

# 利用花粉管通道法获得水稻变异材料<sup>\*</sup>

刘国权, 孟昭河, 刘永巍, 孟巧霞

(黑龙江省农垦科学院水稻所生物技术实验室, 佳木斯 154025)

**摘要:** 1999 年对水稻花粉管通道法转化外源总 DNA 进行了初步研究, 得到 563 粒种子, 2000~2001 年对后代材料进行了详细的观察和分析。结果表明: 应用这种方法转化外源总 DNA 可以得到水稻变异材料, 是一条切实可行、有效的方法。

**关键词:** 水稻; 总 DNA; 花粉管通道; 变异材料

**中图分类号:** S 511.035.2      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1002-2767(2002)05-0007-02

## Obtained Mutative Materials of *Oryza Sativa* by Pollen-tube Pathway

LIU Guo-quan, MENG Zhao-he, LIU Yong-wei, MENG Qiao-xia

(Rice Research Institute of Land Reclamation Academy of Heilongjiang Province, Jiamusi 154025)

**Abstract:** Transferring exterior total DNA into rice by pollen-tube pathway in 1999 obtained 563 seeds. The offspring materials were observed and analyzed in 2000-2001. The results demonstrated that it were able to obtain mutative materials of rice by pollen-tube pathway. It is a effective and practicable method to create mutative material of rice.

**Key words:** oryza sativa; total DNA; pollen-tube pathway; mutative material

花粉管通道法是由周光宇等(1978)建立并在长期科学研究中发展起来的。利用花粉管通道法将外源 DNA 导入受体的技术, 称为“花粉管通道法”(pollen-tube pathway), 其主要原理是授粉后使外源 DNA 能沿着花粉管通道渗入, 经过珠心通道进入胚囊, 转化尚不具备正常细胞壁的卵, 合子或早期胚胎细胞。这一技术原理可以应用于任何开花植物。目前, 通过这一技术已培育出多种植物的新材料并已推广应用。经过三年的试验观察和分析认为, 通过这种方法可以获得水稻变异材料, 是一条切实可行的途径。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

1.1.1 受体水稻材料 垦鉴稻 3 号、垦 98-495、垦稻 8 号、垦稻 7 号、垦鉴稻 6 号、垦 94-1043、垦 98-529、垦 98-562、垦 97-437、垦 83-412、垦稻 10 号、空育 131、藤系 138、绥粳 3 号、延 106、新越光、富士光、星之梦等, 由本所育种室提供。

1.1.2 供体材料 东农 415、垦稻 10 号、世锦、一目惚、新越光、秋田小町、菰、L302(旱稻)、芦苇、V<sub>5</sub>、稗草等, 由东北农业大学和黑龙江省农垦科学院水稻研究所育种室提供。

### 1.2 试验方法

1.2.1 总 DNA 的提取 参考《分子克隆实验指南》和《精编分子生物学实验指南》。用液氮研磨成粉状, 加入 SDS 植物 DNA 提取液(100 mmol/L Tris-Cl, pH8.0, EDTA 100 mmol/L, pH8.0, 250 mmol/L NaCl, 100 mg/L 蛋白酶)65℃、水浴 30 min, 用酚: 氯仿: 异戊醇(25:24:1)抽提 2 次, 用乙醇或异丙醇沉淀 DNA, 用 70%的乙醇清洗 2 次 DNA, 然后融于 TE(Tris-Cl, EDTA, pH8.0 的缓冲液)中。

1.2.2 DNA 的检测和 DNA 浓度的测定 (1)用 1%的琼脂糖凝胶电泳, 5V/cm、120 min; (2)进行紫外检测确保提取液中含有 DNA; (3)紫外分光光度计测定 OD<sub>260</sub>、OD<sub>280</sub>、OD<sub>230</sub> 值, 计算 DNA 浓度和纯度, 1.8≤

\* 收稿日期: 2002-06-27

基金项目: 农垦总局“十五”攻关项目。

第一作者简介: 刘国权(1976-), 男, 黑龙江省人, 农学硕士, 从事水稻生物技术育种研究。

$OD_{260}/OD_{280} \leq 2.0$ ;  $OD_{260}/OD_{230} \geq 2$  即可达到试验要求; (4) 按要求稀释 DNA 浓度使终浓度为  $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ , 贮藏于  $-4^\circ\text{C}$  或  $-20^\circ\text{C}$  冰箱中。

1.2.3 总 DNA 导入方法 试验在温室内进行。(1) 选取水稻开花盛期的稻穗;(2) 在水稻开花时及时用镊子剔除开过的和未开颖花;(3) 在水稻开花后的 1.5~3 h 内, 在内外颖交接处用镊子扒开, 剪掉雌蕊的柱头和花柱(但不能伤及子房);(4) 注入  $5 \sim 10 \mu\text{L}$ 、 $100 \mu\text{g}/\text{mL}$  DNA, 合上内外颖;(5) 套袋, 放入含有水的脱脂棉保湿, 挂上标签, 做好记录;(6) 5 d 后套袋, 适时收获, 按组合分别保存。

### 1.3 田间观察

2000 年和 2001 年对试验材料进行田间观察, 对它们的出苗期、抽穗期、成熟期、分蘖能力、株高、粒型、穗型等进行调查和记录。田间管理与大田管理相似, 秋天收获时每株选取 3 穗, 供室内考种和下一年继续试验。2001 年对收获的 3 穗进行播种, 每穗种 1 行, 行长 12.5 m, 穴距 0.20 m, 行距 0.25 m, 每穴单株, 亲本为对照。

## 2 结果与分析

1999 年试验 49 个组合, 共计 2 103 朵小花, 收获 563 颗水稻种子, 成粒率为 26.77%。2000 年将所得到的种子继续在田间进行试验, 得到 476 株水稻, 成活率为 84.55%。2001 年发现后代材料中在熟期、穗型、粒型、株高等性状均出现了变异, 一共得到 132 株变异材料, 变异率为 4.8%。例如: 在垦 83—412/芦苇的组合中发现 2 株变异株, 在穗型上发生了明显的变异, 由原来的紧穗型变为散穗型; 在垦鉴稻 3 号/L302 的组合中发现有 1 行多数植株发生了变异, 植株变得更高、抗倒能力增强、粒型变长从受体亲本长宽比 1.8 增加到 2.1、熟期变晚; 在垦稻 9 号/L302 的组合中, 发现的变异株更为丰富, 有的植株变矮、有的熟期变早等; 在垦 95—295/芦苇的组合中, 发现 1 株变异株, 植株变高, 穗变大; 其他的组合也有一些变异株。这种较高频率的变异, 不会在自然条件下杂交产生, 更不会是机械人为等因素混杂造成, 可以推断是由于外源 DNA 的参与引起的变异。

## 3 讨论

3.1 花粉管通道法的科学性。在花粉管通道法研究之初, 许多人对此提出疑问, 认为花粉管通道法很难找到分子生物学证据。后来的许多试验证明了花粉

管通道法的可靠性和科学性。1979 年周光宇等发表的“远缘杂交的分子基础—DNA 片段杂交假设的一个论证”一文, 为花粉管通道法导入外源 DNA 的整合奠定了理论基础。目前, 这一方法在吉林省农科院、黑龙江省农科院、黑龙江八一农垦大学等科研单位广泛应用, 并获得了许多水稻变异材料。

3.2 后代材料变异的随机性。根据花粉管通道法的理论, 总 DNA 是随机进入的, 进入之后, 是通过 DNA 片段的交换或者插入很难做出判断和控制, 产生的变异材料具有很大的随机性, 同时具有潜在的丰富性、多向性和不可预知性, 存在变异率偏低, 目的性不强的缺点。如果在把总 DNA 改为目的 DNA, 或者是某些特定的 DNA 片段(如带有抗病基因的 DNA 片段等)产生的后代材料会更加有利于对材料的选拔, 也更容易达到预期的目标, 同时也有利于后代分子生物学检测(如 PCR 检测、southern blot 检测等)。

3.3 类似花粉管通道法的其他方法。例如: 种子浸泡法、浸胚法、胚囊、子房注射法、穗下节注射法等。2000 年, 赵炳然、袁隆平等对水稻孕穗期茎注射野生稻 DNA 变异株系进行了 RAPD 分析, 结果表明变异株系中导入了野生稻 DNA。这些方法大同小异, 同花粉管通道法操作程序也基本相似。首先提取外源 DNA, 然后进行 DNA 的导入, 最后对 DNA 进行检测。在科学研究的过程中, 只有不断的探索研究, 不断的改进或改变试验方法, 通过比较分析, 才能找到更好的方法, 获得理想的育种材料和种质资源。花粉管通道法是一种简单易行的方法, 可打破生物物种之间生殖隔离界限, 拓宽水稻种质资源, 如何高效的利用这种方法, 还需要进一步的研究。

### 参考文献:

- [1] 黄大年. 转基因技术在水稻上的应用[M]. 北京: 中国农业科技出版社 1995, 1-20.
- [2] F. 奥斯特伯 R. 布伦特, R. E. 金斯頓. 精编分子生物学实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1998.
- [3] J. 萨姆布鲁克, E. F. 弗里奇, T. 曼尼阿蒂斯. 分子克隆实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1998, 309.
- [4] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程原理与技术[M]. 北京: 科学出版社, 1998.
- [5] 赵炳然, 袁隆平. 水稻孕穗期茎注射野生稻 DNA 变异株系的 RAPD 分析[J]. 作物学报 2000, 26(4): 424-430.
- [6] 王连铮 戴景瑞. 全国作物育种学术讨论会论文集[C]. 北京: 中国农业科技出版社, 1998.
- [7] 何中虎. 第三届全国青年作物遗传育种学术会论文集[C]. 南京: 中国农业科技出版社 1994.