

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,导入远缘材料鹰嘴豆(*Cicer L. arietice*m)总体 DNA,于 D₂ 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^[1]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)^[2]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)^[3]将披碱草 DNA 导入小麦产生了不育株,万文举等(1991)^[4]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^[5]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 μ 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 I₂-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% H₂BO₃ + 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 D₁ 代获得农艺性状的变异,其 D₂ 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
\bar{x}	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. Arieticeum]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_2 -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^[6]。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 D₂ 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)

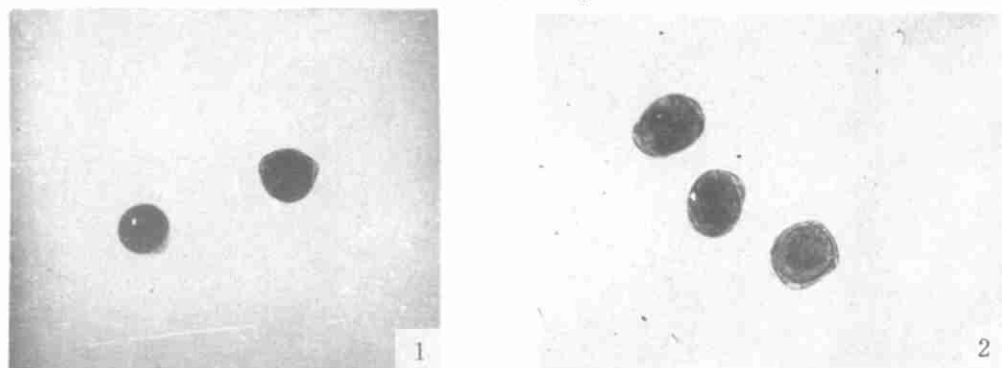
Abstract

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 D₂ generation by introducing total DNA of *cicer L. arietlicem*, 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

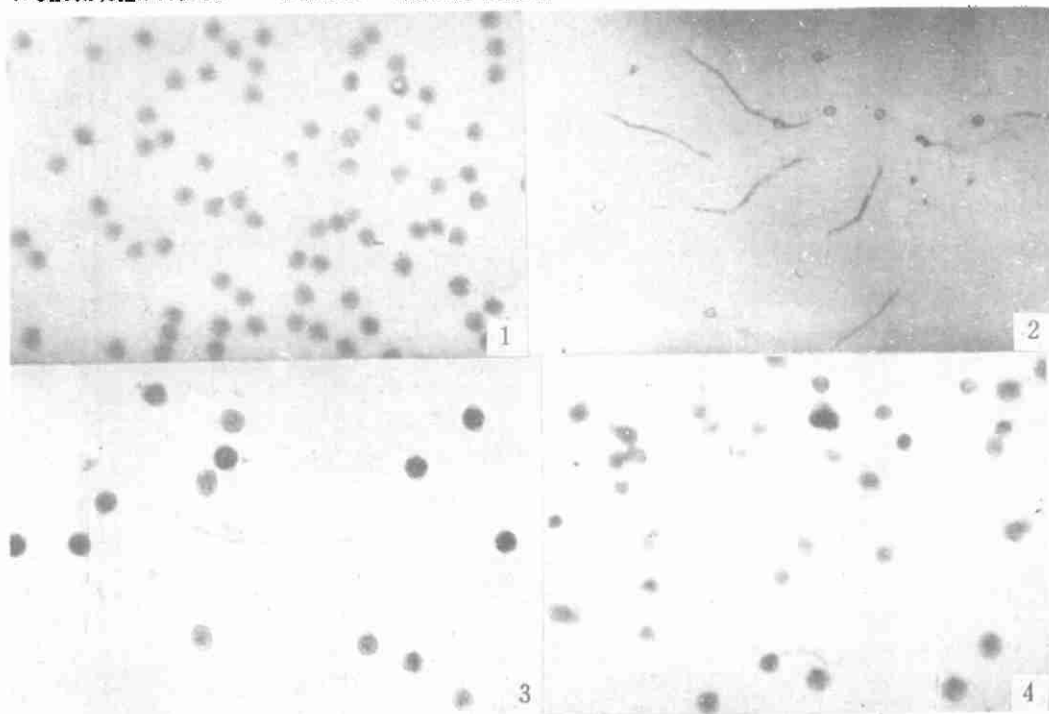
Zhao Limei et al. : A sterile material of soybean gained by introducing exogenous DNA



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