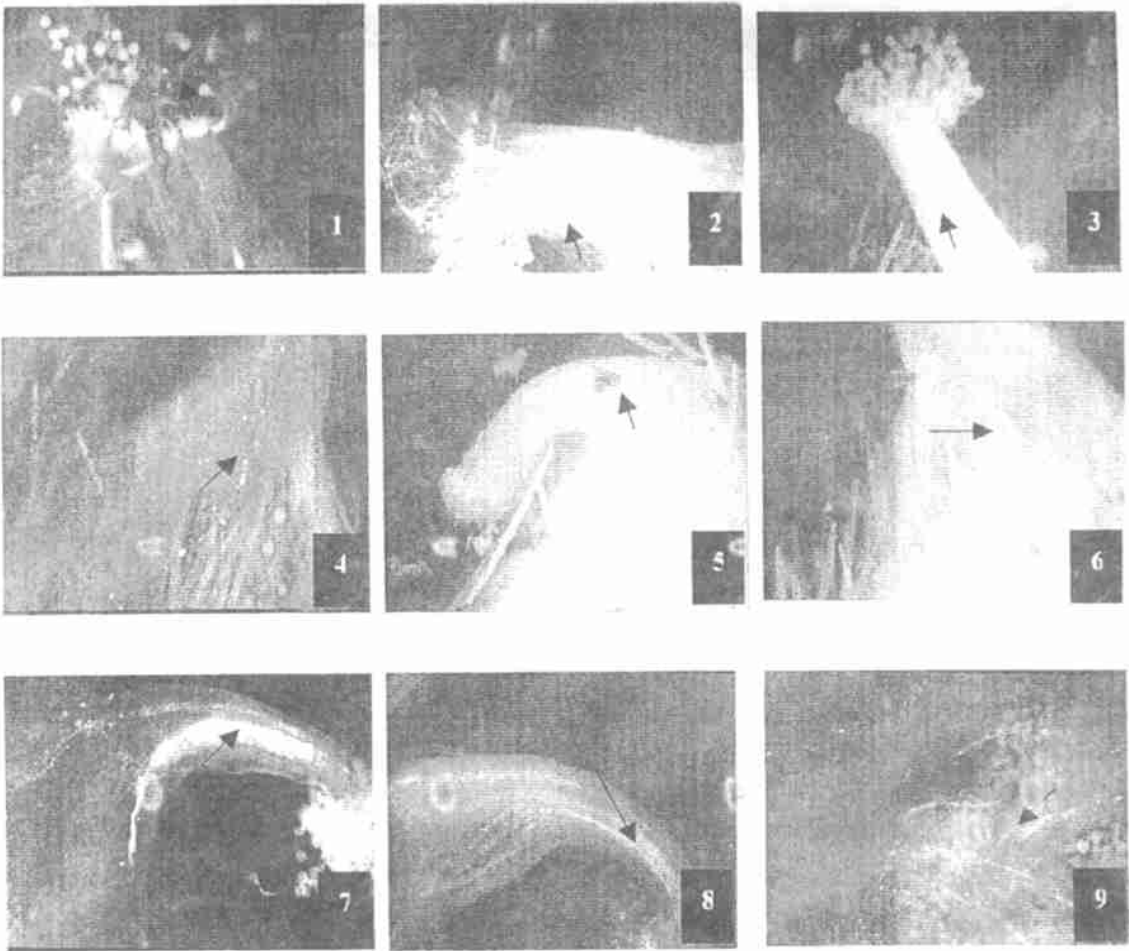


图 1: 上午 7: 00—8: 00, 花粉尚未萌发
图 2: 自花授粉初期, 花粉在柱头上萌发
图 3: 随着自花授粉时间的延长, 花粉在柱头上萌发的数量增多
图 4: 自花授粉后 2—3 小时, 少数花粉管已延伸到达花柱基部
图 5: 自花授粉后 5—6 小时, 花粉管已延伸到达子房腔
图 6: 自花授粉后 6—7 小时, 花粉管在子房腔内延伸
图 7: 自花授粉后 6 小时, 花粉管通过整个花柱后, 到达子房腔内沿着胎座的表面生长
图 8: 自花授粉后 8—9 小时, 在同一子房内有許多花粉管同时沿着胎座生长
图 9: 自花授粉后 10—11 小时, 花粉管在子房中延伸情况

图 10: 花粉管从花柱延伸入子房部分, 有些花粉管在花柱的基部或子房腔内便停止延伸, 并且在花粉管的尖端畸形膨大

1. From 7: 00—8: 00 A.M. pollen didn't germinate
2. Pollen germinated on stigma during the initial stage of selfing
3. With time of selfing went by, multi-pollinate germinated on stigma
4. 2—3 hours after selfing, some pollen tubes stretched to the basal stem
5. 5—6 hours after selfing, pollen tubes stretched to ovarium
6. 6—7 hours after selfing, pollen tubes stretched in ovarium
7. 6 hours after selfing, across all stilet, the pollen tubes arrived in ovarium and grew along placental faces
8. 8—9 hours after selfing, a lot of pollen tubes grew along placenta in the same ovarium
9. 10—11 hours after selfing, pollen tubes stretched in ovarium
10. Pollen tubes stretched to ovarium through stem. Some pollen tubes stayed at the basal stem or ovarium, and the end of pollen tube swell malformed