

# 外源 DNA 导入大豆获得一不育材料\*

赵丽梅 刘德璞 孙 寰 袁 英 黄 梅

(吉林省农业科学院大豆所)

## 提 要

获得不育系的途径有许多,如远缘杂交,自然变异,无性系变异等。本试验以吉林 20 号大豆为受体,采用花粉管通道导入技术,导入远缘材料鹰咀豆(*Cicer L. arieticum*)总体 DNA,于 D<sub>2</sub> 代获得一不育变异株 D8804-7,通过对该材料雌雄育性进行的一系列研究,初步认为,D8804-7 材料为雌雄育性均不正常,自交可结少量种子,不育性可自交保持的不育材料。

**关键词** 大豆;不育;外源 DNA 导入;花粉管通道

获得植物不育系的途径有许多,除了可以从自然群体中找到外,亦可通过远缘杂交等途径获得,这在水稻、小麦、高粱、大豆等许多作物中都有成功的先例。随着科学技术的发展,试验手段的不断完善,利用组织培养、原生质体培养、遗传操作等手段,通过植物体细胞无性系变异获得不育系也取得了可喜的进展。赵成章等<sup>[1]</sup>在水稻中利用原生质体培养与辐射相结合的方法,获得了核质互作的水稻雄性不育系,并实现了三系配套。李修庆等利用原生质体培养获得了林烟草胞质雄性不育突变体,并发现这一不育突变可能与线粒体 DNA 的变异有关。此外,在玉米和马铃薯的无性系中均观察到了线粒体 DNA 有变异。Anna M. Koltunow 等(1990)<sup>[2]</sup>将专门出现于花药中而且与毡绒层有关的 TA-29 基因分离出来并将其与 Barnase 基因和 Barnase 蛋白酶抑制剂基因结合,形成嵌合基因,将它们导入烟草和油菜获得了不育系和恢复系,而未转化株则是保持系,这是目前世界上最成功的一例采用纯遗传操作获得的“三系”。

利用授粉后形成的花粉管通道,直接导入外源 DNA 来转化受精卵前后细胞这一技术,在小麦、水稻、棉花等作物上应用,均获得了良好的育种效果,先后获得了一批抗病、优

\* 本文于 1994 年 9 月 10 日收到。

This paper was received on Sep. 10, 1994.

质、高产的品种和种质资源,同时也有一些关于产生不育材料的报道,于元杰(1991)<sup>[3]</sup>将披碱草 DNA 导入小麦产生了不育株,万文举等(1991)<sup>[4]</sup>将玉米 DNA 导入水稻也产生了不育株。然而对不育产生的机制、不育材料的遗传学特性没有做进一步的研究。

我们于 1988 年以吉林 20 号大豆为受体,试验以远缘材料做为外源 DNA 的供体,采用花粉管通道法导入,以期获得不育系,现将研究结果报告如下。

## 材料与方 法

1. 材料:受体为大豆品种吉林 20 号,供体为鹰咀豆。

2. DNA 提取纯化和导入:DNA 的提取是参照陈永强<sup>[5]</sup>的方法,稍加改进进行的,经紫外分光光度计和琼脂糖凝胶电泳测其纯度、浓度和分子量,使其符合导入要求。导入是在大豆自花授粉 7 小时后(下午三点后),切去柱头,将 DNA 导入液(浓度 300 $\mu$ g/ml)滴在柱头上,使 DNA 沿花粉管通道进入胚细胞。

3. 花粉粒观察:采用 I<sub>2</sub>-KI 染色法

4. 花粉活力测定:采用花粉萌发试验,在 18-20℃ 条件下进行。培养基为:15%,蔗糖 + 0.05% HBO<sub>3</sub> + 水。于上午 10 时,取花药将花粉粒抖入培养基中,置于适宜的温度下,1 小时后在显微镜下观察花粉粒萌发情况。

## 试验结果

### 一、不育材料的获得及各世代的表现

1988 年以吉林 20 号大豆为受体,导入属间材料鹰咀豆总体 DNA,在 D<sub>1</sub> 代获得农艺性状的变异,其 D<sub>2</sub> 代出现一新的变异株 D8804-7,株高 76 厘米、结荚 16 个,成熟时叶子仍浓绿,显现出不育系所具有的某些特征。1991 年播种 14 粒,成苗 5 株,其中三株未结荚,另两株共结 12 粒种子,混脱,1992 年全部播种,成苗 6 株,仍全部表现上代特征,结实情况见表 1。

表 1 1992 年 D8804-7 单株后代结实情况

Table 1 Pod-fertility of single D8804-7 progeny plants in 1992

株号 Plants	单株结实情况 Pod fertility No. /per plant
D8804-7-1	15
D8804-7-2	21
D8804-7-3	16
D8804-7-4	16
D8804-7-5	21
D8804-7-6	5
∑	15.7

1993 年种成株行、由于雹灾影响,只收获 4 个株行共 18 株,结实情况见表 2。

表 2 1993 年 D8804-7 单株后代结实情况  
Table 2 Pod-fertility of D8804-7 progeny plants in 1993

株号 Plant	单株荚数 Pod No. /per plant	单株粒数 Grain No. /per plant
D8804-7-1-1	15	39
D8804-7-1-2	10	17
D8804-7-1-3	11	14
D8804-7-1-4	丢失	
D8804-7-1-5	23	33
D8804-7-1-6	18	23
D8804-7-1-7	6	9
D8804-7-2-1	19	24
D8804-7-2-2	3	3
D8804-7-2-3	10	15
D8804-7-2-4	11	18
D8804-7-2-5	7	11
D8804-7-2-6	6	8
D8804-7-3-1	11	15
D8804-7-3-2	9	17
D8804-7-6-1	9	13
D8804-7-6-2	3	3
D8804-7-6-3	2	2
D8804-7-6-4	4	4
$\bar{x}$	9.83	14.87

连续四年的种植结果表明,所有单株均表现不育的特征,而且这种不育性是可以遗传的,并可通过自交保持。

## 二、 $I_2-KI$ 染色试验

鉴于 D8804-7 所表现出的不育特征,我们采用  $I_2-KI$  染色法观察其花粉的育性。在  $I_2-KI$  溶液中,可染色的花粉百分数很高,基本与对照吉林 20 号相同,分别为 96%、98.4%,但花粉粒的密度低,对四个花药的花粉粒数量进行统计,结果见表 3。

表 3 D8804-7 花粉粒染色试验(四个花药)

Table 3 The test of staining pollen grain (4 anthers) in D8804-7

材料名 Materials	可染色花粉粒数 No. of stainable	不染色花粉粒数 No. of unstained	总数 Total	染色率% Rate
D8804-7	1025.5	42.2	1067.7	96
吉林 20 号	1644	26	1670	98.4

从表 3 可见,D8804-7 四个花药的花粉粒数比其原始亲本吉林 20 号大为减少,只有

它的 63.9%。从染色情况看, D8804-7 的花粉似乎是正常的, 但其大小却存在显著差异, 明显大于吉林 20 号。它的直径为 28.67 微米, 而吉林 20 号为 21.82 微米。花粉粒的形状也相当不规则。正常植株的花粉粒为三个发芽孔, 而它却有相当数量的 4-5 个发芽孔的花粉粒, 花粉粒间还有相互粘连的现象(见图版 I)。

### 三、花粉粒萌发试验

进一步对 D8804-7 的花粉进行发芽试验, 以观察它的花粉活力。吉林 20 号花粉在培养基中萌发的迅速而整齐一致, 培养 1 小时后的花粉管长度是花粉粒直径的 20-30 倍, 花粉萌发率为 79.97%。而 D8804-7 花粉粒萌发很慢, 且不整齐, 花粉管长短不一, 长度仅为花粉粒直径的 1-5 倍, 萌发率仅为 8.01%, 这说明 D8804-7 花粉活力是很低的(见图版 I)。

### 四、杂交试验

为对 D8804-7 的雌雄育性做进一步的了解, 1992, 1993 两年进行了杂交试验, 杂交工作是由技术熟练的常年杂交成功率至少在 30% 以上的技术人员进行, 以 D8804-7 为父本, 以吉林 20 号为母本做了 37 朵花, 均未成活, 这说明其雄性育性的确不好。以 D8804-7 为母本进行两年的杂交试验结果列于表 4

表 4 以 D8804-7 为母本的杂交试验结果

Table 4 The result of pollination test used D8804-7 as female

杂交年份	父本名称	杂交花数	结荚数	成活率%
Year	Name of father	No. of pollinated flowers	No. of fertility pods	Rate
1992	吉林 20 号	77	0	0
1992	吉林 21 号	17	0	0
1993	吉林 20 号	46	1	2.2
总计		140	1	0.7

共做了 140 朵花只活一荚, 成功率为 0.7%, 这样低的成功率表明该材料的雌性育性也不佳。该材料的雌雄配子为何不育, 尚未做进一步的研究。

## 讨 论

1. 大豆导入属间材料鹰咀豆[Cicer L. Arieticem]外源 DNA, 产生了不育变异, 该变异株雌雄育性均不正常, 但自交可结少量种子, 不育性可自交保持。该不育材料可做为进一步遗传研究的试材, 如它的花粉为何能被 I<sub>2</sub>-KI 染色, 但又不能发芽? 雌雄配子都不育, 为何自交又能结少量种子? 这也是下一步我们要做的工作。同时, 通过对该材料的改造有可能使其具有一定的实用价值。

2. 远缘杂交可以产生不育, 在本研究中导入远缘外源 DNA 也得到了不育后代, 并且可以遗传, 这说明外源 DNA 导入产生了与远缘杂交相同的效果, 即通过此途径获得不育材料是可行的。

将目的基因分离出来,然后导入受体,获得目的基因的表达,这在许多研究中已经获得成功,例如,在大豆上导入抗阿特拉津的目的基因,已获得了抗性植株<sup>[6]</sup>。如果能够找到不育的目的基因,并将其分离出来,然后导入受体是可以定向转育出不育材料的。

许多研究表明,植物的胞质不育基因存在于线粒体基因中,在这方面我们也做了些工作,提取高粱胞质不育系的线粒体 DNA,导入大豆,于 D<sub>2</sub> 代的一个株行,出现了不育株变异,对该材料的遗传研究,正在进行中。

### 参考文献

- [1] 赵成章等,1991,水稻体细胞无性系变异特点及其应用,《植物体细胞无性系变异与育种》,江苏科学技术出版社,142—149
- [2] Anna M. Koltunow, et al., 1990, Different Temporal and Spatial Gene Expression Patterns Occur During Anther Development, American Society of Plant Physiologists, Vol. 2, 1201—1224
- [3] 于元杰等,1991,外源 DNA 导入小麦引起性状变异的研究,第二次全国分子育种会论文
- [4] 万文举等,1991,玉米 DNA 导入水稻获得种质变异,第二次全国分子育种会论文
- [5] 陈永强,1979,植物组织 DNA 提取的一种快速方法,遗传,1(1):39—40
- [6] 菲克强,1990,植物基因工程进展、植物生物技术和作物改良,中国科学技术出版社出版 P5—14

## A STERILE MATERIAL OF SOYBEAN GAINED BY INTRODUCING EXOGENOUS DNA

Zhao Limei Liu Depu Sun Huan Yuan Ying Huang Mei

(Soybean Institute Jilin Academy of Agricultural Sciences, Gongzhuling 136100)

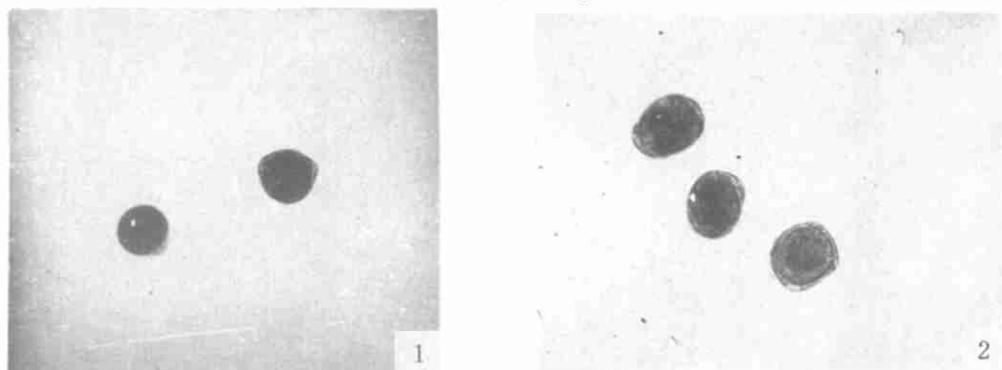
### Abstract

There are many ways to gain sterile variant, for example, distant hybridization, natural variation, clonal variation, et. A sterile variation plant (D8804—7) was gained in D<sub>2</sub> generation by introducing total DNA of *cicer L. arvensis*, into cultivated soybean Jilin No. 20 through pollen tube pathway technique. Through studies on the variant, it is primarily suggested that the D8804—7 variant is a material in which the fertility of both male and female are not normal, but sterility can be maintained by self pollination and a few seed can be formed.

**Key words** Soybean; Sterile; Exogenous DNA introduction; Pollen tube pathway

赵丽梅等:外源 DNA 导入大豆获得一不育材料

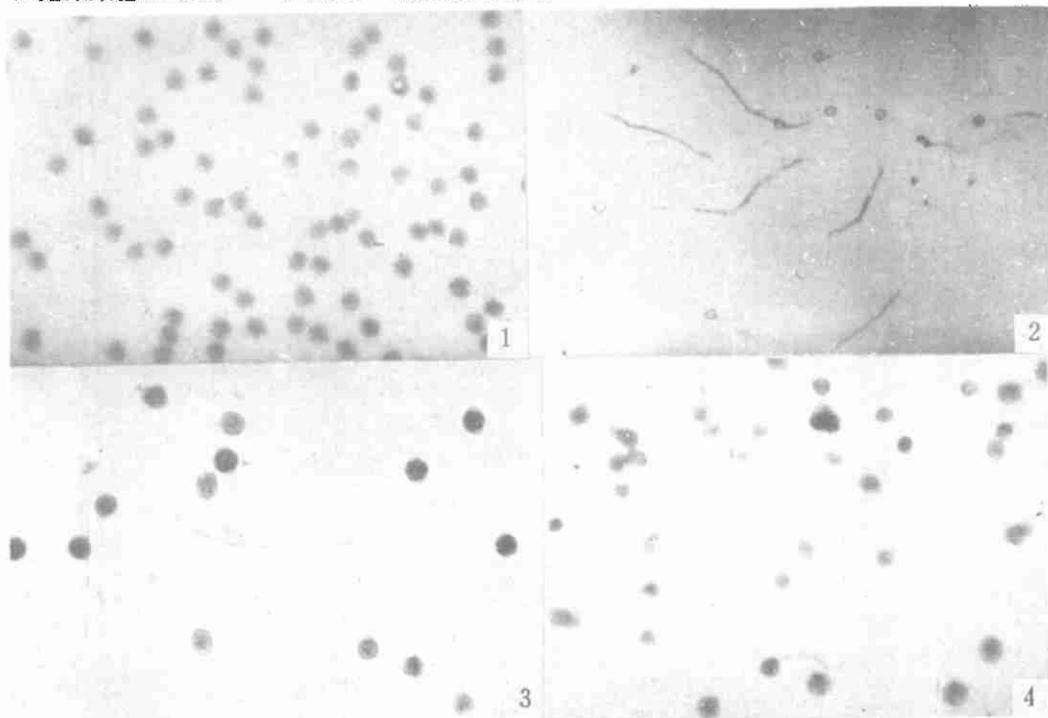
Zhao Limei et al. : A sterile material of soybean gained by introducing exogenous DNA



图版 I 花粉粒的大小、形成及发芽孔的数量

Plate I Size shape and germination pore number 1. 对照 吉林 20 号 2. D8804-7 不育变异株

1. Check, Jilin No. 20 2. D8804-7, Sterile variant



图版 II 发芽前后的花粉粒 Plate II Pre- and post-germination pollen grains 1, 2; 吉林 20 号发芽前后的

的花粉粒 1, 2; Pre- and post-germination pollen grains in Jilin No. 20. check. 3, 4; D8804-7 不育变异株

发芽前后的花粉粒 3, 4; Pre- and post-germination pollen grains in sterile variant of D8804