

利用外源 DNA 直接导入方法 进行大豆抗线育种研究^{*}

田中艳

(黑龙江省农科院盐碱地作物育种所, 安达 151400)

摘要: 提取海滩豆的总 DNA, 在适宜时间通过花粉管通道直接导入受体大豆抗线 2 号, 选育出了抗线虫新品系 安 D205—8。

关键词: DNA; 适宜时间; 花粉管通道; 导入; 抗线大豆新品系

中图分类号: S 565.103.4 文献标识码: A 文章编号: 1002—2767(2003)05—0027—03

Study on the Breeding of Cyst Nematode Resistant by Introducing of Foreign DNA into Soybean

TIAN Zhong-yan

(Saline—alkali Soil Breeding Institute, Heilongjiang Academy of Agriculture Sciences Anda 151400, China)

Abstract: The total DNA of “Haitandou” was extracted and introduced into the soybean “Kangxian No. 2” through pollen—tube pathway in suitable time. A new strain resisting soybean cyst nematode “AnD205—8” was screened.

Key words: DNA; suitable time; pollen—tube pathway; introducing; strain resisting soybean cyst nematode

大豆外源 DNA 直接导入法即利用大豆花粉管通道, 将同物种或其它物种的总 DNA 直接导入受体。此方法系 70 年代由我国的科研工作者周光宇先生首先提出, 近 30 年来, 我国的科研工作者利用此方法先后培育了一大批种质材料, 有的还直接培育出新品种。此方法有效的打破了远缘亲本的不亲和性, 拓宽了作物的变异类型。我所在 1995 年利用此方法将海南省海滩上匍匐生长的豆科植物(以后称海滩豆)的总 DNA 导入到大豆受体中, 现已选育出抗线虫大豆新品系安 D205—8。外源 DNA 导入方法与常规育种相比, 基因变异表达及后代的稳定均快于常规育种, 缩短了育种年限。但它也有缺点, 即成活率较低。外源 DNA 导入方法成活率的高低与导入时期和方法密切相关, 同时又与当地的温度、湿度等条件有关。本文就黑龙江省农业科学院盐碱地作物育种研究所对利用外源 DNA 直接导入技术选育抗线虫大豆品种的研究结果进行报道, 以供参考。

1 材料与方 法

1.1 材 料

海滩豆, 抗线 2 号品种。

1.2 方 法

提取海滩豆的总 DNA, 通过花粉管直接导入受体抗线 2 号。

1.2.1 花的选择 由于底部的荚在后期脱落的概率较大, 易影响成活率。要选择生长健壮的植株, 选择主茎中上部的花朵导入^[1]。选择花冠高出花萼 0.5~1.0 mm、颜色鲜艳的花蕾^[2]。也可选择花冠已打开颜色鲜艳的花朵。

1.2.2 导入的具体操作 首先选择符合条件的花蕾, 将其下一节的花、幼荚及同一节位上的其它不符合条件的花、荚去掉。然后将其上部萼片沿水平方向拉下, 留下部的筒状花萼, 再将花瓣轻轻夹掉。此时可见二体雄蕊的花药已高出柱头, 并将柱头包围。用镊子将二体雄蕊夹掉, 柱头随之显露。然后用左

^{*} 收稿日期: 2003—04—03

基金项目: 省“九五”攻关项目(G96B—1—01—03)

作者简介: 田中艳(1968—), 女, 黑龙江省安达市人, 助理研究员, 学士, 从事大豆抗线育种研究。

手姆指指甲作砧板托住柱头,用食指勾住茎的相应部位,右手拿刀片(此刀片要求锋利、薄,在顶端延与刀刃成 30°角剪下),延与弯曲的柱头成 45°角左右切除 1/3~1/2 柱头。在标签上注明供体名称及导入的花数、节数和时间,将标签挂在导入花蕾的下一节位上。如果一株上有多个节位上的花符合标准,也可同时导入,在标签上要同时注明导入的节数及每节的花数,这样可减少挂标签、写标签的工作量,也便于以后的管理。最后将 DNA 提取液滴于柱头上,液滴不可过大,如超过花萼的承受能力,液滴就会流下来,形成水流的通道,遇到这种情况,可过一段时间,待干后再滴。

1.2.3 田间管理 良好的田间管理也可有效的提高导入成活率。干旱提高大豆的落花落荚比率,因此视土壤墒情适时灌水。我们于 1997 年开始,对导入的花于晚 4:00 以后或次日早晨用邻近的豆叶将其包住,再用牙签别上,这样给导入花蕾形成一个小环境,可对暴露柱头的损伤降低到最小。3 日后打开,以后每隔 7 d 检查一次,检查成活情况及去掉

新长出的花芽,以免收获时混杂。

1.2.4 抗线虫鉴定 导入后代稳定后,在线虫病圃鉴定其抗病性。我国通用的抗病等级标准:根上胞囊数为 0 个,抗病等级为免疫;根上胞囊数为 0.1~3.0 个,抗病等级为高抗;根上胞囊数为 3.1~10 个,抗病等级为中抗;根上胞囊数为 10.1~30 个为中感;根上胞囊数为 30 个以上为高感。

2 结果与分析

2.1 大豆新品系安 D205—8 与受体差异比较

1995 年我所与黑龙江省农业科学院生物中心合作,将海滩豆的总 DNA 导入到抗线 2 号大豆中,D₀ 代得到 10 粒种子,在 D₁ 代时有 8 株荚的宽度比抗线 2 号宽,而且子粒粒径大于抗线 2 号。后代经系谱法选择结合病圃鉴定,选育出了抗线虫新品系安 D205—8。从表 1 中可见,安 D205—8 与抗线 2 号(受体)在花色、叶形、茸毛、结荚习性、粒色、脐色、粒形、抗病虫上没有变异,而在百粒重上有很大变化,比抗线 2 号增加了 25.9%;D205—8 蛋白质、脂肪含量与抗线 2 号(受体)基本一致,没有受到海滩

表 1 海滩豆、抗线 2 号、安 D205—8 有关性状比较

性状	海滩豆(供体)	抗线 2 号(受体)	安 D205—8(导入后代)	性状	海滩豆(供体)	抗线 2 号(受体)	安 D205—8(导入后代)
百粒重(g)	43.2	17.8	22.4	结荚习性	无限	无限	无限
蛋白质(%)	27.82	38	38.30	粒色	黑褐色	黄色	黄色
脂肪(%)	0.76	20.54	20.96	粒形	椭圆	圆	圆
茎	匍匐	直立	直立	脐色	黑褐色	褐	褐
花色	粉色	白	白	SCN		抗	抗
叶形	圆	圆	圆	红蜘蛛		抗	抗
茸毛	无	灰	灰				

豆(供体)的影响。

2.2 导入的最佳时期

大豆每天开花的高峰期是早晨 7:00 左右,8:00 以后授粉基本完毕^[3]。因此从 7:00 既可以进行导

入,但从我们几年的导入结果看,11:00~13:00 导入效果最好,这与以前的报道不同^[4](见表 2)。从表 2 中可见,13:00~15:00 这段时间导入成活率也很高,此时间段的转化率低于 11:00~13:00。

表 2 不同时间导入 DNA 荚的成活率

年份	导入时间	导入花朵总数 (个)	成活荚数 (个)	成活率 (%)	年份	导入时间	导入花朵总数 (个)	成活荚数 (个)	成活率 (%)
1995	7:00—9:00	67	2	3.0	1997	7:00—9:00	52	2	3.9
	9:00—11:00	66	3	4.5		9:00—11:00	48	2	4.2
	11:00—13:00	68	4	5.9		11:00—13:00	53	6	11.3
	13:00—15:00	—	—	—		13:00—15:00	50	5	10
1996	7:00—9:00	68	1	1.5	1998	7:00—9:00	50	1	2
	9:00—11:00	68	3	4.4		9:00—11:00	49	1	2.0
	11:00—13:00	67	5	7.4		11:00—13:00	51	6	11.8
	13:00—15:00	—	—	—		13:00—15:00	52	6	11.5

2.3 抗线虫鉴定

导入后代 D₄、D₅ 时在线虫病圃鉴定其抗病性。

首先用 5 个标准鉴别品种 Picktt、Peking、PI88788、PI90763、Lee68 按 Riggs 等(1998)的标准确定土壤中

线虫生理小种类型^[3] (见表3), 各鉴别寄主根上胞囊数为 Picktt 4.8 个、Peking 5.1 个、PI88788 2.4 个、PI90763 3.6 个、Lee68 62.4 个, 结果显示我所土壤线虫生理小种类型为 3 号。安 D205—8 根上胞囊数平均 1.4 个左右, 再根据我国通用的抗病等级标准确定为高抗 3 号生理小种大豆品种, 与抗线 2 号相同。

2.4 大豆新品系安 D205—8 特征特性

表 3 大豆胞囊线虫生理小种在鉴别品种上的反应

生理小种	在鉴别品种上的反应				生理小种	在鉴别品种上的反应			
	Pickett	Peking	PI88788	PI90763		Pickett	Peking	PI88788	PI90763
1	—	—	+	—	9	+	+	—	—
2	+	+	+	—	10	+	—	—	—
3	—	—	—	—	11	—	+	+	—
4	+	+	+	+	12	—	+	—	+
5	+	—	+	—	13	—	+	—	—
6	+	—	—	—	14	+	+	—	+
7	—	—	+	+	15	+	—	+	+
8	—	—	—	+	16	—	+	+	+

注: 胞囊指数= (供试品种平均每株根上的胞囊数或雌虫数)/ (感病品种 Lee 根上的平均胞囊数或雌虫数)×100。胞囊指数小于 10 记为“—”号; 胞囊指数等于或大于 10 记为“+”号, 表示感病。

3 讨论

3.1 如果用海滩豆与大豆有性杂交, 是很难得到杂交种子的, 而利用外源 DNA 直接导入方法进行大豆育种, 有效的克服了远缘亲本间杂交的不亲合性。

3.2 用外源 DNA 直接导入方法选育大豆品种, 由于是在自花授粉的基础上, 是部分 DNA 片段或目的重组分子进入受体基因组, 避免了供体与受体基因的全面重组, 易于稳定。D205—8 即是在第二代稳定, 后经系谱法选择结合病圃鉴定选育而成。

3.3 外源 DNA 直接导入方法育种也存在缺点, 成活率低。通过选择适宜的导入时间、操作手法及完善的后期管理可以提高成活率。

参考文献:

[1] 吴秀红. 大豆花粉管通道法导入外源 DNA 的适宜时期与方法探讨[J]. 黑龙江农业科学, 2001, (2): 48-49.

[2] 雷勃钧. 中国东北大豆[M]. 哈尔滨: 黑龙江科学技术出版社, 1999. 462

[3] 申家恒, 严国忠. 大豆自花授粉时花蕾形态特征特性的观察[J]. 中国油料, 1981, (3): 16-20.

[4] 王志新. 影响大豆 DNA 导入受体幼荚成活率因素的初探[J]. 黑龙江农业科学, 2000, (4): 10-11

[5] Riggs, R. D. Complete characterization of the race scheme for *Heterodera glycine*[J]. Journal of Nematol. 1998, 20(3): 392-395.

该品系抗大豆胞囊线虫 3 号生理小种。株高 90 cm, 无限结荚习性, 分枝 1 个左右, 圆叶、灰毛、花白色, 粒黄色、圆形、脐褐色, 百粒重 22.4 g 蛋白质含量 38.30%, 脂肪含量 20.96%, 抗旱性强, 耐盐碱, 对红蜘蛛有一定的抗性, 产量为 200kg/667m² 左右。

实用新技术 助您快致富

一、名副其实的《实用技术》报。《实用技术》报四开四版, 激光照排, 胶版印刷, 专刊当代实用新技术, 包括工业、农业、加工与保鲜及信息、网络等。年 12 期刊出 200 多项可操作性很强的实用技术, 读后即可使用, 用之则能创造可观的财富和效益。随时可以起订、补购。年价 15 元, 1995—2002 年 8 年报价 120 元, 如全购可优惠 30%, 汇 84 元即挂寄。可先付邮资 2 元索目录 (含样报 7 期)。

二、推出 41 套当代实用新技术系列资料。包括:《螺旋藻开发利用系列技术资料》、《中国实用技术“失效专利”精选》、《待业人员再就业门路及技术项目精选》、《城乡实用技术 600 项》、《实用热门技术 300 项》、《高新实用热门技术汇编》、《实用工艺品制作》、《实用热门产品制作教材》、《工艺模具制作大全》、《实用华工小商品制作专辑》、《丝网印刷技术培训教材》等成套技术资料。付邮资 2 元索目录和简介。

三、惠供《求富者名录》。本名录由本院 (报) 部分来函和汇款单整理而成, 共分 17 册, 总计 80500 名。千名 50 元, 一次购 2 万名以上, 优惠 20%, 全购优惠 50%。

信款寄: 232001 安徽淮南洞山 中安科技研究院 王桂泽
电 话: 0554—6648209、6650000
E-mail: syjsb@163.net