

利用有性途径的植物转化

陈林姣, 李爱贞

(厦门大学生命科学学院, 福建厦门 361005)

摘要: 近年来, 植物基因工程技术取得了重要进展, 在农作物品种改良和育种方面发挥越来越重要的作用。然而, 目前植物遗传转化所采用的受体系统, 大都依赖于细胞组织培养技术才能获得转基因植株。其中, 基因型限制和遗传变异是限制该技术应用和发展的两大障碍。因此, 一些研究者试图避开组织培养和植株再生过程, 利用植物有性生殖途径进行转化, 并取得了一系列成果。这些方法包括以下方面: (1) 利用花粉粒或花粉管作为转化 DNA 的载体; (2) 将外源 DNA 导入子房或胚珠中; (3) 以精、卵细胞、合子作为转化受体。这些方法利用了高等植物的有性生殖机制和胚胎发育过程, 避免了无性繁殖过程中的遗传变异、植株再生困难及转基因植株嵌合等问题。该文归纳综合了该研究领域所取得的成果和最新进展, 并对这些方法进行了评价及其发展趋势进行了分析。

关键词: 植物转化; 有性途径; 遗传变异

中图分类号: Q943 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2004)03-0248-05

Advance in plant transformation of using sexual route

CHEN Lin-jiao, LI Ai-zhen

(College of Life Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: Molecular genetic manipulations and plant biotechnology have become important improvements. Great success has been achieved with transformation of genetically modified crops in recent years. However, routine transformation of any given cultivar in a specie is not yet possible in both monocot and dicot species. Almost all methods of transformation published so far require regeneration of plants from transformed cells or tissues which is generally highly genotype-dependent and prone to somaclonal variation due to longtime culture process *in vitro*. Therefore, many investigators have tried to use sexual pathway for plant transformation. The methods include the following: (1) The use of pollens or pollen tubes as vectors of transforming DNA; (2) The introduction of exogenous DNA into ovules and ovaries; (3) The use of sperms, eggs and zygotes as targets for plant transformation. These approaches developed recently were reviewed in this paper.

Key words: plant transformation; sexual route; genetic variation

自 1983 年首次获得转基因烟草以来, 植物基因工程技术取得了重要进展, 在农作物品种改良方面发挥越来越重要的作用。然而, 迄今为止, 在植物基因工程研究中尚未找到一种高效、普遍适用的转基

因方法。农杆菌介导的转化 (*Agrobacterium*-mediated transformation)、PEG 介导的转移 (PEG-mediated transfer)、电激法 (electroporation)、基因枪法 (microprojectile bombardment) 以及微注射法 (mi-

收稿日期: 2003-07-28 修订日期: 2003-09-24

基金项目: 福建省自然科学基金资助(B0010001)

作者简介: 陈林姣(1970-), 女, 湖南东安县人, 博士生, 研究方向: 植物细胞与分子生物学。Email: linjiaochen@163.com

croinjection)等多种外源基因的转化方法在不同的植物类型和组织中有着不同的适用范围和优缺点(Christou, 1996; Hansen 和 Wright, 1999)。植物转化还存在许多技术问题,如受体系统中普遍存在的转基因沉默、转化频率低、转化植株后代遗传不稳定;而且无论是以原生质体、愈伤组织或幼胚还是细胞悬浮系等作为转化受体系统都依赖于无性的组织培养技术。这样不仅实验周期长,而且在长期的组织培养过程中,容易产生变异和造成不育,影响转化效率。因此,一些研究者试图避开无性的组织培养和植株再生过程,在利用植物有性生殖途径的转化方面进行了不懈的探索。这些方法包括以下方面:(1)利用花粉粒或花粉管作为转化 DNA 的载体。(2)将外源 DNA 导入子房或胚珠。(3)以精、卵细胞、合子作为转化受体。以上方法利用了高等植物的有性生殖机制和胚胎发育过程,避免了长期组织培养过程中的遗传变异、植株再生困难和不育等问题。近年来,利用有性途径的植物转化取得了一系列重要进展,本文归纳综合了该研究领域所取得的成果和最新进展,并对这些方法进行了评价,对其发展趋势进行了分析。

1 以花粉为载体的遗传转化

早在 70 年代就提出了利用花粉作为受体对 DNA 进行转化(Hess, 1978)。最早是将萌发的花粉同外源 DNA 一起孵育,然后对收集这些花粉的物种进行授粉。该转化方法基于外源 DNA 自动进入花粉中,经授粉和受精过程传给子代的设想,无需体外的组织培养和再生步骤。80 年代,许多研究者进行了这方面的尝试,获得一些具有表现型证据支持的转化植物,但缺乏分子证据(Dewet 等, 1985; Ohta, 1986)。由于花粉粒具有坚硬的外壁,用外源 DNA 直接和花粉粒混合培养,外源 DNA 进入花粉比较困难。随后研究者以花粉作为靶目标尝试了花粉管通道法、电激法、农杆菌共培养、基因枪及微注射等多种转化方法(Alwen 等, 1990; Van 等, 1995)。Luo 等(1989)首次提出通过花粉管途径对水稻(*Oryza sativa*)进行转化的方法。他们在子房上方切除传粉 2 h 的花柱,在切口上滴上一滴包含一个有 CaMV 35S 启动子控制的编码 NPT 基因的 p35S NPT 质粒溶液,推测外源 DNA 将通过花粉管到达胚珠,并用 Southern 印迹分析和酶学检验两个

方法对转化体进行了检测。Mattews 等(1990)首次以萌发花粉为材料用电激法将外源 DNA 转入烟草,并取得了分子杂交的证据。Twell 等(1989)和 Hess 等(1989)分别采用基因枪法和农杆菌共培养转化法将外源 DNA 导入番茄(*Esulentum tomato*)和矮牵牛(*Petunia*)的花粉粒,较好克服了外源 DNA 被花粉中核酸酶(nuclease)降解的问题,并获得了外源 DNA 瞬间表达的证据。Kranz 和 Lorz(1993)首次尝试了通过玉米(*Zea mays* L.)花粉萌发孔进行 DNA 微注射的实验,并用注射了外源 DNA 的单个花粉进行授粉,其中有 26% 的转化花粉授粉成功。此后,以花粉作为靶目标的转化相继在烟草(*Nicotiana rustica*)、百合(*Lilium longiflorum*)、牡丹(*Paeonia lactiflora*)、紫露草(*Tradescantia albi flora*)、针叶植物(confine)等许多植物上取得成功(Deng 等, 1997; 吴茂森等, 2000; 王景雪等, 2001; 杨示英等, 2003)。花粉介导的转化,其成功与花粉所处的发育阶段有关。Touraev 等(1997)用基因枪轰击烟草单胞时期(unicellular)的花粉,转化花粉经短暂的离体培养成熟,用成熟花粉进行授粉,获得了转基因烟草植株,并取得了分子和遗传上的验证,而用 2-胞时期(bicellular)的花粉为材料,却未能成功。

花粉介导的转化利用了植物正常的受精过程,不需体外的组织培养和植株再生步骤,实验周期短,避免了组织培养过程中的遗传变异。向萌发或未萌发的成熟花粉中导入外源基因,已有许多转化方法被证明是有效的,但普遍转化率较低。花粉萌发过程中,花粉和柱头释放的核酸酶均降解外源 DNA,可能是导致转化失败的一个重要原因(Roeckel 等, 1992)。温度、pH 值和一些化学试剂能影响花粉中核酸酶活性(Brogli 等, 1995),但至今还没有文献报道怎样抑制转化花粉授粉过程中核酸酶的活性。此外,还存在许多其它问题需要进行更深入的研究,如花粉粒本身的质量和转化的最佳发育时期、花粉粒对外源 DNA 的吸收性,微量活体授粉技术等(Deng, 1997)。最近,针对花粉粒对外源 DNA 的吸收性问题,王劲等(1997)在烟草和芸苔属(*Brassica*)两种植物中建立了脱外壁花粉人工萌发实验系统,并取得了烟草脱外壁花粉离体授粉受精成功,所结种子可以出苗。脱外壁花粉由于排除了外壁对生物大分子的屏障作用,有利于外源基因的导入。进一步的电击转化实验和基因枪转化研究结果显示烟

草脱外壁花粉瞬间表达 *GUS* 外源基因的频率较高(施中华等, 1996; Wang 等, 1998)。这表明通过脱外壁花粉离体授粉系统的转化可望成为一种良好的植物有性途径转化方法。

2 子房注射法

子房注射法是用微玻针把外源 DNA 注射到子房或胚珠中, 使其在受精前后或合子胚的旺盛分裂期进入细胞, 进而整合到基因组中。Zhou 等(1985)首次在棉花自花受精后, 将野生型棉花 DNA 注射到枯萎敏感系子房的胎座上, 获得了转化体表型, 转化的个体即使在几代之后仍然具有高频率的个体抗性, 遗憾的是枯萎抗性的恢复没有给出任何基因转移的分子证据。丁群星等(1993)以子房为受体, 用子房注射方法将 *Bt* 基因转入到玉米中, 获得了转基因植株。林良斌等(2000)运用子房注射法成功地将 *Bt* 基因导入油菜 (*Brassica napus*), 转化频率为 2.66%。王景雪等(2001)用子房注射方法也成功地将几丁质酶基因导入到玉米自交系中。目前, 利用子房注射法进行植物遗传转化的机理尚不清楚, 一些遗传操作具有盲目性, 经验性很强。转化质粒的构建、授粉与注射间隔的时间、注射量、外源 DNA 浓度等各种转化参数均影响转化效率, 因而转化频率低, 重复性差(牟红梅等, 1999)。但子房转化法能避开组织培养步骤, 简化了基因转化过程, 并由此避免了由长期组织培养带来的弊端。

3 以合子为受体的转化

高等植物的合子是体内个体发育的第一个细胞, 具有易分裂和形成胚的特征。90 年代以来, 植物精、卵细胞分离技术日趋成熟和完善, 离体受精及人工合子、自然合子的离体培养与植株再生技术取得了重要进展和突破(孙蒙祥等, 2002; 田惠桥, 2003), 为研究植物转基因开辟了新的途径。Kranz 等(1993)率先应用离体受精技术获得玉米人工合子, 并将人工合子离体培养获得可育植株。接着, 大麦、小麦和玉米体内合子的分离也获得成功, 为合子作为转基因受体细胞打下了基础。Holm 等(1994)用具胚胎发生能力的大麦小孢子培养物与合子共培养 3~4 d, 合子形成了球状多细胞团。培养 2~3 周时, 75% 的多细胞团发育成胚状体, 其中一半最终形

成了可育植株。在 55 个再生植株中, 35% 的植株完全可育, 41% 的植株具 75% 以上的可育性。Kumlehn 等(1997)对小麦合子培养做了一系列研究, 他们将 186 个合子转移到预先用 2,4-D 处理过的小麦子房的胚珠中, 有 17.2% 的合子直接形成了胚并再生出可育植株。接着他们又将小麦合子与具胚胎发生能力的大麦小孢子培养物共培养, 合子以类似体内发育的方式先形成长形原胚, 再分化成胚, 最终有 80%~90% 的胚形成可育植株(Kumlehn 等, 1998)。Zhang 等(1999)用水稻悬浮细胞做饲养物, 在籼稻和粳稻的两个品种中, 各有 40% 左右的合子形成了多苗结构, 再经诱导生根, 各再生出约 80 株可育植株。人工合子和体内合子的培养显示合子具有旺盛的生命力, 并基本遵循胚胎发育途径再生植株, 这些特性使得它们可成为良好的转基因受体。

由于分离的性细胞及合子的数量有限, 显微注射法是向性细胞和合子中导入外源基因的一种首选方法。Leduc 等(1996)在玉米合子分离、培养成功的基础上首次采用显微注射法向授粉 24 h 后分离出来的玉米合子注射两种报告基因, 约 3.5% 的合子在培养 4 d 后显示出报告基因的瞬时表达。Pónya 等(1999)分别向小麦的卵细胞注射了带有泛素启动子 (ubiquitin promoter) 的绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 基因, 向合子注射具 35S 启动子的 *GUS* 基因, 两者平均的瞬时表达率分别为 46% 和 52%, 远远高于以它的体细胞为受体的转化率。其中卵细胞的转化率高低与卵细胞分离的时间有关, 开花前一天的卵细胞表达率可达 73.91%, 而不同时期的合子的外源基因的表达率没有明显差异。Home 等(2000)向分离的大麦 (*Hordeum vulgare* L.) 合子注射了一种具水稻肌球蛋白启动子 (rice actin promoter) 的 *GUS* 基因, 被注射的合子有 75% 发育为胚状体结构, PCR 检测显示 21% 的胚状体有转入的外源 DNA。Scholten 和 Kranz(2001)向玉米的卵细胞、精细胞、助细胞、中央细胞中注射了具有 35S 启动子的 *GFP* 基因, 其中卵细胞、助细胞和中央细胞呈现 GFP 荧光, 而转基因精细胞中没有检测到 GFP 荧光, 但转基因精细胞与没有转基因的卵细胞融合, 在受精不久后就可诱导外源基因的转录, 合子中可检测到 GFP 荧光。这些研究结果显示, 以合子作为转化受体, 虽然数量有限, 但在转化率和外源基因在转化后代中的遗传表达及稳定性方面, 具有一般体细胞所不可比拟的

明显优势,可以大大简化转基因研究后期的筛选工作。此外,由于是对单个细胞进行遗传操作,并且有较高的转化效率,因而可以不需抗毒素基因、抗除草剂基因等作为筛选的标记基因。目前在田间试验和被批准商业化应用的转基因植物中都含有标记基因,有关标记基因的安全性常常是科学家和社会广泛关注的问题。因此,上述无需标记基因的转基因体系在今后的转基因农作物商业化生产中将会有巨大的应用前景。

4 问题与展望

综上所述,采用花粉、子房、精、卵细胞、合子等作为受体系统的植物转化法都是利用植物有性生殖机制和胚胎发育途径获得转化体,避开了长期无性的组织培养中转化体早期夭亡、不分化、不孕、不育等弊端,产生嵌合体的可能性小或无,较易得到转化种子,这些都是其它转化方法无法替代的。目前,花粉介导法和子房注射法都是基于外源 DNA 自动地进入雌、雄生殖细胞,并整合到核基因组的假设。该方法虽然花费少,操作简单,但由于对转化的机制缺乏系统研究,某些操作过程带有一定的盲目性,外源 DNA 进入有性途径很不稳定和不可预测,转化率低,存在许多问题尚待进一步深入研究。因而,其应用受到了一定的限制。目前,以性细胞、合子为受体的遗传转化研究正方兴未艾。虽然进行这方面的转化需要有非常高的操作技术,但具有高的转化率,能遵循胚胎发育方式再生可育植株,不需要筛选的标记基因。此外,以精、卵细胞和合子为转化受体的转基因体系,可用来研究特定基因在受精过程、合子激活及早期胚胎发育过程中的表达及功能,将有助于从细胞和分子水平揭示受精过程及早期胚胎发育机制。目前,利用该途径进行转基因研究已引起人们的极大兴趣,相信随着离体受精与合子培养技术的进一步发展和完善,以性细胞、合子为受体的转基因途径将在农作物改良及基因功能研究方面得到广泛的应用。

参考文献:

- Alwen A, Eller N, Kastler M, *et al.* 1990. Potential of in vitro pollen maturation for gene transfer [J]. *Physiol Plant*, **79**: 194—196.
- Brogia M, *et al.* 1995. Treatment of maize pollen to reduce nuclease activity[J]. *Sex Plant Reprod*, **8**: 187—188.
- Christou, P. 1996. Transformation technology[J]. *Trends in plant science*, **1**(12): 423—431.
- Deng DW, Wang GY, Shi S, *et al.* 1997. Advances in pollen mediated genetic transformation[J]. *Development & Reproductive Biology*, **6**(1): 69—80.
- Dewet JM, Bergquist, RR, Haplan, JR, *et al.* 1985. Exogenous gene transfer in maize using DNA-treated pollen [A]. In: chapman GP, Mantell SH, Daniel RW (eds). *Experimental manipulation of ovule tissues* [C]. New York: Plenum Press, 197—209.
- Ding QX(丁群星), Xie YJ(谢友菊), Dai JR(戴景瑞), *et al.* 1993. Studies on introducing *Bt* toxic protein gene into maize by ovary-injection(用子房注射法将 *Bt* 毒蛋白基因导入玉米的研究)[J]. *Science in China (Series B)*(中国科学), **23**(7): 707—713.
- Hansen G, Wright MS. 1999. Recent advances in the transformation of plants[J]. *Trends in Plant Science*, **4**: 226—231.
- Hess D, Dressler K. 1989. Tumor transformation of *Petunia hybrida* via pollen cultured with *Agrobacterium tumefaciens*[J]. *Bot Acta*, **102**: 202—207.
- Hess D. 1978. Genetic effects in *petunia hybrida* induced by pollination with pollen treated with Lac transducing phages [J]. *Z P flanzphysiol (from CAB)*, **90**: 119—132.
- Holm PB, Olsen O, Schnorf M, *et al.* 2000. Transformation of barley by microinjection into isolated zygote protoplasts [J]. *Transgenic Res*, **9**: 21—32.
- Holm PB, Knudsen S, Mouritzen P, *et al.* 1994. Regeneration of fertile barley plants from mechanically isolated protoplasts of the fertilized egg cell[J]. *Plant Cell*, **6**: 531—543.
- Kranz E, Lorz H. 1993. *In vitro* fertilization with isolated, single gametes results in zygotic embryogenesis and fertile maize plant[J]. *Plant Cell*, **5**: 739—746.
- Kumlehn J, Brettschneider R, Lorz H, *et al.* 1997. Zygote implantation to cultured ovules leads to direct embryogenesis and plant regeneration of wheat[J]. *Plant J*, **12**: 1473—1479.
- Kumlehn J, Lorz H, Kranz E. 1998. Differentiation of isolated wheat zygotes into embryos and normal plants [J]. *Planta*, **205**: 327—333.
- Leduc N, Matthys-Rochon E, Rougier M, *et al.* 1996. Isolated maize zygotes mimic in vivo embryonic development and express microinjected genes when cultured in vitro[J]. *Dev Biol*, **177**: 190—203.
- Lin LB(林良斌), Guan CY(官春云), Li X(李 恂), *et al.* 2000. Comparative studies on the genetic transformation of

- Brassica napus* by using Agrobacterium-mediated and ova-ry-injection techniques(子房注射法与农杆菌介导法转化甘蓝型油菜的比较研究)[J]. *Life Science Rresearch* (生命科学研究), 4(3): 231-236.
- Luo ZX, Wu R. 1989. A simple method for the transformation of rice via the pollen-tube pathway[J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 6: 165-174.
- Mattews BF, Abdul-Baki AA, Saunders JA. 1990. Expression of an exogenous gene in electroporated pollen grains of tobacco[J]. *Sex Plant Reprod*, 3: 147-151.
- Mu HM(牟红梅), Liu SJ(刘树俊), Zhou WJ(周文娟), et al. 1999. Transformation of wheat with insecticide gene of arrowhead proteinase inhibitor(葱蒜蛋白酶抑制剂通过花粉管途径经对小麦的导入及转基因植株的分析)[J]. *Acta Genetica Sinica* (遗传学报), 26(6): 634-642.
- Ohta Y. 1986. High efficiency genetic transformation of maize by a mixture of pollen and exogenous DNA[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 83: 715-719.
- Pónya Z, Finy P, Fehér A, et al. 1999. Optimisation of introducing foreign genes into egg cells and zygotes of wheat (*Triticum aestivum* L.) via microinjection[J]. *Protoplasma*, 208: 163-172.
- Roeckel P, Maurice MM, Drevell JL. 1992. Plant transformation using the sexual route[J]. *Int Rev Cytol*, 140: 425-446.
- Scholten S, Kranz, E. 2001. In vitro fertilization and expression of transgenes in gametes and zygotes[J]. *Sex plant reprod*, 14: 35-40.
- Shi ZH(施华中), Wang J(王 劲), Yang HY(杨弘远), et al. 1996. Exined-detached pollen of *Nicotiana tabacum* as an electropration target for gene transfer(烟草脱外壁花粉的电激基因转移)[J]. *Acta Botanica Sinica* (植物学报), 38(8): 625-630.
- Sun MX, Yang HY. 2002. In vitro fertilization of angiosperms-10-year effort in China[J]. *Acta Bot Sin*, 44: 1 011-1 021.
- Tian HQ(田惠桥). 2003. Advances in *in vitro* fertilization study of higher plants(高等植物离体受精研究进展)[J]. *Acta of Plant Physiol and Mol Sin* (植物生理与分子生物学学报), 2003, 29: 3-10.
- Touraev A, et al. 1997. Plant male germ line transformation [J]. *Plant J*, 12: 949-956.
- Twell D, Klein TM, Fromm ME, et al. 1989. Transient expression of chimeric genes delivered into pollen by microprojectile bombardment[J]. *Plant Physiol*, 91: 1 270-1 274.
- Van der Leede-Plegt LM, van de Ven BC, Schilder M, et al. 1995. Development of a pollen-mediated transformation method for *Nicotiana glutinosa*[J]. *Transgenic Res*, 4: 77-86.
- Wang J(王 劲), Xia HJ(夏惠君), Zhou C(周 嫦), et al. 1997. Establishment of an experimental system for artificial germination and *in vitro* pollination with de-exined pollen in *Nicotiana tabacum* (烟草脱外壁花粉人工萌发与离体受粉实验系统的建立)[J]. *Acta Botanica Sinica* (植物学报), 39(5): 405-410.
- Wang J, Shi HZ, Zhou C, et al. 1998. β -glucuronidase gene and green fluorescent protein gene expression in de-exined pollen of *Nicotiana tabacum* by microprojectite bombardment[J]. *Sex Plant Reprod*, 11: 159-162.
- Wang JX(王景雪), Sun Y(孙 毅), Cui GM(崔贵梅), et al. 2001. Transgenic maize plants obtained by pollen-mediated transformation(花粉介导法获得玉米转基因植株)[J]. *Acta Botanica sinica* (植物学报), 43(3): 275-279.
- Wang JX(王景雪), Sun Y(孙毅), Du JZ(杜建中). 2001. The progress on maize transformation research(玉米转基因研究进展)[J]. *Biotechnology Information* (生物技术通报), 2: 12-16.
- Wu MS(吴茂森), Tian MY(田苗英), Chen CC(陈采层), et al. 2000. Transformation of wheat with defective replicase gene of BYDV-GPV via pollen tube pathway(通过花粉管途径将 BYDV-GPV 株系缺失复制酶基因导入小麦)[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology* (农业生物技术学报), 8(2): 125-127.
- Yang SY(杨示英), Pang W(庞 雯), Li RB(李容柏), et al. 2003. Study on transfer of total soybean DNA into pigeonpea varieties(外源大豆总 DNA 导入木豆品种的研究)[J]. *Guangxi Agricultural Science* (广西农业科学), 1: 9-12.
- Zhang J, Dong WH, Galli A, et al. 1999. Regeneration of fertile plants from isolated zygotes of rice (*Oryza sativa*) [J]. *Plant Cell Reports*, 19: 128-132.