中 国 科 学 (B 辑)
第23卷 第3期 SCIENCE IN CHINA (Series B) 1993年3月

用花粉管途径获得小麦转基因植株 *

曾君祉 王东江 吴有强 张 健
周文娟 朱小平 徐乃正
(中国科学院遗传研究所, 100101)

摘 要

本文将带GUS标记基因的质粒pBI121用花粉管途径转化普通小麦(*T. aestivum L*)品种小山3号的小花. 从结实的106粒种子中,经点杂交初步筛选,再经Southern分子杂交鉴定,选出5株转基因小麦,转化率为4.7%. 同时用荧光法和X-Gluc染色法测试,检测到这些植株中有GUS基因的表达产物β-葡糖苷酸酶(GUS)存在,证明GUS基因已整合到小麦植株中,并能在植物体中表达.

关键词 小麦、GUS基因、花粉管途径、转基因小麦植株

小麦是重要的粮食作物,也是企图用基因工程方法进行品种改良的重要作物. 但由于目前在禾谷类作物上还缺乏类似农杆菌的优良转化系统,致使转基因的工作同双子叶植物相比,进展缓慢. 目前,已获得转基因植株的禾谷类作物有水稻和玉米[1—5]. 这主要是采用外源基因直接转移的方法如PEG法、电激法或基因枪法等转化原生质体或细胞,由这些细胞再生出转基因植株,然而,不论是PEG等方法或基因枪法,它们的共同特点是都要经过胚性细胞系,或悬浮细胞系或原生质体培养及植株再生等过程. 而用小麦材料建立这些体系中的任何一个都比其它作物困难得多. 尽管小麦的原生质体植株在1988年获得成功[6],但目前仍未有获得转基因植株的报道.

与此同时,近几年来国内外学者在一些花器结构和开花习性合适的双子叶和单子叶植物中,使用了花粉管途径作转化手段. 这是利用花朵在受粉后,花粉管穿行雌蕊组织,将外源基因引入胚囊,进入合子,从而直接得到转基因种子的一种方法. 目前,在棉花、水稻和高粱等作物中已有报道,它们都经分子杂交证明了外源基因已整合到作物基因组中[7—10]. 我们认为,与前几种方法比较起来,花粉管途径法的特点更适合于小麦的转基因工作. 首先,转化受体(小花)直接得到种子,长成植株,越过了体细胞或原生质体再生的难关; 其次,由于未用组织培养,避免了各种附加激素的不良影响; 第三,转化方法操作简便,成本低,适合普及使

1991-12-13收稿,1992-09-02收修改稿.

* 国家"863"高科技资助项目.

用. 因此，1990年我们以普通小麦为主，开展了花粉管途径的转化工作，获得转基因植株，现将结果报道如下.

1 材料和方法

1.1 供试小麦品种，转化方法和植株栽培

供试材料有普通小麦(*Triticum aestivum L.*)品种小山3号，CA8361，早红玉和硬粒小麦(*T. durum Desct*)品种D90. 处理时，选取正在开花的小花作标记，0.5 h后到3 h内用刀片切去羽状柱头，并立即滴加10 μl浓度为100 μg/ml的质粒DNA，候其自然结实. 同年将种子人工萌发后，种入塑料盒中，栽种时取每粒种子的1—2个根尖提取DNA供点杂交用. 幼苗在露天下生长约一个月后移入温室栽培.

1.2 用于转化的质粒

实验中用于转化的质粒有pBI121[11]，pAIGUSN[12](又名AT13)和pDO432[13]. 其中pBI121携带NPTII基因和GUS标记基因，pAIGUSN携带GUS标记基因，pDO432携带Luc标记基因(图1). 质粒DNA的提取参照Maniatis等[14]的方法.

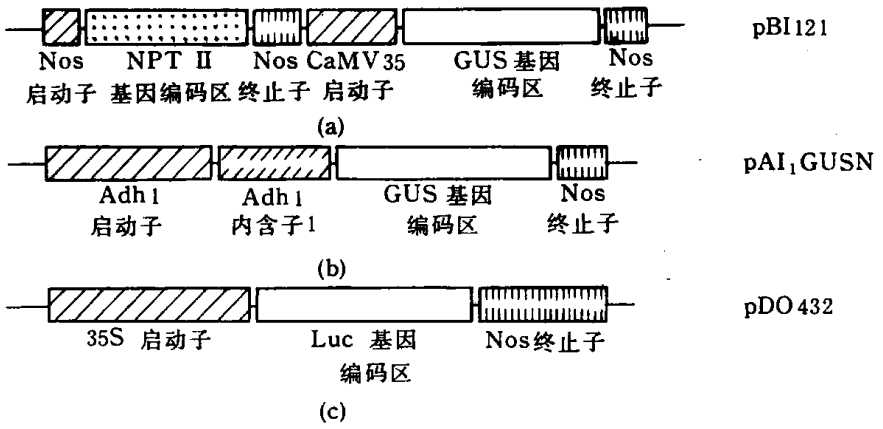

图1　质粒pBI121。pAI$_1$GUSN和pDO432携带的嵌合基因图

(a) 质粒pBI121，携带有由胭脂碱合成酶(Nos)启动子，新霉素磷酸转移酶(NPT II)基因编码区和胭脂碱合成酶(Nos)终止子的嵌合基因及由花椰菜花叶病毒(CaMV)35启动子. β-葡糖苷酸酶(GUS)基因编码区和Nos终止子的嵌合基因；(b) 质粒pAI$_1$GUSN(AT13)，携带由玉米Adh1启动子，Adh1内含子、GUS基因编码区和Nos终止子的嵌合基因；(c) pDO432携带由CaMV35 S启动子、萤火虫荧光素酶(Luc)基因编码区和Nos终止子的嵌合基因

1.3 DNA的提取和分子杂交

1.3.1 根尖高分子量DNA的提取和点杂交

提取根尖DNA基本按Luo Zheng-Xun[7]等描述的方法进行. 变性后的DNA滴在尼龙膜上. 点杂交的方法同下述Southern杂交. Luc和NPT II基因探针分别从pDO432和pBI121中分离获得. 此法一次可鉴定数十粒种子，用于初步筛选可收到早期、快速的效果.

1.3.2 叶片高分子量DNA的提取和Southern杂交

剪取植株幼小分蘖的叶子或抽穗后旗叶下第一，二片叶的上半部，按CTAB法[15]提取

DNA. Southern 杂交时，取 8—10μg 叶片 DNA 用 BamHI 和 EcoR I 酶切过夜. 分于杂交按 Maniatis 等[14]的方法进行. GUS 基因探针从质粒 PBI121 经 BamHI 和 EcoRI 酶切后电泳分离获得. 探针标记用随机引物法(random primer method)进行.

1.4 GUS 基因表达的荧光测定

GUS 荧光检测的程序基本上按 Jefferson R[16] 的方法进行. 从植株分蘖最上面两片叶的上部 1/2 或 2/3 处剪下叶片，重约 0.1 g. 用 70% 酒精清洁叶表面，将叶子放在研钵中研碎，加 1.5 ml 提取缓冲液，按 Huttly等[17] 的方法收集提取液，加 6 mmol/L 4-甲基伞形酮获糖苷酸[17](4-methylumbellferylglucuroride, MUG) 其终浓度为 2 mmol/L，在 37°C 下保温过夜. 再加入 0.2 mol/L Na_2CO_3 终止反应后，用荧光分光光度计测定相对荧光强度(用相对峰值表示).

1.5 X-Gluc 组织化学法检测 GUS 基因的表达

取麦穗顶部的四朵未成熟小花，按 Jefferson[16] 的方法，固定、染色.

2 实 验 结 果

2.1 滴加 DNA 后的结实情况

从去柱头后滴加 DNA 的小花中收获种子，从硬粒小麦品种 D90 和普通小麦品种小山3号，早红玉和 CA8361 中分别获得 270 粒，291 粒，174 粒和 386 粒种子. 这些种子的外形比正常种子略短一些，可能是切柱头时刀伤所致. 种子发芽率和以后植株的生长情况与对照正常结实种子无差异.

2.2 根尖 DNA 点杂交结果

从上述种子中随机取出一部分人工发芽，每一种子取 1 或 2 个根尖提取 DNA 供作点杂交用. 实验的 4 个品种分别和相应的 3 种探针杂交，杂交阳性反应的百分率列于表 1. 表1表明 4 个品种和相应的 3 种探针杂交都有一定数量的植株呈阳性反应. 但同一个材料用两种探针杂交时，阳性反应的株数差异很大，如品种 D90，用 NPTII 基因作探针，阳性反应率为 34.2%，用 GUS 基因作探针为 14.8%; 品种小山 3 号亦有类似的结果，分别为 29.2% 和 15.1%. GUS 基因探针的频率都低于 NPTII 探针.

表 1 花粉管途径转化小麦植株(T_0代)点杂交阳性反应百分率

种	品种	质粒	探针	处理种子		
				总数	阳性反应数	阳性反应 %
硬粒小麦 (*T. durum L.*)	D90	pBI121	NPTII	38	13	34.2
			GUS	27	4	14.8
普通小麦 (*T. aestivum D.*)	小山3号	pBI121	NPTII	106	31	29.2
			GUS	106	16	15.1
	早红玉	pDO432	Luc	88	16	18.2
	CA8361	AT13	GUS	32	8	25.0

图 2 示小山 3 号品种根尖 DNA 与 GUS 探针点杂交的部分结果. 未转化对照株 CK 和部分转化株呈阴性反应，81, 82, 85, 86, 88, 93 和 94 号转化株呈阳性反应.

用根尖 DNA 进行点杂交，可以在幼苗时期对转化的效果作初步的筛选，对进一步鉴定极其有用.

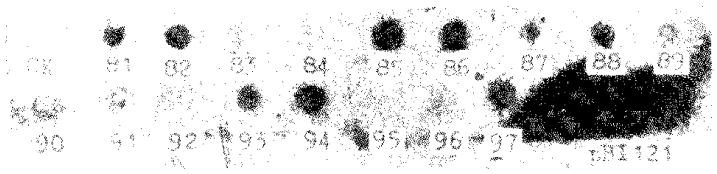

图 2　小麦品种小山 3 号的转化和未转化植株种子根尖 DNA 点杂交部分结果

CK 为未转化植株；81— 97 为转化 T_0 代植株；pBI121 为质粒 pBI121 的 DNA 作阳性对照．GUS 基因作探针

2.3 Southern 分子杂交结果

在点杂交工作的基础上，取种子群体最大的品种小山 3 号的部分阳性反应株进一步做 Southern 杂交．图 3 显示部分杂交结果．图中第 4,5 和 6 行分别为转化 T_0 代植株 3 号，82 号和 11号的 DNA，经 EcoRI 和 BamHI 酶消化后与 GUS 探针杂交的图谱．第 3 和第 82 号株都有一条 2.1 kb 的带，与 GUS 基因(第 3 行)带在同一位置上．第 11 号株，则无此带．同对照(CK)的表现一样．该株的根尖 DNA 在同 NPTII 基因点杂义时亦为阳性反应．此外，第 4 行(第3号株)的15 kb处还有一条杂交信号较弱的带，此带在图3 其他各行中都不存在．上述结果证明，外源 GUS 基因已整合进小麦植株中，类似的 Southern 杂交还鉴定出另外 3 棵植株整

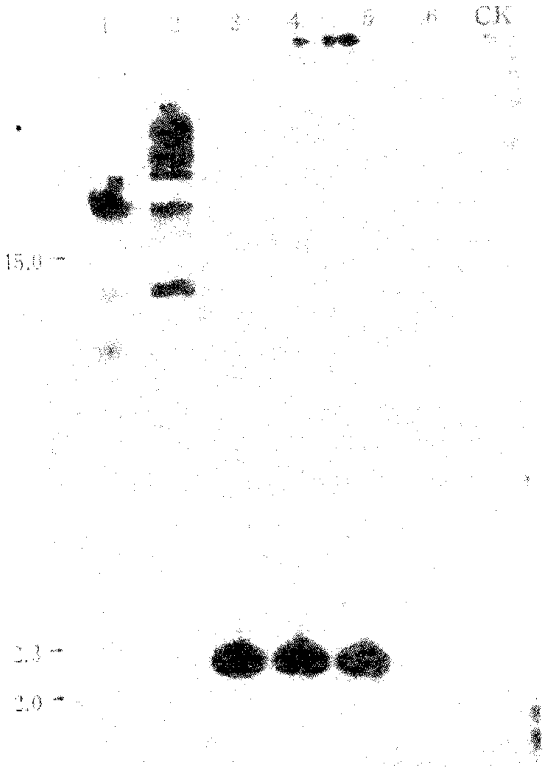

图 3　Southern 杂交结果

1. DNA+HindIII 分子量标准；2. 质粒 pBI121 的 DNA；3. 报告基因 GUS 片段；4—6. 转化小麦植株 3 号、82 号和 11 号的叶子 DNA，经 EcoRI+ BamHI 酶解；CK. 非转化小麦

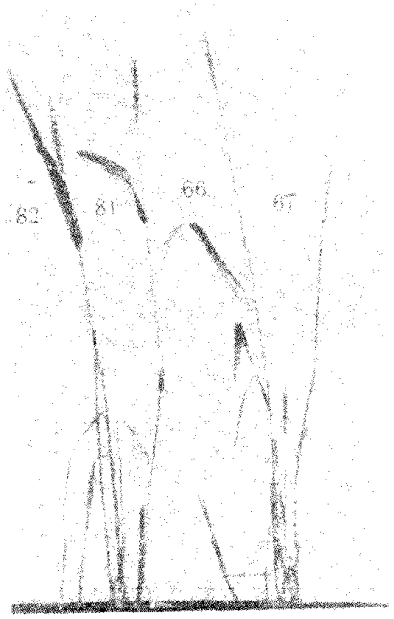

图 4　小麦品种小山 3 号的转化 T_0 代植株

从左至右分别是第 82 号、81 号、66 号和 67 号株；第 82 号株在点杂交和 Southern 杂交时均呈阳性反应(见图2 和图 3 第 5 行)；第 81 号株只在点杂交时

合了 GUC 基因，株号分别为 12, 85 和 93 号. 因此从小山 3 号全部 106 株植株中，迄今已鉴定出 5 株转基因植株. 这些植株的外形同对照未经转化的植株无差别，并都已结实. 图 4表示了转化植株与未转化植株在形态上无差异. 目前，从 38 粒 T_1 代种子中，经点杂交法已鉴定出 7 株呈阳性反应. 其他的鉴定工作正在进行中.

2.4 荧光法检测 GUS 基因的表达

从未转化的和转化的植株叶片中提取 GUS 基因产物 β-葡糖苷酸酶(GUS), 在荧光分光光度计上比较荧光发射的强弱. 以未转化对照植株的峰值(32.6)为 100, 同其它转化株的峰值作比较，结果如图 5. 从图 5 看出，有些植株如 81 和 89 号株，峰值为 30.7 和 34.6, 与对照株接近，然而另外 3 株 85,82 和 93 号峰值分别为 52.0,70.5 和 72.9, 比对照高 0.5 到 1 倍. 该 3 株在 Southern 杂交中都为阳性反应，说明转入的 GUS 基因在植株叶中能够表达.

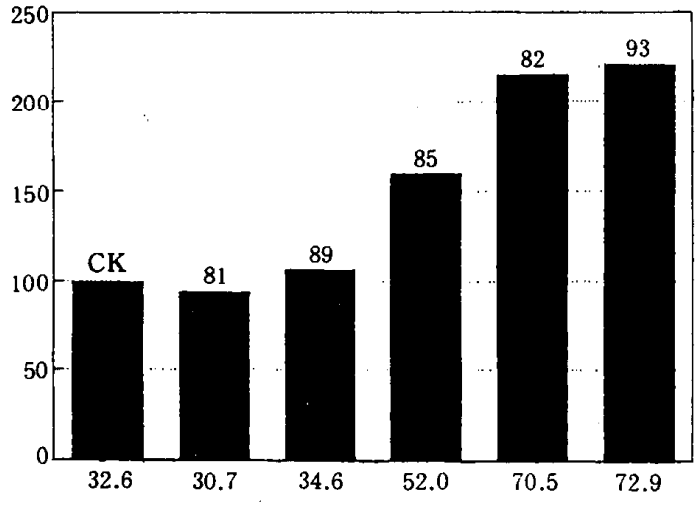

图 5 转化 T_0 代植株和未转化株叶片中 GUS 基因的荧光表达测定

纵坐标示以对照(CK)峰值为 100 时的相对强度; 横坐标为峰值, CK 为未转化对照株，81, 89, 85, 82 和 93 号为 T_0 代转化株，其中后 3 株在 Southern 杂交时呈阳性反应

2.5 X-Gluc 染色测 GUS 基因表达

从 Southern 阳性反应株 T_0 代82 号，93 号和对照未转化株的穗顶部取幼嫩小花，经 X-Gluc 染色，发现第 82 和 93 号株小花的花梗及秆片染成蓝色，以小花花柄的部分着色最深，对照株的小花花柄不着色. 如图 6.

上述结果表明，通过花粉管途径法将 3 种质粒基因初步转入两种小麦的 4 个品种中，从根尖 DNA 点杂交的结果看，都有一些阳性反应株存在，其频率在 14—34% 之间. 进一步对普通小麦品种小山 3 号进行 Southern 杂交分析，已从 106 株 T_0 代植株中证实有 5 株已整合了质粒 pBI121 的 GUS 基因，其转化频率为 4.7%, 用荧光法检测植株叶片提取物可测到 GUS 基因产物 β-葡糖苷酸酶，用 X-Gluc 染植株小花，可观察到该产物特有的蓝色. 证明转入的 GUS 基因能在植株中表达.

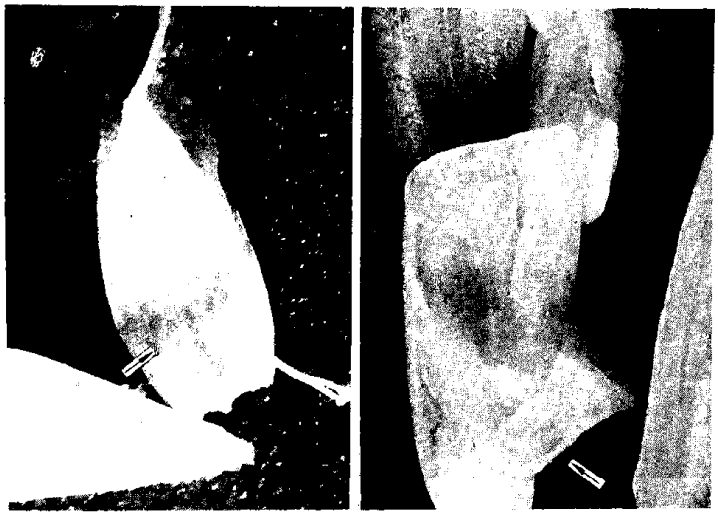

图6　小山3号T_0代植株82号与对照株小花经X-Gluc染色的表现

右侧为82号植株的小花，花梗（箭头所指）染成蓝色（黑白版为黑色），稃片比花梗稍浅；左侧为对照株，花梗（箭头所指）和稃片不着色

3　讨　论

3.1　点杂交筛选的优点和准确性

根据Luo Zhong-Xun的报道，用点杂交测定根尖DNA是一个快速初筛的好方法．这一点在我们的工作中得到证实．本实验对4个品种的264粒种子进行点杂交，在种子栽种后数天内即确定出68个阳性反应株，大大缩小了进一步鉴定的范围，节省了人力和物力，同时也不妨碍植株的正常生长．

另外通过Souhtern杂交，从品种小山3号中选出5棵转基因植株，它分别占点杂交阳性反应株的17.2%(NPTII基因探针)和38.5%(GUS基因探针)．这说明经点杂交后，平均从6株(NPTII基因探针)或3株(GUS基因探针)植株中即可选到一棵转基因植株，其选择效率是较高的．

3.2　Southern杂交中的带型

图3第4行(即T_0代3号植株)的DNA除在2.1 kb处有一条主带外，还在15 kb处有一条杂交信号较弱的带，类似现象在玉米的转化试验中亦有报道[18]．这种现象的产生可能是质粒DNA在整合入基因组时发生突变或重组所致，需进一步分析确定．

3.3　用花粉管途径获得转化植株的可能性

正如前言中提到的通过花粉管途径已获得转基因的棉花，水稻和高粱植株．现在我们又得到了小麦的转基因植株，这些结果都经Southern杂交所证实．目前，有关花粉管途径在创造转基因植物的可能性和可靠性方面，仍有人抱怀疑态度．但是，从作者对小麦受精过程的多年研究中所观察到的现象来看，外源DNA通过花粉管途径进入卵细胞是完全可能的．小麦受粉后相当一段时间内(如48 h内)，大量花粉管及其内含物仍然经过花柱等组织不断流向胚囊，因此在卵细胞受精后甚至合子分裂时都可看到后来的花粉管内含物以及精子进入胚囊

或卵细胞(待发表). 众所周知,卵器细胞在胚囊中几乎是无壁的,相当于原生质体,而且在精子进入时,它的膜亦有一个开闭的过程,因此随花粉管而流入胚囊的物质是有进入卵细胞的机会的. 另外龚蓁蓁[19]等也用放射自显影的方法追踪到外源 DNA 沿棉花花粉管通道进入胚囊的过程,并在胚囊中观察到标记的 DNA. 这些资料都说明外源物质能够通过花粉管途径进入胚囊. 当然从去掉柱头后的花柱端加入 DNA,这些 DNA 进入胚囊需较长的一段旅程,其间部分外源 DNA 不可避免会被降解,不过从目前的实验结果看,仍有一些进入了卵细胞. 当然,这些 DNA 进入后的行为及整合位置还有待进一步研究.

致谢 R. A. Jefferson 博士赠送质粒 pBI121,朱立煌研究员转赠质粒 AT13,金振华副研究员转赠质粒 pDO432,张炎研究员提供材料,以及张佳云同志参加大量工作,作者在此一并表示感谢.

参 考 文 献

[1] Toriyama, K. *et al., Bio/technology,* 1988, **6**:1072—1074.
[2] Shimanoto, K., *et al., Nature,* 1989, **338**(16): 274—278,
[3] Hayashimoto, A. *et al., Plant Physiol,* 1990, **93**: 857—863.
[4] Rhodes, C. A., *et al., Science,* 1988, **240**: 204—207.
[5] Gordon-Kamm, W. J., *et al., The Plant Cell,* 1990, **2**: 603—618.
[6] Harris, R. *et al., Plant Cell Reports,* 1988, **7**: 337—340.
[7] Luo Zhong-Xun *et al., Plant Mol Biol Rep.,* 1988, **6**(3): 165—174.
[8] 谢道昕、范云六、倪丕冲,中国科学,B 辑,1991, (8): 830—834.
[9] 谢道昕、范云六、倪万潮等,中国科学,B 辑, 1991, (4): 367—373.
[10] 刘根齐、张孔恬、李京京等,中国遗传学会第四次代表大会暨学术讨论会论文摘要汇编(1987—1990), 1990, 115.
[11] Jefferson, R., *The EMBO,* 1987, **6**(13): 3901—3907.
[12] Wang Yi chang, *et al., Plant Mol. Biol.,* 1989, **11**: 433—439
[13] Ow, D. W. *et al., Scinece,* 1986, **234**(1): 856—859.
[14] Mariatis, T. *et al., Moecular cloning.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989,
[15] Kosuge, T. *et al., Genetic Engineering of Plants, Agricultural Perspective,* Published by Plenum Press, New York, 1983.
[16] Jefferson, R. *Plant Mol Biol, Rep.,* 1987, **5**(4): 387—405.
[17] Hutty, A. K., *et al., The EMBO,* 1988, **8**(7): 1907—1913.
[18] Spenceer, T. M. *et al., TAG,* 1990, **97**: 625—631.
[19] 龚蓁蓁、沈慰芳、周光宇, 中国科学,B辑, 1988, (6): 611—614.