

燕麦 DNA 导入普通小麦变异观察及 RAPD 分子验证

刘 萍^{1,2}, 康振生¹

(1. 西北农林科技大学植保学院, 陕西 杨凌 712100; 2. 宁夏大学农学院, 宁夏 银川 750021)

摘 要: 利用花粉管通道将健壮燕麦(*Avena sativa* L.)的总 DNA 导入普通小麦宁春 4 号中, 获得 12 个稳定变异的品系。农艺性状变异观测结果显示多数变异品系的叶面积、穗长、主穗粒数、主穗粒重和千粒重等性状都显著地超过了受体宁春 4 号小麦; 对受体、供体和稳定变异的品系进行 RAPD 分析, 在 68 个随机引物中有 8 个引物检测出 DNA 的多态性, 并且在后代基因组中找到了受体没有而供体特有的 DNA 片段, 从 DNA 分子水平上证明了燕麦 DNA 可以通过花粉管通道进入受体, 并与其基因组 DNA 整合, 在后代中遗传和表达。

关键词: 燕麦; 普通小麦; DNA 导入; RAPD

中图分类号: S512.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7601(2006)03-0100-04

利用开花植物授粉后形成的花粉管通道, 直接将外源总 DNA 或目的基因的重组 DNA 分子导入植物中, 实现农作物品种的改良, 已逐渐被人们接受并受到重视, 在小麦转基因作用中发挥的作用也越来越大^[1,2]。燕麦总 DNA 导入宁春 4 号小麦后, 引起小麦多方面性状的变化, 通过对变异植株的不断选择, 获得了若干具有少量燕麦性状且能稳定遗传的变异品系^[3,4]。

由于所采用的是供体总 DNA 而非目的基因, 因而无法采用常规的 PCR、Southern 杂交等分子生物学手段进行检测和验证, 一直没有足够的证据证明利用该方法所获得的转化后代是由于供体 DNA 片段整合到受体基因组中引起的变异, 还是由于外界刺激而导致后代发生变异。为了能从分子水平上得到直接的证据, 我们以导入燕麦总 DNA 的稳定转化后代及供体燕麦、受体宁春 4 号小麦为材料, 进行 RAPD 分子水平的 DNA 多态性分析, 以取得导入的 DNA 分子水平的转化证据。

1 材料与方法

1.1 材 料

受体材料: 宁夏主栽小麦品种宁春 4 号小麦。

供体材料: 瑞典燕麦品种健壮燕麦(*Avena sativa* L.)。

转化后代: D8 代的 11 个稳定变异品系。

1.2 方 法

1.2.1 供体 DNA 的提取 采用改良的氯仿一异戊醇方法进行^[5]。提取的燕麦黄化苗基因组 DNA

用 751 紫外分光光度计进行紫外检测, $A_{260}/A_{280} = 2.20 > 1.8$, $A_{260}/A_{230} = 2.16 > 2.0$, 纯度符合导入要求。导入浓度为 $355 \mu\text{g/ml}$ 。

1.2.2 外源 DNA 导入的时期和方法 利用花粉管通道途径, 人工授受体(宁春 4 号)花粉 2~3 h 后剪去受体小麦羽状柱头, 用小滴管在其颖壳内滴入一滴供体燕麦总 DNA, 套袋。24 h 后复滴一次, 同时以 $0.1 \times \text{SSC}$ 溶液作空白对照。

1.2.3 变异后代的性状观察 收获的 D1 种子第二年全部点播于试验田中, 并按常规育种程序对有变异的植株挂牌、记载、单收并考种。第三年种成穗行, 对变异性状继续观察, 并进行抗条锈病鉴定。以后每年对稳定变异的品系分别收获、考种, 并于 D5 代进行部分品系的生理生化分析。

1.2.4 RAPD 分析的模板 DNA 提取 采用 CTAB^[7]法提取各变异品系黄化苗的基因组 DNA。提取的 DNA 用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测其片段大小。

1.2.5 RAPD 反应 供体、受体和转化后代同时进行扩增, 所用引物购于上海生物工程技术公司。

反应总体积 $25 \mu\text{l}$; 超纯水 $12.84 \mu\text{l}$, $10 \times$ 缓冲液 $2.5 \mu\text{l}$, MgCl_2 (2.5 mmol/L) $2 \mu\text{l}$, dNTP (2.5 mmol/L) $2.0 \mu\text{l}$, Taq DNA 酶 ($1 \text{ unit}/\mu\text{l}$) $0.16 \mu\text{l}$, 模板 DNA ($5 \text{ ng}/\mu\text{l}$) $5 \mu\text{l}$, 随机引物 ($0.2 \mu\text{mol/L}$) $1 \mu\text{l}$ 。反应体系各样品加完混匀后, 加一滴石蜡油覆盖。

反应仪器: 美国 PE 公司生产的 DNA 热循环仪 (DNA Thermal Cycler 9600)。

RAPD 扩增程序: 96°C 预变性 1.5 min , 然后进

收稿日期: 2005-11-09

基金项目: 宁夏自然科学基金(A1019); 宁夏大学科研基金(032210)

作者简介: 刘 萍(1961—), 上海市人, 教授, 主要从事植物遗传育种的教学和科研工作。

入循环:94℃变性 45 s,36℃复性 40 s,72℃延伸 1.5 min,共 40 个循环,最后 72℃保温 7 min。

1.2.6 电泳检测 反应完成后,向反应管中加入 2.0 μl 6×的溴酚蓝,混匀,扩增产物在 1.0%琼脂糖凝胶中 65 V 电泳 2 h,EB 染色后在紫外检测仪下观察,照相。

2 结果与分析

2.1 导入后代的获得及主要变异

燕麦总 DNA 导入宁春 4 号小麦后,在 D1、D2、D3 代共选得有变异的单株 12 株,待其稳定后对其主要农艺性状进行考种,结果见表 1 和图 1。

表 1 部分导入后代及其亲本主要农艺性状的比较(2004)
Table 1 The agronomic traits of variant strains and parents (2004)

品系 Strains	株高 Plant height (cm)	旗叶叶面积 Flagleaf area (cm ²)	穗长 Spike length (cm)	结实小穗数 Spikelet number	主穗粒数 Grain number of main spike	主穗粒重 Grain weight of main spikelet (g)	生物学产量 biological yield (g)	千粒重 Thousand-grain weight (g)
NL01	89.85	27.99	10.80*	16.40	49.40*	2.47**	6.79	45.93
NL02	85.52	26.20	11.50**	18.60*	52.00*	2.46**	6.22	46.87*
NL03	87.81	25.65	10.56*	16.73	47.50	2.30*	5.28	45.07
NL04	82.96	26.69	10.91*	17.10	45.70	2.20*	5.12	47.23**
NL05	85.77	29.69*	10.63*	17.67	51.20*	2.52**	6.82	45.81
NL06	83.06	27.09	11.34**	18.20*	53.10**	2.52**	5.62	46.98*
NL07	83.88	29.05*	11.00*	17.00	51.80*	2.61**	6.39	44.31
NL08	81.59*	29.88**	11.68**	18.6*	57.20**	2.73**	6.53	45.73
NL09	113.08**	29.27*	10.92*	16.53	44.23	2.62**	10.69**	55.76**
NL10	87.89	34.41**	11.02*	17.59	50.00*	2.18	5.31	38.97**
NL12	121.44**	25.91	12.01**	16.85	40.59	2.08	7.64*	45.71
Ningchun 4	86.94	25.55	9.96	15.75	37.80	1.78	5.92	43.81
oat	119.43**	28.70*	23.76**	—	104.00**	3.55**	15.29	31.56**

注: * 表示 α=0.05 的显著水平, ** 表示 α=0.01 的显著水平

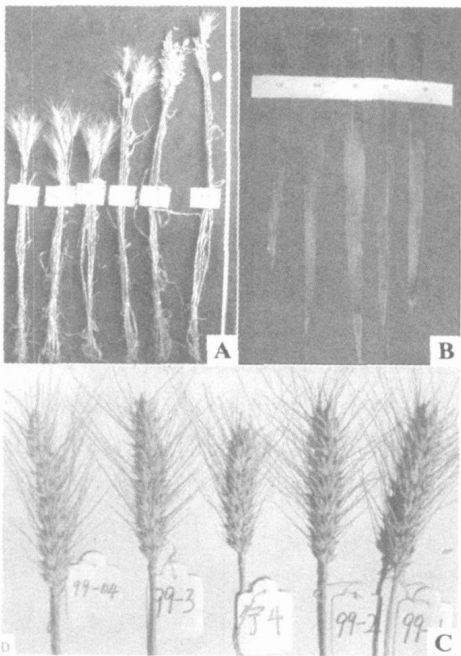


图 1 转化后代和受体农艺性状的形态差异

Fig. 1 Morphology of variants in comparison with their donor and receptor

A. 株高 Plant height; B. 旗叶 Flag leaf; C. 穗长 Ear length

中国知网 <https://www.cnki.net>
由表 1 和图 1 可知,转化后代主要农艺性状和

受体相比在多个方面均有变异。

株高 有些变异品系略高于受体,也出现高于受体约 35cm 的极端类型(表 1,图 1—A)。

叶 有的变异品系叶片变长变宽,叶片上举,旗叶叶位上升;变异品系单株旗叶叶面积普遍比受体的旗叶叶面积略微增加(表 1,图 1—B);大多数变异品系的叶色比受体的浓绿,有的表现出供体燕麦的蓝绿色特征,叶片变厚变硬。

穗 变异品系穗长一般均比受体增加 1~2 cm;结实小穗数增加 1~3 个,多数在 17 个左右,主穗粒数增加 10~20 粒(表 1,图 1—C)。

籽粒 籽粒腹沟加深;变异品系的千粒重普遍增加;另有变异品系籽粒颜色由红变白。

抗病性 经多年人工接种小麦条锈菌优势小种鉴定,供体燕麦对小麦条锈病免疫,受体宁春 4 号小麦严重感病,各变异品系的抗性发生了较大的变化,筛选获得 4 个抗性较好的品系^[3]。

分析各变异品系的主要农艺性状,并分别进行方差分析,发现各性状都存在着一定的差异。用 LSD 法分别对各主要性状与受体作多重比较,结果显示多数变异品系的叶面积、穗长、主穗粒数、主穗

粒重和千粒重都显著地超过了受体宁春 4 号(表 1),表明燕麦总 DNA 导入小麦后,可以引起农艺性状多方面的改变。

2.2 RAPD 扩增产物多态性

本试验选用综合农艺性状优异、高抗条锈病的 3 个变异品系,用 68 个引物进行 DNA 片段的扩增,供体、受体及变异品系以每个引物为一组,扩增产物用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳后,在紫外检测仪下分出清晰的条带。根据条带差异的有无,可将结果分为如下两种类型。

(1) 在所用的这些引物中变异品系和受体扩增产物完全相同的有 55 个引物,占 80.9%。

(2) 在 68 个引物的扩增产物中,供体、受体和变异品系存在稳定差异的引物有 8 个,占所用引物的 11.76%,其中引物 S1402,S1466,S1468 经 3 次

重复扩增,结果稳定(图 2)。

试验结果表明,供体、受体和变异后代多态性的变异情况比较复杂:引物 S1402 在受体宁春 4 号小麦中扩增出 5 个片段,在供体燕麦中扩增出 7 个片段,3 个变异品系中均出现了供体特有的 1 个片段(图 2a);引物 S1466 在受体中扩增出 3 个片段,在供体中扩增出 7 个片段,变异品系 NL05 和 NL07 中出现了不存在于供体和受体的新片段(图 2b);引物 S1468 在受体中扩增出 4 个片段,在供体中也扩增出 4 个片段,3 个变异品系表现各不相同,变异品系 NL05 具有 3 个受体的片段和一个供体的片段;变异品系 NL07 除具有 3 个受体片段和 1 个供体片段外,还出现了 1 个新片段;变异品系 NL08 的多态性表现最强,共有 6 个片段,其中 2 个是供、受体均没有的新片段(图 2c)。

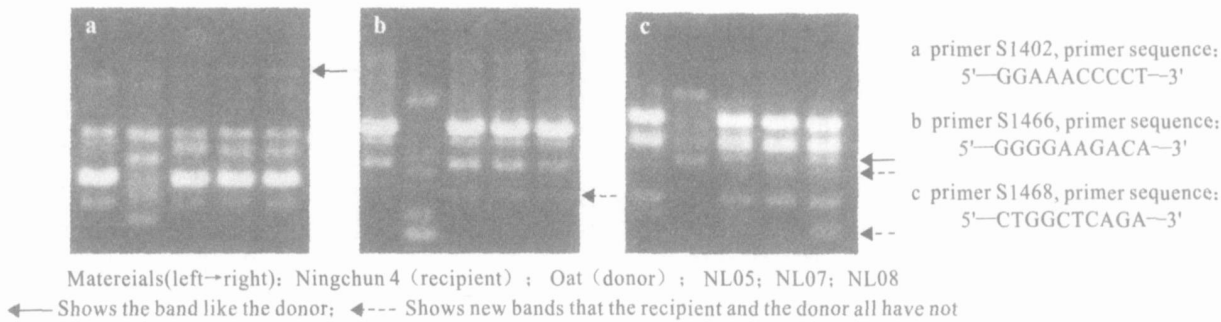


图 2 3 种引物的 RAPD 扩增结果
Fig.2 RAPD products amplified by 3 primers

3 讨 论

燕麦 (*Avena sativa* L. $2n=42$) 是小麦的亲缘物种之一,同时也是世界性重要的粮草兼用作物,它具有分蘖力强、籽粒蛋白质含量高,抗旱、耐瘠薄等优良特性,且对小麦的条锈病、叶锈病免疫。利用花粉管通道途径,将燕麦的相关特性导入小麦,可改良小麦的某些性状。利用花粉管通道实现燕麦总 DNA 的导入所获得的转化后代,在 D1 代就出现明显的变异,多数转化后代从 D2 代起即稳定遗传,这与有性杂交有着本质的区别。

RAPD 扩增结果表明,供体燕麦和受体宁春 4 号小麦各有其特异性的 DNA 多态性片段,表明它们的基因组存在着较大的差异。变异品系中能扩增出供体特有的片段,说明供体 DNA 片段能够通过花粉管通道进入受体,并以一定的方式插入到受体的基因组中进行表达。然而,在有些变异品系中,除扩增出供体特有的 DNA 片段外,还产生了供体和受体都没有的新片段,这些新片段是否也带有供体的遗传信息,有待进一步研究,但从另一方面可以推

测,外源总 DNA 进入受体后,不仅可以整合到受体基因组中直接表达,还可能影响受体基因组中其他基因的结构及表达,使转化后代的基因组发生变化,在 RAPD 扩增产物中出现多态性,这与同工酶的鉴定结果是一致的^[6]。

由此,我们认为,NL05,NL07,NL08 确是燕麦 DNA 导入普通小麦宁春 4 号所获得的转化后代,同时也从分子水平上验证花粉管通道技术是植物基因转移的一种方法。将花粉管通道技术与常规育种方法相结合,定能在小麦育种中培育出具有特殊性状的新的种质资源。

参 考 文 献:

[1] 肖兴国,张爱民,聂秀玲. 转基因小麦的研究进展与展望[J]. 农业生物技术学报,2000,8(2):111-116.

[2] 朱生伟,黄国存,孙敬三. 外源 DNA 直接导入受体植物的研究进展[J]. 植物学通报,2000,17(1):11-16.

[3] 刘 萍,张立杰,刘生祥,等. 燕麦 DNA 在小麦抗条锈病育种中的利用[J]. 植物保护学报,2002,29(4):305-308.

[4] 刘 萍,马宏伟,刘生祥,等. 导入燕麦 DNA 的小麦后代光合特性及农艺性状变化的研究[J]. 干旱地区农业研究,2004,22

(3):96—99.

[5] 刘 萍,代红军,张立杰,等. DNA 提取方法与植物种类的效应比较[J]. 宁夏农林科技,1998,(1):15—18.

[6] 刘 萍 李树华 马宏伟,等. 燕麦 DNA 导入普通小麦后代的同工酶酶谱分析[J]. 干旱地区农业研究,2002,20(1):49—51.

Oat (*Avena sativa* L.) exogenous DNA introduction
into common wheat and PAPD analysis

LIU Ping^{1,2}, KANG Zhen-sheng¹

(1. Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, College of Plant Protection, Yangling, Shaanxi 712100, China;
2. College of Agronomy, Ningxia University, Yinchuan, 750021, China)

Abstract: 12 variant strains have been developed form pollen tube pathway method by taking oat (*Avena sativa* L.) and common wheat (Ningchun 4) as donor and recipient. The major agronomic traits of variant strains such as the flagleaf area, spike length, grain number of main spike, grain weight of main spike and weight of thousand grains were significantly exceeded of Ningchun 4. RAPD analysis with 68 random primers was performed. Products of each primer were detected to have polymorphism among oat, Ningchun 4 and variant strains. The specific DNA fragments of donor have been found in genome of progenies, which didn't exist in the original recipient. Oat total DNA fragments can insert into recipient through pollen tube pathway and perform phenotypic expression can be inherited in progenies. This has been directly verified through technique of molecular level of DNA.

Keywords: oat (*Avena sativa* L.); exogenous DNA introduction; pollen tube pathway; ningchun 4 spring wheat; RAPD

(上接第 81 页)

[4] Li Y S. Effects of forest on water circle on the Loess Plateau[J]. Journal nature resources, 2001,16(5):427—432.

[5] 陕西师大地理系. 西安地理志 [M]. 西安:陕西人民出版社, 1988.

[6] 张 航,徐明岗,张富仓,等. 陕西农业土壤持水性能及其与土壤性质的关系[J]. 干旱地区农业研究,1994,12(2):32—37.

[7] 陕西统计局. 陕西统计年鉴 (1990—2004) [M]. 北京:中国统计出版社,2005.

[8] 延军平. 渭河谷地的气候干暖化与未来趋势[J]. 环境科学, 1999,20(2):85—87.

[9] 黄明斌,杨新良,李玉山. 黄土区渭北旱塬苹果基地对区域水循环的影响[J]. 地理学报,2001,56(1):7—13.

[10] 陈云明,侯喜禄,刘文兆. 黄土丘陵半干旱区不同类型植被水土保持生态效益研究[J]. 水土保持学报,2000,14(3):57—62.

[11] 杨文治,邵明安. 黄土高原土壤水分研究 [M]. 北京:科学出版社,2000,86—114.

[12] 王义风. 黄土高原地区植被资源及其合理利用 [M]. 北京:中国科学技术出版社,1991.

Study on deep soil moisture in farmlands in rainy year in Xi'an

LI Yu-qin¹, ZHAO Jing-bo^{1,2}

(1. College of Travel and Environment, Shaanxi Normal University, Xi'an, Shaanxi 710062, China;
2. State Key Laboratory of Loess and Quaternary Geology, Environment Institute of Earth, CAS, Xi'an, Shaanxi 710075, China)

Abstract: Based on the determination of soil moisture in farmlands in south of Xi'an and Chang'an, the changes of soil moisture from zero to six meters in different rainy year are studied in this paper. The results show that the soil moisture is higher than 12 percent from zero to two meters, soil moisture in farmland is normal. In plentiful rainy year, the soil moisture from zero to two meters is higher than 18 percent and the soil moisture from two to six meters is higher than 24 percent, which are higher than that of the layers in normal year. It shows that Xi'an district is the place suitable to the flat root crops.

Keywords: Xi'an; rainy year; wheat land; maize land; soil moisture