

花粉管通道法导入外源 DNA 创造燕麦新种质

赵世锋¹, 刘根齐², 田长叶¹, 刘春光², 陈淑萍¹, 侯 宁², 黄文胜¹, 赵世民²

(1. 河北省高寒作物研究所, 河北 张北 076450; 2. 中国科学院遗传研究所, 北京 100101)

摘要:采用花粉管途径将不同倍性燕麦以及花生、大豆、小麦等不同作物外源 DNA 导入裸燕麦早熟品种品二号、中晚熟品种冀张莜四号和晚熟品种冀张莜五号, 获得了较为广泛的变异, 经过逐代选择鉴定, 育成了一批裸燕麦新种质。本研究以 GUS 报告基因为外源目的基因用同样方法导入燕麦, 从其导入一代(GT)中检测出了表达 GUS 活性的阳性植株。

关键词:花粉管通道法; 外源 DNA 导入; 新种质; 燕麦

中图分类号:S501 **文献标识码:**A **文章编号:**2003-7091(2003)03-0053-04

Selection of New Germplasm Resource Using the Technique of Pollen Tube Pathway Transfer Exogenous DNA into Recipients of Oats

ZHAO Shi-feng¹, LIU Gen-qi², TIAN Chang-ye¹, LIU Chun-guang²,
CHEN Shu-ping¹, HOU Ning², HUANG Wen-sheng¹, ZHAO Shi-min²

(1. Institute of High Cold Crop Hebei Province, Zhangjiakou 076450 China;

2. Institute of Genetics Academia Sinia, Beijing 100101, China)

Abstract: Using a series of naked oat variety as recipients, such as early-ripe PIN2 mid-late maturing Jizhangyou 4 and late-maturing Jizhangyou 5 and varied-ploidy oats, peanut, soybean and wheat, etc. as the donor, Exogenous DNA was transfered into recipients by pollen tube method, and variations had been obtained. After selected and identified generation-by-generation a series of germplasm resource of naked oats were developed. In order to further test the efficiency of transformation by pollen tube method GUS report gene was introduced as exogenous target gene into oats. In the colony of GT1, a great number of positive plants were inspected what expressed the activity of GUS gene.

Key words: Pollen tube pathway; Exogenous DNA transformation; Oats; New - idioplasm

利用带有目的基因的供体植物 DNA(包括远缘供体 DNA)直接转化受体亲本, 筛选目的性状变异后代培育农作物新品种的方法是植物基因工程与分子水平上的生物技术在农业育种上的实际应用。由于这种以整体植物为受体的外源基因转移是通过植物的授粉受精过程实现的, 故此技术既具备基因工程的先进性(可使某些特定基因或少数优良性状基因导入待改良的受体植物), 又保留了常规育种的基本特点(可直接按照育种要求选择转化后代), 在实

际育种工作中简便易行。近年来我国已通过此技术在棉花^[1]、大豆^[2,3]、水稻^[4]、小麦^[5,6]等一系列重要农作物上育成了许多有生产应用价值的新品系或品种, 为其他各类作物育种技术的改进和提高展示了广阔的前景。

1 材料和方法

1.1 受体和供体的选择

受体选用六倍体皮、裸燕麦种间杂交育成的当

收稿日期: 2002-08-22

基金项目: 河北省自然科学基金资助项目(398379)

作者简介: 赵世锋(1963-), 男, 河北张北人, 高级农艺师, 主要从事燕麦育种及栽培研究工作。

前生产上大面积种植的早熟品种品二号、中晚熟品种冀张莜四号和晚熟品种冀张莜五号。

供体选用燕麦属的小粒裸燕麦(2n)、大燕麦(4n)、野燕麦(4n)、普通皮燕麦(6n)和高蛋白种属的花生、大豆以及紫粒小麦。

GUS 报告基因质粒 P35SGUS 由中国科学院遗传所提供。

1.2 供体 DNA 的提取

基本方法采用氯仿-异戊醇-核糖核酸酶提取法并参照文献^[6,7]进行。所提取的 7 份供体 DNA 经紫外吸收光谱测定,其 260 μm /230 μm 的比值在 1.88~2.14 之间,260 μm /280 μm 的比值在 1.76~1.96 之间,电泳观察其分子量均达 50 kb 以上,表明所得 DNA 的纯度及分子量大小完全符合转化实验的要求。

1.3 导入方法及后代处理

在受体燕麦植株开花后 12 h 内(须先行去雄)用细毛笔蘸取供体 DNA 溶液涂抹受体柱头,10 min 后授以本品种花粉;在田间从第 1 代(D1)开始,按照常规育种程序选育目标性状变异后代,对后代群体主要经济性状进行 t 测验。对 GUS 基因导入后代通过组织化学法及荧光测定法进行酶活性分析。

2 结果与分析

2.1 GUS 报告基因通过花粉管携带法导入裸燕麦及验证

GUS 基因是一种来自大肠杆菌 E-coil 编码 β -葡萄糖苷酸水解酶的基因,它的酶活性可以催化底物 X-Gluc(5-溴-4-氯-3-吲哚葡萄糖醛酸苷)产生一种深兰色的化合物,由于绝大多数植物中没有可检测到的葡萄糖苷酸酶的背景活性,从而可作为标记基因来判断外源基因在各种不同植物细胞组织或器官中的整合与表达,所以 GUS 基因是目前进行转化方法和转化系统研究最常用的报告基因,此基因导入受体细胞后它的酶活性可以方便地通过组织化学方法显示出来,而且也容易进行定量检测。本试验所用 P35SGUS 基因质粒 DNA 由中国科学院遗传所提供,供试浓度为 1 g/L(与基因枪转化法相同),用此 DNA 对冀张莜四号燕麦品种成熟柱头(经提前去雄)进行处理,间隔 10 min 后人工授以本品种花粉,组合编号为 988D。共做 1 290 朵小花,成熟后获 92 粒种子,实验室条件下发芽得 66 个小苗。分别对各小苗叶片取样进行 Gluc(GUS 酶活性

的催化底物)染色观察,从中发现有 3 株小苗叶片的边缘切口处及表面创伤细胞呈现不同程度的兰色反应,转化率为 4.55%(3/66),而未经转化处理的对照小苗共检测 91 株,均为 GUS 阴性,说明上述 3 株转化处理植株的兰色反应是 GUS 基因导入并获得表达的结果。

为了进一步了解其 GUS 基因的表达水平,我们对以上 3 株 GUS 染色为阳性的植株按 Toffeson(1987)的方法进行了荧光测定分析,发现它们的相对荧光强度分别为对照株的 2.58 倍、2.34 倍和 3.75 倍(表 1)。以上结果表明,本研究所用的导入方法是可行的。

表 1 GUS 基因在受体燕麦冀张莜四号植株中的表达

植株	荧光值	对照/处理荧光值
GT1	30.21	100/258
GT2	27.43	100/234
GT3	43.90	100/375
ck	11.70	-

2.2 外源 DNA 导入燕麦及其后代性状表现

1998 年以裸粒小莜麦(2n)、大燕麦(4n)、野燕麦(4n)、皮燕麦(6n)、紫粒小麦(6n)、花生、大豆为供体,以裸燕麦极早熟品种品二号、中晚熟品种冀张莜四号(品五号)和晚熟品种冀张莜五号(品 14 号)为受体共配制导入组合 8 个,共做 6 990 朵小花,成熟后获 453 粒种子;1999 年种植 D1 出苗 257 株,苗期生长表现同受体一致,拔节后呈现明显变异,淘汰劣株选择 209 株单收单脱。2000 年种成株行圃,由于气候干旱影响,986D、987D 2 个晚熟组合未能正常抽穗成熟,对其余 6 个后代组合群体的株高、单株茎数、单株成穗数、单株粒重、主穗长、主穗铃数、主穗粒数、主穗粒重等性状进行调查,结果经 t 测验,发现后代群体性状均值显著或极显著不同于受体群体(表 2)。外源 DNA 的导入处理,改变了受体群体的性状表现,证明了导入处理的有效性。从表 2 中可看出,小莜麦和皮燕麦显著或极显著地提高了受体亲本品二号的株高、主穗长度和主穗铃数,却显著或极显著降低了受体亲本品二号的单株产量;花生、大豆、紫粒小麦 DNA 导入后代除均显著或极显著地提高了受体亲本冀张莜四号的主穗长、主穗铃数和主穗粒重外,花生外源 DNA 导入后代并极显著地提高了冀张莜四号的株高,紫粒小麦显著地提高了受体亲本冀张莜四号的单株成穗数;小莜麦显著降低了受体亲本的株高、提高了主穗铃数,极显著降

低了单株产量。导入后代群体的上述性状变异,为 有效地选育燕麦新种质提供了可能性。

表 2 受体、后代群体(D2)主要数量性状均值及 t 测验

亲本		组合 编号	单株性状				主穗性状			
受体	供体		株高(cm)	单株茎数	单株穗数	单株粒重(g)	主穗长(cm)	主穗铃数	主穗粒数	主穗粒重(g)
品二号			64.68±3.90	4.37±1.64	3.89±1.45	4.64±1.76	12.70±1.35	22.94±3.33	62.55±15.76	1.23± 0.27
品二号	小莠麦	981D	68.20±7.77*	4.82±1.85	4.29±0.83	3.50±1.69*	13.89±2.33*	26.65±3.97**	62.37±14.41	1.32±0.26
品二号	皮燕麦	982D	69.24±4.96**	4.41±0.89	4.12±0.81	3.23±1.31**	14.46±1.81**	27.54±2.81**	64.12±14.78	1.31±0.25
冀张莠四号			89.20±4.81	6.75±3.75	3.40±0.94	6.34±3.07	20.07±1.76	33.57±6.36	86.42±23.24	1.80±0.43
冀张莠四号	花生	983D	94.19±4.72**	5.41±1.32	3.41±1.12	5.30±1.56	21.85±1.43**	40.77±5.56**	97.81±18.15	2.06±0.31*
冀张莠四号	大豆	984D	92.06±4.45	7.14±1.88	3.99±0.88	5.12±1.81	22.39±1.29**	41.46±4.61**	98.20±18.65	2.13±0.24**
冀张莠四号	紫粒小麦	985D	91.56±3.27	8.15±1.36	4.66±0.58**	6.29±1.39	22.07±1.45**	40.84±2.61**	98.60±16.42	2.15±0.35*
冀张莠四号	小莠麦	989D	85.68±8.12*	8.39±2.56	3.48±0.93	3.68±1.36*	20.89±3.20	38.49±8.46*	99.95±28.19	2.03±0.55

注: * 显著, ** 极显著

2.3 优异变异资源的选择

依据 D2 田间生长表现及室内考种结果,在 209 个后代株行中选择优异目标变异系 28 个,2001 年种植为株系圃,通过田间评定及室内考种选择优异变异品系 15 份,与受体亲本性状相比较,使受体在熟期、植株高度、千粒重及产量等重要性状上得到了

显著改善(表 3)。在以早熟矮秆品种品二号为受体的导入后代中,选出了早熟高秆品系 2 个,矮秆大粒品系 1 个,在以高秆中晚熟品种冀张莠四号为受体的导入后代中选出了中早熟高产品系 6 个,早熟矮秆大粒品系 4 个,晚熟高秆大粒品系 2 个。优异变异品系与受体亲本相比较性状得到了如下改进:

表 3 优异变异品系与受、供体主要性状比较

亲本及品系名称	抽穗期(月-日)	株高(cm)	主穗铃数(个)	千粒重(g)	产量比受体±(%)	性状特点
品二号(受体)	07-05	77	19.6	21.4	-	
981D-27	07-08	99	40.4	21.0	+24.1	早熟高秆
小莠麦(供体)	07-12	85	19.0	6.6		
982D-2	07-08	103	36.4	21.2	+48.2	早熟高秆
982D-11	07-05	71	31.0	27.6	+6.0	早熟矮秆大粒
皮燕麦(供体)	07-18	88	22.0	36.0		
冀张莠四号(受体)	07-23	95	50.3	20.8	-	
983D-5	07-16	100	50.0	19.4	+24.1	中早熟
983D-7	07-16	103	54.8	19.6	+19.0	中早熟
983D-22	07-16	98	51.6	20.0	+38.6	中早熟
花生(供体)	-	-	-	-		
985D-1	07-16	98	43.6	19.2	+33.9	中早熟
985D-2	07-16	103	44.8	21.0	+15.0	中早熟
985D-11	07-16	104	33.6	17.0	+46.5	中早熟
紫粒小麦(供体)	07-16	80	-	38.0		
989D-1	07-07	78	18.6	27.0	-10.2	早熟矮秆大粒
989D-11	07-05	76	15.6	26.0	-11.8	早熟矮秆大粒
989D-12	07-07	73	19.4	27.0	-26.3	早熟矮秆大粒
989D-13	07-28	94	47.4	28.5	-27.6	晚熟大粒
989D-17	07-28	96	54.6	27.0	-1.3	晚熟大粒
989D-19	07-05	68	18.22	26.4	-17.1	早熟矮秆大粒
粒小莠麦(供体)	07-12	85	19.0	6.6		

品二号为极早熟种(70~76 d),矮秆(68~80 cm),子粒偏小(千粒重 19~22 g),是一个极好的救灾备荒品种,使其在河北坝上的播种期可推迟到 6

月 20 日,若在其 6 月底至 7 月上旬播种仍能获得一定产量,但因其子粒小植株矮,生物产量低,正常年份农民不愿种植,使其的推广应用受到一定限制。在

其导入后代品系中选到了产量比受体亲本增产6.0%~48.2%,株高增加22~26 cm,千粒重增加6.2 g,主穗增大且熟性相当的新种质3份。

冀张莜四号为中晚熟种(89~98 d),高秆(90~140 cm),子粒偏小(千粒重19~21 g),抗旱抗倒伏,是生产上应用极为广泛的粮草兼用型品种,但因其子粒小,生育期偏长,在生产上应用受到一定影响。从其外源DNA导入后代品系中选到了3类改良型品系,一类为中早熟增产型6份,其熟期比原冀张莜四号提前了7 d,产量提高了15.0%~46.5%,株高相当或偏高;二类为晚熟大粒型2份,其熟期比原冀张莜四号推迟了5 d,千粒重提高6.2~7.7 g,株高相当,明显优于生产上应用的晚熟种冀张莜五号,三类为极早熟大粒型4份,其熟期提前16~18 d,株高降低17~27 cm,千粒重提高5.2~6.2 g。

3 讨论

应用花粉管通道法导入外源DNA可以引起花生、大豆、棉花、小麦等多种作物的性状变异,这已被前人所证实。本项研究应用燕麦作为受体同样获得了比较广泛的性状变异,包括植株形态、生长发育、生理生化、产量构成及成分品质的各个方面,从表型上看这些变异多数来自供体,也有供、受体均没有的,在D1就可以出现并可稳定地遗传给下一代,但可能因其只是某些DNA片段与受体基因组实现了杂交,其基本遗传性状仍是由受体亲本控制,这与其他作物相一致。试验结果中发现燕麦种属内外源DNA导入比其他作物种属间外源DNA导入,其子代表现型变异更为明显,变异率更大,且二倍体品种大于四、六倍体品种,原因可能是种属内供体的基因

组与受体基因组同源关系较近的缘故,有利于外源DNA片段的插入、整合、调控、启动等产生多种多样的变异和遗传,所以在选择供体时应尽可能选择与受体亲源关系较近的供体。试验中还发现外源DNA导入后代的变异中未能出现预期变异后代,例如在以紫粒小麦为供体的后代中未能选到紫粒莜麦,在花生、大豆为供体的后代中未能选到超高蛋白莜麦,可能由于后代群体偏小或亲缘关系偏远,而在以小莜麦为供体的后代中选到了大量极早熟、矮秆、大粒、高蛋白种质,变异呈现多样化超亲遗传。所以我们认为直接转化外源DNA是随机的、不定向的,但在实现了丰富的变异类型后通过选择手段可以达到改变受体遗传性状的目的,实现种质改良。

参考文献:

- [1] 倪万潮,张震林,郭三堆,等.转基因抗虫棉的培育[J].中国农业科学,1998,31(2):8-13.
- [2] 苗保河.外源DNA直接导入大豆遗传变异的研究[J].作物品种资源,1998,(2):21-23.
- [3] 苑保军,周延清,杨青春,等.导入外源DNA选育大豆新品种研究初报[J].华北农学报,1998,13(增刊):40-44.
- [4] 段晓岚,陈善葆.外源DNA导入水稻引起性状变异[J].中国农业科学,1985,(3):6-10.
- [5] 王亚馥,陈克明,焦成瑾,等.外源DNA导入小麦后变异系生物学特性及胚乳蛋白的研究[J].作物学报,1995,24(4):404-411.
- [6] 刘根齐,张孔焜,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.
- [7] 雷勃钧,李希臣,卢翠华,等.外源野生大豆DNA导入栽培大豆及RAPD分子验证[J].中国科学(B辑),1994,24(6):463-467.