

技术与方法 Techniques and Methods

萱草花粉电击转化参数的选择

钟荣, 谭雨馨, 张铮, 尹冬梅, 刘翔, 秦巧平, 张志国, 倪迪安*

上海应用技术大学生态技术与工程学院, 上海201418

*通信作者(dani@sit.edu.cn)

摘要: 以萱草品种‘斯特拉’成熟花粉为材料, 比较了不同电场强度和电击次数对花粉转化率的影响。结果显示: 萱草花粉电击转化的最佳参数为 $1\text{ kV}\cdot\text{cm}^{-1}$ 、电击3次。

关键词: 萱草; 花粉; 电击转化

Selection of pollen electroporation transformation parameters of daylily (*Hemerocallis* sp.)

ZHONG Rong, TAN Yuxin, ZHANG Zheng, YIN Dongmei, LIU Xiang, QIN Qiaoping, ZHANG Zhiguo, NI Di'an*

School of Ecological Technology and Engineering, Shanghai Institute of Technology, Shanghai 201418, China

*Corresponding author (dani@sit.edu.cn)

Abstract: Different pulse field strength and number of pulses were used for electroporation transformation of mature pollens of daylily (*Hemerocallis* sp.) ‘Black Eyed Stella’ to obtain an optimal parameter. The results showed that the optimal parameter of daylily pollen electroporation was $1\text{ kV}\cdot\text{cm}^{-1}$ with 3 pulses.

Key words: daylily (*Hemerocallis* sp.); pollen; electroporation transformation

植物转基因育种以其打破生殖隔离、育种方向性强、缩短育种年限等诸多优势, 受到广泛关注。萱草品种丰富、花色艳丽, 具有较好的绿化观赏价值。然而, 通过多年种间杂交, 萱草多为杂合体, 遗传背景较为复杂, 且为多年生单子叶植物, 因此萱草遗传转化的研究较少(Rodriguez-Enriquez和Grant-Downton 2013; 金立敏等2012)。

目前, 萱草遗传转化的方法有基因枪法、花粉管通道法和农杆菌介导法(Aziz等2003; 郑楠等2015)。笔者最近通过花粉管通道法获得了转基因萱草(倪迪安等2020), 但该方法较适用于花器官较大的植物品种, 且由于是在大田或温室操作, 受环境因素影响较大, 转化效率低且遗传不稳定。农杆菌介导法严重依赖组织培养技术, 受基因型的影响比较大, 且农杆菌的天然寄主不是单子叶植物,

因而农杆菌介导的萱草遗传转化比较困难, 需要经过长周期且繁琐的组织培养植株再生阶段, 转化效率较低。外植体的基因型、培养的时间和农杆菌浸染浓度等均会影响农杆菌介导法的转化。迄今为止, 仅有1例通过农杆菌感染及萱草愈伤组织再生获得转基因植株的报道(王霞霞等2015)。由于仪器和耗材都较为昂贵, 以胚性愈伤组织材料, 通过基因枪法获得转基因萱草植株的报道也仅有1例(Aziz等2003)。

电击法又称为电穿孔法或电激法, 电穿孔技术被广泛应用于将外源大分子如DNA、蛋白质等转入受体细胞中的遗传学和分子生物学研究中。

收稿 2020-11-28 修定 2021-01-27

资助 上海市科技兴农项目[沪农科推字(2019)第1-8号]。

电穿孔遗传转化技术操作简单快速、成本低,常以原生质体为受体。近年来,陆续报道了电穿孔法运用于植物组织细胞遗传转化的尝试(张小红等2013;郑栋华等2019),但目前尚无花粉电击转化法应用于萱草的报道。包括花粉管通道、基因枪和原生质体在内直接转化方法可能存在转基因后代遗传不稳定等缺点,限制了上述技术在常规遗传转化中的应用,目前一般仅应用于瞬时表达研究。最近兴起的基因编辑技术,不依赖于外源基因在植物基因组的整合及其稳定遗传,只要满足受体细胞的基因组得到编辑的条件即可。因此在基因编辑实验中采用花粉管通道、花粉电击等直接转化技术,可降低技术难度和克服对组织培养及基因型的依赖。

本研究以萱草花粉为材料,利用电击转化法将含有35S:GUS融合基因的pBI21质粒导入萱草花粉细胞中,探索萱草花粉在不同条件下的萌发率和转化率,选择最优萱草花粉电击转化的参数,为基于萱草花粉电击转化的基因编辑提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

受体材料为萱草‘斯特拉’(*Hemerocallis* sp. ‘Black Eyed Stella’),该品种为Roberson博士于1989年通过杂交获得,并登录美国萱草协会萱草品种数据库(<https://www.daylilies.org/DaylilyDB/>)。携带卡那霉素抗性基因和35S:GUS融合基因的质粒pBI21用于花粉电击转化。

1.2 花粉的收集与处理

参照张小红等(2013)的方法,具体如下:早上7:30~8:30在试验田挑选受体萱草‘斯特拉’的成熟花粉,取出花丝,将花粉放入1.5 mL离心管,迅速置于冰上。加入1 mL的PGM Buffer缓冲液($0.16 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_3\text{BO}_3$ 、 $1.27 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{CaCl}_2$ 、 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{KNO}_3$ 、20%蔗糖、 $35 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 赤霉素及 $4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{MES}$, pH 5.9),缓慢地清洗花粉,使萱草花粉与PGM Buffer充分混匀, $8\ 814.3 \times g$,离心1 min,弃上清,重复此步骤一次。加入1 mL 20%蔗糖溶液, $8\ 814.3 \times g$,离心1 min,弃上清。再加入150 μL 20%蔗糖溶液,用移液枪吸打混匀,得到花粉悬浮液。

1.3 电击参数

用德国艾本德公司(Eppendorf)的多功能细胞电穿孔仪(Multiporator, Eppendorf AG 22331 Hamburg),将上述花粉溶液分别转入电击杯中(电击杯需提前预冷),分别以电场强度200、400、600、800、1 000和1 200 $\text{V} \cdot \text{cm}^{-1}$ 电击2、3和5次,脉冲时间为80 μs 。

1.4 花粉管萌发

电击完成后,将花粉溶液转移到1.5 mL管中,冰上静置30 min,再置于28°C孵育3 h;取少量花粉溶液在显微镜下观察花粉萌发情况,分别随机选取3~5个视野的花粉细胞,观察萱草花粉的萌发情况,统计花粉萌发率,重复实验3次,花粉萌发率为萌发花粉孔的数量/花粉总数。

1.5 电击转化

在试验田收集受体萱草‘斯特拉’成熟的花粉,在制备好的花粉悬浮液(150 μL)中加入20 μL 浓度为 $1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ EGTA抑制核酸酶的活性,再加入50 μL 浓度为 $5 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的含有35S:GUS融合基因的质粒pBI21,混匀后冰浴5 min。将花粉溶液移至2 mm的电击杯中(电击杯需提前预冷),电击处理参数分别为200、400、600、800、1 000和1 200 $\text{V} \cdot \text{cm}^{-1}$,电击次数为2、3、5次。电击处理完毕后,28°C孵育3 h。将萌发完成后的花粉加入GUS染色液[50 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲液, pH 7.2; 0.1% Triton X-100, 2 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ X-Gluc贮存液, 2 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, 2 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$, 10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA], 37°C过夜。用50%、60%、70%、80%和90%乙醇依次脱水30 min,在100%乙醇中放置1 h后进行复水,再加入适量透明缓冲液(透明液为水合三氯乙醛:水:甘油=8:2:1)(赵林姝等2014),对花粉进行透明处理,室温静置过夜。取少量花粉溶液在显微镜下观察花粉转化情况,统计花粉萌发率,重复实验3次。花粉转化效率为显色花粉数/花粉总数。

2 实验结果

2.1 电压强度和电击次数对萱草花粉萌发的影响

萱草花粉在进行电击处理及培养后,在显微镜下可观察到已经伸长的花粉管(图1)。与对照相比,萱草花粉细胞在不同电压强度和电击次数处



图1 萱草花粉离体萌发

Fig. 1 Daylily pollen germinates *in vitro*

UP: 未萌发花粉, PT: 花粉管。

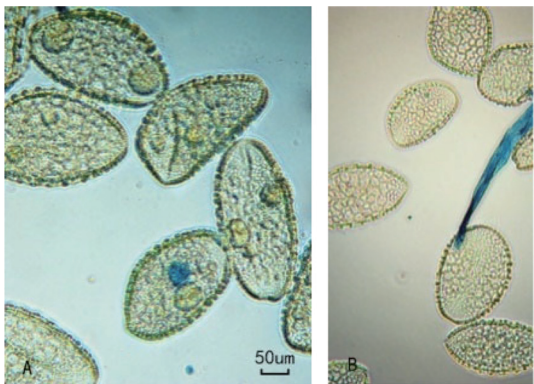


图3 转基因萱草花粉GUS染色

Fig. 3 GUS staining of transgenic daylily pollen

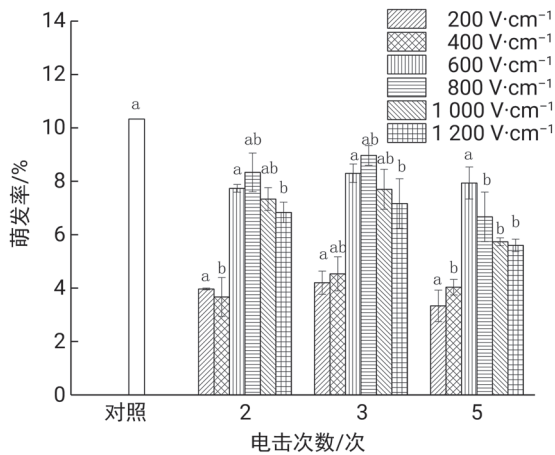


图2 不同电场强度和电击次数下萱草花粉的萌发率
Fig. 2 Daylily pollen germination rate under different pulse field strength and number of pulses

对照: 冰上未电击。不同小写字母表示同一电场强度不同电击次数之间差异显著($P<0.05$)。下同。

理之后的萌发率有所下降(图2)。当电压强度不变时, 电击次数分别为2、3和5次时, 花粉萌发率先升高后下降, 其中, 电击3次时, 电压强度800 V·cm⁻¹的花粉萌发率最高, 为9%。当电击次数相等, 电压强度低于800 V·cm⁻¹时, 花粉萌发率逐渐升高, 而电压强度高于800 V·cm⁻¹时, 花粉萌发率开始下降。

2.2 电压强度和电击次数对萱草花粉转化率的影响

在电击溶液中加入含有35S:GUS融合基因的质粒pBI121, 以200、400、600、800、1 000和1 200 V·cm⁻¹分别电击2、3、5次。GUS染色后, 在显微镜下可观察到显色的花粉及花粉管, 表明GUS基

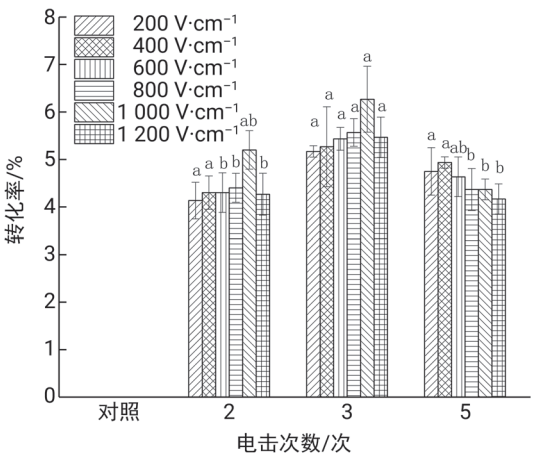


图4 不同电场强度和电击次数下萱草花粉的转化率
Fig. 4 Daylily pollen transformation rate under different pulse field strength and number of pulses

因在花粉中的表达(图3)。图4显示, 电击次数为2和3次时, 电压强度为1 000 V·cm⁻¹的花粉转化率最高; 电击次数为5次时, 电压强度为400 V·cm⁻¹的花粉转化率最高, 但比电击次数为3次时最低的转化率低。因此萱草花粉电击转化效率最高的参数为电击3次、电场强度为1 000 V·cm⁻¹。

3 讨论

花粉电击转化法操作简单便捷、成本较低, 省去了复杂的组织培养过程, 克服了植物遗传转化依赖于建立高效植物组织培养再生体系的瓶颈问题。电击过程中产生的细胞膜损伤是可逆的, 对花粉细胞的损害较小, 是一种将DNA导入植物细胞

进行瞬时基因表达的可靠方法。

在电击转化前,用缓冲液清洗花粉可以增加花粉细胞的通透性(张小红等2013),与制备用于电击转化的感受态细菌的原理类似,可提高外源基因的转化效率。本研究使用的花粉萌发缓冲液是浓度为20%的蔗糖溶液,蔗糖既可以提供营养物质,也可以维持外界渗透压的稳定。萱草花粉的活力对温度较为敏感,早晨的活力最高(王婧等2019)。因此收集萱草花粉的时间宜在早晨7:00~8:00之间,此时外界温度较低,花粉活力较高。花粉的活力受电压强度和电击次数影响较大,当电压强度和电击次数超过一定的值时,对花粉细胞活力造成较大的影响,本研究结果也表明萱草花粉在电击处理之后的萌发率有所下降。

电击转化效率受电压强度和电击次数影响较大(张小娟和张荣光2011;张小红等2013),对于特定的植物来说,适合的电压强度和电击次数可获得最高的转化效率。本实验对萱草花粉电击的电压强度和电击次数进行了探索,结果表明萱草花粉的最适电击参数为 $1\ 000\ \text{V}\cdot\text{cm}^{-1}$,电击3次。下一步需进一步优化萱草花粉电击转化的各项参数以进一步提高转化效率,探索适合的授粉条件以获得转基因植株及其在基因编辑中的应用。

参考文献(References)

- Aziz AN, Sauvé RJ, Zhou S (2003). Genetic transformation of *Stella De Oro* daylily by particle bombardment. *Can J Plant Sci*, 83: 873–876
- Jin LM, Zhou YZ, Guo ZH, et al (2012). Effect of inbred, hybrid and different cultivation environments on seed setting characteristics of *Hemerocallis* hybrid. *Hubei Agric Sci*, 51: 2760–2763 (in Chinese with English abstract) [金立敏, 周玉珍, 郭志海等(2012). 大花萱草自交、杂交及不同栽培环境结实率比较. *湖北农业科学*, 51: 2760–2763]
- Ni DA, Liang J, Gao MY, et al (2020). Daylily glyoxalase gene cloning and pollen-tube pathway transformation. *J Plant Physiol*, 56 (2): 171–179 (in Chinese with English abstract) [倪迪安, 梁锦, 高马也等(2020). 萱草乙二醛酶基因的克隆及花粉管通道法遗传转化. *植物生理学报*, 56 (2): 171–179]
- Rodriguez-Enriquez MJ, Grant-Downton RT (2013). A new day dawning: *hemerocallis* (daylily) as a future model organism. *AoB Plants*, 5: pls055
- Wang J, Luan DT, Liang J, et al (2019). Effects of different storage temperatures on pollen viability of *Hemerocallis fulva*. *Mol Plant Breeding*, 17: 3058–3063 (in Chinese with English abstract) [王婧, 栾东涛, 梁俊等(2019). 不同贮藏温度对萱草花粉活力的影响. *分子植物育种*, 17: 3058–3063]
- Wang XX (2013). The plant regeneration and transformation of CHS gene by agrobacteria-mediated in *Hemerocallis* hybrid (dissertation). Lanzhou: Gansu Agricultural University (in Chinese with English abstract) [王霞霞(2013). 萱草植株再生及农杆菌介导的CHS基因转化的研究(学位论文). 兰州: 甘肃农业大学]
- Zhang XH, Zhao XJ, Li B, et al (2013). Factors optimization of pollen electroporation transformation and identification of transgenic wheat. *Sci Agric Sin*, 46 (12): 2403–2411 (in Chinese with English abstract) [张小红, 赵雪晶, 李波等(2013). 小麦花粉电穿孔转化因素优化和转基因植株获得及鉴定. *中国农业科学*, 46 (12): 2403–2411]
- Zhang XJ, Zhang RG (2011). Factors which influence the efficiency of electroporation. *Med Recap*, 17 (5): 666–668 (in Chinese with English abstract) [张小娟, 张荣光(2011). 影响电穿孔法转化效率的因素. *医学综述*, 17 (5): 666–668]
- Zhao LS, Liu LX, Gu JY, et al (2014). A method to improve sample preparation for observing stomata guard cells in *Triticum aestivum*. *Chin Bull Bot*, 49 (1): 120–126 (in Chinese with English abstract) [赵林姝, 刘录祥, 古佳玉等(2014). 一种小麦叶片气孔保卫细胞观察样品的制备方法. *植物学报*, 49 (1): 120–126]
- Zheng DH, Cui XN, Gao KL, et al (2019). Improvement of corn pollen transformation and its application in maize transformation. *J Henan Agric Univ*, 53 (4): 525–530 (in Chinese with English abstract) [郑栋华, 崔晓娜, 高凯莉等(2019). 玉米花粉转化方法的优化及其在玉米转化中的应用. *河南农业大学学报*, 53 (4): 525–530]
- Zheng N, Wang XX, Cao DM (2015). Transformation of agrobacteria-mediated CHS gene in *Hemerocallis* hybrida. *Chin Horticult Abs*, 31 (2): 5–11 (in Chinese with English abstract) [郑楠, 王霞霞, 曹冬梅(2015). 农杆菌介导萱草植株CHS基因的转化. *中国园艺文摘*, 31 (2): 5–11]