

# 花粉管通道法在玉米自交系改良中的应用<sup>\*</sup>

祁永红

(黑龙江省农科院玉米研究所, 哈尔滨 150086)

**摘要:** 就几年来花粉管通道法在玉米自交系改良中的应用情况加以概括, 提出了导入方法的适宜细则, 对后代变异情况加以论述, 并对今后该项工作的开展提出几点建议。

**关键词:** 花粉管通道法; 玉米自交系改良; 外源 DNA 导入

**中图分类号:** S 513.035.3   **文献标识码:** A   **文章编号:** 1002-2767(2006)03-0017-03

## the Application of the Pollen Tube Pathway Method in Maize Inbred Improvement

QI Yong-hong

(Maize Research Institute, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086)

**Abstract:** The application of the pollen tube pathway method in improving maize inbred lines was summarized in this paper. The method of increasing the introduction efficiency was also discussed, the variant traits of the progenies from this method were described, and several proposals for future study were mentioned.

**Key words:** pollen tube pathway method; improvement of maize inbred lines; exogenous DNA introduction

目前, 我国玉米自交系的主要来源为单交种组合(二环系)占 42.3%, 综合种或群体占 13.4%, 地方品种占 12.6%, 回交占 10.6%。我国玉米杂交种的亲本种类较少, 种质遗传基础较为狭窄, 玉米杂交种的产量提高水平进展缓慢, 因此, 拓宽种质基础是玉米育种长期的重要任务。随着生物技术的发展, 农业分子育种已从梦想走向探索研究阶段, 并将成为现实, 但由于目前对植物遗传背景了解有限, 目的基因的分离和转移有很大困难; 同时, 为了避免研究与应用的脱节, 从现行遗传育种的应用角度考虑, 我们采用了周光宇先生首创的外源 DNA 直接导入技术即花粉管通道法<sup>[1]</sup> 探讨玉米自交系的改良, 通过对外源种质的引入达到拓宽玉米种质基础的目的。

### 1 根据玉米的花器结构探讨导入方法

#### 1.1 导入所需设备及操作要点

##### 1.1.1 导入工具 一把医用手术刀、一个微量滴管

和 DNA 的存放及灭菌等辅助设备。

1.1.2 操作要点 由于玉米的花柱比较长, 在外源 DNA 导入前必须对果穗进行整理, 用手术刀割去大约距穗轴顶端 1~2 cm 的花丝和苞叶, 为使滴入的外源 DNA 不流出来, 要去掉苞叶里面的花丝, 使其低于苞叶, 注意不要伤着果穗; 因为玉米的花丝比较多, 为使其充分接收 DNA 溶液, 滴入的 DNA 溶液量一定要充分, 一般每穗 0.5~1.0 mL, 在不同时间段分别滴入等量的 DNA, 以提高转化效率和试验准确性; 在进行外源 DNA 导入操作步骤中要严格控制外来花粉的侵入, 以免影响试验的可靠性。

#### 1.2 导入时间的选择

由于花粉管通道法利用的是花粉萌发后形成的花粉管通道, 何时花粉萌发, 何时形成管道以及何时管道关闭等对外源 DNA 的进入、转化都有影响。因此, 我们从玉米的花器结构及授粉、受精等特点进

\* 收稿日期: 2006-04-03

基金项目: 哈尔滨学科后备带头人基金项目(2002AFXJ040)

作者简介: 祁永红(1963-), 女, 黑龙江省尚志市人, 副研, 从事玉米育种研究。Tel: 0451-86673117; E-mail: qi yong hong@126.com.

行探讨。玉米是单性花,所以可以人为控制授粉的时间,玉米的花粉落到柱头上几分钟就可萌发,再经过十几个小时就可授精,2~3 d后花丝就萎蔫。在借鉴前人经验的同时<sup>[2,3]</sup>,我们设计了授粉后12~26 h的不同时间段来进行导入的方案,考虑到DNA

溶液高温容易蒸发的的问题,所以把导入时间放在晚上或早晨。经几年摸索,可看出年季间气候影响导入效果;能够产生变异的时间为授粉后12~24 h。导入时期在上午8:30之前,22:00以后都可产生变异,导入次数1~2次都有变异发生(见表1)。

表1 不同年份导入时间及变异情况

| 项目           | 1993年 | 1994年      | 1995年 | 1996年 | 1997年 | 2002年 | 合计 | 百分率(%) |
|--------------|-------|------------|-------|-------|-------|-------|----|--------|
| 导入时期(授粉后时间h) | 22-26 | 18-23      | 20-22 | 18-20 | 20-22 | 12-20 | -  | -      |
| 变异时间(h)      | 22-24 | 18-23      | -     | -     | -     | 12    | -  | -      |
| 变异时期         | 8:30  | 7:30, 8:30 | -     | -     | -     | 22:00 | -  | -      |
| 导入次数         | 1     | 2          | -     | -     | -     | 1     | -  | -      |
| 导入组合数        | 4     | 10         | 3     | 3     | 19    | 7     | 46 | -      |
| 变异组合数        | 1     | 5          | 0     | 0     | 0     | 1     | 7  | 15.2   |

## 2 导入后代的变异情况

### 2.1 对变异率的影响

导入后代的变异多发生在D<sub>1</sub>、D<sub>2</sub>代,因此统计到D<sub>3</sub>代如表1所示:年季间转化效率不同,这也许

表2 不同变异组合的变异率

| 变异组合                | 变异率                   |
|---------------------|-----------------------|
| 2691×丰收11(22h)      | $9.19 \times 10^{-3}$ |
| 2691×丰收11(24h)      | $6.53 \times 10^{-4}$ |
| 746×M017(23h)       | $1.1 \times 10^{-3}$  |
| 抗甸11×紫玉米(18-19h)    | $3 \times 10^{-3}$    |
| M017×抗甸11(23h)      | $5.5 \times 10^{-3}$  |
| 抗甸11×高粱(18-19h)     | $6.4 \times 10^{-3}$  |
| M017×大豆兴隆93-95(12h) | $8.47 \times 10^{-3}$ |

与气候条件有关,由于近几年的温室效应,使得授粉期温度过高,DNA溶液易蒸发,6年的导入组合只有

表3 大豆丰收11 DNA导入辐2691变异株系生理指标

| 样品       | CK    | 1     | 2     | 3    | 4     | 5     | 6     | 7     | 8     | 9     | 10    |
|----------|-------|-------|-------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 粗蛋白含量(%) | 10.96 | 12.40 | 11.26 | 9.88 | 11.77 | 11.29 | 12.10 | 12.27 | 11.07 | 12.57 | 13.67 |

表4 亲本及后代间细胞结构的异同

| 结构      | 供体  | 受体   | 变异系1 | 变异系2 | 结构       | 供体  | 受体  | 变异系1 | 变异系2 |
|---------|-----|------|------|------|----------|-----|-----|------|------|
| 表皮细胞物质  | 丰富△ | 液泡化○ | 丰富△  | 丰富△  | 上表皮细胞大小  | 小△  | 大○  | 小△   | 小△   |
| 表皮细胞外侧壁 | 加厚△ | 未加厚○ | 加厚△  | 未加厚○ | 上表皮细胞一致性 | 一致△ | 一致○ | 一致△○ | 一致△○ |
| 叶肉细胞排列  | 紧密△ | 疏松○  | 紧密△  | 紧密△  | 下表皮细胞大小  | 小△  | 大○  | 大○   | 大小△○ |
| 维管束排列   | 紧密△ | 疏松○  | 紧密△  | 紧密△  | 下表皮细胞一致性 | 一致△ | 一致○ | 一致△○ | 不一致  |

从表4看出,两个变异新品系从结构上多数与供体相似,对其它变异组合的后代变异情况没有进行更深入的探讨,但从田间的形态特征表现看都或多或少的具有双亲的特点,而同时又有自己的特异性。

15.2%的变异产生,而每一变异组合的变异率也有所不同(见表2)。从表2看出,只要产生变异,其变异率除在24时是 $10^{-4}$ ,其余都在 $10^{-3}$ 左右。

### 2.2 对变异性状的影响

外源DNA的导入变异后代,不论从形态特征,生化指标还是细胞结构都发生了变化,如大豆丰收11 DNA导入辐2691的变异后代中,形态特征如叶型、株型、株高和子粒等都有不同程度的变化,对其后代进行生化指标分析粗蛋白含量,除一个品系下降外,普遍提高(见表3)。最高可提高2.71个百分点,为玉米品质育种提供了良好的途径。而形态特征表现明显差异的如紫玉米DNA导入抗甸11的两个变异后代明显像供体,但果穗类型保留受体的特性,对其亲本及后代细胞结构进行电镜观察发现,供体、受体及后代间存在明显变化(见表4)。

## 3 导入后代的处理

### 3.1 导入后代的种植群体数量及取舍世代

由于目前受生物技术水平和各种条件的限制,转化效率比较低,这样导入后代的种植必须保证一

定的群体数量,双株或分批种植,以防止导入材料丢失,且每株都必须严格自交授粉,在整个生育期观察后代变异情况。

从几年的试验观察,导入外源 DNA 产生的变异多发生在 D<sub>1</sub>、D<sub>2</sub> 代, D<sub>3</sub> 代性状充分分离,从遗传学的角度解释,若整合的为显性基因则 D<sub>1</sub> 代即表现出来,若整合的有隐性基因,则需自交纯合后,方能表现出来,若整合的为 DNA 片段,则部分性状发生变化。因此低世代材料尽量不要舍去,到 D<sub>4</sub> 代大量淘汰。

### 3.2 导入后代的筛选

基因是以 DNA 片段形式存在,不像有性杂交那样产生杂种优势,只产生某些性状优势变异。因此,对于特别高大的植株有可能操作不严,应视具体情况进行取舍,要区分变异株系和后代分离株系,以便准确的统计变异率。虽然利用花粉管通道技术打破了物种间的界限,将优良外源基因导入玉米自交系中,但产生变异后代的类型特别丰富,各种变异性状都有理论研究的价值,但侧重应用研究的育种工作者须利用常规育种技术进行种质资源鉴定评价,筛选优良性状,为杂交组合的组配提供良好的基础材料。

## 4 讨论和建议

4.1 花粉管通道法已成为目前转基因的有效技术手段之一<sup>[5~7]</sup>,特别是从育种家角度考虑,既简便又实用。通过导入外源总 DNA 确实可以产生变异,虽变异目的性不强,但可以从中筛选很多有利用价值

的变异类型,在目前条件下可以利用。

4.2 不同种间的遗传物质的交换,通过花粉管通道法可以实现,如玉米的蛋白质含量只有 8%~10%,而通过导入大豆的 DNA,可以产生高蛋白的类型,拓宽了玉米基础材料种质资源。

4.3 利用花粉管通道法转移外源 DNA 的具体细则,例如何时导入效果最佳有待进一步探讨。根据经验,晚上因气温较低, DNA 中溶液不易蒸发,把导入时间改在傍晚效果较好。若前一天 20:00~21:00 左右授粉,第二天 16:00~18:00 导入外源 DNA,导入时间为授粉后 19:00~22:00,此时的花粉未开,需要把花粉保存在冰箱里,以获得较好的变异结果。

4.4 今后做此项工作时应记录环境条件,以便探讨外界环境对转化效果的影响。

### 参考文献:

- [1] 周光宇. 农业分子育种[J]. 中国农业科学, 1988, 21(3): 1-6.
- [2] 耿庆汉. 小麦 DNA 导入玉米引起性状变异的研究[J]. 内蒙古农牧学院学报, 1992, 13(1): 14-21.
- [3] 董延瑜. 外源 DNA 导入技术在植物分子育种上的应用研究[J]. 湖南农学院学报, 1994, 20(6): 513-521.
- [4] 雷勃钧. 外源 DNA 直接导入大豆的研究[J]. 大豆科学, 1991, 10(1): 58-63.
- [5] 王昱, 张艳贞, 魏松红, 等. 1, 2 花粉管通道法将 Bt 毒蛋白基因导入优良玉米自交系[J]. 吉林农业大学学报, 2002, 24(4): 40-44.
- [6] 崔良国, 刘开昌, 汪黎明, 等. 谷子 DNA 导入玉米创造变异及其利用的研究[J]. 山东农业科学, 2002, (3): 18-20.
- [7] 杜娟, 王昱. 玉米生物技术育种的研究[J]. 玉米科学, 2003, (2): 28-31.
- [8] 陈英, 曹毅, 蒋彦, 等. 转基因玉米的遗传转化方法研究[J]. 四川草原, 2000, (1): 51-55.

## 《黑龙江农业科学》征稿启事

凡是投到《黑龙江农业科学》双月刊的文章,本刊先从撰写规范进行审查。审查通过后,方可进入学术审查程序。为了你的论文能及时进入学术审查程序,请参阅如下撰写规范:

- 1 是否是课题?如果是,请提供课题名称和编号,这将会使你的论文尽早发表。凡属于课题(无论哪一级政府或部门下达的课题)的论文,本刊优先送审,优先录用。
- 2 研究报告、试验报告必须交代清楚试验时间和地点;试验材料和试验方法。
- 3 必须提供第一作者简介,包括出生年份、籍贯、最终学历和职称、研究方向;同时,务必提供作者电子信箱、办公室电话、移动电话和详细通信地址。
- 4 必须有中英文摘要和关键词。中英文摘要写成 400 字以内的报道性摘要,即把目的、方法、结论和结果以数据或要点的形式放在摘要中。
- 5 必须有参考文献。参考文献应标注在正文引用处。参考文献必须符合著录规范。见本网站以及本刊发布的《黑龙江农业科学》参考文献征稿简则。
- 6 文中计量单位要符合国家标准。
- 7 所有表格必须成三线表。所有坐标图表要求用 excel 软件制作,并带上数据库。
- 8 凡是因课题鉴定、成果验收、博士出站、硕士答辩以及紧急用于职称晋升的学术论文,请投稿时务必说明最晚发表期限,以免延误。
- 9 本刊实行电子信箱投稿,请将稿件以附件形式发送(E-mail: nykx13579@sina.com),投稿时请用 word 软件排版,以附件形式发送。没有条件进行电子信箱投稿的,也可以邮寄磁盘。
- 10 凡是电子信箱投稿者,本刊在工作日内实行即时回复,请作者及时打开信箱查看本刊回复修改意见,并及时回复。电子信箱投稿后,3 日内未见本刊回复者,请及时与本刊电话联系(0451-86668373)。

《黑龙江农业科学》编辑部