

花粉管通道(或运载)法转化的植株后代遗传表现及转化机理的探讨

曾君祉 吴有强 王东江 张健 马铮嵘 周志勇

(中国科学院遗传研究所, 北京 100101)

摘要 追溯了花粉管通道法的起因和形成以及现在的应用情况,说明利用此法可以将报告基因、目的基因等转入植物,经 Southern blot, Northern blot 等法鉴定和对表达产物的检测,证明这是一个行之有效的转化方法.作者实验室对小麦转基因植株后代连续4代遗传表现的观察证明,转入的处源基因可以连续遗传,遗传规律与其他转化方法如农杆菌法、基因枪法等所得结果相似.在此基础上,作者从植物受精生物学的光学和亚显微结构的观察结果出发,探讨了此法的转化机理,证明受精前后的卵细胞类似未完全酶解的原生质体,因此其转化机理应与原生质体的转化相似.最后总结了此法的优点,列出了应用中应该注意的一些问题.

关键词 花粉管通道(或运载)法 转基因后代表现 转化机理

1 花粉管通道法转化方法的提出

70年代末期,我国学者在远缘杂交的基础上,通过授粉时混入异种作物花粉匀浆的方法,看到后代中出现与异种作物对应性状的变异,推测异种DNA有可能参与了受精过程^[1].同时,周光宇等又从生物化学的角度分析远缘杂种产生的原因,提出用作物总DNA作外源基因,通过花粉管通道对作物进行基因转移,并首先用放射自显影的方法,在棉花胚珠的花粉管通道和胚囊中看到带有同位素标记的DNA,证明转化时注入的DNA进入了胚囊^[2~5].随后,这一方法在我国的一些育种单位中开始应用,并观察到相应的变异.但是这些结果都得不到分子水平上的验证和明确的基因表达产物,使这一方法不能应用到转基因植物中.1988年Luo等人^[6]首次报道用花粉管通道法将含报告基因的质粒DNA转入水稻,经Southern杂交和酶学测定证明,得到了外源基因整合并表达的转基因水稻植株.使花粉管通道法的转化工作像其他直接转化法一样,完全按转基因技术的操作进行.接着,1991年谢道昕等人先后将抗虫基因(BT)导入棉花和水稻,用分子生物学和酶学方法鉴定,都得到了转基因植株^[7,8].1993年曾君祉等人和1995年Chong等人报道了用该法转化小麦,经过筛选、Southern blot和Southern和Northern blot鉴定以及对表达产物的检测,获得了小麦的转基因植株^[9,10].至此,花粉管通道法已在多种作物中获得成功,确定了其在直接转化法中的地位.

总结过去的工作,我们发现这些研究对转基因当代植株的鉴定是明确的,但对外源基因在后代中的遗传表现情况报道甚少,有必要加强.由于从1990年开始我们一直以小麦为材料研究了此转化方法的可重复性及基因型的影响等,并连续4代观察了外源基因在后代中的表现.本文拟首先简要地报道这部分研究结果,以便接下来对此方法的转化机理及应用价值作进一步的探讨.

2 花粉管通道(或运载)法获得的转基因小麦的转化频率及后代中的遗传学表现

首先报道近年来获得的T1代的转化频率.1993年报道了1990年的转化频率为4.7%^[9],随后从1991~1994年又多次重复了此实验,共转化了4个六倍体小麦和1个四倍体

小麦品种,经 Southern 杂交鉴定都得到了一定数量的转基因植株. 最少的为 1994 年,将几丁质酶基因转入北京地区的小麦品种京双 16,经 PCR 法鉴定转化频率为 3% (资料未发表),一般情况下都在 3%~6%^[11],甚至到 13.5%.

其次,分别报道外源基因在 T2, T3 和 T4 代植株中的遗传表现(其鉴定和检测方法请参看文献[9]).

T2 代植株. 转基因 T1 代植株 No. 49 和 No. 57 自交后分别结实 35 和 36 粒. 提取每粒种子的根尖 DNA 进行斑点杂交(图 1),发现有一类根尖未杂交上,斑点类似未转化的对照(CK);另一类杂交强,斑点深黑;第三类居中,斑点灰色. 统计 3 类斑点的分布情况列于表 1. 随后取 No. 49 的 T2 代黑色斑点株的叶片,提取总 DNA 做 Southern 分析,发现它们都显阳性杂交带(资料未发表);提取 GUS 做荧光检测,发现表达量差异大(图 2). 如 No. 49_28 和 35 两株的相对荧光峰值与对照(CK)接近, No. 49_20, 33 和 34 分别比对照高 26, 11 和 2.7 倍.

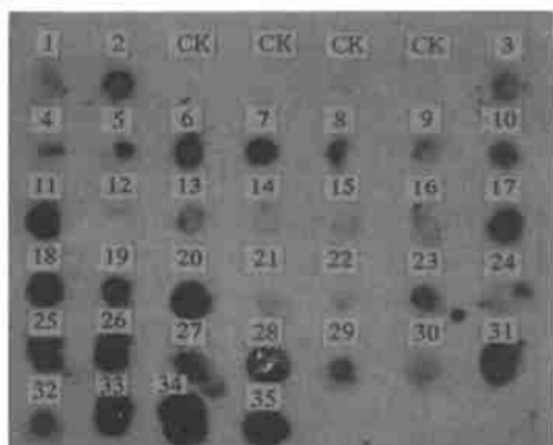


表 1 T2 代种子斑点杂交阳性斑点的分布

T1 代 植株	结实 粒数	斑点分布		
		黑	灰	无
No. 49	35	9	17	9
		1 :	2 :	1
No. 57	37	10	17	11
		1 :	2 :	1

图 1 转基因植株 No. 49 自交结实种子(T2)

根尖 DNA 斑点杂交

CK —— 未转化植株, 1~35 —— 种子号码

T3 和 T4 代植株. 观察了 T2 代植株 No. 49_33 和 No. 49_34 自交结实后代的遗传学表现, 分别报道如下: 首先, T2 代植株 No. 49_33 的后代成活 8 棵 T3 代植株. 取 6 株做 Southern 分析, 都为阳性(图 3), 荧光测试 GUS 基因的表达(图 4), 发现其强度比 T2 代亲本(图 2)低, 最高荧光强度只比对照高 2.2 倍. 这一现象在其他转化方法中也有类似报道^[12]. 接着, 播种 T3 代的 4 棵植株(No. 49_33_2, 3, 5

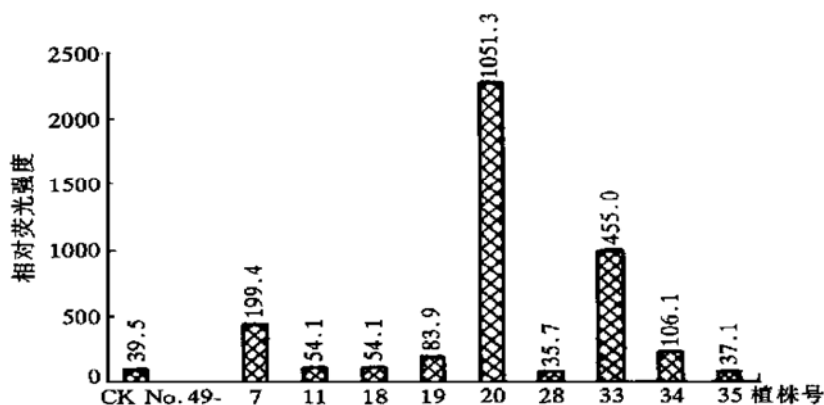


图 2 T2 代植株荧光峰值及相对强度比较

CK 为 3 棵未转化植株的平均峰值(35.4, 24.8, 58.4)

方形柱上方为峰值

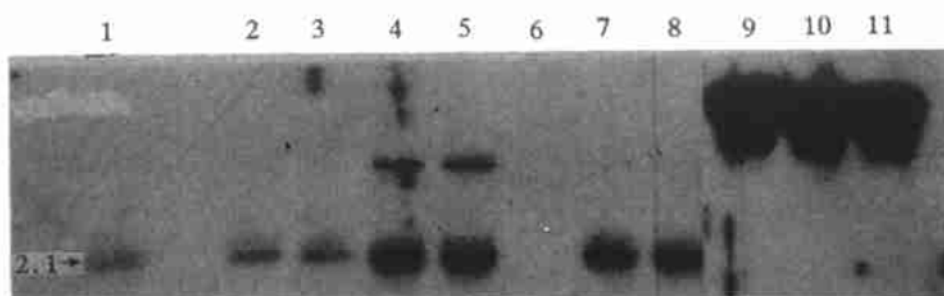


图3 T3代植株 Southern 杂交结果(部分)(图示 No. 49_33(T2)的后代)

1 为 GUS 基因;2~ 5, 7, 8 为后代植株的 DNA, 经 EcoR iv 和 BamH iv 酶切;6 为未转化对照植株;9~ 11 为与 3~ 5 行相同植株的总 DNA

和 6), 它们的荧光强度都分别比对照高 1.8 倍以上(图 4). 用 X_Gluc 组织染色法鉴定这些后代植株, 结果发现每一株系内都有几植株的叶片和根被染成蓝色: 如 No. 49_33_2 株的株系后代共 12 株, 有 2 株被染色 (2/12), 其他 3 个株系分别为 2/23, 4/21 和 4/21.

另外, T2 代植株 No. 49_34 自交结实 26 粒, 播种后形成 26 个株系, 从中共收获 T4 代种子 766 粒. 用卡那霉素筛选这些种

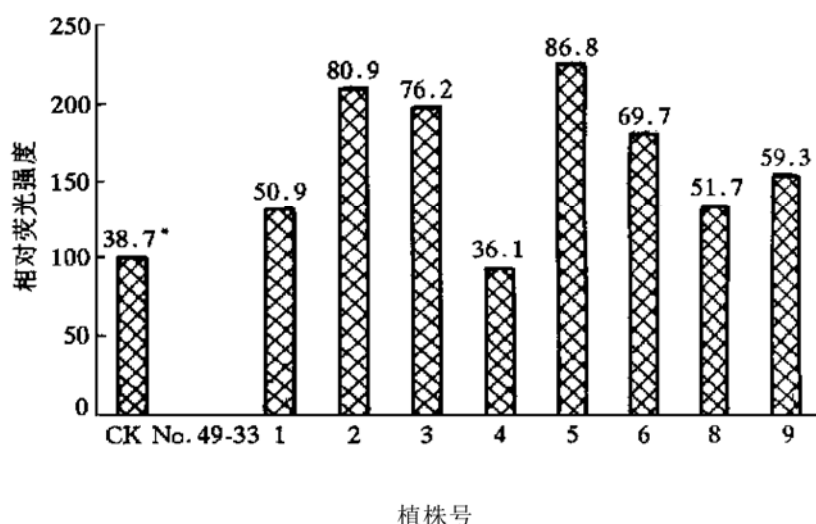


图4 T3代植株荧光峰值及相对强度比较

CK 为 2 株未转化植株的平均峰值, * 为对照组, 方形柱上方为峰值

子幼苗, 结果有 47 棵苗保持绿色, 其余的苗均白化. 这 47 棵绿苗分别属于 14 个株系(No. 49_34_1, 3, 4, 6, 7, 11, 12, 14, 16, 20, 21, 24, 25 和 26), 其分布情况为 No. 49_34_1 株的株系后代共 36 株, 得 1 棵绿苗, 35 棵白苗, 为 1: 35, 其他株系分别为 2: 22, 5: 20, 5: 25, 1: 30, 7: 16, 7: 22, 1: 29, 1: 38, 5: 10, 2: 33, 1: 18, 3: 17, 7: 26. 其他 12 个株系的苗全部白化. 用 X_Gluc 法分别染全部绿苗和部分白苗的叶片或根, 结果发现 47 棵绿苗中有 28 棵被染成蓝色(图 5), 一些白苗的叶片也呈现蓝色(图 5).

对上述 T2 至 T4 代植株中外源基因的整合和表达的观察说明:

(1) 用花粉管通道法转入的外源基因能通过自交连续地传递给下一代. 从基因的表现型看, 被观察的这批材料不遵循孟德尔氏遗传规律.

(2) 存在外源基因不表达的现象. 图 2 中 No. 49_18, 28 和 35 株在 Southern 分析中都显 GUS 基因杂交带, 荧光检测中表达强度很低, 同对照接近. 说明尽管外源基因已传递到下一代, 但是基因沉默不表达. 这种基因沉默现象在转基因植株中经常发生, 并被认为是由于 DNA 碱基的甲基化造成的^[12~14], 当然也可能由于整合位置不合适而受抑制, 导致不表达.

(3) 外源基因拷贝数随世代增高而降低. 例如在进行 Southern 杂交时, T3 代植株必须多

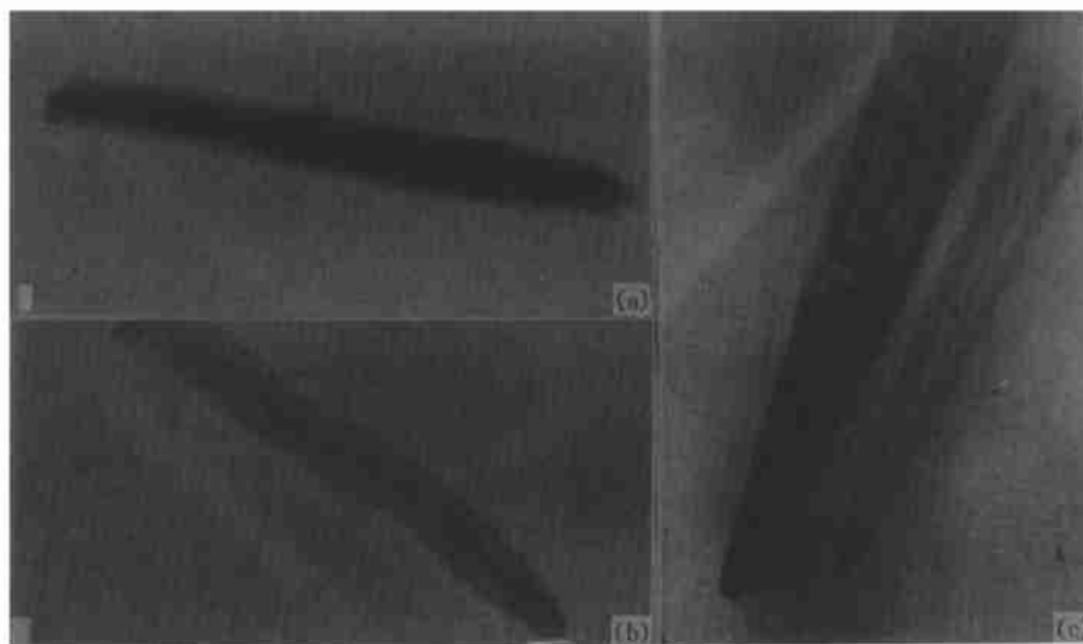


图5 X-Gluc 染色法鉴定 T4 代植株的叶片和根尖

(a) 为卡那霉素筛选后的绿苗根尖, 显蓝色; (b) 为未转化植株的根尖, 不着色; (c) 为不抗卡那霉素的白苗叶片显蓝色(左), 未转化植株的叶片不着色(右)

加入 1.5 倍的 DNA 量, 才能得到与低代(T1, T2) 同样深浅的条带(资料未发表). 说明拷贝数至少减少了一半.

(4) 同一质粒上的两个基因可以不同时表达. T4 代植株的结果表明, NPT^Ⅱ和 GUS 基因可以同时或分开表达, 表现出基因表达的独立性.

(5) 上一代表达量不高的植株, 后代中外源基因仍然有高的表达机率, 如 No. 49₃₄ 株的后代.

3 转化机理的探讨

1990 年 Potrykus 著文将受体组织的细胞分成 8 种状态, 并认为此 8 种状态中同时具备再生感受态和转化感受态的细胞, 才是与转化成功至关重要的^[15]. 关于这类细胞的特征, 有人认为, 要想使细胞恢复全能性, 必须消除细胞以前的分化程序, 使之呈脱分化状态, 那么这种细胞对外源基因的导入是感受的^[16]. 从目前对脱分化细胞的形态描述看, 大多是指细胞核大、原生质浓厚、液胞化程度低的类似分生组织的细胞. 用这种标准分析受精过程发生时的精卵接合和合子形成, 就会发现分化程度很高的卵细胞在同精子接触的一刻开始, 发生急剧的脱分化过程. 受精后形成合子, 彻底消除了以前的分化特征变成核大、质浓和分裂活跃的细胞, 具有上述再生及转化感受态细胞的特点. 花粉管通道法正是利用这一特点, 在此时将外源 DNA 引入运行的花粉管内, 使之有机会参与受精过程, 达到转化的目的. 因此花粉管实际上是起着运载外源 DNA 的作用. 所以这种方法也可以称为花粉管运载法.

总之, 这种不依赖植物组培的转化系统目前称之为原位转化系统^[17]. 另外, 从小麦受精过程的细胞形态学分析, 我们推测, 当花粉管在花柱内向胚囊行进时, 花柱被横向切断, 此时滴加在断口上的外源 DNA 可以被断面上的任何细胞吸收, 其中也有花粉管. 如果含外源 DNA

的花粉管进入胚囊并参加受精, 基因转化就可能发生. 细胞学观察证明, 在小麦、黑麦、大麦、水稻等禾本科及棉花、向日葵、豌豆等农作物中, 受精过程发生时常有多个花粉管进入胚囊的现象^[18~23], 给外源 DNA 进入胚囊提供了机会. 龚蓁蓁等人曾报道, 在棉花的胚囊内可观察到标记有同位素的外源 DNA^[5]. 近年来亚显微结构的观察揭示, 在精子进入时, 卵细胞的细胞壁还未形成, 一些胞壁物质分散地聚集在细胞膜的表面, 似小岛状^[24, 25]. 因此这时的卵细胞类似未完全酶解的原生质体, 为外源基因的进入提供了可能性. 何况在精子进入卵细胞的过程中, 也为其他内含物的进入提供了机会. 因此我们认为这一方法的转化原理同原生质体的转化相似.

4 花粉管通道法转化的优点及应用

用基因枪、电激、微束激光等方法都离不开组织培养诱导再生植株的过程. 但这一步骤受基因型的影响大, 使许多好品种不能用作受体, 因此人们希望能用原位转化系统进行操作. 现在除花粉管通道法外, 还有转基因花粉授粉、子房注射、麦杆注射、便携式基因枪等方法, 都取得了良好的结果^[26~29].

目前从花粉管运载法转化的结果看, 有如下优点:

- (1) 直接得到转化种子, 无需经过组培, 减少了基因型的影响;
- (2) 操作简便经济, 育种家可直接在大田工作;
- (3) 大量快捷. 每年可获大量转化种子, 提供一定数量的群体, 供转基因后代的遗传学研究和育种之用;
- (4) 转化频率高等.

另外, 通过这几年的工作, 在如何应用这一方法上, 我们认为应该考虑如下两点: 即受体作物的花器结构和该作物的受精过程. 如棉花为多胚珠大子房, 可采用注射 DNA 或切断受粉后的花柱滴加 DNA 的方法; 小麦、水稻为单胚珠小子房, 采用授粉后切断花柱滴加 DNA 的方法. 而了解受精过程是为了更好地确定转化时间, 使卵细胞能在最佳感受态的状态下接受外源 DNA 以完成转化. 只要掌握好这些条件, 此法能适用于多种作物, 也可获得高的转化频率.

同其他许多直接转化法的工作一样, 外源基因的整合机理还不清楚, 因此对后代中出现的碱基甲基化, 基因沉默以及拷贝数量对表达水平的影响等问题, 还需做进一步的研究. 我们期望着更多的研究者对原位转化法加以关注, 以便这类技术更好地应用于禾谷类等重要农作物上, 为国民经济作贡献.

致谢 本文实验部分在“七五”和“八五”期间为国家“八六三”高科技资助项目.

参 考 文 献

- 1 张孔恬, 刘根齐, 孔繁瑞, 等. 通过花粉管携带恢复系花粉匀浆探讨育性物质的转移. 中国科学院遗传研究所研究工作报告, 北京: 中国科学院遗传研究所, 1979. 127~129
- 2 周光宇. 从生物化学角度探讨远缘杂交的理论. 中国农业科学, 1978(2): 16~20
- 3 周光宇, 龚蓁蓁, 王自芬. 远缘杂交的分子基础——DNA 片段杂交假设的一个论证, 遗传学报, 1979, 6(4): 405~413
- 4 Zhou G Y, Weng J, Zeng Y, et al. Introduction of exogenous DNA into cotton embryos. Meth Enzymol, 1983, 101: 433~

481

- 5 龚蓁蓁, 沈慰芳, 周光宇, 等. 受粉后外源 DNA 导入植物技术——DNA 通过花粉管通道进入胚囊. 中国科学, B 辑, 1988 (6): 611~ 614
- 6 Luo Zhongxun, Wu Ray. A simple method for the transformation of rice via the pollen_tube pathway. Plant Mol Bio Rep, 1988, 6(3): 165~ 174
- 7 谢道昕, 范云六, 倪万潮, 等. 苏云金杆菌(*Bacillus huringiensis*)杀虫晶体蛋白基因导入棉花获得转基因植株. 中国科学, 1991(4): 367~ 373
- 8 谢道昕, 范云六, 倪丕仲, 等. 苏云金杆菌杀虫基因导入中国水稻栽培品种中花 11 号获得转基因植株. 中国科学, 1991 (8): 830~ 834
- 9 曾君祉, 王东江, 吴有强, 等. 用花粉管途径获得小麦转基因植株, 中国科学, 1993, 23(3): 256~ 262
- 10 Chong K, Tan K H. Function analysis of ver 203 gene through antisense transgenic winter wheat plants. Plant Physiology (Subplamant), 1995, 108(2): 475
- 11 王东江, 吴有强, 曾君祉, 等. 小麦转基因植株的后代鉴定及遗传学分析. 中国农业科学, 1995, 28(2): 90~ 92
- 12 Derolles S C, Gardner R C. Expression and inheritance of Kanamycin resistance in a large number of transgenic petumias generated by Agrobacterium_mediated transformation. Plant Mol Bio, 1988, 11: 334~ 364
- 13 Linn F, Heidmann I, Saedler H, et al. Epigenetic changes in the expression of the maize Al gene in Petunia hybrida: role of numbers of integrated gene copies and state of methylation. Mol Gen Genet, 1990, 222: 329~ 336
- 14 Shaun L, Hobbs A, Kpodar P. The effect of T_DNA copy number, position and methylation on reporter gene expression in tobacco transfarmants. Plant Mol Bio, 1990, 15: 851~ 864
- 15 Potrykus I. Gene transfer to cereals: an assessment. Bio/technologe, 1990(6): 535~ 542
- 16 Ronchi V N, Giorgetti L. The cell's commitment to somatic embryogenesis. Biotechnology in Agriculture and Forestry, 1994, 30: 3~ 18
- 17 陈正华, 张海燕, 王槐. 当代农业工程. 北京: 化工出版社, 1997
- 18 曾君祉, 李璠. 小麦受精过程中花粉管入胚囊的研究. 见: 余传隆主编. 生命科学讲展——理论·技术·应用. 北京: 中国医药科学技术出版社, 1993. 456~ 468
- 19 周 嫦, 杨弘远. 小麦受精过程中若干问题的研究. 遗传学集刊, 1964, 4: 39~ 48
- 20 吴素萱, 蔡起贵. 水稻(*Oryza sativa* L.) 双受精过程的细胞学观察, 植物学报, 1965, 2: 114~ 121
- 21 格鲁申科 N E. 植物多父本受精现象, 苏联农业科学, 1957, 7: 339~ 347
- 22 •аа•ао• •. ••• ки•цв•цк•ав•кб• ш•ъаа ш•щц•щ•ъкГ• Б•щъ ок•а к а•• Бъ щц•а Б щ •ъкГ. •ъд • ки•, 1963, 8B: 129
- 23 Polyakov I M. Pollen Physiology and Fertilization. Amsterden: Morth Hall and Pullishing Company, 1964. 194~ 199
- 24 Zhu T, Mogensen H L, Smith S E. Quantiative, three_dimensional analysis of alfalfa egg cells in two genotypes: implication for biparental plastid inheritance. Planta, 1993, 190: 143~ 150
- 25 Willemse M T M, Van Went J L. Embryology of Angiosperms. Berlin_Heidelberg_New York: Springer_Verlag, 1984. 159~ 197
- 26 de la Pena A, Lorz H, Schell J. Transgenic rye plants obtained by injecting DNA into young floral tillers. Nature, 1987, 325 (15): 274~ 276
- 27 丁星群, 谢友菊, 戴景瑞, 等. 用子房注射法将 BT 毒蛋白基因导入玉米的研究. 中国科学, B 辑, 1993, 23(7): 707~ 713
- 28 Leonne M, Leede P, Bernadette C E, et al. Development of a pollen_mediated transformation method for *Nicotiana gluti-nosa*. Transgenic Resaerch, 1995, 4: 77~ 86
- 29 杜立群, 李银心, 麻 密, 等. 小麦生长点转化初报. 植物学报, 1996, 38(11): 921~ 924

(1997-06-11 收稿, 1997-11-20 收修改稿)