

# 用浸胚法将外源 DNA 导入水稻的研究进展

杨前进 (安徽省农业科学院绿色食品工程研究所, 安徽合肥 230031)

**摘要** 系统地概述了将外源 DNA 采用浸胚法导入水稻的理论基础、原理、转导机理、浸胚处理及后代分之验证方法;总结了 1989 年以来我国育种工作者采用该方法将外源 DNA 导入水稻所选用的供体、受体及所创建的水稻新种质类型;报道了笔者用浸胚法将空心莲子草 DNA 导入水稻增强其耐旱性和创建水稻新种质的研究进展。

**关键词** 水稻;外源 DNA;浸胚法;研究进展

中图分类号 Q812 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2006)24-6452-03

利用外源 DNA 直接导入技术培育农作物新品种或创建新种质是 20 世纪 70 年代以来在我国创立的一个育种新途径。它以植物为受体,带有目的性状的外源遗传物质(总 DNA)或目的基因为供体,进行直接导入,既不同于载体转化的基因工程技术,也有别于通过有性杂交实现植物间基因交流的传统育种方式。种胚浸泡法(即浸胚法)是以供体的 DNA 溶液浸泡受体干种子的胚或萌动的种子,将外源 DNA 导入受体细胞,达到转化目的的一种外源 DNA 直接导入植物方法,具有无需特殊设备,可行、简便、易操作的特点,是我国水稻育种工作者解决原缘杂交不孕采用的方法之一。

## 1 浸胚法的理论基础

**1.1 DNA 片段杂交假说** 外源 DNA 直接导入植物技术的理论基础来源于国内广泛的远缘杂交科学实验活动,由我国生物化学家周光宇先生提出 DNA 片段杂交假说。即从整体上看,远缘亲本间的染色体结构是不亲和的,但从进化的角度来讲,部分基因间的结构有可能保持一定的亲和性;当远缘花粉中的基因组进入母体(受体)后,被分解成片段,大部分片段被受体降解,保存下来的某些 DNA 片段有可能被整合进受体染色体,在子代中表达典型的或更多的是非典型的遗传变异,后者可能是外源 DNA 参与受体性状基因表达的调控或数量遗传,影响了多基因表达体系,使子代出现变异<sup>[1]</sup>。在该假说的理论指导下,首先设计出了花粉管通道法并在育种实践中得到验证,其后发展成了穗茎注射、花粉转化和种胚浸泡等方法。

**1.2 外源 DNA 双重作用假说——基因转移和生物诱变** 万文举等就外源 DNA 导入产生变异机制提出了双重作用假说,即外源 DNA 导入具有基因转移和生物诱变双重作用,既可能达到基因转移的目的也可能作为生物诱变因素。他将生物诱变理解并定义为继物理诱变(第 1 诱变)和化学诱变(第 2 诱变)之后的 1 种新型诱变即第 3 诱变<sup>[2]</sup>。所谓生物诱变是指由于外源 DNA 片段导入到受体细胞并整合(插入)到受体 DNA 中而引起的基因突变和性状变异,这种变异能在后代中遗传。其特点是引起突变的物质本身就是遗传物质,由 4 种单核苷酸(A, T, C 和 G)组成的 DNA 片段,而不是异种物质(非遗传物质);能直接参与基因突变,成为突变基因的组成部分;不会产生大的有害性甚至致死突变;具有“引发作用”或“再启动”作用,把在系统发育中曾经潜

在”下来的性状又引发出来。

## 2 浸胚法的原理及转导机理

**2.1 原理** 利用外源 DNA 溶液浸泡受体干种子的胚或萌动的种子,使外源 DNA 进入受体并转化分裂旺盛的茎端生长点细胞,受体为成熟的植物胚细胞。

### 2.2 转导机理

(1) 水稻胚生长点存在胞间壁通道,有利于大分子物质在细胞间运输。王联芳等对水稻胚细胞间大分子转移的通道及其发生机理进行研究,发现了核穿壁和外源 DNA 在细胞间的转移现象,证实了细胞间存在着可让大分子或细胞器通过的通道,并将其定名为胞间壁通道(Intercellular wall channel),以区别于胞间连丝,但胞间壁通道一般在胞间连丝的所在部位形成<sup>[3]</sup>。胞间壁通道的形成是生物体特定发育时期的生理现象,可能在种子萌发阶段细胞间物质快速运输过程中,尤其是对大分子物质运输起重要作用。

(2) 水稻胚生长点细胞在浸泡过程中发生显微和亚显微结构变化。刘春林等以质粒 pBI121 为外源 DNA,去壳水稻种子为受体,对受体材料进行 Southern 分子杂交检验和胚生长点表层细胞电镜扫描,结果表明外源 DNA 可诱导生长点细胞表面产生新的结构<sup>[4]</sup>。阮颖等利用扫描电镜和透射电镜对水稻 DNA 浸种法受体进行研究,结果表明水稻胚生长点细胞在浸泡过程中内部和表面发生了一系列显微和亚显微结构变化,这些结构变化对外源 DNA 直接导入受体是非常有利的<sup>[5]</sup>。

(3) 水稻胚在浸泡过程中能主动降解外源 DNA 分子。张学文等以鲤鱼精液 DNA 为供体,湘早籼 8 号为受体,研究外源 DNA 分子在浸胚过程中的降解情况。结果表明,水稻胚在浸泡过程中能主动降解外源 DNA,24 h 后有大部分 DNA 分子完全被降解;48 h 后大部分 DNA 分子被降解成小分子片段、单磷酸脱氧核苷酸、碱基甚或无机成分;紫外吸收光谱扫描发现 220~240 nm 有明显的增色效应<sup>[6]</sup>。

(4) 外源 DNA 降解成分对受体胚细胞的生物诱变作用。张学文等用经过 DNA 酶(DNase I)完全酶解后的鲤鱼精液 DNA 浸泡处理中优早 2 号糙米,研究外源 DNA 酶解成分在水稻浸胚法导入中的诱变作用。结果处理当代即表现了一定程度的变异,表明浸胚法外源 DNA 导入过程中确实存在着完全降解成分的诱变作用<sup>[6]</sup>。朱启升等用空心莲子草的整体 DNA 溶液浸泡处理优质常规中籼 6527 的糙米,也在处理当代就出现了变异类型,获得早熟变异单株<sup>[7]</sup>。

## 3 浸胚处理方法

**3.1 受体材料选择** 成熟干种子的健全糙米,除去颖壳的

**作者简介** 杨前进(1964-),男,安徽霍邱人,在读博士,研究员,从事水稻遗传育种研究。

**鸣谢** 该文得到了西南大学何光华教授和安徽省农科院朱启升研究员的指导,特此鸣谢。

**收稿日期** 2006-10-11

萌动种子。

**3.2 处理方式** 直接浸泡。用外源 DNA 溶液浸泡受体干种子的健全糙米或除去颖壳的萌动种子。

**3.3 DNA 溶液浓度** 浸泡所用的 DNA 溶液浓度在 2.0~600  $\mu\text{g/ml}$  均可,普遍采用的浓度为 300~400  $\mu\text{g/ml}$ 。糙米的发芽率随着 DNA 溶液浓度的增加呈下降趋势,浓度范围不同,发芽率下降的幅度也不同。杨前进等研究结果表明:DNA 溶液浓度为 2.0 和 0.2  $\mu\text{g/ml}$  时,发芽率分别是 76.67% 和 80.00%,比对照去离子水的 81.67% 低 3.33 和 1.67 个百分点,差异不显著;DNA 溶液浓度为 20.0  $\mu\text{g/ml}$  时,发芽率为 58.00%,比对照低 23.67 个百分点,差异极显著<sup>[9]</sup>。

董延瑜等以浓度为 300~400  $\mu\text{g/ml}$  的玉米 DNA 溶液,在 20  $^{\circ}\text{C}$  条件下处理水稻干胚,并在浸胚过程中采用逐步增添 DNA 溶液的方法,第 1 次用 DNA 溶液处理后,隔 10 h 再加入同样浓度的 DNA 溶液;当种胚萌动时再添加 DNA 溶液 1 次,待幼芽明显可见时,即按常规播种方式育秧,取得了较好的诱导效果<sup>[9]</sup>。朱启升等用浓度为 2.0  $\mu\text{g/ml}$  的空心莲子草整体 DNA 溶液浸泡水稻干种子的健全糙米,在处理当代即出现了性状变异<sup>[7]</sup>。伏军等先将受体种子用清水浸泡 2 d,待种子开始萌动时,用含量为 600  $\mu\text{g/ml}$  的 DNA 溶液浸种 36 h,获得明显变异类型<sup>[10]</sup>。

#### 4 导入后代的分子验证

陈信波等对以玉米 DNA 溶液浸泡水稻种子后选育的新品系 GER-1 及其供体、受体进行 RAPD 分析。从 60 个引物中,发现 4 个引物的扩增产物出现仅存于子代 GER-1 和供体玉米,而受体中没有 DNA 谱带;并用同位素标记这些供体特异片段为探针,与供体、受体、子代 DNA 进行 Southern 杂交,发现 OPJ-091120 和 OPJ-15850 2 个探针在 GER-1 和玉米中有其他水稻材料中不具有的杂交带,证明 GER-1 基因组中存在玉米 DNA 片段<sup>[11]</sup>。

除 RAPD 技术外,还可采用 RFLP、AFLP 和 SSR 等技术比较供体、受体和子代基因组 DNA 的差异,寻找供体转移到子代基因组的 DNA 片段(或基因)。随着分子生物学技术的发展,有待于对浸胚法导入水稻后供体 DNA 与受体基因组的整合及表达作进一步的研究。

#### 5 导入外源 DNA 的成效分析

**5.1 能够使受体后代产生广泛的表型性状及分子水平的变异** 刘春林等对供体慈利玉米、原受体及变异后代优良株系进行了酯酶同工酶分析,发现 DNA 浸泡法能在保证受体及其后代基本酶带不变的前提下,改变其他酯酶同工酶的表达类型,变异个体酯酶酶带,出现与供体相同的酶带,或者出现与供体玉米和受体均不同的酶带<sup>[12]</sup>。他们认为原因可能有 2 个:一是玉米外源 DNA 中的某一完整的酯酶同工酶结构基因整合到了受体基因组中;二是玉米的一段 DNA 调控序列整合到了受体基因组中,改变了受体基因组原有的酯酶同工酶表达类型。倪苏等采用浸泡法以萌动种子胚为受体导入籼稻不育系 D 汕 A 的总 DNA,引起了受体常规稻蜀丰 108 的叶色、生育期和穗部的变异;同工酶及 RFLP 分析表明,外缘 DNA 的导入引起了分子水平上的变异<sup>[13]</sup>。

**5.2 用高蛋白含量植物的总 DNA 浸泡水稻种子能够提高后代蛋白质含量** 李建粤等,万文举等分别利用浸种法将

高蛋白含量的大青豆总 DNA 导入常规粳稻品种越光,结果表明,利用大豆总 DNA 的导入方法能有效地提高稻米蛋白质和赖氨酸含量,而且稻米高蛋白、高赖氨酸变异性状还能够稳定遗传<sup>[14,15]</sup>。刘国华等采用浸种法将大豆、高粱、玉米的 DNA 导入早稻恢复系 0146 和早稻常规品种 91-264,对变异后代籽粒蛋白质含量进行逐代分析研究,结果表明利用高蛋白含量植物的外源 DNA 溶液浸种能选育出蛋白质含量高的水稻新品种<sup>[16]</sup>。何登骥等将大豆(湘春豆 18 号)DNA 导入水稻,培育出 4 个 3 高(高蛋白、高产、高出糙率)饲料稻品系,其中 01 早 3324 蛋白质含量高达 13.4%<sup>[17]</sup>。

**5.3 用耐旱植物整体 DNA 溶液浸泡水稻糙米增强了变异后代的耐高温干旱性** 朱启升等用生命力极强的水旱两栖植物空心莲子草(俗称革命草)的整体 DNA 溶液,浸泡优质常规水稻“6527”的糙米,在旱地种植各变异后代群体,经多年干旱胁迫条件下连续定向选择,育成了国审高产早稻新品种“绿早 1 号”(国审稻 2005031 号),并创建出一批耐高温干旱水稻新种质资源<sup>[7]</sup>。

#### 6 已选用的供体种类、受体类别和创建的水稻新种质类型

据中国期刊全文数据库资料(1989-01~2006-05)的不完全统计,目前我国科技人员已成功地将 32 种植(动)物的 DNA 采用浸胚法直接导入 26 个栽培水稻品种(系)(表 1),创制出约 21 类水稻新种质资源。

**6.1 已选用的供体种类** 禾本科:野生稻、栽培稻、茭瓜、玉米、高粱、狼尾草、稗草、牧草、大麦、小麦、黑麦、雀麦、早熟禾、车前草、高粱、荞麦、珍珠粟、谷子、商陆、薏米、苦荞等。豆科:大豆、蚕豆、豌豆、绿豆、黑豆、红豆、油菜等。苋科:空心莲子草等。其他:蓝藻 DNA,牛胰 DNA,鲤鱼精液 DNA 等。

**6.2 已选用的受体类别** 早籼:金早 4 号、5 号,湘早籼 1 号、4 号、8 号、15 号、21 号和 24 号,沪红早 1 号、中优早 2 号、早稻 91-264、早稻 MW、早籼 91-L、瑰宝八号、早籼 90-519 等。中籼:常规品系 6527、繁 3、绿稻 24、安选 8 号、浙场 9 号,红米冬粘,稻蜀丰 108 等。中粳:秀水 04、越光等。其他:寒丰 S、晚稻粳 187、粳 85-5、晚籼优 1 号、早稻恢复系 0146 等。

**6.3 创建的水稻新种质类型** 水旱 2 用稻品种(系):绿早 1 号等(中籼 6527+空心莲子草 DNA)。玉米稻新品种(系):GER-1 等系列,玉米早稻品系 00 早 4024(湘早籼 15 号+西玉 3 号 DNA)。稗子稻品系:稗子早稻品系 00 早 HK5(早籼 90-519+稗子 DNA)。雀麦稻品系:早熟雀麦早籼品系 00 早 HK1(湘早籼 1 号+雀麦 DNA)。茭瓜早籼品系:99 早 HK4(早籼 90-519+茭瓜 DNA)。油菜早籼糯、牧草早晚稻、大麦早稻、蚕豆早稻、车前草早稻、薏米早稻定型品系,大豆早稻、荞麦早稻、谷子早稻和绿豆早稻、早熟禾晚稻、高粱晚稻、低钾水稻种质(空心莲子草和商陆的 DNA),代替蚕豆粉原料的专用蚕豆早稻,代替大麦做啤酒原料的专用大麦早稻,含有人体所需赖氨酸(现有大米缺乏)的优质营养专用苦荞早稻,以及具有利尿作用的食、药兼用车前草早稻等。

#### 7 空心莲子草 DNA 导入水稻研究进展

**7.1 导入常规水稻“6527”增强其耐旱性** 朱启升等 1995 年首次将生命力极强水旱两栖的空心莲子草整体 DNA 采

表 1

1989 年以来在我国外源 DNA 浸胚法导入水稻所选用的供体、受体

文献报道年份	第 1 作者姓名	第 1 作者单位	供体种类、名称	受体类别、名称	研究目的	备注
1989	朱秀英	福建农学院	牛胰 DNA	金早 4 号,金早 5 号	理论研究	
1992	万文举	湖南农学院	慈利玉米 171	湘早粘 4,8 号	种质创新	GER-1 等
1992	伏 军	湖南农学院	珍珠粟	沪早 1 号	种质创新	
1994	洪亚辉	湖南农业大学	农垦 58	浙场 9 号,红米冬粘	转导光敏感基因	光敏 S
1994	张学友	湖南农业大学	酶解后的鲤鱼精液 DNA	早粘中优早 2 号	理论研究	外源 DNA 诱变作用
1994	张学友	湖南农业大学	鲤鱼精液 DNA	湘早粘 8 号	理论研究	外源 DNA 降解现象
1999	徐竹筠	中科院上海植物生理研究所	广东普通野生稻抗稻瘟病株系 YD100	秀水 04、寒丰 S	种质创新	抗稻瘟病
2000	刘国华	湖南农业大学	大豆、高粱、玉米	早稻恢复系 0146;早稻常规品种 91-264	种质创新及后代蛋白含量变化研究	高蛋白
2000	洪亚辉	湖南农业大学	马齿黄玉米	早粘 91-L	种质创新	高蛋白稻新品系
2002	彭志红	湖南农业大学	空心莲子草、商陆	早稻 MW;早粘 91-L、瑰宝 8 号;晚稻粳 187,粳 85-5	种质创新	耐低钾水稻种质
2000	倪 苏	四川农业大学	D 汕 A	常规粘稻蜀丰 108	理论研究	分子水平变异
2000	李建粤	上海师范大学生物系	大青豆 南农 87-C38)	粳稻越光	种质创新	蛋白质及赖氨酸
2001	何登骥	湖南省水稻研究所	雀麦、牧草、大麦、蚕豆、早熟禾、车前草、薏米、绿豆、黑豆、红豆、高粱、荞麦、谷子、油菜	早粘 90-519;湘早粘 1、15、21、24 号;晚粘优 1 号	种质创新	特种品质新品系
2003	朱启升	安徽省农业科学院绿色食品工程研究所	空心莲子草	中粘 6527	种质创新	水旱 2 用稻

注:此表根据中国期刊全文数据库资料(1989-01~2006-05)统计而成;统计日期为 2006 年 5 月 27 日。

用浸胚法导入栽培水稻 (*Oryza sativa* L.) 优质常规中粘“6527”,在旱地种植各分离世代,水分胁迫情况下,以耐旱性和丰产性为主要选择目标,采用系统选育法对受体子代材料进行定向选择,培育耐旱水稻新品种<sup>[9]</sup>。笔者 2002 年以“导入空心莲子草基因组 DNA 增强水稻耐旱性”为题获得安徽省自然科学基金项目的资助,再次采用浸胚法,同时增加花粉管通道和穗颈注射法,将空心莲子草基因组整体 DNA 导入“6527”,创建耐旱水稻新种质。

主要进展:育成了国审早稻新品种绿早 1 号(国审稻 2005053 号);构建成了 32 个农艺性状已稳定的耐旱变异后代群体;创制了一批耐高温干旱水稻新种质资源;研究耐旱变异后代的分子验证、耐旱遗传参数的测定和耐旱机理。

7.2 导入水稻保持系和恢复系,创建水稻新种质 笔者 2002 年开展了将空心莲子草基因组 DNA 溶液,分别采用“浸胚、花粉管通道、浸穗和穗颈注射”4 种方法导入恢复系“绿稻 24、繁 3 和安选 8 号”和保持系“90125B、122B 和 K17B”,创建水稻新种质研究。经 3 年 7 代系统选择,初步构建成了 6 种受体 13 个不同处理的 74 个 D7 代株系材料。

## 8 浸胚法导入外源 DNA 的主要优缺点

### 8.1 优点

(1) 导入体是含有目的性状基因的总 DNA,有可能 1 次导入达到改良多基因控制的数量性状的目的,不需事先分离、提纯和克隆目的性状基因,导入操作方法简便易行,勿需特殊设备和条件。

(2) 不受供体种类限制,植物和动物等均可作为外源 DNA 的供体,具有广阔的应用前景。

(3) 可任意选择生产上的当家常品种、恢复系和保持系作受体进行外源 DNA 导入,既可转移目的性状基因,又可同时保留受体品种优良性状。

(4) 能够实现远缘杂交不亲合植物间的遗传物质(基因)重组,获得各种有价值的变异新类型,丰富育种资源。

### 8.2 缺点

(1) 由于导入的是外源总 DNA,缺乏标记基因,因此对

导入成效的鉴定难度较大。

(2) 外源总 DNA 溶液浸胚后,哪种基因或 DNA 片段可为受体细胞整合并实现转化完全是随机的,缺乏控制机制,因而实现性状转移的目的性和预见性较差。

(3) 外源大分子 DNA 是如何穿越细胞壁及细胞膜进入受体细胞并实现遗传转化的,目前尚缺乏公认的理论解释。

- 参考文献
- [1] 李建粤,范士靖,皱震,等.大豆 DNA 导入引起稻米蛋白质含量变异的遗传稳定性及赖氨酸含量分析[J].种子,2001(6):3-7.
  - [2] 万文举,邹冬生,彭克勤.论外源 DNA 导入的双重作用——基因转移与生物诱变[J].湖南农学院学报,1992,18(4):886-891.
  - [3] 王联芳,傅荣昭,赵世绪.水稻成熟种子萌发过程中胚细胞壁通道的形成[J].北京农业大学学报,1995,21(1):17-18.
  - [4] 刘春林,阮颖,董延瑜.DNA 浸泡水稻种子的分子和亚显微水平研究[J].中国水稻科学,1999,13(1):51-56.
  - [5] 阮颖,刘春林,董延瑜.外源 DNA 浸泡水稻种子的电镜观察[J].湖南农业大学学报,1997,23(2):113-116.
  - [6] 张学文,赵燕,董延瑜,等.水稻浸胚法外源 DNA 导入过程中 DNA 分子降解研究[J].湖南农学院学报,1994,20(5):407-411.
  - [7] 朱启升.水旱 2 用稻的研究初报[J].安徽农业科学,2003,31(4):523-525,545.
  - [8] 杨前进.外源 DNA 溶液浸泡水稻糙米对其发芽率的影响[J].安徽农业科学,2005(2):193,294.
  - [9] 董延瑜,洪亚辉,任春梅,等.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.
  - [10] 伏军,徐国庆,罗弘,等.外源 DNA 导入水稻的育种效果研究[J].湖南农学院学报,1992,18(1):10-17.
  - [11] 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.
  - [12] 刘春林,洪亚辉,赵燕.DNA 浸泡法所获水稻优良株系酯酶同工酶分析[J].湖南农学院学报,1994,20(6):522-52.
  - [13] 倪苏,李平,胡廷玉.外源 DNA 导入水稻引起性状与分子变异初探[J].四川农业大学学报,2000,18(2):134-136.
  - [14] 李建粤,周根余,许燕,等.经大豆 DNA 溶液处理的水稻后代种子粗蛋白和氨基酸含量分析初报[J].植物研究,2000,20(2):189-194.
  - [15] 万文举,张福泉.玉米 DNA 导入水稻获得种质变异[J].湖南农业科学,1992(3):6-7.
  - [16] 刘国华,陈立云,洪亚辉,等.外源 DNA 导入诱导水稻高蛋白变异的初报[J].湖南农业大学学报:自然科学版,2000,26(6):415-417.
  - [17] 何登骥,詹庆才,龚浩如.开创 21 世纪外源 DNA 导入培育水稻新品种的新局面[J].湖南农业科学,2001(4):7-9.