

大豆花粉管通道法导入外源 DNA 的 适宜时期与方法探讨*

吴秀红

(黑龙江省农科院合江农科所, 佳木斯 154007)

Preliminary Study on the Suitable Time and Method for Introduction of Foreign DNA into Soybean through Pollen-tube Pathway

WU Xiu-hong

(Hejiang Institute, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Jiamusi 154007, China)

花粉管通道法是由我国科学工作者发展起来的植物转基因技术。自 70 年代, 由上海生物化学研究所的周光宇先生提出后, 20 年来, 我国科学工作者通过该技术创造了一大批新型育种材料, 有些并获得了新的商业品种。花粉管通道法是一个不依赖于组织培养的将外源基因转入受体的简便技术, 易于被许多研究人员应用。有关大豆外源 DNA 直接导入时期与方法虽以陆续有过多报道^[1], 但实际操作起来不同地区还需要根据自己的实际, 不断进行调整和经验的摸索。本文报道黑龙江省农科院合江农科所对大豆进行了外源 DNA 导入的适宜时

期与方法的研究结果, 以此供不同地区从事大豆有关研究的人员参考。

1 导入的适宜时期

1.1 导入的时间

选择大豆开花的盛花期。大豆花蕾自花授粉均发生于清晨, 7:00 自花授粉的花蕾占 97.4%, 8:00 以后, 所有花蕾均已自花授粉, 即 100%^[2]。故 7:00 以后的任何时间均可导入, 但为防止滴于柱头的 DNA 液滴过快蒸发, 最好避开中午 11:00-14:00 的暴晒时期。注意, 如果露水过大或滴完 DNA 液后 34 h 即下雨, 则不宜导入, 否则会影响导入转化率。

表 不同导入部位的成活率

导入花的位置	导入时间	导入花数	成活荚数	成活率 (%)	平均 (%)	导入花的位置	导入时间	导入花数	成活荚数	成活率 (%)	平均 (%)
顶端	1998	53	8	12	19	下部	1998	48	4	8	8
		55	10	18				50	4	8	
		50	9	18				50	3	6	
	1999	51	11	22		51	5	10	8		
		50	10	20			50	3		6	
		50	9	18			50	3		6	
中上部	1998	50	9	18	23	分枝	1998	50	4	8	7
		50	15	30				52	4	8	
		53	10	20				50	2	4	
	1999	49	11	23		50	5	10	4		
		51	13	25			54	2		4	
		51	13	25			54	2		4	

1.2 花的选择

1.2.1 花的部位选择 在盛花期, 选择植株中上部

及顶端的花, 与顶端导入不易成活^[3]略有不同, 下部及分枝上的花不易成活。合江农科所大豆室经过

* 收稿日期: 2000-08-12

基金项目: 本研究为院生物技术中心雷勃钧研究员主持的省科委“九五”重大项目(G96B8-1-01-03)的一部分内容。

作者简介: 吴秀红(1972-), 女, 黑龙江省东宁县人, 硕士, 从事大豆育种研究。

1998-1999 年两年的研究表明(见表):中上部导入成活率最高,顶端第二,远高于下部及分枝。但这里强调一点,顶端导入后,最好把植株生长点及周围不符合标准的小花蕾全部去掉,避免生长点和未导入花萼与导入花萼争夺营养及混杂,而影响成活率、成株率和导入转化率。

1.2.2 花蕾大小的选择 花冠的高度低于最高花萼 0.5 mm 范围内时,二体雄蕊的花药形成一圈将柱头包围其中,此时自花授粉率达 80%,而未授粉率占 20%。花冠高度高于最高花萼 0.51.0 mm 时,几乎所有花蕾均已自花授粉,此时花冠尚未开放^[2]。因此,选花过程中,一定要注意选择花冠高度于最高花萼 0.51.0 mm 范围内的、颜色鲜艳的花蕾。如果花蕾颜色暗淡,虽然花冠尚未开放,但往往是旗瓣萎缩,花冠高度与最高花萼的距离无法估算,此时打开花瓣可以看出花粉和柱头均比鲜艳花蕾的暗淡,说明该种花蕾已经自花授粉完毕或授粉末期,选择这样的花蕾易造成导入转化率的降低。既浪费时间、人力,又浪费较昂贵的 DNA 提取液。与雷勃钧^[4]花冠高度高于最高花萼 0.51.0 mm 时,为自花授粉后 632 h^[4]的论点相同。

2 导入方法

导入方法为切部分柱头与不切柱头两种。本文就多数采用的切部分柱头的方法进行剖析。首先将标准花蕾周围的花去掉,按受体的花色(白色或紫色)将导入方法分为如下两种。

2.1 针对紫色花蕾

用尖镊子分开旗瓣,轻轻夹掉翼瓣和龙骨瓣(保留旗瓣,以托住 DNA 液滴并防止过快蒸发),当花冠的长度低于最高花萼 0.5 mm 至高于最高花萼 0.5 mm 的范围内时,二体雄蕊的花药形成一圈,将柱头包围其中,花冠长度高于最高花萼 0.51.0 mm

时,柱头上落有大量花粉粒,此时打开龙骨瓣,根本就看不到柱头,当把包围于柱头的雄蕊去掉后,柱头上的花粉粒也随之掉落,露出球形柱头,在紫色花蕾映衬下,亮晶晶的柱头非常易见,此时可采取剔、剝、切三种方式实现切掉部分柱头。第一种,刀片(一定要锋利)延花柱向上,剔除部分柱头;第二种,用刀尖将微微弯曲抵在花蕾内侧的柱头剝除一部分;第三种,用未拿刀的一只手的拇指托住弯曲的柱头,延与花柱成 30°-60°角度准确切除部分柱头,然后挂牌,标明日期、该节的导入花数、供体名称,最后滴 DNA 液于柱头。

2.2 针对白色花蕾

用镊子夹掉花瓣,保留花萼,以托住 DNA 液滴,然后用镊子轻轻夹掉包围柱头的雄蕊,露出柱头,以不拿刀的一只手的拇指托住柱头,延与花柱成 30°-60°角度切除部分柱头,然后挂牌,以下同上。

3 田间管理

分别于导入后的第三天和第十天进行检查,去掉后长出的花芽,成熟期调查成活率,注意防止干旱、虫害、鼠害等影响成活率的因素。

上述 DNA 导入的适宜时期和具体方法,是我们在 1998-2000 年 3 年间,通过 20 个组合,2 000 多朵花的导入实践试验、总结的结果,与以往的导入方式存在许多细节上的不同,但是在实践中是行之有效的,仅供参考与讨论。

参考文献:

- [1] 雷勃钧 尹光初 卢翠华,等.外源 DNA 导入大豆的适宜时期与相应的方法[J].中国油料,1991(1):88-89.
- [2] 申家恒 吴国忠,等.大豆自花授粉时花蕾形态特征的观察[J].中国油料,1981,(3):16-20.
- [3] 卢翠华 雷勃钧 钱华,等.提高大豆自花授粉后外源 DNA 导入成活率的探讨[J].黑龙江农业科学,1994,(2):41-42.
- [4] 雷勃钧.中国东北大豆[M].哈尔滨:黑龙江科学技术出版社,1999.

天麻供种培训

栽天麻每平方投 60 元半年获利 300 元。我所长年供高产杂交乌红箭麻、白麻、米麻种公斤价 80、90、100 元,有性种子袋当年产米白麻 2kg 每袋 20 元。萌发菌蜜环菌母种支、原种瓶、栽培种袋分别 15、10、5 元。蜜环菌枝菌棒公斤价 3.2 元。蒴果每只 6 角。3 种天麻有性无性栽培 VCD 每种 80 元。资料 20 项每项 10 元 2 项起寄。正版天麻书 5 册共 40 元。有大型基地参观,现场免费培训随到随学,回收麻种供应产品。

其它:食药菌种、书刊资料 VCD、所有菌需物资 1 000 种。详细说明索要即邮。价格均含邮挂费。

通信汇款:山东金乡真菌研究所(鸡黍) 丁爱英 邮编:272208 电话/传真:0537—8851472 手机:013605476232