

花粉電穿孔轉殖法於作物育種之應用¹

趙秀滂²

摘 要

趙秀滂。2012。花粉電穿孔轉殖法之應用。臺南區農業改良場研究彙報 60：22-29。

本篇為花粉電穿孔轉殖法之文獻探討。植物的基因轉殖有農桿菌轉殖、電穿孔、花粉管導入、基因槍、顯微注入、聚乙烯二醇及超音波等方法，以上大多需要經由組織培養過程才能得到轉殖植株。花粉電穿孔轉殖法則是以花粉做為基因載體，將外源基因以電穿孔方式送入花粉後再經授粉，即可得到轉殖種子，不需要經由組織培養過程。影響電穿孔的基因轉殖之因子包括電場強度、電容、電擊次數、緩衝液之鹽類濃度與離子濃度、載體的狀況、數量與形態、DNA 之濃度與形態及外界環境溫度等，若能善加利用此轉殖方式，將能縮短作物育種年限，加速作物改良的步調。

關鍵字：花粉、載體、轉殖

接受日期：2012 年 8 月 15 日

前 言

雜交育種是選取具所要性狀的親本雜交，以重組不同基因，為作物改良使用最廣泛的育種方法。種內的雜交無雜交障礙容易重組優良基因獲得優良品種，但種間雜交有雜交不親性障礙，而且授精後胚發育也常中途萎縮，除須配合胚拯救技術以克服外，雜交成功後不良性狀需要數代的回交與選拔，花費許多的人力及時間。因此，種、屬間雜交育種甚為困難。利用生物技術進行作物品種改良，又稱為分子育種，即利用遺傳工程技術，自任何物種分離特定基因，再利用基因轉移技術，將其導入至缺乏此一基因或特性的目標植物的育種方法⁽⁵⁾。所以基因工程育種可以說是傳統作物育種的延伸，利用基因工程技術進行作物品種改良，將可以突破種原的限制，及種、屬間雜交的瓶頸。

Potrykus (1990) 指出植物的基因轉殖系統可分為直接和間接二大類，其中直接法包括：顯微注射 (microinjection)、基因槍法 (gene gun)、電穿孔 (electroporation)、聚乙烯二醇 (polyethylene glycol, PEG) 及花粉管導入 (pollen tube pathway) 等；間接法則是利用農桿菌 (*Agrobacterium*)、病毒 (virus) 及脂微粒 (liposome) 等做為載體，將外來基因送入細胞的方法。無論是直接或間接的基因轉殖方法，大多需要透過組織培養的過程，先誘導出癒傷組織後，再誘導分化成幼株，整個流程繁雜而且時間長，而且有些植物不易由癒傷組織

1. 行政院農業委員會臺南區農業改良場研究報告第 398 號。

2. 臺南區農業改良場義竹工作站助理研究員。

再生植株，所以經由組織培養的基因轉殖系統，仍有許多作物仍待克服，因而發展出許多的轉殖方式。

自 80 年代起，許多研究紛紛改以花粉為載體來進行基因轉殖^(12,24,27)。其方式有：一、使外源基因附著在雄配子體表面，經由花粉管之延伸將外源基因帶至雌配子體內，在受精過程中將外源基因轉移至染色體上；二、將外源基因送入雄配子體，再經由授粉與受精作用，採收果實後，再播種其種子來進行後代的篩選。因為送入的外源基因大多都含有抗生素及 Gus 等篩選標誌，所以後代容易進行篩選及判定。本文主要以花粉做為載體之基因轉殖方法進行探討，以提供有興趣的人參考及利用。

基因工程育種法

利用基因工程進行作物品種改良，實際上是傳統作物育種之延伸。主要是利用生物技術，可以將自生物體內分離，或在生物體外改造之特定基因，利用基因轉移技術導入缺乏此一基因目標作物的育種方法。由於基因工程育種每次僅改良少數性狀，若能選用現有優良品種為材料直接導入新性狀或基因，即可以縮短育種年限及選拔次數，新品種將可於短期內育成。

利用基因工程進行作物品種改良之主要步驟包括：標的基因之選殖、構築標的基因至表現載體上、基因轉殖及轉殖株後代遺傳分析等。其中植物的基因轉殖系統，主要將構築完成含有標的基因之表現載體，送入植物細胞中，截至目前共計有農桿菌轉殖、電穿孔、花粉管導入、基因槍、顯微注入、聚乙烯二醇及超音波等方法，簡要敘述如下：

(一) 農桿菌轉殖 (*Agrobacterium*-mediated transformation)

自然界中之植物農桿菌（或稱腫瘤菌，*Agrobacterium* spp.）之細胞內含有會使植物產生腫瘤之質體，稱之 Ti 質體（tumor inducing plasmid）。這種質體之特定 DNA 區域會在農桿菌感染宿主植物時嵌入植物的染色體 DNA，達成穩定的基因轉移⁽²⁸⁾。

(二) 電穿孔 (electroporation)

細胞在微秒～毫秒極短暫的時間內，通以瞬間高電壓之直流電，此時在細胞膜上形成極微小之孔洞⁽²⁵⁾，細胞即很容易吸收大量外來的 DNA⁽³⁶⁾。此法簡單快速，可應用於原生質體、細胞、組織及器官等。

(三) 花粉管導入 (pollen tube pathway)

本方法由中國科學院周光宇教授於 1983 年提出，利用注射針將外來 DNA 直接由柱頭注入使進入子房中，再篩選種子，即可得到轉殖株。

(四) 基因槍 (gen gun) 或粒子槍導入 (particle bombardment)

利用鎢 (tungsten) 或金粒子 (gold particle) 等高密度金屬微粒 (1.0 ~ 1.6 μm)，將外來 DNA 附著並包裹在粒子表面，藉由高壓縮氦 (He) 在真空狀態下產生的動能高速推力，將帶有外來 DNA 之金屬粒子推送入細胞深層。此法所用的培植體為癒合組織、葉片、胚及生長點幼嫩再生能力強的組織，因此再生沒有問題；但此方法常會有多重轉殖插入 (multiple transgene copy) 的問題，因此無法確定能否穩定遺傳到下一代⁽²⁾。

(五) 顯微注入 (microinjection)

此法係在顯微鏡觀察下操作，利用顯微操作儀，以毛細管將外來基因直接注入原生質體中⁽²⁹⁾，經抗生素篩選及組織培養再生，即得轉殖植株。此種方法最早用於動物的轉殖。

(六) 聚乙烯二 (polyethylene glycol, PEG)

培植體必需是原生質體，於原生質體培養液中加入外來 DNA 片段，藉由 PEG 在細胞膜上所造成之孔洞，使得外來 DNA 進入原生質體中。此法可克服部分有性雜交不親和的問題，創造新種或育成優良品種；缺點在於培植體需是原生質體，而且原生質體分化再生不易⁽¹⁾。

(七) 超音波 (sonoporation)

是利用超音波使培養液產生微量氣泡，微量氣泡撞擊細胞壁後產生孔洞，外源物質藉此進入細胞中⁽²³⁾。

其中以農桿菌轉殖和基因槍這兩種方式最常被使用^(7,8,9,10)。因為基因槍轉殖法所需費用偏高，而農桿菌轉殖是以作物葉片做為培植體，對於作物的遺傳操作非常方便，所以利用這種方式已成功地轉殖提高產量、抗病蟲害和提高作物抗逆性等相關的基因^(16,17,19,20,21)。但是該轉殖方法必需要組織培養的協助，而且整個組織培養流程繁雜而且時間長，同時有些植物不易由癒傷組織再生植株，所以經由組織培養的基因轉殖系統，仍有許多困難仍待克服，因而希望發展出不需要組織培養的轉殖方式。

花粉電穿孔轉殖法

Saunders *et al* (1992) 指出花粉電穿孔轉殖法 (Pollen electrotransformation) 是將外源 DNA 以電穿孔的方式送入花粉內，其花粉仍具活性，可用來授粉產生種子，其後代可表達出外源 DNA 應有的特徵。此一方法最大的優點不需要組培過程，可縮短轉殖的時間；而且適用於任何開花植物。

花粉是種子植物的微小孢子堆，成熟的花粉粒是為小配子體，能產生雄性配子。大小為 10 ~ 200 micro-meter 依作物種類而異。植物的花粉顆粒由三個部分組成包括：核源、花粉內壁及花粉外壁。核源在花粉粒中央，由細胞質組成，進行受精作用的主要部份。花粉內壁主要由纖維素構成，容易破裂。花粉外壁主要由孢粉素 (sporopollenin) 組成，比花粉內壁厚並且很堅固，用高溫、強酸和強鹼進行處理也不易使得花粉粒解體。

Roedel (1988) 指出當外來 DNA 隨著花粉在作物柱頭上，花粉管及柱頭會分泌核苷分解酶 (nuclease)，將外來 DNA 予以分解 (degradation)。推測這可能是作物的一個天然的保護機制，以防範外源 DNA 進入而改變其遺傳特性，所以以花粉作為載體，而進行的轉殖作業早期效率並不高。Ohta (1986) 使用外源 DNA 片段與玉米成熟花粉混合，經授粉以後獲得轉殖株，而且花粉與 DNA 混合後必需要立刻授粉，有助於提升轉殖效率。de Wet *et al* (1985) 報告指出裸露的 DNA 片段或質體，可經由萌發的花粉管細胞膜進入營養細胞之細胞核，但是花粉在萌芽過程會釋放核苷分解酵素，分解部份的 DNA 片段。Van Wert and Saunders (1992) 進一步發現未經電穿孔處理的花粉其 DNA 降解量會隨著時間增加而增加，而經電穿孔處理的花粉其 DNA 降解的量並沒有隨著時間增加而增加。所以花粉電穿孔轉殖

法應該避免外源 DNA 被花粉萌芽所釋放的核酸分解酵素所降解，才能提高基因轉殖率。Saunders *et al* (1992) 表示剛萌發的花粉管具活性又沒有細胞壁，最適合進行花粉轉殖作業。張 (1997) 進一步指出利用外力，使得外來 DNA 先進入花粉粒或花粉管中，應可防止或減少外來 DNA 被分解，以提高轉殖效率。

Saunders *et al* (1995) 指出利用電穿孔進行基因轉殖之範圍非常廣泛，包括植物、動物、細菌及酵母菌等。在植物方面共計有原生質體^(14,18,26)、胚^(13,35)、細胞^(22,31)和花粉^(24,27)等部位均可用於電穿孔的基因轉殖。影響電穿孔的基因轉殖之因子包括電場強度、電容、電擊次數、緩衝液之鹽類濃度與離子濃度、載體的狀況、數量與形態、DNA 之濃度與形態及外界環境等⁽¹⁾。

(一) 電場強度及電容

不同的細胞因細胞膜組成和滲透壓的特性不同，所以有其最適當之電場強度。Chu *et al* (1987) 表示當電場強度愈強，細胞轉殖效率也愈強，但細胞之存活率也會隨電場強度的升高而下降；但是當電場強度超過細胞臨界點時，轉殖效率反而會下降。電容之影響主要是造成電荷改變和影響電壓在脈衝時，通過細胞懸浮液的時間長短。脈衝之強度與長度會受到電容的影響而增減，因此較高的電容會有較佳之轉殖效果。

(二) 電擊次數

細胞電穿孔處理時電擊次數，會因為不同的細胞種類而有所不同。Saunders *et al* (1995) 指出以菸草花粉進行電穿孔處理時，隨著電擊次數增加，其花粉活性並不會改變，反而使得外來 DNA 吸收增加；但以原生質體為載體時，隨著電擊次數增加，其原生質體活性反而有下降的表現。

(三) 緩衝液之鹽類濃度與離子濃度

不同的細胞種類有其適合的緩衝液。Fromm *et al* (1986) 在轉殖玉米的原生質體中加入 PEG buffer，反而降低轉殖效率及原生質體的成活率。但是王 (2006) 將玉米花粉加入 PGM buffer，有助於轉殖效率的提升。

(四) 載體的數量、形態及狀況

以花粉為載體的轉殖方式，選用具有活力且發芽率高的花粉是必要條件。不同作物有最適宜的開花時間，隨著溫度的上升，在盛花時期花粉之成熟度並不會完全相同，衰老、死亡、未成熟和發育失敗的花粉也混在其中，因此可以利用緩衝液來篩選成熟度高的花粉，同時緩衝液內含鈣及硼元素，對後續花粉之萌發率及花粉管生長具有顯著之促進效果。此外在基因轉殖上載體細胞之狀況，也是提高效率之決定因素之一，張 (2004) 表示當載體存活率在 20 ~ 50% 時，具最佳的基因轉殖效率；所以選擇電穿孔處理後細胞存活 50% 的電壓，可以做為處理不同細胞之依據標準⁽⁶⁾。

(五) 外來 DNA 之濃度與形態

Fromm *et al* (1985) 指出電穿孔處理時，基因轉殖效率會隨著外來 DNA 濃度的增加而上升。外來 DNA 以緊密的超螺旋形 (supercoil) 較易通過細胞膜，但線形 (linear) DNA 在細胞內表現較佳⁽¹¹⁾。

(六) 外界環境

Andreason and Evans (1989) 表示電穿孔處理後，細胞與 DNA 混合液放置在

在 4°C 可提高其轉殖效率。張（2004）指出進行電穿孔處理時，由於電能會釋放至緩衝液中而產生部分的熱，所以爲了增加細胞存活率及維持孔洞的形成，低溫處理可達到較佳的轉殖效果。王（2006）利用花粉電穿孔處理進行玉米轉殖時，電穿孔處理前後放置在 4°C 可提高其轉殖效率。

展 望

自從 1984 年首次成功地得到轉殖基因的菸草後，植物基因轉殖的技術便以驚人的速度發展，目前全世界在 45 個以上的國家，分別針對不同作物進行有用的經濟性狀改良。雖然植物基因轉殖方法很多，但是目前以農桿菌轉殖和基因槍這兩種方式最常被使用^(7,8,9,10)。這兩種植物基因轉殖方法需要組織培養的協助，經由組織培養的基因轉殖系統，仍有許多困難仍待克服，因而希望發展出不需要組織培養的轉殖方式。花粉電穿孔轉殖法早期主要應用在禾本科之玉米及菸草，以電穿孔方式將外源基因送入花粉內，不需要組培過程，可縮短轉殖的時間，操作容易，而且適用於任何開花植物，尤其是一果多子之瓜類、百香果及棉花等。

結 語

花粉電穿孔轉殖法有別於其他的基因轉殖方法，不需要透過組織培養系統，直接利用植物的自然生殖過程，並藉由生殖過程使轉殖細胞發育成完整的基因轉殖植物，該方法操作簡單快速，任何開花植物都可透過此方法轉殖。若能善加利用此種轉殖方式，將能縮短作物育種年限，加速作物改良的步調。

引用文獻

1. 王清嵐 .2006. 以花粉做爲受體之玉米轉殖方法 . 國立嘉義大學農業生物技術研究所碩士論文 p.98。
2. 曾夢蛟、劉程煒。2004。第六章—基因槍轉殖技術。In：植物基因轉殖之原理與應用。植物生物技術教學資源中心主編。台中，台灣。p.73-85。
3. 張有明。1997。苦瓜組織培養再生、農桿菌媒介法及花粉電穿孔法之基因轉殖研究。國立台灣大學園藝學研究所博士論文。p.118。
4. 張有明 .2004. 第七章電穿孔轉殖技術 植物基因轉殖之原理及應用 植物生物技術教學資源中心、教育部顧問室出版。p.87-96。
5. 蔡奇助、曾東海、王強生。2002。基因工程與作物品種改良。亞熱帶農作物產業之研究發展研討會專刊。p.166-182。
6. Andreason G. L. and G. A. Evans .1989. Optimization of electroporation for transfection of mammalian cell lines. Anal. Biochem. 180: 269-275.
7. Boulter ME, Croy E, Simpson P, Shields R, Croy RDD, Shirsat AH.1990. Transformation of Brassica napus L.(oilseed rape) using *Agrobacterium tumefaciens* and *Agrobacterium rhizogenes* - a comparison. Plant Sci 70:91-99.

8. Charest PJ, Holbrook LA, Gabard J, Iyer VN, Miki BL .1988.*Agrobacterium* mediated transformation of thin cell layer explants from Brassica napus. Theor Appl Genet 75:438–445
9. Christou P .1992. Genetic-transformation of crop plants using microprojectile bombardment. Plant J 2:275–281.
10. Christou P .1995. Particle bombardment. Methods Cell Biol 50:375–382.
11. Chu G., H. Hayakawa, and P. Berg .1987. Electroporation for the efficient transfection of mammalian cell with DNA. Nuclei. Acids Res. 15: 1311-1326.
12. de Wet J. M. J., A. E. de Wet, D. E. Brink, A. G. Hepburn, and J. H. Woods.1985. Gametophyte transformation in maize (*Zea mays*, Gramineae). In: Biotechnology and Ecology of Pollen, Mulcahy D. L., Mulcahy G. B., Ottaviano E. (eds.), Springer-Verlag, New York, pp. 59-64.
13. D'Halluin K., E. Bonne, M. Bossut, M. De Beuckeleer, and J. Leemans.1992. Transgenic maize plants by tissue electroporation. Plant Cell 4: 1495-1505.
14. Fromm M., L. P. Taylor., and V. Walbot.1985. Expression of genes transferred into monocot and dicot plant cell by electroporation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82: 5824-5828.
15. Fromm M. E., L. P. Taylor. and V. Walbot .1986. Stable transformation of maize after gene transfer by electroporation. Nature 319: 791-793.
16. Girijashankar V, Sharna HC, Sharma KK, Swathisree V, Prasad LS, Bhat BV, Royer M, Secundo BS, Narasu ML, Altosaar I, Seetharama N.2005. Development of transgenic sorghum for insect resistance against the spotted stem borer (*Chilo partellus*). Plant Cell Rep 24:513–522.
17. Guan C, Wang G, Chen S, Li X, Lin L .2001. Breeding and agronomic characters of Bt transgenic insect-resistant Brassica napus lines. Cruciferae Newsl 23:43–44
18. Hauptmann R. M., P. Ozias-Akins, V. Vasil, Z. Tabaeizadeh, S. G. Rogers, R. B. Horsch, I. K. Vasil, and R. T. Fraley.1987. Transient expression of electroporated DNA in monocotyledonous and dicotyledonous species. Plant Cell Reports 6: 265-270.
19. Horsch RB, Klee HJ, Stachel S, Winans SC, Nester EW, Rogers SG, Fraley RT.1986. Analysis of *Agrobacterium tumefaciens* virulence mutants in leaf discs. Proc Natl Acad Sci USA 83:2571–2575.
20. Howe AR, Gasser CS, Brown SM, Padgett SR, Hart J, Parker GB, Fromm ME, Armstrong CL .2002. Glyphosate as a selective agent for the production of fertile transgenic maize (*Zea mays* L.) plants. Mol Breeding 10:153–164.
21. Kohnomurase J, Murase M, Ichikawa H, Imamura J .1995. Improvement in the quality of seed storage protein by transformation of *Brassica napus* with an antisense gene for cruciferin. Theor Appl Genet 91:627–631.
22. Lin Y. K. and S. Y. Hwang.1998. Gene transfer through electroporation of sweet potato intact cells. Hwa Kang J. Agriculture. 8: 89-98.
23. Liu Y., H. Yang, A. Sakanishi.2006.Ultrasound: mechanical gene transfer into plant cells by sonoporation. Biotechnol. Adv. 24: 1-16.
24. Matthews B. F., A. A. Abdul-Baki, and J. A. Saunders.1990. Expression of a foreign gene in electroporated pollen grains of tobacco. Sex. Plant Reprod. 3: 147-151.
25. Neumann E., M. Schaefer-Ridder, Y. Wang, and P. H. Hofschneider .1982. Gene transfer into

- mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J.* 1: 841-845.
26. Nishiguchi M., W. H. R. Langridge, A. A. Szalay, and M. Zaitlin. 1986. Electroporation-mediated infection of tobacco leaf protoplasts with tobacco mosaic virus RNA and cucumber mosaic virus RNA. *Plant Cell Reports* 5: 57-60.
27. Ohta Y. 1986. High-efficiency genetic transformation of maize by a mixture of pollen and exogenous DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83: 715-719.
28. Potrykus I. 1990. Gene transfer to plants: Assessment and perspectives. *Physiol. Plant.* 79: 125-134.
29. Rakoczy-Trojanowska M. 2002. Alternative methods of plant transformation-A short review. *Cell Mol. Biol. Lett.* 7: 849-858.
30. Roeckel P., P. Heizmann, M. Dubois and C. Dumas .1988. Attempts to transform *Zea mays* via pollen grain-Effect of pollen and stigma nuclease activities. *Sex. Plant Reprod.* 1:156-163.
31. Sabri N., B. Pelissier, and J. Teissie .1998. Ascorbate increases electrotransformation efficiency of intact maize cells. *Anal. Biochem.* 264: 284-286.
32. Saunders J. A., B. F. Matthews and Van Wert S.L. 1992. Pollen electrotransformation for gene transfer in plant. *Meth. Mol Biol.* 55: 81-88.
33. Saunders J. A., C. H. Lin, B. H. Hou, J. Cheng, N. Tsengwa, J. J. Lin, C. R. Smith, M. S. McIntosh, and S. Van Wert .1995. Rapid optimization electroporation conditions for plant cells, protoplasts, and pollen. *Mol. Biotech.* 3: 181-190.
34. Van Wert S. L. and J. A. Saunders .1992. Reduction of nuclease activity release from germinating pollen under conditions used for pollen electrotransformation. *Plant Sci.* 84: 11-16.
35. Xu X., Li B. 1994. Fertile transgenic Indica rice plants obtained by electroporation of the seed embryo cells. *Plant Cell Rep.* 13: 237-242.
36. Zimmermann U. and P. Scheurich. 1981. High frequency fusion of plant protoplasts by electric field. *Planta* 151: 26-32.

Application of Pollen Electrotransformation on Crop Breeding¹

Chao H. F.²

Abstract

The purpose of this review is to focus on pollen electrotransformation method for efficient production of transgenic plant. There are many ways for plant transformation including Agrobacterium-mediated, electroporation, pollen tube pathway, gene gun, microinjection, PEG and sonoporation. These techniques require tedious and time-consuming tissue culture procedures. The pollen electrotransformation method at using mature pollen as carrier of gene to transformant external gene was introduced into pollen via electropotation, coupled with artificial pollination, finally the transgenic seeds can be readily produced, do not require tissue culture. There are many factors to affect pollen electrotransformation including the electric field strength, capacitance, electric shock times, buffer solution of salt types and concentration, carrier volume, DNA concentrations and the outside environment conditions. This simple and efficient transformation method, which can be applied to any flowering plants, will facilitate plant breeding program study and crop improvement in the future.

Key words : Pollen, Carrier, Transformation

Accepted for publication : August 15, 2012

1. Contribution No.398 from Tainan District Agricultural Research and Extension Station.

2. Assistant Researcher, Tainan District Agricultural Research and Extension Station.