

# 利用外源 DNA 导入玉米自交系创造变异的研究

安颖蔚<sup>1,2</sup>, 张宝石<sup>\*</sup>, 杨立国<sup>1</sup> (1. 沈阳农业大学, 辽宁沈阳 110161; 2. 辽宁省农业科学院, 辽宁沈阳 110161)

**摘要** 采用玉米开苞导入技术通过花粉管通道将玉米自交系 13A 的总 DNA 导入玉米自交系沈 109 中, 结果表明, D<sub>1</sub> 和 D<sub>2</sub> 代的生育期、株高、穗位、株型等性状都发生了变异, 总变异率为 17.98%, 并用原位杂交技术进行验证。讨论了后代变异、变异率和该项技术的特点。

**关键词** 玉米; 外源 DNA; 导入; 变异

中图分类号 S513 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)03-00667-02

## Study on the Variation of Maize Inbred Line with Exogenous DNA

AN Ying-wei et al (Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110161)

**Abstract** With a novel DNA transformation method, exogenous DNA was laid on the surfaces of ovaries with cutting pathways of pollen tubes of each maize ear and total DNA extracted from inbred line-13A was introduced into Shen 109. The field investigation and indoors study indicated the character (growth period, plant height, ear height, plant shape and so on) were changed. The genetic variation frequency was relatively high. The variation frequency was 17.98%. It was verified by in situ hybridization. The offspring variation, variation frequency and characteristic of the technology were discussed.

**Key words** Maize; Exogenous DNA; Transfer; Variation

外源 DNA 直接导入技术是植物分子育种的内容之一, 它既不同于载体转基因工程技术, 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, 它是通过受体, 直接将带有目的性状的供体遗传物质(总 DNA) 或目的基因进行导入, 创造新的变异材料, 通过筛选获得目的性状的后代, 达到改良品种的目的。由于它简单易行, 被许多育种工作者所采用, 并培育出了一些抗病、抗虫及其他优良性状的农作物新品系。目前, 花粉管通道法转基因技术已成为国内农作物分子育种的主要方法之一。用该法成功地培育出一批棉花、水稻、大豆和高粱等作物新品种。国内学者应用花粉管通道法进行玉米转基因育种时, 通常的操作步骤是: 将雌穗授粉后, 剪断苞叶外的花丝, 并在花丝的截面上滴入或涂抹供体 DNA 溶液。这种处理方法往往因玉米花粉管通道(花柱内) 过长, 而使外源 DNA 导入率较低。为此辽宁省农科院生命中心杨立国独创了一种使外源 DNA 经最短花粉管通道进入胚囊的“开苞导入法”。

笔者应用开苞导入法将玉米自交系 13A 导入到遗传稳定的玉米自交系沈 109 中, 以期得到优良的变异新材料, 并用原位杂交技术进行分子验证。

## 1 材料与方 法

**1.1 供体与受体** 供体为玉米自交系 13A, 受体为沈 109(表 1)。

表 1 供试亲本主要农艺性状及特征

材料	株高 cm	穗位 cm	单穗重 g	穗长 cm	穗粗 cm	百粒重 g	粒型	株型	生育期 d
沈 109	221.3	100.2	96.00	13.47	4.49	29.90	半马齿	平展	150
13A	172.6	66.0	110.67	15.62	4.38	25.81	硬粒	紧凑	134

**1.2 DNA 的提取** 采用 CTAB 法提取供体 DNA。纯化后的 DNA 溶液测定值: A<sub>260/230</sub> 2, A<sub>260/280</sub> 1.8, 符合导入条件, 以 1 × SSC 溶液配制 DNA 溶液, 浓度为 800 μg/ml。

**1.3 外源 DNA 导入技术** 选自花授粉后 28 ~ 30 h 的果穗, 于果穗外周均分 3 处用小刀纵向切开全部苞叶成 3 瓣, 并扒开苞叶, 从花丝基部去掉全部花丝, 在花丝断面处用毛

笔尖涂抹供体 DNA 溶液。然后将苞叶复原, 用皮套捆紧, 再套袋防虫。

**1.4 田间试验方法** 转基因 D<sub>1</sub> 代按穗顺序排列, 单粒点播, 全部单株套袋自交。D<sub>2</sub> 代按穗行播种, 顺序排列。调查田间性状。

**1.5 原位杂交技术** 参照 Y.C.Song 等方法, 主要步骤为: 植物染色体制片 植物基因组 DNA 的提取 封闭 DNA 的制备 探针的制备 染色体原位杂交 荧光原位杂交的信号检测。

## 2 结果与分析

**2.1 D<sub>1</sub> 代植株表现** 沈 109 D<sub>1</sub> 代的田间出苗率为 61.9%, 这可能是由于利用开苞导入法处理时的药物刺激和机械损伤导致的种子发育不良。D<sub>1</sub> 代获得 562 个单株, 因虫害等原因, 秋季共收获 495 个自交穗。这些后代与亲本相比, 部分农艺性状发生了改变(表 2)。

表 2 D<sub>1</sub> 代株系与亲本沈 109 主要性状比较

材料	株高 cm	穗位 cm	穗长 cm	穗行数	百粒重 g	穗粒数	粒型	株型	生育期 d
D <sub>1</sub>	199.0	84.0	16.90	15.67	29.77	352.5	半马齿 硬粒	平展 紧凑	141
沈 109	221.3	100.2	14.15	15.67	30.13	371.3	半马齿	平展	150

**2.2 D<sub>2</sub> 代植株表现** 对 D<sub>2</sub> 代群体跟踪调查了 6 个性状, 各株系每个性状的表现以群体平均值和系内多数为准。对部分株系同时发生 2 种或 2 种以上性状变异的, 按差异最大的一个变异统计, 其他变异不重复计算(表 3)。

表 3 D<sub>2</sub> 代转基因株系的变异

性状变异 (与 CK 比)	变异株 系数量	D <sub>2</sub> 代株系 变异率 %	占总变异株系 的比率 %
株高	增高 30 cm 以上	4	0.80
	降低 30 cm 以上	13	2.63
穗位	增高 30 cm 以上	3	0.60
	降低 30 cm 以上	11	2.22
穗长	增长 30 mm 以上	8	1.62
	变短 30 mm 以上	5	1.01
株型	紧凑	11	2.22
粒型	硬粒	9	1.82
生育期	早熟 5 d 以上	19	3.84
	晚熟 5 d 以上	6	1.21
合计		89	17.98

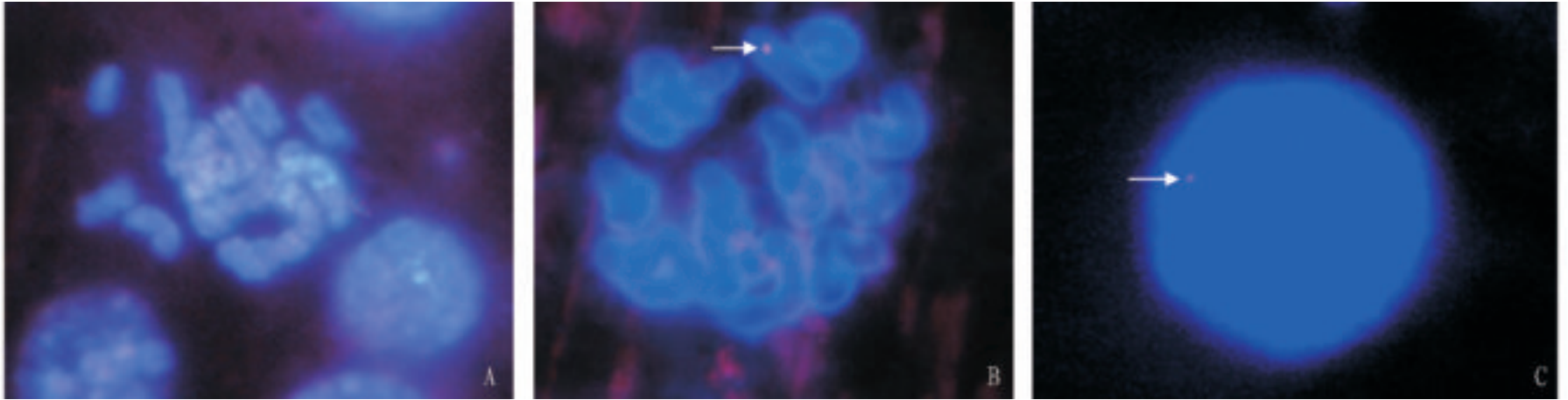
**作者简介** 安颖蔚(1974 - ), 女, 辽宁沈阳人, 在读博士, 助理研究员, 从事作物遗传育种的研究工作。\* 通讯作者, 博士生导师, 教授。

收稿日期 2006-09-06

D<sub>2</sub> 代 495 个株系中共有 89 个株系至少在某一性状上发生了变异,总变异率为 17.98%。其中熟期变异居多,为 25 个,变异率达 5.05%,占总变异株系的 28.09%。其次是株高和穗位,变异株系分别为 17 和 14 个,变异率为 3.43% 和 2.82%。穗长的变异率也较大,为 2.63%。株型和粒型变异较明显,变异率分别为 2.22% 和 1.82%。

**2.3 原位杂交结果** 为了验证供体 13A 的 DNA 片段是否整合到受体沈 109 的染色体上,应用原位杂交技术进行验

证。原位杂交技术(*in situ hybridization*) 的基本原理是:根据核酸分子碱基互补配对的原则(A T, A U, G C),将有放射性或非放射性标记的外源核酸片段(探针,probe)与染色体上经过变性后的单链 DNA 片段,在适宜条件下互补配对,结合形成专一的核酸杂交分子,再经过相应的检测手段,将待测核酸在染色体上的位置显示出来,从而确定待测核酸是否与探针序列具有同源性,达到鉴定靶核酸序列性质的目的。该试验原位杂交结果见图 1。



注:A. 作为对照的自交系沈 109 染色体分裂相上无信号点出现;B. 沈 109/13A 后代染色体分裂相上有信号点出现;C. 箭头指示杂交信号点。

图 1 应用原位杂交鉴定玉米中的外源 DNA 片段

### 3 结论与讨论

**3.1 导入后代性状变异广泛** 外源 DNA 导入玉米自交系沈 109 后代产生了广泛的变异,虽然只跟踪调查了 6 个性状,但是发生变异的性状不止这些。大体可分为植株形态(株型、叶部、穗部等器官形态特征)变异、生育期(抽雄期、散粉期、吐丝期、成熟期)变异、产量性状(单穗重、穗长、穗粗、穗粒数、百粒重)变异、茎秆性状(茎粗、倒伏性)等。其中,生育期、株高、穗位等性状变异较大。这与冯世康等(2001)的结果基本一致。

**3.2 变异率问题** 采用开苞导入法利用花粉管通道将外源 DNA 导入玉米自交系中,所得到的变异率比通常用的花粉管通道法大,与杨立国等(2005)的结果一致。其原因可能是开苞导入法可使外源 DNA 经最短的花粉管通道进入胚囊。但采用开苞导入法进行基因转导后当代的结实率相对较低,这可能是由于采用该法机械损伤较大,破坏组织内部或苞叶,易造成霉烂,从而降低结实率。但如果操作规范,导入后半个月内经常晾晒,可避免结实率低的问题。

**3.3 花粉管通道法的特点** 花粉管通道法已成为目前转基因的有效技术之一,特别是从育种角度考虑,有效地利用

了自然生殖过程,具以下优点:方法简便易行,一般育种工作者均可掌握;直接针对成株操作,避免了组织培养的诸多限制因素;凡绿色开花植物原则上讲均可适用,只需针对不同的花器构造、开花习性和受精过程,确定合适的导入细则。本试验采用的开苞导入技术就是针对玉米作物的实际情况独创的一种行之有效的技术。采用的原位杂交技术验证了开苞导入法在玉米遗传转化应用上是可行的。

#### 参考文献

- [1] SONG Y C, HU L Y, TIAN X B. Comparisons of G banding patterns in six species of Peaceae[J]. *Heredity*, 1994, 121: 31 - 38.
- [2] 周光宇. 从生物化学的角度探讨远缘杂交的理论[J]. *中国农业科学*, 1978(2): 16 - 20.
- [3] 周光宇, 龚蓁蓁, 王自芬. 远缘杂交的分子基础- DNA 片段杂交假说的一个论证[J]. *遗传学报*, 1979, 6(4): 405 - 412.
- [4] 杨立国, 王金艳, 石太渊, 等. 利用外源 DNA 导入新技术选育玉米新品种及杂交种[J]. *杂粮作物*, 2005, 25(5): 283 - 285.
- [5] 冯世康, 陈成斌, 赖群珍, 等. 外源 DNA 直接导入玉米的分子育种技术研究初报[J]. *广西农学报*, 2001(4): 16 - 18.
- [6] 杜雄明, 潘兆娥, 孙君灵, 等. 棉花 DNA 遗传转化系的农艺性状变异和 SSR 标记分析[J]. *农业生物技术学报*, 2004, 12(4): 380 - 385.
- [7] 谢道昕, 范云六, 倪丕堆, 等. 苏云金杆菌杀虫基因导入中国水稻栽培品种中花 11 号获得转基因植株[J]. *中国科学*, 1991(8): 830 - 834.
- [8] 曾君祉, 王东江, 吴有强, 等. 用花粉管途径获得小麦转基因植株[J]. *中国科学*, 1993, 23(3): 256 - 262.