

花粉管通道介导外源 DNA 导入技术的研究与应用

胡文明^{1,2}, 徐翠莲, 王岳光^{2*} (1. 塔里木大学植物科技学院, 新疆阿拉尔 843300; 2. 青岛农业大学, 山东青岛 266109)

摘要 探讨了花粉管通道法介导外源 DNA 导入技术的分子机理, 并对其在育种中的应用、转基因后代变异特点及目标性状的鉴定方法进行了综述, 最后对该技术的应用前景进行了展望。

关键词 花粉管通道; 外源 DNA; 遗传转化

中图分类号 Q503 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)36-11773-02

Study and Application of the Exogenous DNA Introduction Technique Mediated by Pollen Tube Pathway

HU Wen-ming et al (Institute of Plant Science and Technology, Tai m University, Alar, Xinjiang 843300)

Abstract The molecular mechanism of exogenous DNA introduction technique mediated by pollen tube pathway were studied and its application in crop breeding, variance characteristics of offsprings and testing method of aim character were summarized. The prospect of this technique was expected in the end.

Key words Pollen tube pathway; Exogenous DNA; Genetic transformation

花粉管通道介导外源 DNA 导入技术首先由我国科学家周光宇^[1]提出并在棉花上应用, 经多年的改进和完善, 目前该技术已日趋成熟, 并在作物育种中发挥着独特的优势, 迄今已在大豆^[2]、玉米^[3]、小麦^[4-5]、棉花^[6]、水稻^[7]、高粱^[8]、烟草^[9]等作物上应用并获得成功。

1 花粉管通道介导外源 DNA 导入技术的分子机理探讨

20 世纪 70 年代, 周光宇等结合我国远缘杂交的成功经验, 提出了 DNA 片段杂交假说^[10-11], 认为当外源 DNA 沿着花粉管进入胚囊以后被分解成片段, 大部分片段会被降解, 侥幸保存下来的 DNA 片段可能以冈崎片段的方式整合到受体的染色体上, 参与受体性状基因表达的调控或数量遗传, 影响多基因表达的体系, 从而在子代中表现出性状的变异。而后周光宇等从分子水平上加以验证, 模拟授粉杂交设计出花粉管通道技术并首先在棉花上应用成功^[12]。万文举等^[13]认为, 外源 DNA 导入具有基因转移和诱变双重作用。郭光荣^[14]认为, 外源 DNA 整合时, 受体染色体 DNA 必须断裂为外源 DNA 片段提供“座位”。赵炳然^[15]认为, 外源 DNA 导入植物后, 在细胞中先与蛋白结合形成“小染色体”, 同源结构“单元”经“拟联会复合体”与受体基因组发生重组, 非同源性外源 DNA 可能以“B 染色体”方式存在。

总之, 目前科学家关于花粉管通道介导外源 DNA 导入受体的整合机理尚未达成共识, 但可以肯定的是外源 DNA 的部分片段一定能够整合到受体基因组中, 并且一般不会影响母本的染色体行为和后代的可育性。

2 花粉管通道介导外源 DNA 导入技术的应用

1988 年 Luo 等^[16]报道用含报告基因的质粒 DNA 导入水稻, 经 Southern 杂交和酶学测定, 外源基因已整合并在转基因植物中得到表达, 从而使花粉管通道法得到分子水平验证。

自此, 外源 DNA 导入技术的研究工作在多种植物中陆续开展起来, 并获得了生产上推广的品种和品系。1991 年谢道昕等^[6]将 BT 杀虫基因导入棉花品种中, 后代经分子杂交证明杀虫基因已经整合进棉花基因组中。1993 年曾君社

等^[17]用花粉管通道法将报告基因和目的基因导入小麦, Southern、Northern 分子杂交及后代连续 4 代的检测证明, 外源基因已导入并可以在受体中稳定遗传。1999 年洪亚辉等^[8]采用花粉管通道法将密穗高粱总 DNA 导入水稻品种, 从 D₁ 代到 D₅ 代变异后代中, 选育出多个具有高光效、高产、优质的新品系。裴新梧等^[18]将高粱总 DNA 通过花粉管通道导入小麦, 发现在后代中产生了广泛变异, 并从中选育出高产、抗逆、耐盐碱的小麦新品种。2000 年王晓娟等^[19]报道, 通过花粉管通道法将高粱的总 DNA 导入春麦 8 号、陇春 13 号和陇春 10 号, 经多代选择, 获得了 5 个稳定的后代。在选择的后代中, 高分子量谷蛋白及其亚基的含量有较大的变化。

3 转基因后代变异特点研究及检测

3.1 转基因后代变异特点研究 外源 DNA 导入受体植株后, 可能出现有性杂交和辐射育种中不可能出现的变异, 为种质资源的创新、优良品种的选育发挥着积极作用^[5,20]。总的说来, 其后代特点如下:

3.1.1 变异随机性。 外源 DNA 在受体细胞内的命运是随机的, 因而后代的变异也具有随机性^[14]。这种随机性使后代性状或表现为供体的性状, 或表现介于二者之间的性状, 或是超亲性状, 或者也会表现出一些供、受体中都没有的性状或后代野生性状等^[21-23]。

3.1.2 变异广泛性。 外源 DNA 导入受体后, 其后代变异所涉及的性状极其广泛, 既有形态特征(包括根、茎、叶、种子、果实等)的变异, 又有生理特性(包括光合能力、抗病性、抗逆性等)和品质特性(如蛋白质组成和含量等)的变异^[3,8-9,24]。黄骏麟等^[25]通过花粉管通道法, 将海岛棉 416 的 DNA 导入到“无棉毒素棉”中, D₂ 代在生育期、株高、木枝数、果枝数、株结铃率和蕾铃脱落率等方面与对照(导入前)相比均发生了显著的变异。雷勃钧等^[2]利用大豆自花授粉后的花粉管通道, 将外源 DNA 导入栽培大豆中, 转化的后代在成熟期、株型、花色、种皮色、百粒重等方面发生了变异。

3.2 转基因目标性状的鉴定

3.2.1 形态标记鉴定和生物测定。 形态标记鉴定是指利用那些能够明确显示遗传多态性的外观性状, 如株高、穗型、粒色、芒毛等相对性状进行鉴定。生物测定即针对转基因应当表达的表现型直接应用生物学的方法进行鉴定, 以明确目的

基金项目 青岛农业大学博士基金项目(9951)。

作者简介 胡文明(1978-), 男, 山东招远人, 硕士, 讲师, 从事作物遗传育种研究。* 通讯作者。

收稿日期 2007-08-07

基因能否在受体植物中表达及表达水平如何,如抗虫性、抗病性等。这两种鉴定方法受自然环境的影响都很大。

3.2.2 细胞学标记和生化标记鉴定。细胞学标记和生化标记鉴定是最常用的鉴定方法。细胞学标记研究后代染色体结构和数量特征等。丁国华等^[26]对导入抗赤星病烤烟 CV87 DNA 的烤烟品种 NC89 的根尖进行了细胞学观察,发现畸变类型有染色体落后、染色体桥、染色体断片及其他畸变类型。利用细胞学标记进行鉴定虽方便,但也存在局限性。

生化标记主要有种子储藏蛋白标记和同功酶标记两种。与形态标记、细胞标记相比,生化标记数量上更丰富,受环境的影响更小,能更好地反映遗传多态性。雷勃钧等^[2]利用此法对大豆 D₂ 代单株或株系的变异进行研究,发现疯狂分离的单株酶带显示不规则性。

3.2.3 分子鉴定。与众多方法相比,分子鉴定的结果更加准确。一般采用 PCR、Southern Bot、ELISA 等方法来进行分析鉴定,以明确目的基因的整合与表达情况,以及表达水平与表现型之间的对应关系等。

4 前景展望

虽然外源 DNA 导入育种已取得了很大成效,但还存在一系列需要解决的技术问题。其一,外源 DNA 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,尚待进一步的研究。期望外源 DNA 导入育种与分子遗传学、分子生物学进一步结合,以便更加深入探讨外源 DNA 导入及整合的确切机制。其二,影响转化效率的因素很多,转基因工作受自然花期和环境条件的影响与限制。希望根据不同作物的遗传特性和育种目标,制定适宜的外源 DNA 导入程序,采取适当的措施,提高转化率,使该项育种途径趋于规范化、常规化。

花粉管通道法作为一种颇具特色的转基因技术,无基因型限制和易于实现大规模基因转化,为创造新种质,拓宽基因库提供了新途径,具有广阔的应用前景。期望有更多的分子生物学方面的研究者对此项技术予以关注,深入探讨其中机理,切实解决目前存在的问题,使该项技术更好地发挥其独特的优势,为农业生产做出重要贡献。

参考文献

- [1] 周光宇. 农业分子育种研究进展 M. 北京: 中国农业科技出版社, 1993: 15- 16.
- [2] 雷勃钧, 尹光初, 卢翠华, 等. 外源 DNA 直接导入大豆的研究 J. 大豆科学, 1991, 10(1): 33- 36.
- [3] 王罡, 杜鹃, 张燕华. 用花粉管通道将 BT 杀虫基因导入玉米自交系的研究 J. 玉米科学, 2002, 10(1): 36- 37.
- [4] 柏锋. 玉米核 DNA 导入小麦获得矮秆优质和早熟两个新品系 J. 作物学报, 1999, 25(2): 260- 265.
- [5] 张茂银, 刘庆昌, 王子霞. 用花粉管通道法将新疆大赖草 DNA 导入普通小麦的研究 J. 农业生物技术学报, 2000, 8(2): 165- 168.
- [6] 谢道昕, 范云六, 倪万潮, 等. 苏云金杆菌杀虫晶体蛋白基因导入棉花获得转基因植株 J. 中国科学, 1991(4): 367- 373.
- [7] 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 J. 中国科学, 1991(8): 830- 834.
- [8] 洪亚辉, 董延瑜, 赵燕, 等. 密穗高粱 DNA 导入高粱的研究 J. 湖南农业大学学报, 1999, 25(2): 87- 91.
- [9] 丁国华, 徐仲, 朱祥春, 等. 花粉管通道导入抗赤霉病烤烟 D₁ 代性状变异的研究 J. 东北农业大学学报, 2000, 31(2): 173- 179.
- [10] 周光宇. 从生物化学的角度探讨远缘杂交的理论 J. 中国农业科学, 1978(2): 16- 18.
- [11] 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 J. 遗传学报, 1979, 6(4): 405- 413.
- [12] GUANG YU ZHOU. Introduction of exogenous DNA into cotton embryos [J]. Methods in Enzymology, 1983, 101: 443- 448.
- [13] 万文举, 邹冬生, 彭克勤. 论生物诱变——外源 DNA 导入的双重作用 [J]. 湖南农学院学报, 1992, 18(4): 886- 891.
- [14] 郭光荣. 人工诱变与外源 DNA 直接导入相结合创造遗传变异的探讨 [J]. 作物研究, 1994, 8(2): 15.
- [15] 赵炳然. 外源总 DNA 直接导入植物后的整合与分子验证 J. 作物研究, 1998(4): 1- 3.
- [16] LUO Z X, WU R. A simple method for the transformation of rice via the pollen tube pathway [J]. Hart Mill Bd Rep, 1988, 6: 165- 174.
- [17] 曾君社, 王东江, 吴有强, 等. 用花粉管途径获得小麦转基因植株 J. 中国科学: B 辑, 1993, 23(3): 256- 262.
- [18] 裴新梧, 崔凯荣, 孔英珍, 等. 导入高粱 DNA 选育丰产抗逆小麦新品系及其 RAPD 分子验证 J. 兰州大学学报: 自然科学版, 1999, 35(2): 130- 135.
- [19] 王晓娟, 李兴林, 王亚馥. 高粱总 DNA 导入春小麦稳定后代高分子量麦谷蛋白亚基的变化 [J]. 西北植物学报, 2000, 20(6): 979- 983.
- [20] 向平安, 洪亚辉, 董延瑜. 高粱 DNA 导入水稻的 RAPD 分子验证 J. 湖南农业大学学报, 1999, 25(1): 6- 8.
- [21] 王文静, 刘景德, 任林昌. 新疆大赖草 DNA 导入栽培稻引起性状变异 [J]. 新疆农垦科技, 1999(2): 26- 27.
- [22] 王文静, 任林昌, 战勇. 新疆甘草 DNA 导入大豆性状变异的研究初报 [J]. 新疆农垦科技, 2001(1): 14- 15.
- [23] 刘萍, 张立杰, 马宏伟, 等. 燕麦 DNA 导入普通小麦的初步研究 J. 麦类作物学报, 2000, 20(4): 6- 11.
- [24] 崔良国, 刘升昌, 汪黎明. 谷子 DNA 导入玉米创造变异及其利用的研究 J. 山东农业科学, 2002(3): 18- 20.
- [25] 黄骏麒, 钱思颖, 周光宇, 等. 外源抗枯萎病棉 DNA 导入感病棉的抗性转移 J. 中国农业科学, 1986(3): 32- 36.
- [26] 丁国华, 徐仲. 外源 DNA 导入烤烟后 D₁ 代植株根尖细胞有丝分裂的细胞学观察 J. 东北农业大学学报, 2000, 31(3): 288- 293.