

# 花粉管通道导入外源 DNA 方法的研究

陈 彦

(聊城大学 生命科学学院, 山东 聊城 252059)

**摘 要:** 在总结前人研究的基础上, 认为花粉管通道法导入外源 DNA 的方法可分为花粉粒携带法、子房注射法和柱头切除法。3 种导入外源基因的方法已在植物转基因育种研究中被广泛运用。在实际运用中应针对某一特定的受体植物, 根据受体植物的雌蕊结构特点选择合适的导入外源基因的方法, 可提高花粉管通道法的转化效果和转化率。

**关键词:** 花粉管通道法; 外源 DNA; 花粉粒携带法; 柱头切除法; 子房注射法

**中图分类号:** Q 943.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)13-0226-03

外源基因通过植物开花受精过程中形成的花粉管外通道导入胚珠转化受精的卵细胞, 进而与受体细胞的基因组整合, 随着受精卵的发育可以成为转基因新个体, 这一技术称为花粉管通道法<sup>[1]</sup>。该技术由我国生物化学家周光宇<sup>[2]</sup>创立, 并经过许多研究者的共同努力发展起来的一种不依赖于组织培养的转基因技术, 给那些植株再生有难度或组织培养体系还未建立的植物转基因育种带来了希望, 即使对那些具有完善组织培养体系的物种, 花粉管通道法也会大大降低其转基因育种的成本和操作难度, 使植物的转基因育种更接近于生产化。1981 年首次利用该法成功培育出抗枯萎病棉花新品种<sup>[3]</sup>后, 迅速在小麦、水稻、大豆、玉米、烟草等重要农作物育种方面展开了广泛研究, 转化率也由原来的  $10^{-2} \sim 10^{-11}$ <sup>[4]</sup> 提高到现在  $1\% \sim 16\%$ <sup>[5]</sup>。

有关花粉管通道法的概念、范畴及归属问题, 在目前的研究报道中不完全一致。王关林和方宏筠<sup>[6]</sup>在《植物基因工程原理与技术》一书中指出, 花粉管通道法、浸泡种胚转化法和子房注射法统称植物种质系统转化, 其中花粉管通道法具体分为柱头涂抹法、柱头切除法、花粉粒携带法。试验证明, 子房注射法导入的外源 DNA 是通过珠心通道进入植物胚囊的<sup>[7]</sup>, 这条通道是花粉管进入胚囊时形成的, 属于花粉管通道。因此常利芳等<sup>[8]</sup>把子房注射法归属于花粉管通道法是合理的, 还把花粉管通道法范围扩大, 认为花粉管通道法就是种质系统转化法, 包括柱头滴加法(包括柱头涂抹法和柱头切除法)、子房注射法、花粉粒携带法、穗茎注射法和种胚浸泡转化法。后来, 放射自显影技术显示穗茎注射法的外源 DNA 是通过维管束的导管进入水稻花器的<sup>[9]</sup>, 电泳

下观察发现种胚浸泡转化法外源 DNA 进入胚囊的途径可能是浸泡后细胞壁上形成各种类型的孔洞、细胞壁变薄形成的胞间通道<sup>[10]</sup>, 因此, 穗茎注射法和种胚浸泡转化法应与花粉管通道法并列, 属于种质系统转化。

目前文献报道对花粉粒携带法、柱头涂抹法、柱头切除法、柱头滴加法、子房注射法的提法并不一致, 例如不同的文献报道将切除柱头后滴加 DNA 溶液描述为柱头涂抹法、柱头切除法和柱头滴加法。严格讲, 柱头涂抹法是在授粉前用外源 DNA 溶液涂抹柱头, 应属于花粉粒携带法的范畴; 而柱头切除法和柱头滴加法实际是对同一种操作的不同描述。因此, 认为将花粉管通道法导入外源 DNA 的方法分为花粉粒携带法、子房注射法和柱头切除法比较妥当。

## 1 花粉粒携带法

花粉粒携带法是直接用供体 DNA 溶液或花粉匀浆处理受体的花粉或柱头的转化方法。在花粉管通道法创立之前, 一些国外学者就已经展开了此方面研究。1975 年, Pandey<sup>[11]</sup>将烟草供体品种的花粉用射线杀死后与受体品种新鲜花粉混合后授粉, 得到了具有供体花色性状的后代, 指出经照射杀死的花粉其遗传物质可不经配子融合而转化受体基因组。这是花粉管通道法最初的萌芽。1980 年, Hess<sup>[12]</sup>用在外源 DNA 溶液中浸泡过的矮牵牛花粉进行授粉, 结果得到了花色变异的矮牵牛。De Wet<sup>[13]</sup>采用此技术使玉米叶斑病抗性基因的转移获得成功。1986 年, Ohta<sup>[14]</sup>在美国科学院报上报道应用外源 DNA 与玉米花粉混合授粉, 得到较高转化率的转基因后代。我国科学家也利用该法获得了转基因高蛋白水稻<sup>[15]</sup>、小麦改良新品系<sup>[16]</sup>和花色变异的仙客来<sup>[17]</sup>。

在利用花粉粒携带法成功获得具有供体性状后代的同时, 人们就开始思考其转化机理。最早的推断是外源遗传物质可能被萌发的花粉或花粉管吸收, 借助花粉管内通道进入子房参与受精。然而, 花粉粒和花粉管都

**作者简介:** 陈彦(1966), 女, 博士, 副教授, 现从事花卉的花粉管通道法育种研究工作。E-mail: chenyan1@lcu.edu.cn.

**基金项目:** 山东省自然科学基金资助项目(Y2008D41)。

**收稿日期:** 2010-04-06

具有完整的细胞质膜结构,供体 DNA 片段要想进入花粉管内,要么以自由扩散的方式透过细胞质膜,要么以主动吸收的方式进行跨膜运输。DNA 片段是极性大分子,不可能以自由扩散的方式透过细胞质膜,目前也没有发现花粉管细胞质膜上转运 DNA 的载体蛋白或通道蛋白的存在。供体 DNA 片段是否会通过细胞内吞作用被吸收入花粉管,理论上讲,花粉是植物的生殖单位,如果在萌发过程中随意地通过内吞作用吸收其它物质,也就失去了遗传的真正意义。目前也没有关于花粉粒或花粉管通过内吞作用吸收外界物质的报道。

## 2 柱头切除法

柱头切除法是在受体授粉后的一定时间切除柱头,将供体 DNA 溶液滴加在花柱切面上导入外源 DNA 的方法。对于花柱较长的植物,切除花柱会缩短外源 DNA 进入子房的距离,提高转化率。因为在花粉管生长过程中,花粉管和花柱不断向外分泌核酸酶<sup>[18]</sup>,外源 DNA 经过花柱的长度越长,被分解的数量越多,进入胚囊机会就减少。因此柱头切除法适用于花柱较长、花朵较大的植物。聊城大学生命科学学院实验室用柱头切除法转化紫薇,当花粉管到达子房后,在离子房大约 2 ~ 3 mm 处切除花柱,不但不影响紫薇的结实率,而且处理后得到的果实比对照的还要大<sup>[19]</sup>。这对植物转基因育种非常重要,因为只有在保证结实率的基础上关注转化率才会更有意义。为了提高转化率,李玲玲等<sup>[21]</sup>在切除柱头时使刀片与花柱的夹角保持大约为 45°角以增加 DNA 溶液与花柱切面的接触面积;还有的在花柱切除后重复滴加外源 DNA 溶液<sup>[21-22]</sup>增加外源 DNA 的总量。冀俊丽等<sup>[23]</sup>作了更新颖的创新,用常规方法切除小麦柱头后,又经过 5 min 的负压处理,使小麦的花粉管通道法转化率由原来的 3% ~ 6% 提高到 14.1%。但是奚亚军等人<sup>[24]</sup>用不同浓度外源 DNA 滴加到小麦花柱切面,结果显示外源 DNA 浓度越高则结实率越低。说明靠增加外源 DNA 浓度来提高花柱切面 DNA 的施加量以提高转化率要慎重考虑。

柱头切除法主要解决了花柱较长受体在柱头滴加 DNA 溶液后到达胚囊几率小的缺陷,进而大大提高了花粉管通道法的转化率。然而,邱宏等<sup>[25]</sup>将长达十几厘米的玉米花丝从末端剪去 2 ~ 3 cm,然后将花丝切面完全浸入薄膜袋中的 DNA 溶液,成功获得了转化株。这个试验说明缩短外源 DNA 进入胚囊的距离并不是提高柱头切除法转化率的唯一方法,增加接触时间使更多的 DNA 也能达到满意效果。

理论上讲,柱头切除法对于花柱较长、花朵较大的植物操作比较容易,而对于花朵小、花柱又短的植物操作起来往往有些困难。虽然目前也有小麦<sup>[22-23]</sup>、水稻<sup>[26-27]</sup>柱头切除法转基因的成功报道,但是在研究过程中出现一些问题,例如胡文明等<sup>[21]</sup>发现在后代变异小麦中, D<sub>0</sub> 代种子发芽率低,平均株高也低于对照。原因可

能是由于小麦花朵小,柱头切除时可能对花器官造成伤害大所致。因此在对小麦这类小花朵植物进行操作时,应尽量避免损伤花器官。

## 3 子房注射法

子房注射法是用微注射器将少量(根据子房的大小而定)外源 DNA 溶液直接注射到子房,又叫子房微注射法。这种方法具有外源 DNA 进入胚囊的距离短、受体子房内具有更高浓度的外源 DNA、对注射时间要求比较宽泛、对子房较大花朵操作比较容易等优点。许多试验证实,子房注射法优于柱头切除法。曹德菊等<sup>[28]</sup>将除草剂基因导入红麻的试验证明,子房注射法的结实率高于柱头切除法;梁明山等<sup>[29]</sup>分别用花粉粒携带法、柱头切除法和子房注射法转化油菜,结果只有子房注射法得到了具有供体性状并优于受体的转化株;侯丽霞等<sup>[30]</sup>用微量注射法和柱头切除法转化甜瓜均得到转化株,但子房注射的转化率高。李远新等<sup>[31]</sup>在转化黄瓜时发现,虽然花粉粒携带法和柱头切除法有较高的坐果率,但子房注射法的转化率最高;吴中心等<sup>[32]</sup>研究发现子房注射法转化烟草获得的转化后代抗赤星病能力远远超过柱头切除法。

子房注射法之所以比其它 2 种方法具有更高的转化率,因为该方法导入外源基因的数量多于其它花粉管通道法,这一点被杨书华等<sup>[33]</sup>的试验所证实。它们用放射自显影技术研究花粉管通道法导入标记 DNA 在棉花胚珠内的分布,结果显示,子房注射法 DNA 在胚珠内的放射性活度高于柱头切除法,说明子房注射法外源 DNA 进入胚珠的数量多,不仅为花粉管通道法转化棉花选择外源 DNA 导入方法提供试验依据,也为其它植物转化提供有价值的参考。

子房是植物的受精场所,当花粉管到达子房后,助细胞的信号作用诱导花粉管向着胚囊方向生长;进入胚囊后,花粉管首先在退化的助细胞中释放 2 个联结的姊妹精细胞,之后便分离<sup>[34]</sup>;分离的 2 个精细胞分别与中央细胞和卵细胞进行倾向受精<sup>[35]</sup>。这些精准事件的发生要求子房内必须有一个非常稳定的内环境,任何外界物质的介入或对子房的损伤都会直接或间接影响受精作用,最终影响结实率或导致畸形果实增加。在受精前后向子房注射外源 DNA 溶液,或多或少地会影响受精和坐果率<sup>[36-37]</sup>。因为子房注射法首先会损伤子房壁,如果针头进入过深,还会伤及子房内部的胎座、胚珠甚至胚囊等结构,这些机械损伤会直接影响受精作用;其次,注入 DNA 溶液的浓度和纯度可能会改变受体植物子房内固有的受精环境,这还需要进一步研究。

花粉管通道技术适用于任何开花植物。如何选择合适的导入外源基因的方法是花粉管通道法转化的关键。不同的开花植物,其花器的结构特点各异。进行花粉管通道法转化时尤其要考虑花柱长度和子房大小。一般来说,子房较大的植物首先要考虑子房注射法,花

柱较长的植物首先要考虑柱头切除法,那么对于花柱较短、子房又小的植物,花粉粒携带法应该会比较合理的选择。当然,选择理想的导入外源 DNA 方法还要从时间出发,放射自显影技术能够快速、准确地检测不同导入方法到达胚囊的 DNA 数量,统计不同方法的坐果率和转化率会如实地反映出 3 种方法的转化效果。

### 参考文献

- [1] 林栖凤.耐盐植物研究[M].北京:科学出版社,2004:188.
- [2] Zhou G Y, Weng J, Zeng Y, et al. Introduction of exogenous DNA into cotton embryos[J]. Methods in Enzymology, 1983, 101:433-438.
- [3] 黄俊麒,钱思颖,刘桂玲,等.外源海岛棉 DNA 导致陆地棉性状的变异[J].遗传学报,1981,8(1):56-62.
- [4] 王关林,方宏筠.植物基因工程[M].北京:科学出版社,2002:481-496.
- [5] 马盾,周小云,黄乐平.花粉管通道法转基因棉花后代的遗传特性[J].新疆农业科学,2008,17(3):147-149.
- [6] 王关林,方宏筠.植物基因工程原理与技术[M].北京:科学出版社,1998:304-317.
- [7] 龚葵素,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[J].中国科学(B 辑),1998(6):611-614.
- [8] 常利芳,王立新,王省芬,等.花粉管通道转基因技术研究进展[J].河北农业科学,2003,7(1):45-50.
- [9] 赵炳然,黄见良,刘春林,等.茎注射外源 DNA 体内运输及雌不育变异株的研究[J].湖南农业大学学报,1998,24(6):436-441.
- [10] 阮颖,刘春林,董延瑜.外源 DNA 浸泡水稻种子的电镜观察[J].湖南农业大学学报,1997,23(2):113-116.
- [11] Pandey K K. Sexual transfer of specific genes without gametal fusion[J]. Nature, 1975, 255(256):310-313.
- [12] Hess D. Investigations on intra- and interspecific transfer of anthocyanin genes using pollen as a vector[J]. Z. Pflanzenphysiol Bd 1980, 98:321-327.
- [13] De Wet J M J. The experimental manipulation of ovules tissue[J]. Published by Longman Inc Y. N. P. 1983:197.
- [14] Ohta Y. High efficiency genetic transformation of maize by a mixture of pollen and exogenous DNA[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1986, 83:715-719.
- [15] 刘国华,陈立云,洪亚辉,等.外源 DNA 导入诱导水稻高蛋白质变异的研究[J].湖南农业大学学报(自然科学版),2000,26(6):415-417.
- [16] 刘根齐,张孔溢,林世兰,等.外源 DNA 直接导入小麦及其在育种上的应用[J].遗传学报,1994,21(6):463-467.
- [17] 赵万苓,姜世平,付新生,等.利用花粉管通道法将查尔酮合酶基因

导入仙客来[J].分子植物育种,2005,4(3):531-536.

- [18] Lush W M, Spurck T, Joosten R. Pollen tube guidance by the pistil of a Solanaceous[J]. plant Annals of Botany, 2000, 85(Supplement 1):39-47.
- [19] 陈彦.小盐芥总 DNA 导入紫薇的研究[D].南京:南京林业大学,2007.
- [20] 李玲玲,江昌俊,房婉萍,等.花粉管通道法对茶树进行 dsTCS 基因转化的初步研究[J].安徽农业大学学报,2007,34(1):20-22.
- [21] 万春雁,韩明玉,赵彩平,等.桃花花粉管通道法转基因技术的初步研究[J].中国农学通报,2009,25(5):38-42.
- [22] 胡文明,徐翠莲,王岳光.花粉管通道介导螺旋藻总 DNA 导入小麦[J].山东农业科学,2008(1):18-21.
- [23] 冀俊丽,盛长忠,石明,等.通过负压花粉管法将耐盐基因 HVA 1 转入小麦的研究[J].麦类作物学报,2002,22(2):10-13.
- [24] 奚亚军,任鹏,刘曙东,等.花粉管通道法转化小麦影响因素的研究[J].中国农学通报,2004,20(6):23-25,80.
- [25] 邱宏,卢翠华,王振华,等.Bar 基因的玉米花粉管通道法转化[J].中国农学通报,2008,24(2):89-92.
- [26] 刘化龙,刘双奇,王敬国,等.花粉管通道法转 Bar-Bt-1Ab 基因到北方优质粳稻的研究[J].东北农业大学学报,2008,39(7):5-8.
- [27] 赵凌,王才林,张亚东,等.花粉管介导的转抗冻蛋白基因(AFP)水稻[J].江苏农业学报,2006,22(4):315-317.
- [28] 曹德菊,程备久,徐明照,等.花粉管法将外源除草剂基因导入红麻的有效方法及参数研究[J].中国麻作,2000,22(1):1-5,31.
- [29] 梁明山,吴书惠,潘骏玲.外源 DNA 导入油菜的研究[J].西北农业学报,1994,7(4):37-42.
- [30] 侯丽霞,何启伟,卜丽霞,等.花粉管通道法转化甜瓜自交系的技术研究初报[J].山东农业科学,2007(3):8-12.
- [31] 李远新,王关林,葛晓光.黄瓜授粉后外源基因直接导入技术研究[J].华北农学报,2000,15(2):89-94.
- [32] 吴中心,张同庆,王振坤,等.外源 DNA 导入转移烟草抗赤星病性状的研究[J].河南农业大学学报,1995,29(1):71-75.
- [33] 杨书华,倪万潮,葛才林,等.花粉管通道法导入标记 DNA 在棉花胚珠内的分布[J].核农学报,2007,21(1):13-16.
- [34] Higashiyama T, Yabe S, Sasaki N, et al. Pollen tube attraction by the synergid cell[J]. Science, 2001, 293:1389-1544.
- [35] Ye X L, Yeung E G, Zee S Y. Sperm movement during double fertilization of a flowering plant Phaius tankervilleae[J]. Planta, 2002, 215:60-66.
- [36] 尹钧,余桂荣,任江萍,等.小麦花粉管通道及子房注射法转化 Anti-TxS 基因[J].西北植物学报,2004,24(5):776-780.
- [37] 张美善,卢敏,陈展宇,等.利用外源 DNA 导入技术培育向日葵育种新材料[J].吉林农业大学学报,2001,23(1):18-20.

## Study on Techniques of Introduction of Exogenous DNA into Plants via Pollen Tube Pathway

CHEN Yan

(College of Life Sciences, Liaocheng University, Liaocheng, Shandong 252059)

**Abstract:** The pollen-mediated introduction, which introduced exogenous DNA to acceptors by the treatment of the pollen grains or the stigma of acceptor with the donor DNA or the donor pollen grains, was studied earlier. The stigma excision-mediated introduction was a method of addition of exogenous DNA to the excised style of the acceptor plants. The direct injection of exogenous DNA into ovary of acceptor via a microinjector was called ovary injection-mediated introduction, also called ovary microinjection-mediated introduction. All these three method of introduction of exogenous DNA into acceptors have been universal in plant genetic transformation. An optimal method obtained by studying the structure of the pistil of the acceptor could make higher transgenic transformation rate and more efficient transformations.

**Key words:** pollen-tube pathway; exogenous DNA; pollen-mediated introduction; stigma excision-mediated introduction; ovary injection-mediated introduction