

外源 DNA 导入技术在作物育种中的应用与验证

吴丽丽

(黑龙江省农业科学院 佳木斯分院, 黑龙江 佳木斯 154007)

摘要:主要介绍了外源 DNA 导入技术的方式、应用实例及导入植株后的可行性验证方法。

关键词:外源 DNA 导入; 验证; 育种

中图分类号:S510.35; Q781

文献标识码:A

文章编号:1002-2767(2010)04-0003-02

外源 DNA 导入技术是分子育种的一个常用手段,以其简便、快捷的特点逐渐被育种者广泛应用。外源 DNA 导入技术打破物种界限,可以解决常规育种难以克服的困难,也可以将分子育种与常规育种结合起来,缩短育种时间,培育出符合需要的新品种。

1 外源 DNA 导入方式

随着基因工程研究的不断深入,外源 DNA 导入受体细胞的方法越来越多,在单、双子叶植物中均取得了很大的进展。其中最常用的技术是花粉管通道法,该方法因其操作简单和适用于多种单、双子叶植物以及育种时间短等特点,在植物遗传转化研究和作物育种上有重要的应用价值。该技术在我国应用最广泛,它能较为明显地扩大作物的变异范围,在作物育种上取得了良好的效果。

此外,还有穗茎注射法、花粉转化法、幼胚浸泡法、茎端枪击法(粒子枪法)、DNA 注射幼胚法、DNA 浸泡愈伤组织或胚状体等方法^[1]。不同的方法各有其优点,利用这些方法已获得了水稻、小麦、棉花、大豆、玉米、高粱、烟草^[2]等几十种转基因植株。

2 外源 DNA 导入技术在作物育种中的应用

祈永红^[3]利用花粉管通道法将大豆 DNA 直接导入自交授粉后的玉米自交系中,试验结果表明,玉米自交授粉后 22 h 导入外源 DNA 所产生的变异率最高,其变异性状较丰富,既具有供体性状的类型,也有新产生的类型,且多数性状在 D₄ 代即能稳定。试验表明,通过高蛋白材料 DNA 的导入可以改良受体的品质。李岩等^[4]将玉米自

交系丹 340、巴西抗病杂交种 DNA 分别导入到自交系 7922 和 E28 中,获得株高、穗位高显著降低的改良自交系;将大豆 DNA 导入玉米自交系黄 428,选育出干物质明显增加的改良自交系。

李希臣等^[5]将早熟大豆绥农 8 号导入黑农 26,获得了稳定早熟的转化后代 D92-1072、D92-1035。江巨鳌等^[6]应用“改良浸种法”将玉米、西洋参 DNA 导入大豆,结果表明,该导入方法可降低导入当代种子发芽率、出苗率,导入后代在生育期、株高、单株结荚数、百粒重、节数、种脐色、蛋白质和异黄酮含量等性状上产生广泛变异,且许多变异性状在早世代就能迅速稳定遗传,并进一步探讨了这些性状的变异特点。同时,为了提高育种效率,提出了导入后代的选择方法。

王永斌等^[7]以 C₄ 植物光合速率高、根系发达、抗逆性强的玉米黑 301 为供体,高产水稻品种龙梗 4 号为受体,将供体总 DNA 采用花粉管通道技术直接导入受体,获得在光合特性上产生变异的 2 种后代类型,并从中选出多个优良品系。

倪建福等^[8]利用花粉管通道法将具有高光合效率的 C₄ 植物高粱的 DNA 导入普通小麦陇春 13,成功的选育出了高产、抗逆、耐盐碱小麦新品系 89122,较原受体增产 21.06%,在盐碱地比当地主栽品种 V26 增产 10.5%,比原受体增产 22.5%,同时 89122 的光合效率明显提高。

王黎明等^[9]利用花粉管通道导入技术,将不能进行常规有性杂交的生育期长、茎秆多汁、含糖量高的热带高粱总 DNA 导入到黑龙江省当地高粱品种中,7.9% 的导入后代茎秆含糖量有所提高。

闫春吟^[10]等利用外源 DNA 导入生物技术,并结合病圃连续定向培育,获得的棉花新品系 95-562、95-481,经大面积重病地试验示范,不仅对棉花枯萎病表现出良好的抗(耐)性,尚兼有丰

收稿日期:2010-02-01

作者简介:吴丽丽(1981-),女,黑龙江省双城市人,硕士,研究实习员,主要从事玉米育种研究。Email:lili_0451@yahoo.com.cn.

产、优质性。进而验证了该技术用于棉花抗病育种的可行性。

3 外源 DNA 直接导入植物的分子验证

对外源 DNA 整合到植株的验证一般采用形态学观察、RAPD 分析、PCR 及 Southern 杂交检测以及生化分析等方法。

3.1 形态学观察

祁永红^[3]经过连续 5 代的观察发现,大豆 DNA 的导入引起的变异株性状在后代遗传表现非常复杂,变异性状主要表现在株型、株高、生育期、果穗轴色等,其中有单一性状的变异,也有多性状的同时变异,变异后代性状有恢复正常的,有稳定的,还有继续分离的,大多数性状 D₄ 代即稳定,唯有果穗轴色的分离较复杂, D₅ 代才稳定下来。从 D₃ 代的分离比例,粉:红:白为 9.0:4.6:3.0 来看,控制玉米果穗轴色的基因遗传很可能为隐性上位遗传。

3.2 RAPD 分析

王永斌等^[7]对通过花粉管通道技术将玉米 DNA 导入水稻所获得的水稻后代进行了 RAPD 分析,结果表明,从 60 个引物中找到 12 个引物检测出 DNA 的多态性,证明外源 DNA 导入受体后引起后代基因组的显著变异。

倪建福等^[8]通过 RAPD 鉴定表明,利用花粉管通道法将具有高光合效率的 C₄ 植物高粱的 DNA 导入普通小麦陇春 13,高粱基因组部分片段已经整合到了小麦染色体中。

3.3 PCR 检测及 Southern 杂交

周思军等^[11]采用农杆菌介导的大豆子叶节转化系统成功地将 *Bt* 基因导入大豆。从发芽 5~7 d 的大豆无菌苗切取子叶节外植体,经过培养基培养后,70 d 左右生根,生根后的再生植株移入盆中,所有植株均能正常开花结荚。在移栽成活的 8 株 T₀ 植株中有 7 株 PCR 检测呈阳性反应,在 7 个 T₁ 株系中有 4 个株系存在 PCR 阳性植株。对 4 个 T₁ 代株系内的阳性植株的叶片提取 DNA,用地高辛标记的 *Bt* 基因探针进行 Southern 杂交分析,结果表明 4 个株系均呈现阳性,证明 *Bt* 基因已整合到受体大豆的基因组内并能传递给后代。

3.4 同工酶分析

同工酶是基因表达的产物,同工酶有差异,说明相应的基因结构和功能有所不同。同工酶作为

一种生化标记正在应用于作物育种领域。同工酶分析技术具有简便、经济、快速、准确等优点,对导入后代进行同工酶酶谱分析,可以从生化角度证明外源 DNA 片段被整合到受体基因组中,为农业分子育种提供理论依据。

王黎明等^[9]将热带高粱总 DNA 导入到黑龙江省当地高粱品种中,7.9% 的导入后代的茎秆含糖量有所提高。通过对部分导入后代的过氧化物酶及酯酶同工酶分析结果表明,外源 DNA 片段已整合到受体基因中,并得到表达。此项技术可作为甜高粱常规育种的一个辅助手段。

卢翠华等^[12]报道了利用花粉管通道技术,将芸豆、玉米的总 DNA 导入大豆的试验结果及采用不连续双垂直板聚丙烯酰胺凝胶电泳法,对其导入后代进行过氧化物酶及多酚氧化酶的酶谱分析。结果表明,远缘材料的外源总 DNA 导入大豆,其后代发生明显变异,过氧化物酶和多酚氧化酶酶谱发生了变化,说明了外源遗传物质已转移到大豆基因组中,并且得到表达。

外源 DNA 直接导入技术,克服了常规育种的一些障碍,缩短了育种时间,能发挥广大育种工作者的积极性。这一技术在育种实践中的广泛应用,为高层次基因工程的发展打下坚实的基础。

参考文献:

- [1] 周建林,李达模,李宗道. 外源 DNA 直接导入植物的分子育种技术概述[J]. 农业现代化研究,1996,17(4):237-239.
- [2] 胡文明,徐翠莲,王岳光. 花粉管通道介导外源 DNA 导入技术的研究与应用[J]. 安徽农业科学,2007,35(36):11773-11774.
- [3] 祁永红. 大豆 DNA 直接导入玉米自交系的研究[J]. 玉米科学,2000,8(1):34-36.
- [4] 李岩,徐娥. 导入外源 DNA 改良玉米自交系[J]. 杂粮作物,2006,26(3):159-161.
- [5] 李希臣,雷勃钧,卢翠华,等. 早熟大豆外源 DNA 导入的 RAPD 分子验证[J]. 大豆科学,1994,13(2):152-156.
- [6] 江巨鳌,麻浩,周治森. 应用改良浸种法将外源 DNA 导入大豆的遗传育种效应研究[J]. 湖南农业科学,2004(2):10-13.
- [7] 王永斌,孟庆勇,刘传雪. 玉米 DNA 导入水稻的 RAPD 分子验证[J]. 生物技术通报,2009(增刊):136-139.
- [8] 倪建福,令利军,欧巧明,等. 外源 DNA 导入小麦的分子育种实践[J]. 麦类作物学报,2005,25(5):27-31.
- [9] 王黎明,阴秀卿,焦少杰,等. 利用外源 DNA 导入技术创新甜高粱种质[J]. 作物品种资源,1999(2):12-14.
- [10] 闫春吟,杨品海,杨世刚. 外源 DNA 导入技术在棉花抗病育种上的应用[J]. 新疆农垦科技,2002(3):40-41.
- [11] 周思军,李希臣,刘昭军,等. 通过农杆菌介导法将 *Bt*(cry-IA) 基因导入大豆[J]. 大豆科学,2001,20(3):157-162.
- [12] 卢翠华,雷勃钧,韩玉琴,等. 芸豆和玉米总 DNA 导入大豆及后代同工酶酶谱分析[J]. 大豆科学,2000,19(2):174-179.

植物异源单体附加系鉴定方法研究

马 兰

(黑龙江省农业科学院 大庆分院,黑龙江 大庆 163316)

摘要:植物异源单体附加系是利用外源基因进行品种改良和基因组研究的重要材料。综合阐明了形态标记、细胞学标记、生化标记、分子标记和原位杂交技术在鉴定植物异源单体附加系中的作用,并对各种技术的优缺点进行了综合比较。

关键词:植物异源单体附加系;形态标记;细胞学标记;生化标记;分子标记;原位杂交

中图分类号:Q943 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-2767(2010)04-0005-02

植物异源单体附加系(Monosomic Alien Addition Lines, MAALs)是通过物种间杂交及回交等手段,将2个亲缘关系较远物种中一物种的1条染色体附加到另一物种中而形成的。人们最早发现MAALs是在1924年,Leighty等^[1]通过小麦与黑麦的远缘杂交获得了带有毛颈的小麦-黑麦5R异附加系。目前,已在马铃薯、水稻、甜菜、番茄、大葱、小麦和燕麦等作物中创建了整套的MAALs。随着MAALs种类和数量的不断增加,如何对MAALs进行准确鉴定就显得十分重要。MAALs的鉴定主要是确定外源染色体的存在,可通过形态标记、细胞学标记、生化标记、分子标记和原位杂交等方法对外源染色体进行追踪。

1 形态标记

外源染色体的存在,使得MAALs表现出与整倍体不同的形态特征。形态标记可以利用与外源遗传物质相关的植株外部形态特征,如株高、穗

重等对外源遗传物质进行鉴定。该方法简便、直观、可靠,能够筛选出涉及不同外源染色体的异附加植株,一直是外源染色体鉴定的初步手段和首要依据。但是形态标记又具有数目有限、多态性差、受季节及环境的影响大等缺点。因此,多与其它标记共同使用。周仲华等^[2]以叶片形态为标记,与分子检测相结合,成功鉴定了索马里棉单体附加系。

2 细胞学标记

细胞学标记通常包括有核型分析和带型分析2种,是染色体鉴定的传统方法。核型分析通过对根尖体细胞染色体计数、形态特征观察和花粉母细胞减数分裂中期I染色体配对行为分析等,研究供试材料的染色体数目和结构变异,实现对外源染色体的初步鉴定。王长有等^[3]利用染色体计数成功区分了普通小麦与披碱草衍生后代中的MAALs。刘炜等^[4]通过花粉母细胞减数分裂观察,对大白菜-甘蓝异附加系染色体数目进行鉴定。随着流式细胞仪的诞生,在染色体大小和碱基比例适当的情况下,可运用流式细胞技术识别外源染色体。然而染色体核型分析却无法确定附加的染色体具体为哪一条。染色体分带技术则能

收稿日期:2010-01-25

作者简介:马兰(1980-),女,黑龙江省五常市人,硕士,研究实习员,从事作物育种研究。E-mail: malan042999@163.com。

Application and Verification of Exogenous DNA Introduction in Crop Breeding

WU Li-li

(Jiamusi Branch of Heilongjiang Academy Agricultural Sciences, Jiamusi, Heilongjiang 154007)

Abstract: The way of exogenous DNA introduction, application examples and the methods of verification after the exogenous DNA introduced in to plants were major introduced.

Key words: exogenous DNA introduction; breeding; verification