

· 技术方法 ·

玉米花粉体外萌发方法改进及其对花粉介导转基因的作用

崔贵梅, 孙毅*, 郝曜山, 杜建中, 王亦学

山西省农业科学院生物技术研究中心, 太原 030031

摘要 超声波处理花粉介导植物基因转化方法由山西省农业科学院生物技术研究中心发明, 已被国家知识产权局授予发明专利(专利号ZL 99121152.9)。在该专利的基础上, 针对玉米(*Zea mays*)花粉取样、保存和处理条件等因素对其体外萌发的影响进行深入研究, 提出了改进玉米花粉体外萌发实验的方法。研究表明, 在不同时期对开花的玉米进行花粉培养时所需蔗糖溶液的浓度不同; 确定了玉米花粉的保存时间、条件及其对超声波处理后花粉萌发率的影响, 以提高该转化方法中花粉的活力, 并进一步验证了该转基因方法的可靠性; 讨论了玉米花粉体外萌发的操作技巧和各因子的参数, 对提高花粉介导植物基因转化效率有一定的参考价值。

关键词 转基因, 体外萌发, 花粉, 玉米, 超声波

崔贵梅, 孙毅, 郝曜山, 杜建中, 王亦学 (2012). 玉米花粉体外萌发方法改进及其对花粉介导转基因的作用. 植物学报 47, 155–161.

植物转基因研究对于提高农作物产量、抗病虫能力、抗逆性和改进品质等方面具有重要意义。因此我国特别设立了国家转基因生物新品种培育重大专项给予支持。但植物转基因技术发展缓慢, 主要原因是缺乏高效、实用和大规模转化作物品种的转基因方法。在我国, 对绝大多数农作物而言, 转基因技术还仅停留在实验阶段, 因此简化植物转化方法是不少相关研究人员的努力方向。“超声波处理花粉介导植物转基因方法”由山西省农业生物技术研究中心首创, 并于2006年3月获得国家发明专利(专利号ZL99121152.9)。该转基因新方法采用超声波处理后的花粉介导基因转移并形成种子, 而不需要传统植物转基因方法(Grimsley et al., 1987; D'Hallui et al., 1992; 王国英等, 1995)所必需的组织培养和再生植株过程。该方法具有操作简单、所需设备费用低、获得转化种子周期短、转化率高及后代嵌合体少等优势, 具有较好的应用前景(王景雪等, 2001; 梁雪莲等, 2005)。采用该方法已在玉米(*Zea mays*)上获得了转基因植株, 其转化率可达40%以上(王景雪等, 2001; 陈定虎等, 2003; 杜建中等, 2008)。现已初步证明该方法在谷子(*Setaria italica*)(王节之等,

2004)、油菜(*Brassica napus*)(杜春芳等, 2006)、高粱(*Sorghum bicolor*) (Wang et al., 2007)和野罂粟(*Papaver nudicaule*)(魏玉杰等, 2007)等植物上也是可行的, 说明其对单子叶和双子叶植物都有普遍的应用价值(孙毅, 2010)。

体外萌发实验对利用花粉作为载体介导植物转基因方法中各参数的建立具有重要的意义, 其作用是在进行超声波处理前及处理后检测花粉的生活力, 有助于掌握花粉样品的质量, 优化花粉处理体系中的各项参数, 从而提高基因转化的效率。通常在实际应用该方法对玉米进行转基因操作中, 由于玉米花期较集中, 花粉经超声波处理后需即时涂抹到柱头上, 人工授粉工作量大, 往往没有时间详细做花粉体外萌发检测, 一般只能直接看田间结实率及对一代种子苗进行分子检测基因转化率来证明结果, 但这样不利于提高转基因实验的效率。因此, 本研究通过探讨玉米离体花粉在多种处理条件下的活力和萌发能力, 以期进一步优化花粉介导转基因方法中对花粉处理的参数, 有效提高转化率, 为该转基因方法在植物上的深入研究及进一步推广应用提供参考。

收稿日期: 2011-05-06; 接受日期: 2011-11-30

基金项目: 国家转基因生物新品种培育重大专项(No.2008ZX08003-001, No.2009ZX08003-017B)

* 通讯作者。E-mail: sunyi692003@yahoo.com.cn

1 材料与方法

1.1 材料

选用玉米(*Zea mays* L.)自交系478、海9-21及昌7-2,分温室早播物候条件(3月下旬播种,花期始于5月30日)及正常春播大田物候条件(5月上旬播种,花期始于7月20日)2个时期采集玉米花粉。

1.2 方法

1.2.1 玉米花粉体外萌发培养条件及操作

本实验中玉米花粉体外萌发培养基使用已优化配方(郝曜山等, 2005): 蔗糖+50 mg·L⁻¹硼酸+300 mg·L⁻¹氯化钙+200 mg·L⁻¹氯化镁+100 mg·L⁻¹硝酸钾+35 mg·L⁻¹赤霉素。室温25℃下, 玉米花粉0.5小时开始萌发, 5小时以后花粉管基本停止生长, 长度同隔夜后一样。

首先进行花粉体外萌发操作方法探索。(1) 液体与固体培养基效果比较。在液体培养基中加入1%琼脂成为固体培养基。(2) 进行液体培养基悬滴法、凹槽法(胡适宜, 1993)及培养皿浅层培养法的效果对比。悬滴法是将干花粉撒在盖玻片悬滴液表面, 翻扣在凹玻片小室内培养; 凹槽法是将花粉直接撒在滴加有液体培养基的凹玻片凹坑内并盖上盖玻片; 浅层培养法是在小培养皿中加入少量液体培养基与花粉混匀培养。(3) 选择取粉时间。分别在上午玉米刚开花至接近中午时间段分期取粉, 观察萌发效果。同时注意连续干旱高温或阴雨低温等天气对花粉萌发的影响。

1.2.2 花粉体外萌发镜检方法

显微镜下观察花粉萌发, 分别随机取8个视野区域的花粉粒计数, 利用公式计算花粉破率和花粉萌发率。

$$\text{花粉破率} = (\text{胀破花粉个数} / \text{花粉总数}) \times 100\%$$

$$\text{花粉萌发率} = (\text{长出花粉管花粉个数} / \text{花粉总数}) \times 100\%$$

用显微镜测微尺测量本视野中最长花粉管长度。统计数据使用Excel表格工具计算平均值及标准差。采用DPS数据处理系统Duncan's多重比较法5%显著水平测定观察结果的显著性。0.5小时内测定花粉破率, 1–2小时测定花粉萌发率, 5小时以上测量花粉管长度。

1.2.3 花粉体外萌发培养基中使用的蔗糖浓度

蔗糖是花粉体外萌发常用的细胞渗透压调节剂, 同时也可作为碳源提供营养。不同植物及品种间花粉培养所需蔗糖浓度存在差异, 并且不同物候条件也对花粉渗透压有微小影响。此外, 花粉超声波介导转基因方法中蔗糖溶液作为超声波介质起到悬浮花粉与质粒的作用。花粉体外萌发实验中选择适宜的蔗糖浓度至关重要。针对本实验温室早播与大田春播及玉米不同品种, 设计蔗糖浓度梯度分别为1%、5%、10%、15%、20%、30%、40%及50%。以花粉萌发率高、花粉管生长势好并且破率较低的选择为适宜蔗糖浓度。

1.2.4 花粉保存时间及条件

为了使花粉超声波介导转基因操作方法更方便有效, 有必要进行实验探索花粉采集后室内保存时间及条件。采用花粉体外萌发鉴定花粉生活力的方法较适合本研究(王钦丽等, 2002)。本实验针对2种物候条件下的玉米花粉分别试用了冰箱或冰壶低温(4–10℃)干燥或潮湿保存、室温(25℃)开放或封闭等简便易行的保存方案, 所谓干燥和潮湿、开放和封闭的条件仅指放置于培养皿内加盖和不加盖的区别。保存时间分别为0.5、2、6、24、48、72和96小时, 直到无花粉萌发或花粉管停止生长为止。

1.2.5 花粉超声波介导体系中花粉体外萌发检测

使用花粉超声波介导转基因方法, 将0.2 g新鲜玉米花粉悬浮于20 mL适当浓度的蔗糖及质粒溶液中, 在超声波处理前、后分别用滴管吸出少许含花粉的溶液, 按比例加入培养基其它成分后进行花粉体外萌发检测。实验重复3次, 尽量使用同期取样的花粉。

2 结果与讨论

本实验选用的玉米自交系478、海9-21及昌7-2, 品种间差异较小, 因此以自交系478的数据为代表进行实验结果分析。

2.1 不同蔗糖浓度的实验结果

玉米花粉体外萌发不同品种间对蔗糖浓度的反应基本一致, 但不同物候条件下种植的玉米花粉对蔗糖浓度反应有差异。表1与表2分别为温室早播与大田春播

玉米花粉在不同蔗糖浓度培养基上的体外萌发结果。结果表明, 温室花粉萌发所需最佳蔗糖浓度为20%–30%, 50%蔗糖浓度下仍有少量萌发; 大田花粉萌发的最佳蔗糖浓度是15%, 蔗糖浓度在20%以上对萌发

有抑制作用, 50%时花粉出现质壁分离且无萌发。随着蔗糖浓度的升高, 花粉胀破率明显降低且释放内容物分散现象不同。低浓度下应即时统计花粉破率, 否则花粉内容物散开, 胀破花粉与未破的不易区分。

表1 温室早播玉米花粉在不同浓度蔗糖溶液中的体外萌发

Table 1 The *in vitro* pollen germination of greenhouse maize in sucrose solution of various concentration

Sucrose concentration	Pollen broken percentage (%)	Pollen germination percentage (%)	Pollen tube length (μm)	Character description
1%	72.5±6.85 a	7.26±2.37 e	200±42.3 f	A lot of broken pollen with cell content spilled out in all the medium, and pollen tubes were very short and thin.
5%	60.3±6.07 b	11.1±4.88 e	262±48.1 f	Idem, pollen tubes were short and thin.
10%	32.9±4.76 c	56.5±5.69 c	671±50.2 d	A part of pollen tubes were stretched-out, and then broken.
15%	30.8±4.11 cd	60.0±5.82 bc	1 357±58.4 c	Idem, pollen tubes were longer.
20%	26.6±3.73 cde	71.2±4.71 a	1 804±68.7 b	The number of broken pollen grains decreased. Pollen tubes were longer and grew equably.
30%	25.1±3.51 def	65.6±5.63 ab	2 058±62.4 a	Idem, pollen tubes were longest and grew normally.
40%	22.4±3.71 ef	42.3±5.38 d	756±51.7 d	The pollen contents spilled out from broken pollen and pollen tubes were shorter.
50%	17.9±3.24 f	12.2±4.61 e	380±45.9 e	A few pollen grains were broken. Pollen tubes were thick and short with some curved abnormality.

不同字母表示在邓肯氏多重比较5%显著水平上差异显著。

The different letters denote the significance of differences at the 5% level of DPS Duncan's Multiple Comparison.

表2 大田春播玉米花粉在不同浓度蔗糖溶液中的体外萌发

Table 2 The *in vitro* pollen germination of spring-sown maize in sucrose solution of various concentration

Sucrose concentration	Pollen broken percentage (%)	Pollen germination percentage (%)	Pollen tube length (μm)	Character description
1%	66.4±6.08 a	8.69±2.12 ef	703±54.2 e	Most of pollen was broken with cell content spilled out in all the medium. Pollen tubes were very short and broken easily at their tips.
5%	51.9±5.88 b	17.8±5.47 d	1 428±72.5 c	Pollen broken percentage was high and germination percentage was low, but pollen tubes grew longer and normally.
10%	40.1±5.24 c	67.4±5.72 b	2 206±78.9 b	Pollen germination percentage was higher. Pollen tubes grew robustly with even and smooth shape.
15%	23.8±3.83 d	80.6±4.94 a	2 625±65.5 a	Pollen broken percentage was lower, pollen germination percentage was highest and pollen tubes were longest.
20%	11.4±2.10 e	49.6±5.12 c	2 285±62.0 b	Pollen germination percentage decreased rapidly, but pollen tubes grew normally.
30%	4.07±1.17 f	12.8±5.02 de	1 188±57.6 d	Idem, the pollen contents spilled out from broken pollen.
40%	2.91±1.00 f	2.37±1.21 f	200±46.3 f	Pollen broken percentage was very low, the pollen contents spilled out from broken pollen and pollen tubes were short.
50%	0.50±0.47 f	0	0	There was few broken pollen, plasmolysis was obvious, and no germination.

不同字母表示在邓肯氏多重比较5%显著水平上差异显著。

The different letters denote the significance of differences at the 5% level of DPS Duncan's Multiple Comparison.

在相同蔗糖浓度时大田玉米花粉比温室花粉胀破率低,相近萌发率时大田玉米花粉管长得多且生长势强。总之,本地区大田玉米花粉萌发培养基宜采用低浓度蔗糖,温室或其它低温潮湿地区物候条件宜采用高浓度蔗糖,或者需重新实验决定。

2.2 花粉保存时间和保存条件比较

经反复实验我们得到玉米花粉保存条件优劣依次为低温干燥>低温潮湿>室温封闭>室温开放,尤其以冰箱4℃培养皿内保存花粉最好,完全可满足超声波介导转基因实验用途;同时也修正了先前常采用的冰壶纸袋内潮湿放置及室内敞口放置玉米花粉的一些粗糙、错误的操作方法。从表3可以看出,温室早播玉米花粉在体外存活时间短,只能于低温下干燥保存2小时左右,之后花粉萌发力迅速下降而不宜使用。大田春播玉米花粉置于4℃冰箱中的培养皿内,干燥

保存5天仍有一定萌发率(表4)。同时发现刚采回的花粉易破且萌发率低,保存2小时以上萌发率明显提高。玉米花粉萌发率及保存时间与当天花粉质量有关。总之,大田正常生长季节及良好物候条件下采集到的玉米花粉耐受力强,保存期长、胀破少且花粉管生长势旺。

2.3 超声波处理对花粉体外萌发率的影响

超声波处理对花粉损伤较大,严重影响花粉的生活力,是造成结实率低的主要原因。因此使用花粉超声波介导转基因方法,必须把握适当的超声波处理参数(强度、次数、时间等),需在保留花粉活力与使外源DNA进入花粉内这两个矛盾对立间取得平衡折中。专利公开的方法中,超声波处理参数为功率200–300 J·s⁻¹,每次处理时间5秒,间隔10秒,共处理5–8次。本实验以花粉体外萌发检测为主,为提高研究说服力,

表3 温室早播玉米不同取粉时间及保存条件的花粉体外萌发率(%)

Table 3 The pollen germination percentage of greenhouse maize under various collection time and storing conditions (%)

Storing conditions and time	Pollen collection time		
	8:30	10:00	11:30
Instant germinate	18.3±4.33 a	56.9±6.72 a	69.2±6.79 a
2 h at low temperature and dry	7.30±2.14 b	42.2±5.88 b	68.8±6.45 a
2 h at low temperature and wet	0	15.2±4.13 c	35.4±5.62 b
2 h at room temperature and covered	0	9.3±3.02 cd	12.5±3.67 c
2 h at room temperature and opened	0	0	0
4 h at low temperature and dry	0	5.2±2.13 d	8.26±2.75 c
6 h at low temperature and dry	0	0	0

不同字母表示在邓肯氏多重比较5%显著水平上差异显著。

The different letters denote the significance of differences at the 5% level of DPS Duncan's Multiple Comparison.

表4 大田春播玉米4℃干燥保存条件下的花粉体外萌发

Table 4 The pollen germination of spring-sown maize stored drily at 4℃ for various storing time

Storing time (h)	0.5	2	4	6	24	48	72	96	120	144
Pollen broken percentage (%)	48.2±5.29 c	26.6±3.86 d	21.5±3.17 de	18.4±2.81 de	16.7±2.55 e	24.1±3.34 de	46.3±5.15 c	52.8±6.28 c	79.8±6.91 b	90.4±7.87 a
Pollen germination percentage (%)	35.0±4.52 e	68.3±5.75 c	75.6±5.43 bc	80.2±5.18 ab	84.3±5.27 a	72.4±5.94 bc	45.8±4.57 d	35.7±4.16 e	15.9±3.27 f	0
Pollen tube length (μm)	2 000±71.6 e	2 250±76.5 d	2 500±73.8 c	2 750±74.2 b	3 000±78.5 a	1 500±72.3 f	1 000±68.4 g	625±52.8 h	250±41.2 i	0

不同字母表示在邓肯氏多重比较5%显著水平上差异显著。

The different letters denote the significance of differences at the 5% level of DPS Duncan's Multiple Comparison.

表5 超声波处理前后玉米花粉体外萌发对比

Table 5 The contrast of maize pollen germination before and after ultrasonication treatment

Replica- tion No.	Before ultrasonication treatment			After ultrasonication treatment		
	Pollen broken percentage (%)	Pollen germination percentage (%)	Pollen tube length (μm)	Pollen broken percentage (%)	Pollen germination percentage (%)	Pollen tube length (μm)
1	24.6±3.63	67.5±4.94	2 553.1±108.1	50.1±4.61	4.14±1.73	493.75±70.39
2	40.7±4.11	57.1±4.74	2 265.6±123.9	73.5±4.73	0.83±0.47	171.88±50.78
3	33.5±4.42	64.2±4.92	2 400.0±112.6	70.7±4.70	2.21±1.43	290.63±49.89

设定对玉米自交系花粉处理样20 mL体系，采用较高强度超声波处理。超声波处理参数为功率200 J·s⁻¹，处理时间10秒，间隔5秒，处理6次，分2遍共处理12次。选取优质大田春播玉米花粉，15%蔗糖悬浮，第1次超声波处理使花粉表面核酸酶失活并处于感受态，再加入质粒DNA混匀后进行第2次超声波处理。从表5结果可见，实验数据重复性受花粉样本间差异影响，超声波处理后花粉破率增加1倍，萌发率严重下降，只有极少数花粉可萌发且花粉管短又细弱。超声波处理花粉操作体系有待进一步优化以提高花粉的存活率。

2.4 讨论

2.4.1 玉米花粉体外萌发操作方法比较及技巧小结

经反复实验比较几种玉米花粉体外萌发方法，总结了以下一些操作经验技巧供讨论和参考。(1) 使用液体培养基比固体培养基效果好。液体培养基各成分单独配制成母液保存于4℃冰箱，使用前按比例及需要量混合现用，无需灭菌。实验证明同一样品使用固体培养基花粉萌发率低且操作繁琐。(2) 使用培养皿浅层培养法花粉萌发率最高，花粉管生长状态良好，条件适宜时花粉管长度可达到3 mm(图1)。浅层培养法操作要领是于小培养皿底部铺一薄层液体培养基，并轻轻摇动使花粉在培养液中均匀分布。悬滴法操作技术难掌握，本实验中温室早播玉米花粉采用该法萌发较好，大田花粉用该方法萌发率没有浅层培养法高。凹槽法花粉易聚集、破率高，萌发效果最差。此外，悬滴法和微量凹槽法仅适于花粉直播鉴定萌发率，而超声波介导转基因体系花粉必须悬浮于蔗糖溶液中，检测时可在超声处理前后吸取少量含花粉的蔗糖溶液并加入培养基其它成分，适合采用培养皿浅层培养法测萌发率。(3) 取粉时间以上午10点以后至接近中午时最好，尤其是温室早播玉米在11点以后取粉为好

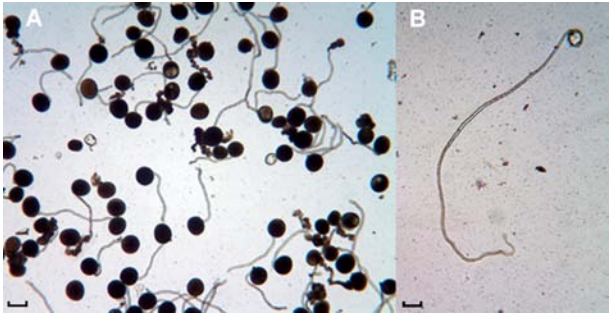


图1 玉米花粉体外萌发
(A) 使用培养皿浅层培养法; (B) 花粉管长度达3 mm
Bar=100 μm

Figure 1 In vitro germination of maize pollen
(A) Shallow fluid culture in petri dish; (B) Pollen tube length reaching about 3 mm
Bar=100 μm

(表3)。花粉体外萌发实验中取样质量是实验成败的关键。玉米花粉受物候条件影响较大，当日气温及空气相对湿度直接影响花粉体外萌发率，本地区大田玉米以雨后2天的花粉最好。为保证取到当日开花的新鲜花粉，前一天下午套袋时应去除旧花药。

2.4.2 有关花粉体外萌发的镜检参数意义及简化操作建议

本研究对花粉体外萌发均测定3项参数，发现除花粉萌发率可直接代表花粉的活力外，花粉破率及花粉管长度也可反映花粉的活力，3项参数相关性较大。一般质量好的花粉破率低、萌发率高、花粉管长；相反，如果花粉因各种原因而使活力下降(即萌发率降低)，则花粉破率就明显增高且花粉管细短，尤其是花粉管长度与萌发率密切相关。花粉管长度在一定程度上可代表花粉初萌发时间及花粉管生长速率。因此，花粉管

长度可认为等同于花粉萌发势,是表征花粉活力的重要指标之一。花粉破率参数有时与花粉活力相关性低,如有时花粉会出现不萌发也不破的休眠状态,或者花粉已萌发又胀破的情形。其原因及如何进一步调控花粉体外萌发生理生化指标还有待深入研究。此外,花粉破率还是转基因操作中超声波处理强度的重要参数。

但实验中3项参数均需镜检获得,操作较繁琐。尤其对玉米花粉破率检查,需即时镜检,否则胀破的花粉外溢,内容物散开,破花粉又没有其它明显特征,易出现数据误差。我们观察到,定量花粉悬浮液的花粉破率与悬浮液混浊程度呈正相关,因此可观察花粉悬液的透明度估测或定量测定其OD值,以简化操作程序。此外,肉眼也可判断花粉萌发程度,花粉萌发率高、花粉管较长的处理会在浅层培养液中形成微量棉絮网状结构物,是花粉管相互缠结将花粉粒固定的结果。

有关花粉体外萌发与结实率及转化率的关系仍有待深入研究。作者认为花粉体外萌发率高一定有利于提高结实率,但不一定能提高转化率。尽管花粉体外萌发仍受其它一些不明因素的影响,本实验结果对超声波介导植物转基因方法的应用可以起到一定的辅助和参考作用。使用该方法的研究人员仅需针对本地区物候条件及品种进行花粉体外萌发检测预备实验,并参考相关专利及文献中的有关方法适当调整个别参数即可。

参考文献

- 陈定虎,王锡锋,周广和 (2003). 抗SCMV转基因玉米植株的获得. 云南农业大学学报 **18**, 39–40.
- 杜春芳,刘惠民,李朋波,孙毅,李润植 (2006). 花粉介导法获得油菜转基因植株研究. 作物学报 **32**, 749–754.
- 杜建中,孙毅,王景雪,谢莉琴,郝曜山,贺健 (2008). 基于花粉介导法转化的玉米自交系抗病植株的获得. 中国农学通报 **24**, 79–82.
- 郝曜山,孙毅,李贵全,马建华 (2005). 玉米自交系花粉生活力的研究. 山西农业大学学报(自然科学版) **25**, 161–163.
- 胡适宜 (1993). 植物胚胎学实验方法(一)花粉生活力的测定. 植物学通报 **10**, 60–62.
- 梁雪莲,郭平毅,孙毅,刘惠民,王景雪,刘少翔,赵志国,唐思静 (2005). 玉米3种非组培转基因方法转化外源*bar*基因研究. 作物学报 **31**, 1648–1653.
- 孙毅 (2010). 拥有自主知识产权的高效转化方法是我国作物转基因领域健康发展的关键. 山西农业科学 **38**, 3–5, 10–10.
- 王国英,杜天兵,张宏,谢友菊,戴景瑞,米景九,李太源,田颖川,乔利亚,莽克强 (1995). 用基因枪将Bt毒蛋白基因转入玉米及转基因植株再生. 中国科学(B辑) **25**, 71–76.
- 王节之,郝晓芬,郑向阳,王路英,孙毅,王景雪 (2004). 谷子花粉介导法转几丁质酶基因的研究. 生物技术 **14**, 5–6.
- 王景雪,孙毅,崔贵梅,胡晶晶 (2001). 花粉介导法获得玉米转基因植株. 植物学报 **43**, 275–279.
- 王钦丽,卢龙斗,吴小琴,陈祖铿,林金星 (2002). 花粉的保存及其生活力测定. 植物学通报 **19**, 365–373.
- 魏玉杰,张金文,何庆祥 (2010). 花粉介导法将萝卜抗菌肽基因导入野薔粟的影响因素研究. 中国农学通报 **26**, 32–37.
- D'Hallui K, Bonne E, Bossut M, De Beuckeleer M, Lee-mans J (1992). Transgenic maize plants by tissue electroporation. *Plant Cell* **4**, 1495–1505.
- Grimsley N, Hohn T, Davies JW, Hohn B (1987). *Agrobacterium*-mediated delivery of infectious maize streak virus into maize plants. *Nature* **325**, 177–179.
- Wang WQ, Wang JX, Yang CP, Li YH, Liu L, Xu J (2007). Pollen-mediated transformation of *Sorghum bicolor* plants. *Biotechnol Appl Biochem* **48**(2), 79–83.

The Improvement of Maize Pollen *In Vitro* Germination Method and Its Role in Pollen-mediated Plant Genetic Transformation

Guimei Cui, Yi Sun^{*}, Yaoshan Hao, Jianzhong Du, Yixue Wang

Biotechnology Research Center, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Taiyuan 030031, China

Abstract The technique of pollen-mediated plant genetic transformation assisted by ultrasonication was patented by the Biotechnology Research Center of the Shanxi Academy of Agricultural Sciences. Here, we further investigated the conditions for sampling, storage and treatment of maize (*Zea mays* L.) pollen and effects on *in vitro* germination of pollen with the method. The optimal sucrose concentration for pollen suspension solution differed for maize pollen collected from plants with different flowering time. We determined the storage time and condition of pollen and their effects on pollen germination after ultrasonication. These results would be useful for improving pollen vitality in genetic transformation and verifying the feasibility of this plant transformation technique. We discuss some key steps for conducting *in vitro* germination of maize pollen and related parameters to increase transformation efficiency of pollen-mediated plant genetic transformation.

Key words genetic transformation, *in vitro* germination, pollen, maize, ultrasonication

Cui GM, Sun Y, Hao YS, Du JZ, Wang YX (2012). The improvement of maize pollen *in vitro* germination method and its role in pollen-mediated plant genetic transformation. *Chin Bull Bot* **47**, 155–161.

* Author for correspondence. E-mail: sunyi692003@yahoo.com.cn