

芦苇草 DNA 导入小麦抗盐性转化体的筛选

刘志生 张坤普 付秀云

(山东省德州市农科所,德州 253015)

提 要 以鲁麦 8 号小麦为受体,开花授粉 0.5 h 后导入芦苇草 DNA 10 穗,113 朵花。D₀ 收获 66 粒,D₁ 实收 39 个单株。从 D₂ 中选出 16 个变异株,出现比较明显变异性状的是无芒、粒色、株高、穗长、穗粒数、颖尖的锐、钝等,特别是变异后代的抗盐性。以上变异后代通过自然盐渍土、盐池、水培筛选,选育出了 89D₂₅₂₂₁₃、89D₃₁₁₁₁₉ 等抗盐性新品系。从形态特征和性状上看,说明芦苇草 DNA 已进入鲁麦 8 号受体细胞核内,并对受体基因组产生了影响,其后代得到充分表达。

关键词 芦苇草;DNA 导入;小麦;抗盐性;筛选

小麦分子育种是通过花粉管通道,将外源 DNA(基因)导入小麦,改变小麦的遗传基础,培育小麦新品种。小麦分子育种克服了常规育种中边缘杂交不亲和、后代不育和疯狂分离时间过长等问题,缩短了育种年限,一般育成 1 个新品种(系)只需 3~4 代。

小麦是最早进行分子育种的作物之一,在我国已进行了 20 多年的研究,技术方法日臻完善,其理论基础与机理的研究取得了很大进展,同时培育出一批具有抗病、高产、优质等优良品种(系)。小麦分子育种所取得的成果证实,这是一种可行的育种方法,特别是在小麦抗性改良方面,有着很好的应用前景。然而,芦苇草 DNA 导入小麦培育抗盐性新品种(系)尚无报道,笔者试图用芦苇草 DNA 导入小麦的方法培育并筛选小麦抗盐性新品种(系),现将结果报道如下:

1 材料和方法

1.1 芦苇草 DNA 的提取和导入

受体为山东省已推广的高产小麦品种鲁麦 8 号(2n=42)。该品种有矮秆高产、长芒、白壳、白粒。不抗条锈病、叶锈病、白粉病和穗发芽等特点,特别是对盐碱非常敏感。

供体为芦苇草(2n=14),禾本科野生植物,特别耐旱、抗盐碱、抗条锈病、叶锈病和白粉病,适应性强,茎秆粗壮、坚硬,叶片宽、短、厚、蜡质多。春季取足够数量的芦苇草心叶,由中国科学院生物化学研究所提取 DNA 并配制溶液。

1.2 芦苇草 DNA 导入小麦的方法

于小麦开花期,早晨 8~9 点前进行整穗,然后记载每个穗开花和自由授粉时间,在授粉后 0.5 h 进行导入处理。先剪去柱头,使子房上端成截面,随即用微型注射器将芦苇草 DNA 溶液滴于子房上端横切面上,每朵小花 10 μ L,以 0.1 \times SSC 为对照,记载导入时间,并挂牌标记。

1.3 导入后代的处理

将D₀的种子分收、分藏。秋播时以穗为单位播成穗行,种于温室,温室0~20 cm耕层土壤盐分在0.3%以上。D₁代成熟后按穗行分收,单株编号,单脱、单藏。秋播时,把种子分成两份,一份种于温室盐碱土中,一份种到大田非盐碱土中。田间设计用常规育种,从出苗到成熟仔细观察记载各生育期和变异情况,以便田间和室内选择,考察变异单株。秋播时将温室盐碱土中和大田非盐碱土中选择的所有单株进行自然盐渍土、盐池、水培筛选。

1.4 抗盐性筛选方法

1.4.1 田间自然盐渍土筛选

将参试材料种在自然盐渍土中,使其在自然条件影响下进行。其田间设计是将参试材料分别种于盐区(0~20 cm耕层含盐量0.25%~0.6%)和非盐区(土壤耕层含盐量<0.25%),相对种植,顺序排列,4次重复,小区面积1 m²,行长1 m,行距25 cm,4行区,每隔5个参试材料设德选1号和科遗26为对照。调查记载基本苗、分蘖动态、株高、单位穗数、穗粒数和小区产量。分别计算各性状的抗盐系数和抗盐指数,根据计算结果评价抗盐级别。

1.4.2 盐池筛选

盐池为防渗漏水泥池,盐池上方为玻璃罩,以便人工控制浇水和施肥期,统一标准。盐池分有盐池和无盐池,盐池土质为轻壤土。有盐池土壤含盐量为0.3%,无盐池土壤含盐量<0.2%。盐池宽0.7 m,长10 m,深1 m。将参试材料同时分别种在盐池和非盐池内,每隔10个材料种对照种德选1号和科遗26,顺序排列,不设重复,双行区,小区行长同池宽,行距15 cm。调查记载项目、计算项目同上。

1.4.3 水培筛选

将参试材料分别种于不同盐溶液浓度的烧杯中,盐溶液浓度分3种:①淡水(矿化度为0.72 g/L);②中度盐溶液(矿化度为12.72 g/L);③重度盐溶液(矿化度为21.52 g/L)。盐溶液浓度分别相当于土壤含盐量的0.3%和0.5%。将溶液分别装入内径9 cm,高11 cm,容量为500 mL的玻璃烧杯内,在400 mL刻度处挂尼龙网,把参试材料播于沙网上,每杯播30粒,重复2次,以德选1号和科遗26为对照。每隔2 d各加淡水1次,使溶液始终保持在400 mL高的水平面上,培养25 d,幼苗长到两叶时,分别统计每杯的出苗数、株高、鲜苗重、风干苗重、鲜根重和风干根重,计算失水率。其它计算内容同上。

2 结果与讨论

芦苇草DNA导入鲁麦8号,共处理10穗,113朵花;D₀结籽66粒,结实率58.4%。D₁代收单株39株。在温室条件下,均比受体早抽穗7 d,早熟5 d。从D₂中选出16个变异株,各单株均同时出现2个以上性状的变异。其中无芒的变异5株,红粒变异2株,株高超亲的8株,穗长超亲的6株,每穗小穗数绝大多数比受体多,穗粒数50~70粒的共7株,颖尖由锐变钝的5株。以上这些变异株均表现了高度抗盐性,在耕层盐分0.3%以上的条件下,叶片不但正常落黄,而且叶功能期比受体长3~4 d。将其变异材料进一步在自然盐渍土、盐池、水培中鉴定筛选,结果表明,89D₂₅₂₂₁₃和89D₃₁₁₁₁₉抗盐性2级,而受体抗盐性4~5级。自然盐渍土筛选既有自然环境因素的影响,又有基因型表达,是基因型和环境条件互作的结果。由于土壤盐分移动和分布不均匀,因此,尽可能在含盐量差异较小的范围内,使区组面积尽量缩小,所以小区面积最大1 m²,并多设对照种。经统计分析表明,经济产量的抗盐系数与其构成产量因子的抗盐系数之间,以及与株高的抗盐系数之间都有极显著的正相关。由于土壤盐分移动和分布不均匀的特点,尽管缩小面积,相距较远的材料仍存在着较大差异,为解

决这一矛盾,必须将抗盐系数评价品种(系)的抗盐力改为抗盐指数予以评价。抗盐指数是将参试材料的抗盐系数除以相邻对照种的抗盐系数之商。用抗盐指数评价抗盐级别的指标是: ≥ 1.3 为1级, ≥ 1.1 为2级, ≥ 0.8 为3级, ≥ 0.5 为4级, < 0.5 为5级。用抗盐指数作为评价小麦抗盐力的指标,它不但可以消除土壤环境差异造成试验结果有误差的矛盾,而且使品种间年度间的试验结果准确、可靠,又有可比性。

盐池筛选是在人工控制土壤盐分和水分子下进行的,可避免自然因素干扰和盐分不均造成的影响,有利于抗盐基因的表达,是自然盐渍土筛选的辅助和补充。盐池土壤含盐量的确立,是根据小麦为中度抗盐作物,将整体土壤盐分配制成 0.3%,这样的土壤盐度使绝大部分参试材料都能获得经济产量,便于计算经济产量的抗盐系数及抗盐指数。

水培筛选是在小麦苗期,尤其是断乳期,对盐分最为敏感,最容易筛选抗盐力强的小麦新品种(系)。研究表明,单株风干苗重、风干根重、鲜苗重、出苗率、幼苗高度、失水率与抗盐系数之间都呈显著正相关。测定小麦抗盐品种(系)的不饱和脂肪酸和脯氨酸的含量,进而鉴定筛选小麦的生理抗盐性。

以上3种筛选方法可以互补,是比较系统而又全面的筛选方法,筛选的结果准确、可靠,对参试材料可做出综合的、正确的评价,是先进而可行的。

3 结 论

通过以上筛选方法筛选出的 89D₂₅₂₂₁₃、89D₃₁₁₁₁₉等抗盐小麦新品系,是芦苇草 DNA 导入鲁麦8号小麦所产生的抗盐体,从形态特征和性状上说明芦苇草 DNA 已进入鲁麦8号受体细胞核内,并对受体基因组产生了影响。芦苇草的高度抗盐性、穗大、粒多、无芒、秸秆坚硬、适应性强等特点在后代抗盐转化体中得到充分表达。

Reed DNA Introducing into Wheat and Salt-resistant Transformation Screening

LIU Zhisheng, ZHANG Kunpu and FU Xiuyun

(Institute of Agricultural Science Dezhou City of Shandong Province, Dezhou 253015)

Abstract The introduction was made between wheat cultivar Lumai 8 as receptor and reed. After half hour of pollination 113 flowers of 10 ears were used for the introduction. The plants of D₀ generation produced 66 grains. Then 39 plants were obtained from D₁ generation and 16 variant plants were selected from D₂ generation. The evident variations were found in several phenotypes, including the awn property, grain color, plant height, ear leath, grain number of each ear and sharp or dull of grain husk point, especially salt resistance. The variation were screened from nature salt soil, salt pond, water pond planting in late generations 89D₂₅₂₂₁₃ and 89D₃₁₁₁₁₉ and other salt-resistant lines were selected.

Key words Reed chromosome, DNA introducing, Wheat, Variation, Screen, Salt resistant

(责任编辑:张 瑛)