

外源抗草甘膦 DNA 导入菜豆及其抗性表达

陶 波¹, 秦智伟¹, 向文胜¹, 吕桂菊²

(1. 东北农业大学农学院, 哈尔滨 150030; 2. 黑龙江省农业科学院园艺分院, 哈尔滨 150069)

摘要: 通过外源 DNA 导入技术, 将抗性 89-05-3DNA 导入敏感品系 89-13 植株中, 其后代抗性鉴定存活率为 7.5%, 而且经过三代的选择, 其受体植株的存活率为 87.5%, 其抗草甘膦遗传特性基本接近稳定。说明外源抗草甘膦 DNA 导入技术其子代表现型变化小, 稳定性快。

关键词: 草甘膦; DNA 导入技术; 抗性表达

中图分类号: S603.6 S643.1 **文献标识码:** B **文章编号:** 1001-0009(2001)05-0037-02

抗除草剂作物筛选和利用是开发选择性除草剂的新途径, 而抗性基因的利用和转移为育种提供了新的手段, 并缩短常规育种的年限, 丰富了抗性育种材料^[1]。抗灭生性除草剂草甘膦基因的利用, 为草甘膦应用提供更广阔前景^[6]。为进一步扩大草甘膦应用范围, 并保持原有菜豆品种的优良性状, 同时探索外源 DNA 直接导入技术在菜豆抗性育种实践上应用的可能性, 我们利用抗草甘膦菜豆品系的 DNA 直接导入对草甘膦敏感性菜豆品系中, 以确定其抗草甘膦特性在敏感型菜豆的表达。

1 材料和方法

1.1 材料

受体为敏感性菜豆品系 89-13; 供体为抗性菜豆品系 89-05-3

1.2 供体 DNA 的提取

DNA 提取采用黄化幼苗, 先按氯仿-异戊醇-RNA 酶法获得 DNA 制品, 然后再通过 Sepharose 4B 柱纯化^[2]。

1.3 导入方法

采用花粉管直接导入法, 在菜豆开花前将受体植株去雄, 以防止其先行授粉, 待开花后用供体 DNA 直接注射到该受体植株柱头^[3]。

1.4 处理与对照

本实验共设以下 2 组处理: 1) 89-05-3 的 DNA 导入 89-13; 2) 89-05-3 花粉杂交到 89-13; 每个处理做 60 朵花, 分布于 15 个不同植株。成熟时同时收取同一植株未作处理的受体荚为对照。

1.5 后代观察与鉴定

将处理当代种子及对照种子(包括 89-05-3 种子)在网室单粒播种, 在 D₁ 代菜豆出苗后 15~20 d(天)用草甘膦进行茎叶喷施(有效量 1 kg/hm²(公斤/公顷)), 仔细观察处理及对照受害情况, 并记录处理与对照的存活率和结实情况, 在 D₂ 代和 D₃ 代作同样的鉴定处理, 并记录其遗传和变异。

2 结果与分析

2.1 处理当代的结实率

在转移当代共获得处理种子 92 粒, 其中处理①收获种子 44 粒, 处理②收获种子 48 粒, 所收获种子与处理有一定差异, 其结实率低于自然杂交, 而转 DNA 结实率低于花粉杂交, 表明导入处理对正常授粉结实有较大的影响。

表 1 转 DNA 菜豆后代抗性表达

处理	类型	观察株数	D ₁ 存活株数	存活率 (%)	D ₂ 存活株数	存活率 (%)	D ₃ 存活株数	存活率 (%)
I	89-05-3DNA 导入 89-13	40	3	7.5	26	65	35	87.5%
II	89-05-3 花粉杂交 89-13	40	5	12.5	12	30	18	45%
CK	89-13	40	0	0	0	0	0	0
	89-05-3	40	37	92.5	40	100	40	100

2.2 转 DNA 菜豆后代抗性鉴定及表达

D₁ 代田间观察结果表明, 幼苗期长势无差异, 经草甘膦处理后, 受害植株很快死亡, 而存活的植株受害较轻, 很快就恢复正常生长, 并且在结实率上不受影响, 成熟植株都正常收获种子。经过草甘膦处理后导入 DNA 的菜豆品系与花粉杂交和对照品系对草甘膦的反映差异明显(表 1)。导入 DNA 处理存活 3 株, 存活率为 7.5%, 花粉杂交处理存活 5 株, 存活率为 12.5%, 而对照 89-

13 存活率为 0.89—0.5—3 抗性品系存活率为 92.5%。说明转入 DNA 处理中存活的抗性菜豆是由于 DNA 的导入而形成的,同时花粉杂交处理也存活抗性植株,而且花粉杂交抗性植株高于转入处理。

D₁ 代存活菜豆种子(D₂ 代)第 2 年种植经草甘膦处理后,导入 DNA 菜豆植株中存活率明显增加达 65%,抗性分离现象不明显,而杂交植株存活率只有 30%,抗性分离明显。这说明导入 DNA 植株抗性遗传稳定性好于杂交处理。

D₂ 代存活菜豆种子(D₃ 代)第 3 年种植后,幼苗期经草甘膦处理后,导入 DNA 菜豆植株中存活率达 87.5%,其抗性遗传性状基本稳定,菜豆原始遗传性状如结实率、叶片分枝、叶形等均无变化。而花粉杂交菜豆在 D₃ 代还在分离,其抗性逐渐增加,但遗传稳定性差。

3 讨论

外源 DNA 直接导入受体植物为育种提供一种新的手段,通过这种直接导入方法,在一定程度上在受体植物可获得目的基因。本试验通过 DNA 直接导入菜豆植株,使对草甘膦敏感品系获得抗性基因,和花粉杂交取得同样的效果,而且其抗性遗传基因稳定快,稳定性较好。但是外源 DNA 导入在获得目的抗性基因同时,由于外源 DNA 导入受体品种所导入的 DNA 片段大小不同,含有的遗传信息不同,并与受体基因组合的随机性,使后代性状的转化可能存在各种情况,特别是单一性状基因 DNA 片段与受体结合,使单一抗性比几个性状同时转化率^[3]。如本试验 D₁ 代转化率只有 7.5%,但通过选择手段可以达到特殊改变受体植物某些遗传性状的目的。

通过借助受体品种自交过程导入供体 DNA 在第三代就抗性稳定遗传表达,所需时间仅为通常用回交法改良的一半^[5]。同时可避免了两亲本基因组之间的全面重组。因而后代分离小,稳定快^[4]。同时由于采用品种间外源 DNA 的导入比其它作物的种间或属间外源 DNA 导入,其子代的表现型变化更小、稳定更快,目标性状的特异性转化现象更为明显。

参考文献

- [1] 陶波、秦智伟. 菜豆抗草甘膦基因筛选的研究[J]. 中国农学通报, 1993(9): 5. 31~33.
- [2] 陈永强. 植物组织 DNA 提取的一种快速方法.
- [3] 刘根齐等. 外源 DNA 直接导入小麦及其在育种上的应用[J]. 遗传学报, 1994. 21(6): 463~467.
- [4] 周光宇等. 农业分子育种授粉后外源 DNA 导入植物技术[J]. 中国农业科学, 1988. 21(3): 1~6.
- [5] Tao Bo et al. Genetic Stability of Resistance of Bean(*Phaseolus vulgaris* L.) to glyphosate. The Journal of Northeast Agricultural University, Vol 1996. 3(1): 15~20.
- [6] Barr j. Brecke et al Effect of Glyphosate on Intact Bean Plants(*Phaseolus vulgaris* L.) and Isolated cells Plant Physiol 1980 (66): 656~659.

鸡西市利用马铃薯、晚西瓜套种技术,获得十分可观的经济效益,平均 667 m²(1 亩),6 月末产马铃薯 1 000 kg(公斤),9 月中旬产西瓜 3 500 kg(公斤),现将套种经验作如下介绍。

1 马铃薯播种 应选超早熟马铃薯早大白,生产期为 70 d(天)。每 667 m²(1 亩)施农家肥 2 000 kg(公斤),磷酸二铵 15 kg(公斤),尿素 10 kg(公斤),硫酸钾 20 kg(公斤),打 70 cm(厘米)垄。将种薯堆 10 cm~15 cm(厘米)厚,盖 4 cm~5 cm(厘米)细土,浇适量水催芽,适宜温度 15℃~18℃,当芽长到 1 cm~2 cm(厘米)时,取出晒 1~2 d(天),切芽块,准备播种时间为 4 月 25 日。土壤 10 cm(厘米)土层温度稳定在 7℃以上时即可播种,播种时不要将芽块上芽碰掉,将垄开深 10 cm(厘米)沟,视土壤墒情稳定浇水量,按株距 15 cm~18 cm(厘米)摆放,覆土厚度为 4 cm~5 cm(厘米)后覆膜。当幼苗拱土顶膜时,及时扎眼放苗,并用细土掩实。当植株底部叶片变黄即可采收,一般从播种期到采收 65~70 d(天),6 月末即可采收上市。

2 晚西瓜播种 选择巨宝、富宝良种,生育期 75~80 d(天)为宜。施底肥:底肥是西瓜生育的主要养分来源,底肥的养分释放慢肥效长。施足底肥对西瓜产量质量有主要作用,施底肥可分成全地粪加堆肥,每 667 m²(平方米)施农家肥 4 000 kg(公斤),尿素 15 kg(公斤),过磷酸钙 50 kg(公斤),硫酸钾 10 kg(公斤)。

经多年经验证实,采取 2 比 2 种植方式,就是种 2 垄空 2 垄,即播种在早大白 2 条空垄上。即 4 条垄为一区马铃薯 2 垄西瓜 2 垄,鸡西市播种期为 6 月 15~20 日。播种结束,再把垄略加修整后,立即覆膜。西瓜播种 3~4 d(天)开始出苗,4~5 d(天)左右苗出齐,刚出土的小子叶,黄绿娇嫩,膜内温度较高,要及时把出土小苗上部的地膜用手撕成 3 cm(厘米)长条口,进行通风换气,降低膜内温度,这是关键环节,千万注意。当小苗的嫩茎伸长 2~3 cm(厘米)时,要把撕开长条口处地膜,立即合并一起,然后用潮湿土把合并的裂口封严(嫩茎都堆上土)把幼苗裸露在膜外。

3 田间管理 因为马铃薯与西瓜是采取 2:2 方式播种,即马铃薯 4 月 25 日播种,6 月末采收,晚西瓜是 6 月 15 日播种。苗在 5~6 叶时马铃薯采收完毕,决不会影响西瓜爬蔓,这种套种形式,白得马铃薯,马铃薯与西瓜为一个种植区,西瓜格外甜。

(黑龙江省鸡西市农业科学研究所, 158100)