

杜周和, 严旭, 左艳春, 等. 花粉管通道转高丹草总 DNA 创制饲草玉米新种质[J]. 江苏农业科学, 2020, 48(12): 141–144.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.12.030

# 花粉管通道转高丹草总 DNA 创制饲草玉米新种质

杜周和<sup>1,2</sup>, 严旭<sup>1</sup>, 左艳春<sup>1</sup>, 王红林<sup>1</sup>, 寇晶<sup>1</sup>, 张浩仁<sup>2</sup>, 蒲军<sup>2</sup>

(1. 四川省农业科学院牧业研究中心, 四川南充 637000; 2. 四川省农业科学院蚕业研究所, 四川南充 637000)

**摘要:**通过花粉管通道将高丹草总 DNA 导入玉米自交系, 获得遗传改变的突变体。突变体第 1 代穗柄明显增长, 结实双穗, 第 2 代长穗柄性状消失, 双穗性状保持, 第 3 代双穗性状保持, 株高发生分化。经纯化选择, 获得遗传稳定的饲草玉米种质新材料, 株高增高, 叶片变细长, 双穗发育良好, 饲用品质改善, 全株干物质含量提高。

**关键词:**花粉管通道技术; 高丹草; 总 DNA 提取; 饲草玉米; 种质资源

**中图分类号:** S513.03 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)12-0141-04

草牧业是农业的重要组成部分, 是一个国家农业现代化水平的重要标志。欧美发达国家畜牧产值的 60% 以上由饲草转化而来, 美国饲料蛋白的 50% 以上来自饲草<sup>[1]</sup>。任继周院士指出, 制约我国草业发展的瓶颈是品种问题。优良种质资源匮乏是制约我国饲草品种选育的重要因素之一。草料是草食牲畜的必需饲料组分, 过量使用粮食饲养, 不仅增加草食牲畜的养殖成本, 而且会造成草食牲畜免疫力降低, 增加发病机会。玉米是重要的粮食和饲料作物, 2015 年中央一号文件提出“粮改饲”工程, 青贮玉米是工程推荐的首选草种。

利用花粉管通道转导外源 DNA 是我国科学家首创的植物转基因技术, 1981 年首次利用该技术培育出抗枯萎病的棉花新品种<sup>[2]</sup>。随后, 众多科学家以不同植物为对象进行了大量研究, 取得一批重要成果<sup>[3]</sup>。祁永红等将大豆 DNA 导入玉米自交系, 获得具有广泛变异的不同类型<sup>[4]</sup>。张秀君等将含高赖氨酸蛋白质基因的 cDNA 导入玉米, 使籽粒干物质中赖氨酸含量提高 18.75%<sup>[5]</sup>。孙学辉等将高赖氨酸基因导入玉米自交系, 获得种子中粗蛋白含量 11.05%、赖氨酸含量提高 16.00% 的转化植株<sup>[6]</sup>。王丰等将稗草总 DNA 和玉米总 DNA 导入水稻, 获得抗稻瘟病转化植株<sup>[7]</sup>。王罡等将 *Bt* 抗虫毒蛋白基因转导到玉米自交系, 获得玉米抗虫育种优良抗源<sup>[8]</sup>。曹阳等研究获得抗虫转基因高粱<sup>[9]</sup>。侯文

胜等成功将人工合成的雪花莲凝聚素基因 *sgna* 导入优良小麦品系<sup>[10]</sup>。乐锦华等将广谱抗真菌的莱豆基因与烟草基因导入棉花育成抗枯萎病、耐黄萎病的抗病新品系<sup>[11]</sup>。张茂银等将新疆大赖草 DNA 导入普通春小麦获得大穗、多粒、晚熟变异株<sup>[12]</sup>。邹冬生等将玉米 DNA 导入水稻, 获得单穗总粒数、千粒质量显著增加的超质量类型<sup>[13]</sup>。李建粤等将大豆总 DNA 导入水稻, 提高了稻米的蛋白质含量和总氨基酸、赖氨酸含量<sup>[14]</sup>。

本研究采用花粉管通道技术将植株分蘖力强、产草量高的乐食高丹草总 DNA 导入玉米自交系, 以期获得在营养体生物产量、品质、抗性、再生性等方面有所突破的饲草玉米新种质, 丰富饲草玉米育种的亲本选择。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

试验草种为乐食高丹草, 市售; 自 46 玉米自交系由四川省农业科学院牧业研究中心提供。

### 1.2 试验方法

1.2.1 试验地概况 试验地位于四川省南充市顺庆区濛溪镇 (106°12'E, 31°06'N), 海拔高度为 305 m, 年日照时数为 1 062 h; 年均气温为 17.6 °C, 极端最低温度为 -2.8 °C, 极端最高温度为 42.1 °C, 10 °C 以上年积温为 5 206.9 °C, 平均气温 10 °C 以上的天数为 232 d; 无霜期为 307 d; 年降水量为 1 060 mm。紫色土壤, 0~20 cm 耕作层土壤 pH 值为 7.94, 有机质含量为 42.8 g/kg, 含全氮 5.1 g/kg、硝态氮 178.82 mg/kg、速效钾 163.66 mg/kg、有效磷 11.96 mg/kg。

收稿日期: 2019-07-01

基金项目: 四川省重点研发项目 (编号: 2018NZ0058, 2019YFN0022);

四川省财政创新能力提升工程项目 (编号: 2016TSCY-007)。

作者简介: 杜周和 (1968—), 男, 四川南充人, 博士, 研究员, 主要从事饲草种质资源及遗传育种研究。E-mail: duzhouhe@126.com。

1.2.2 植物基因组 DNA 提取 乐食高丹草种子用培养箱 25 ℃ 催芽,剪取幼苗幼嫩茎叶,用天根生化科技(北京)有限公司的 DP305 型试剂盒提取基因组总 DNA;核酸测定仪 NanoDrop 2000 测定浓度,内切酶 *Hind* III、*Bam*H I 20 ℃ 酶解 8 h,用柠檬酸钠(SSC)缓冲液稀释至 300 μg/mL,4 ℃ 保存备用。

1.2.3 外源 DNA 转导入玉米自交系 2014 年 4 月 9 日,田间种植自 46 玉米自交系,穴播,行距 100 cm、株距 40 cm,苗高 15 cm 时间苗,每穴留壮苗 1 株。开花前夕用硫酸纸袋分别套住雌花和雄花,避免田间自然传粉污染。每天观察开花进度,雌花盛开时人工收集花粉自交授粉,然后继续套袋保护。人工授粉 15 ~ 24 h 后,剪去距穗轴顶部 1 ~ 2 cm 以上的苞叶和花丝,用移液器将乐食高丹草 DNA 溶液滴在花丝剪口处,每穗 300 μL。继续套袋保护直至玉米成熟,单穗收种。

1.2.4 种植调查 转基因处理玉米单穗收种,翌年按穗行播种,同时播种未处理的自 46 自交系作对照,全生育期观察比较生长发育情况,发掘性状变异株。变异后代隔离种植,调查其生物学性状、农艺学性状及遗传分化情况。转化第 1 代只发现 1 株变异株,作单株调查;其他各代均分别测定 5 个单株计算算术平均值。叶长、叶宽测量自上而下第 7 张叶;株高、叶长、叶宽、穗位、穗长、穗围粗用卷尺测量;茎粗用游标卡尺在基部第 2 茎节“十”字方向测量 2 次;全株干物质含量测定在籽粒 1/2 乳线期收割(留茬高度为 5 cm),105 ℃ 杀青 30 min 后 65 ℃ 烘干测定。

1.2.5 数据处理 采用 Excel 2007 进行数据统计分析。

2 结果与分析

2.1 乐食高丹草基因组 DNA 提取

经检测,所提取的 DNA  $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$  值为 1.83,满足试验要求。

2.2 变异材料发掘

经种植观察,处理材料第 1 代和对照在种子出苗率、生长发育速度、株高、茎粗、株型、叶片大小、叶色、穗位等指标均未发现明显变异。在处理材料的 08 穗行发现 1 株变异(命名为 46 优),单株结实双穗,穗柄明显增长,穗柄长 26 cm(图 1);籽粒变大,百粒质量增加,约为 38 g,与对照相比增加约 33.33%(表 1)。

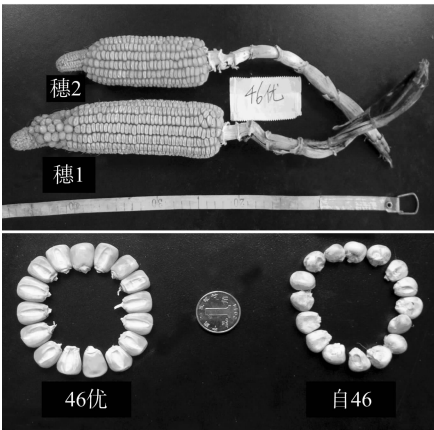


图1 变异株果穗

表 1 转基因变异株第 1 代果穗变异性状

材料	穗柄长 (cm)	穗长 (cm)	穗围粗 (cm)	穗行数 (行)	行粒数 (粒)	秃尖长 (cm)	百粒质量 (g)
变异株穗 1	26.0	22.1	18.3	16	42	2.1	38.1
变异株穗 2	26.0	16.2	17.4	16	30	3.2	37.9
对照	4.6	17.6	17.8	16	34	2.5	28.5

2.3 变异材料继代

变异株的双穗虽然在穗长和行粒数方面存在差异,但双穗一大一小是普通双包玉米常见的现象,因此将 2 个长柄果穗混合脱粒,合并为一个样本作进一步的继代繁育及遗传分化研究。

同期种植变异材料 46 优和对照自 46。自 46 保持自交系固有的短穗柄特性;绝大多数为单穗植株,双穗植株仅占 3.82%。变异材料 46 优的长穗柄性状完全消失,双穗性状出现分化,少数植株保持双穗,多数植株恢复为单穗。选取双穗发育良好的 5 个单株果穗混合收种继代研究。后代中长穗柄性状依然没有出现,双穗性状保持,株高出现分化。分别选取最高株和最矮株各 5 株混合收种建立小系,分别命名为 46 优高和 46 优矮。继代繁育 46 优高和 46 优矮,对株高和双穗性状进行纯化选择,至第 5 代时性状基本稳定,得到 2 个变异材料。

2.4 变异材料基本性状

同期种植 46 优高、46 优矮和自 46,比较它们的基本农艺性状和生物学特性。46 优矮保持双穗特性,其余各项性状指标接近自 46 自交系;46 优高保持双穗特性,株高极显著增高,茎秆变细,叶形变细长,穗位变高,果穗变大,植株干物质含量增高(表 2)。

3 讨论与结论

3.1 种质资源创新助力饲草新品种选育

随着畜牧业的迅猛发展,人畜共粮、粮饲共享

表 2 变异新材料基本农艺性状

材料	株高 (cm)	叶片数 (张)	叶长 (cm)	叶宽 (cm)	穗数 (穗)	主穗位 (cm)	穗长 (cm)	穗围粗 (cm)	茎粗 (cm × cm)	全株干物质 含量(%)
46 优高	197 **	14	96.7 **	11.2 *	2	95 *	25.5 **	20.1 *	2.22 × 2.42	27.04 *
46 优矮	165	14	80.5	13.5	2	85	19.2	18.4	2.35 × 2.83	26.51
自 46	158	14	79.6	13.4	1	83	17.6	17.8	2.41 × 2.53	24.53

注: \*\*、\* 表示在 0.01、0.05 水平上差异显著。

的模式已不能满足现代畜牧业发展的要求,必须大力发展草食畜牧业<sup>[15]</sup>。当前制约我国草业发展的瓶颈是品种问题。种质资源是农牧业品种创新的物质基础,是国际公认的战略资源。水稻育种的 2 次革命性变革(矮化育种和杂种优势利用)均是以特异种质资源的发现和利用为前提的。矮化育种成功于矮秆野生水稻资源的发掘和利用;杂种优势的利用归功于雄性不育细胞质源的发现和利用<sup>[7]</sup>。发掘现有种质资源库中的优良基因和创造自然界不存在的新基因是资源创新工作的两大根本任务。饲草作物种类繁多,饲草种质资源研究基础薄弱,核心骨干亲本缺乏,严重制约了我国突破性饲草品种的育成推广。过度依赖进口品种的局面必须尽快打破,迫切需要大力加强饲草资源创新和育种工作,育成有自主知识产权的主推品种,牢牢掌握我国饲料安全的主动权。

### 3.2 花粉管通道转基因技术的特点及其实践意义

#### 3.2.1 花粉管通道转基因技术原理

植物授粉后,花粉萌发,形成一条贯穿花柱的花粉管通道,将雄配子送入胚珠完成授精作用。授粉后一定时间内,花粉管通道并不及时闭塞,外源 DNA 片段就能沿着花粉管通道渗入细胞胚囊<sup>[16]</sup>。植物在双受精完成后一定时间内,受精卵细胞尚不具备完整的细胞壁和核膜系统,细胞内外物质交流频繁,此时进入胚囊的外源 DNA 片段就有可能进入受精卵细胞,被整合到受体植物基因组中<sup>[17]</sup>。邓德旺等利用激光共聚焦显微技术确定了外源 DNA 进入胚囊的途径是花粉管外通道而不是花粉管内通道,即外源 DNA 沿传输组织束与花粉管间的间隙而非花粉管内腔通道进入胚囊<sup>[18]</sup>。影响 DNA 导入效率的因素包括供体 DNA 的片段大小、纯度、浓度以及 DNA 载体缓冲液 pH 值和导入时期等。转化后代性状变异广泛、类型丰富,涉及作物的各类数量性状和质量性状,包括植株形态、生长发育、生理生化、抗性、产量、品质等诸多方面。

#### 3.2.2 花粉管通道转基因技术的特点

植物转基因方法很多,如基因枪法、超声波法、激光转化法、

农杆菌介导法、花粉管通道法等。其中应用最广的是农杆菌介导法和基因枪法;花粉管通道法因其独一无二的优势,已被众多学者采用。花粉管通道法具有设备要求低、操作简便、适用范围广等特点。只要能进行常规的 DNA 提取及纯化即可,不需要复杂昂贵的仪器设备支撑;不需要组织培养和诱导再生植株,直接获得转基因植株,可直接针对目标性状的表现型进行鉴定,操作简便;可用于任何开花植物,进行任何物种甚至人工合成的基因转移转化;一般不会形成嵌合体,变异性状稳定较快,一般筛选到遗传稳定品系只需 3~4 代。花粉管通道转基因技术的局限之处在于,一是受植物花期限制,操作者需对受体植物开花受精的时间过程准确把握,方能使受体在最佳感受态时接受外源 DNA 完成转化。二是导入的一般都是外源总 DNA,其与受体基因组随机整合,缺乏有效的目标控制,常给受体植物带来一些不希望的连锁累赘性状,增加后期纯化选择的工作量<sup>[19-20]</sup>。

#### 3.2.3 花粉管通道转基因技术的实践意义

转基因育种已然成为当前新法育种的主流技术之一,但除为数不多的重点实验室可以深入开展转基因基础研究和精准操作的分子育种外,绝大部分生产一线的作物育种家能够采用的还是投入节省、操作简便的技术方案,花粉管通道转基因技术就是其中重要的一种。一线育种家是各类作物新品种选育的绝对主体,迫切需要数量众多、类型丰富、特色鲜明的育种素材,种质资源创新是其重要工作内容。花粉管通道转基因技术能跨越天然物种屏障,把来自其他生物基因转导到与其毫无亲缘关系的受体植物中,获得所需的理想性状,培育出高产、优质、多抗的作物新品种<sup>[21]</sup>。就饲草育种而言,饲料作物种类繁多,目前对其遗传背景的了解非常有限,目标基因的分离鉴定存在很大困难;同时,为了避免研究与应用的脱节,从现行遗传育种的应用角度考虑,花粉管通道直接转外源 DNA 法是饲草转基因育种的重要手段<sup>[22]</sup>。

### 3.3 玉米花粉管通道转基因技术关键

花粉管通道形成是作物授精结实的前提,不同作物从授粉到花粉管通道贯通所需时间是不同的。水稻所需时间较短,授粉后 1.5 ~ 2.0 h 即可形成;番茄需要 24 ~ 28 h;棉花需要 24 h 左右<sup>[7,18]</sup>。玉米授精结实时间主要集中在授粉后 15 ~ 22 h,且结实顺序为先中部,后下部,再上部<sup>[23-24]</sup>。试验表明,玉米自交授粉后 22 h 左右导入外源 DNA 所产生的变异率最高。玉米雌花花丝较长,剪去过长的花丝可以缩短外援 DNA 穿越的路径,有利于更多 DNA 及时到达胚囊,提高转化效率;一般以距离穗轴顶部 1 ~ 2 cm 剪去花丝为宜<sup>[25]</sup>。DNA 浓度以 300 μg/mL 为宜;配制 DNA 溶液的溶剂以中性柠檬酸钠 (SSC) 缓冲液为好。

### 3.4 研究成果的实践意义

本研究采用花粉管通道技术,突破种属限制,将同科异属的高丹草 DNA 转导入玉米自交系中,获得了株高增高、叶形变得细长、双穗性状突出、干物质含量提高的饲草玉米新种质,增加了饲草玉米育种的素材选择。植株形态的改变表明确有外源基因整合到受体基因组中,引发了可稳定遗传的变异;双穗发育良好,增加了玉米籽粒在收获物种的比例,饲用品质提高。但研究还只是初步的,新材料的生理生化变异及转化基因的分子检测尚待深入进行,新材料的育种价值更需试验验证。本研究的重要实践意义不在于获得了 1 份突变新材料,更在于将花粉管通道转基因技术引入饲草育种研究中,为饲草种质资源创新增添了一条行之有效的新途径。

### 3.5 结论

饲草核心骨干种质资源匮乏及优良品种不足严重制约我国畜牧业的发展。对广大一线育种工作者而言,花粉管通道转基因技术是创新种质资源的一种有效手段,已在其他作物育种中广泛应用,取得可喜成绩,但在饲草育种上几乎还是空白。本研究成功将高丹草 DNA 转导到饲草玉米中,获得有益突变新材料,展现了花粉管通道转基因技术在饲草种质资源创新中的可行性,为创制出量多质优的饲草种质新资源提供参考。

#### 参考文献:

- [1] 刘忠宽,秦文利,智建飞. 河北省农牧结合战略研究[J]. 河北农业科学,2006,10(2):26-30.
- [2] 龚蓁蓁. 植物“分子育种”的创始人——周光宇[J]. 生命科学,2007,19(3):254-256.

- [3] 黄骏骥,钱思颖,刘桂铨,等. 外源抗枯萎病棉 DNA 导入感病棉的抗性转移[J]. 中国农业科学,1986,19(3):32-36,97.
- [4] 祁永红,韩玉珠,李春秋,等. 玉米自交系授粉后外源 DNA 的导入转化及性状变异的研究初报[J]. 玉米科学,1996,4(1):19-21.
- [5] 张秀君,刘俊起,赵倩,等. 用基因枪将高赖氨酸基因导入玉米及转基因植株的检测[J]. 农业生物技术学报,1999,7(4):363-367.
- [6] 孙学辉,敖光明,于静娟,等. 经高赖氨酸基因导入玉米自交系的研究[J]. 农业生物技术学报,2001,9(2):156-158.
- [7] 王丰,柳武革,李金华,等. 水稻外源 DNA 导入系的创建及主要性状分析[J]. 分子植物育种,2004,2(4):489-494.
- [8] 王昱,张艳贞,魏松红,等. 花粉管通道法将 Bt 毒蛋白基因导入优良玉米自交系[J]. 吉林农业大学学报,2002,24(4):40-44.
- [9] 曹阳,赵东利,王仁军,等. 高粱花粉管通道法导入抗虫基因的研究[J]. 大连大学学报,2001,22(6):47-52.
- [10] 侯文胜,郭三堆,路明. 利用花粉管通道法获得转雪花莲凝集素基因(*sgna*)小麦[J]. 植物学通报,2003,20(2):198-204.
- [11] 乐锦华,祝建波,崔百明,等. 利用目的基因转化技术培育棉花抗病新品种[J]. 石河子大学学报(自然科学版),2002,6(3):173-178.
- [12] 张茂根,刘庆昌,王子霞,等. 用花粉管通道法将新疆大赖草 DNA 导入普通小麦的研究[J]. 农业生物技术学报,2000,8(2):165-168.
- [13] 邹冬生,万文举,彭克勤. 遗传工程水稻研究(二)——玉米 DNA 导入水稻引起的遗传变异[J]. 湖南农业科学,1993(2):8-10.
- [14] 李建粤,范士靖,邹震,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,2001,119(6):3-7.
- [15] 杜志宏,张福耀,平俊爱,等. 我国青贮玉米育种研究进展及发展趋势[J]. 山西农业科学,2010,38(2):85-87,70.
- [16] 孟昭河,刘新军,王玉菊,等. 利用花粉管通道法将外源 DNA 导入水稻之研究进展[J]. 中国农学通报,2006,22(6):52-56.
- [17] 李长缨,简元才. 花粉管通道法在植物遗传转化中的应用[J]. 生物学杂志,2000,17(1):9-10.
- [18] 邓德旺,郭三堆,杨志民. 棉花花粉管通道法转基因的分子细胞学机理研究[J]. 云南大学学报(自然科学版),1999,21(6):124-125.
- [19] 王永锋,栾雨时,高晓蓉. 花粉管通道法在植物转基因中的研究与应用[J]. 东北农业大学学报,2004,35(6):764-768.
- [20] 彭慧娟,刘国华. 花粉管通道法在植物遗传转化中的研究与应用[J]. 作物研究,2005(增刊1):317-321.
- [21] 刘源霞,兰进好,赵延明. 基因工程在玉米遗传育种中的应用[J]. 玉米科学,2007,15(增刊1):146-149.
- [22] 祁永红. 花粉管通道法在玉米自交系改良中的应用[J]. 黑龙江农业科学,2006(3):17-19.
- [23] 李向龙,张中保,张春,等. 通过去除花丝确定玉米花粉管通道形成时间[J]. 江苏农业科学,2018,46(22):80-82.
- [24] 张雅君,陈钦坚,孙毅,等. 玉米花粉管伸长的时空进程[J]. 玉米科学,2015,23(4):98-103.
- [25] 祁永红. 大豆 DNA 直接导入玉米自交系的研究[J]. 玉米科学,2000,8(1):34-36.