

外源 DNA 导入高粱的叶部病害变异及其分子验证

王黎明

(黑龙江省农科院作物育种所, 哈尔滨 150086)

摘要:通过花粉管通道, 将抗叶部病害能力强的热带高粱 DNA 导入后, 有 27 个导入后代的抗病性有所提高, 占导入后代的 9.1%。其中有 5 个导入后代的抗病性提高了 2 级, 3 个导入后代的抗病性提高了 3 级, 显著地提高了受体的抗病性。表明供体 DNA 片段已通过花粉管通道进入受体, 并对受体基因的表达产生影响。此项技术实现了地理远缘的品种间的遗传物质转移, 丰富了遗传类型。

关键词:高粱; 外源 DNA 导入; 叶部病害; 分子验证

中图分类号: S 514.034

文献标识码: A

文章编号: 1002-2767(2007)03-0001-03

Leaf Diseases Resistance Variation and Its RAPD Check of Sorghum Transferred Progenies by Exogenous DNA Introduction

WANG Li-ming

(Crop Breeding Institute, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086)

Abstract: Exogenous DNA with leaf diseases resistance of tropical sorghum was introduced through pollen tube pathway. 27 transferred progenies' diseases resistance were increased, accounting for 9.1%, in which 5 transferred progenies' diseases resistance increased 2 grade and 3 transferred progenies' diseases resistance increased 3 grade. The disease resistance of receptor was increased significantly. This indicated that, donor DNA fragment had inserted into receptor through pollen tube, and affected the expression of genes in receptors. This technique realized the transference of inheritable matter between varieties of distant geography, and made the inheritable types abundant.

Key words: sorghum; exogenous DNA introduction; leaf diseases; RAPD check

0 前言

近年来, 在高粱主产区叶部病害发生较重的田块, 几乎看不到有活秆成熟的植株。由于叶部病害的严重发生, 在高粱开花、灌浆和乳熟期, 因同化器官的破坏, 制造光合产物机能的丧失, 养分输导机能不畅, 而使干物质不能正常积累, 不仅导致籽粒早衰、千粒重降低, 影响籽实的商品价值, 而且还使植株机械组织过早衰老而失去韧性, 造成倒伏。

高粱叶部病害包括真菌性和细菌性病害两类, 前者主要有炭疽病 [*Colletotrichum graminicola* (Cesati) Wi (Son)]、大斑病 (*Helminthosporium turcicum* Pass)、紫斑病 (*Cercospora sorghi* Ellis &

Everhart), 后者主要有条纹病 [*Pseudomonas an-dropogoni* (E. F. Smith) stapp]、条斑病 [*Xanthomonas holcicola* (Elliott) Starr & Burkholder]。上述病害通常是混合发生的, 其中以炭疽病发生较多, 且危害较重^[1]。

通过花粉管通道进行外源 DNA 导入的技术, 可以进行常规育种难以做到的品种间杂交, 实现目的基因的转移^[2~6]。热带高粱的抗病性普遍高于中国类型高粱, 但由于热带高粱的生育期较长, 与当地高粱难以通过常规有性杂交的方法进行品种改良, 因此, 将热带高粱 DNA 通过花粉管通道导入到当地高粱中, 可以有效利用热带高粱的抗叶部病害能

收稿日期: 2006-12-05

基金项目: 国家“863”项目 (2001AA241232)

第一作者简介: 王黎明 (1968-), 女, 哈尔滨市人, 硕士, 副研究员, 从事高粱育种研究。E-mail: dawnw@126.com.

黑龙江
农业科学

力,提高当地高粱的抗病性。

1 材料与方 法

1.1 供试材料

抗叶部病害的热带高粱为供体,不抗病的当地高粱为受体。

1.2 试验方法

DNA 的提取:用氯仿—异戊醇—核糖核酸酶法提取 DNA。导入方法:于高粱开花授粉后,切掉柱头,将外源 DNA 滴于切口处。

2 结果与分 析

2.1 导入后代的抗病性变异

将含有抗病基因的热带高粱外源 DNA 导入后,在导入的 298 个后代中出现了不同程度的抗病性提高,各导入后代抗病性提高等级见表 1。

表 2 抗病性提高 2 级以上的导入后代

受体		供体		后代	
名称	抗病性	名称	抗病性*	抗病性	提高等级
307B	3	741	1	1	2
30B	5	IS3547	1	2	3
克 R42	4	IS3547	1	2	2
西甜	3	MORCANE	1	1	2
7384	5	IS3547	1	2	3
7384	5	R473	2	3	2
319	5	741	1	2	3
319	5	NORKAN	2	3	2

从表 2 中可以看出,利用外源 DNA 导入方法可以显著提高受体的抗病性,导入后代有 5 个抗病性比受体提高 2 级,而 30B、7384 及 319 导入后代的抗病性比受体提高了 3 级,对叶斑病的抗性由高感提高到抗病,极显著地改变了受体的抗病性。常规育种中, F_1 代叶斑病的抗性一般介于父母本之间,且多偏向于母本。从这些抗病性明显提高的导入后代中可以看出,后代的抗病性介于供体和受体之间,并偏向供体。

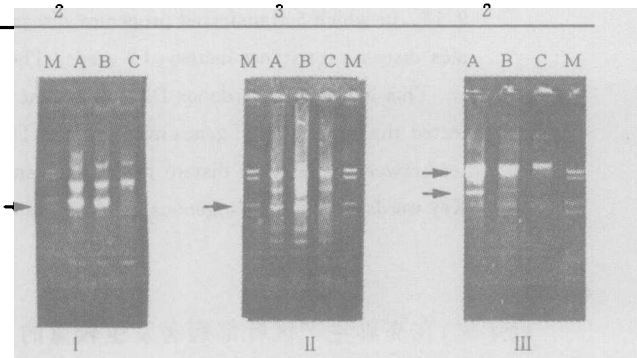
2.2 导入后代的 RAPD 分子验证

后代扩增共用引物 90 个,扩增产物存在稳定差异的引物有 3 个,占所用引物的 3.3%,分别是 OPF₀₂、OPM₀₅、OPM₁₅。其中 OPF₀₂ 在 1 000 bp 处、OPM₀₅ 在 1 100 bp 处、OPM₁₅ 在 1 500 bp 和 1 400 bp 处后代的扩增产物出现了供体具有而受体没有的特异带(见图 1)。说明供体 DNA 片段已通过花粉管通道进入受体,并对受体基因的表达产生影响。供体片段进入受体后,可能发生遗传重组,也可能由于 DNA 片段的进入影响了受体基因组中某个或某几个基因的表达,使导入后代发生变化,在 RAPD 扩增产物中出现多态性。

表 1 导入后代的抗病性变异

抗病性提高等级	变异后代数量	占导入后代总数%
0 级	271	90.9
1 级	19	6.4
2 级	5	1.7
3 级	3	1.0

导入后代中出现了不同程度的抗病性提高的结果,大多数抗病性提高的导入后代,其农艺性状也有较大变异,但也有少数导入后代,其农艺性状改变较小,而只是抗病性提高了。导入后代中抗病性比受体提高 1 级的有 19 份,占导入后代的 6.4%;提高 2 级的有 5 份,占 1.7%;提高 3 级的有 3 份,占 1.0%。抗病能力提高的导入后代共 27 份,占导入后代的 9.1%。其中有 8 份导入后代的抗病性提高了 2 级以上,具体组合及抗病性提高结果见表 2。



I 引物 OPF₀₂ 的扩增结果,引物序列 5'-GAGGATCCCT-3'; II 引物 OPM₀₅ 的扩增结果,引物序列 5'-GGGAACGTGT-3'; III 引物 OPM₁₅ 的扩增结果,引物序列 5'-GACCTACCAC-3'; M: DNA 分子量标准 PUCMix, 片段长度: 1116, 883, 692, 501/489, 404, 331, 242, 190, 147, 111/110bp; A: 供体; B: 导入后代; C: 受体; 箭头所示为多态性片段

图 1 特异 RAPD 引物扩增

3 讨 论

3.1 导入具有抗叶病能力强的热带高粱 DNA 后,使当地高粱的抗病性出现了不同程度的提高,说明利用花粉管通道法进行高粱的抗病性改良是可行的,实现了地理远缘的品种间的遗传物质转移,有效地利用了热带高粱的抗病性。在变异后代中,有的

后代只是抗病性提高了,而其农艺性状变化较小,因此,在进行品种选择时,应尤其注意对这类材料的选择,提高选择的有效性。

3.2 导入后代的变异率并不是很高,这主要是由于外源基因的导入具有很大的随机性,无论是外源 DNA 穿过细胞壁进入核内,还是外源 DNA 和受体 DNA 的整合都是随机的,在一定程度上影响了导入的转化率。因此,可适当人为地使 DNA 断裂,增加供体 DNA 与受体 DNA 的接触和整合几率。另外,也可增加 DNA 导入的强度,包括不同途径的配合、DNA 处理浓度和次数的增加等,以胁迫受体更有效地吸收整合外源遗传物质,提供丰富的变异材料。

3.3 扩增产物中出现的多态性,说明供体 DNA 片段已进入受体,外源 DNA 导入后,产生抗病性提高的变异后代,且多偏向于供体的抗病性,可能由于供体 DNA 片段被整合进入受体基因组,使受体的遗

传基础产生改变,从而引起性状变异,并出现供体性状。另外,受体整合了供体 DNA 片段之后,会引起基因调控作用及基因的相互作用发生改变,从而引起导入后代产生多种变异。

参考文献:

- [1] 杨晓光,杨镇.高粱叶斑病抗性观察研究[J].辽宁农业科学,1993,(4),38-40.
- [2] 洪亚辉,董延瑜,赵燕,等.密穗高粱 DNA 导入水稻的研究[J].湖南农业大学学报,1999,25(2),87-91.
- [3] 向平安,洪亚辉,董延瑜.高粱 DNA 导入水稻的 RAPD 分子验证[J].湖南农业大学学报,1999,25(1):6-8.
- [4] 雷勃钧,钱华,李希臣,等.外源 DNA 直接导入法的大豆分子育种成效[J].大豆科学,2001,(1),26-29.
- [5] 薛淮,刘敏,张纯花,等.花卉分子育种研究进展[J].生物工程进展,2002,(2):81-84.
- [6] 王才林,赵凌,宗寿余,等.用花粉管通道法将 bar 基因导入水稻获得可遗传的基因植株[J].江苏农业学报,2002,18(3),129-137.

提高小尾寒羊成活率的措施

1 接生护理

羔羊的接生护理是提高羔羊成活率的重要环节。要提高羔羊的成活率,首先要注意产房的保暖和卫生。出现难产,要找出原因及时纠正并助产,否则羔羊在产道内时间过长会引起窒息死亡。对于出现假死现象的羔羊,要把羔羊倒挂,轻轻拍打羔羊背部和胸部,使羔羊复苏,并及时清除羔羊身上的及口内的粘液,让母羊自由舔食舔干。当羔羊未自然扯断脐带时,要用消毒剪距腹部 5~8 cm 处剪断,并用碘酊消毒,以防发生脐带炎。

2 产后母羊护理

为了预防乳房炎或利于排乳,做好在母羊产前 15 天,每天用温水洗母羊乳房,并轻轻按摩母羊乳房。母羊分娩后,因失水过多,待休息片刻后应及时饮温水 1.0~1.5 L。在母羊刚产羔羊后的前 2 d,要减少精料的饲喂量,只饲喂易于消化的优质干草和块根饲料,3 d 后再逐渐恢复哺乳期的日粮。母羊分娩后的前 10 d 最好饮温水。

3 哺好初乳

羔羊初生 1 h 内,要尽快让羔羊吃上初乳。因为初乳中含有丰富的营养物质和抗体,具有抗病和轻泻的作用。对于弱羔羊及母性较差的羔羊,可采取人工哺乳。对于母性较差又拒哺的母羊,可采取人工保定母羊,强行授乳,这样连续强行授乳几次,母羊就会授乳羔羊。如果羔羊产出后,母羊因病死亡,可喂人工初乳。制作方法是:鲜奶 1 kg,鲜鸡蛋 2~3 个,食盐 10 g,鱼肝油 30 mL 混匀,加温 39℃~40℃

即可饲喂。

第 1 次初乳饲喂量为 50~80 g。

4 找保姆

对于多羔、母乳不足的母羊可找保姆羊代乳。找保姆羊时,可将保姆羊的乳汁涂在羔羊的头部和后躯,混淆保姆羊的嗅觉,让其接受哺乳。如果保姆羊仍不可授乳,可进行强行授乳,连续几次强行授乳后,保姆羊即可接受代哺羔羊,自行喂乳。

5 人工喂乳

对于多羔、母乳不足,又找不到保姆羊的情况,可采用人工喂乳。人工乳最好用鲜牛奶、鲜羊奶,奶中添加适量的鱼肝油或胡萝卜汁。人工喂乳要注意卫生,喂乳前后,喂乳器要进行严格的清洗和消毒。喂乳要定时、定量、定温、定质。喂乳量:全天喂初生重的 1/6~1/5,每天饲喂 6 次,10 d 后饲喂 4~5 次,20 d 后饲喂 3~4 次。

6 补饲和运动

为了增强羔羊的体质,促进瘤胃发育,羔羊出生后 15 d,开始训练其吃草吃料,要给予味香可口,易于消化的优质饲草饲料。待羔羊能正常吃草吃料时,要注意补饲精料。羔羊 1~2 月龄,日补饲精料 100 g 左右;3 月龄,日补饲精料 150~200 g;10 日龄后,中午要在羊舍进行日光浴,并适当运动;20 日龄后,即可随母羊就近放牧。

7 卫生保健

注意羔羊舍和哺乳卫生,根据需要可适当投服土霉素 1 片/次,预防脐带炎、肺炎和羔羊痢疾的发生。注意随时观察羔羊,及时发现疾病,对症治疗。

(吉林省大安市龙沼镇农科站 薛玉华)