

# 经水稻花粉管导入外源 DNA 的 放射自显影研究

闫洪奎 王丹恣 肖永翔 沈银保

(吉林市农科院作物所,吉林 132101) (吉林省农科院原子能所,公主岭 136100)

**提 要** 本研究应用 $^3\text{H}$ -Tdr 经生物合成法制备玉米 $^3\text{H}$ -DNA,借助微观放射自显影(RAG)技术,按常规方法进行操作,探讨玉米 DNA 经花粉管通道进入水稻胚囊的可行性。结果表明,生物合成标记的 DNA 放射性活度满足 RAG 要求,花柱切口部位存在 $^3\text{H}$ -DNA,在部分花柱切片中发现自显影银粒,但胚囊内未能检验到。

**关键词** 生物合成标记;微观放射自显影;外源 DNA 导入;花粉管通道

我国 50 年代后广泛进行了旨在增强抗性、改善品质等方面的远缘杂交试验<sup>[1]</sup>,出现诸如玉米稻、芦苇稻<sup>[2]</sup>、高粱稻<sup>[3]</sup>等新型杂交类型。同期国外也进行了 DNA 转化等方面的大量研究工作。周光宇<sup>[4,5]</sup>依据上述研究结果和已有理论,提出 DNA 片断杂交的假说。此后国内许多工作者进行外源 DNA 导入的研究工作<sup>[6~9]</sup>,并有不同程度的变异现象,关于导入的验证工作也有所进展,将 RAG 技术用于此项研究具有独特的优势,此技术对棉花外源 DNA 导入的应用有所报道<sup>[10]</sup>,但对水稻经花粉管通道进行外源 DNA 导入的验证未见报道,为更深入研究,并进行了此项工作。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

DNA 供体:玉米四单 8。

导入受体:水稻 86-x-78(吉林省农科院水稻所提供)。

标记前体: $^3\text{H}$ -Tdr(中科院上海核技术开发公司)。

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 玉米 $^3\text{H}$ -DNA 制备

取玉米种子若干并消毒,在 25℃ 下避光培养,待胚根伸出后加入稀释 50 倍的 $^3\text{H}$ -Tdr 少量,以后每隔 5 h 加入一次 $^3\text{H}$ -Tdr,待幼苗叶尖出芽鞘时,将根叶分别剪下洗净,称重,置 -20℃ 下备用。DNA 提取按常规方法进行<sup>[11]</sup>。

#### 1.2.2 DNA 测定及放射性活度测定

①将制得的 DNA 用紫外分光光度计在 220~300 nm 扫描测定纯度;用二苯胺法测定 DNA 含量;用琼脂糖凝胶电泳法测定 DNA 整齐度。

收稿日期 1995-10-13

注:本论文是在高金方研究员、吴殿武教授指导下完成的,特此表示感谢。

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

含量;经二苯胺法测定 A595 及标准曲线, DNA 含量为  $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 。

电泳;经琼脂糖凝胶电泳可知,所制备的 DNA 整齐度好。

放射性计数:用于导入的 DNA 总强度为  $125 \mu\text{Ci}/\text{mL}$ 。

## 2.2 导入

$^3\text{H}$ -DNA 滴于花柱切口后,首先附着于切口表层细胞,以后向细胞内渗入;处理后 1 h 切口部位有大量银粒,且部分花柱内亦有银粒;处理后 2 h 银粒位于花柱基部,位于珠孔附近,有极少部分切片处理后 20 h 银粒位于子房腔壁上。

## 3 讨论

本实验是按照段晓岚等<sup>[7]</sup>设计进行外源 DNA 导入操作。结果可见,外源 DNA 滴于花柱切口后,大部分能被切口组织吸附,但是向花粉管内移动难度大,即使进入花柱,仍停滞不前。由于外源 DNA 自然移动慢,有可能诱导 DNA 大量产生。因此,有必要考虑某种胁迫或诱导方法,加快外源 DNA 移动,才有可能使该技术发挥更大的作用。

## 4 小结

由前述测定结果可见,本实验所采用的生物标记法制备的 $^3\text{H}$ -DNA 的比强可使核-4 乳胶在 3 周时间内曝光到可显银粒的程度,完全可供 DNA 示踪用。

常规法提取的 DNA 纯度和含量可满足实验要求,且分子量基本一致。

DNA 滴于花柱切口后,大量分布于切口表层部分细胞内外,部分切片的花柱中发现显影银粒,但未能在胚囊内检测到。

## 参 考 文 献

- 1 中国科学技术情报所. 作物远缘杂交育种, 1977
- 2 江西宜丰农科所. 芦苇稻选育初报. 遗传与育种, 1977, (5): 6~17
- 3 湖北农科所高粱稻选育小组. 高粱稻(A型)的选育. 遗传与育种, 1977, (1): 25~26
- 4 周光宇. 也谈玉米稻. 遗传与育种, 1977, (5): 24~25
- 5 周光宇. 从生物化学角度探讨远缘杂交的理论. 中国农业科学, 1978, (2): 16~20
- 6 周光宇等. 农业分子育种——授粉后外源 DNA 导入植物技术. 中国农业科学, 1988, 21(3): 1~6
- 7 段晓岚等. 外源 DNA 导入水稻引起性状变异. 中国农业科学, 1985, (3): 6~9
- 8 雷勃钧等. 外源野生大豆 DNA 导入栽培大豆引起的变异. 中国油料, 1989, (3): 13~14
- 9 陈启锋等. 生物工程应用于作物育种的试验研究 第 1 报 外源 DNA 导致水稻性状变异. 福建农学院学报, 1987, 16(3): 175~182
- 10 龚蓁蓁等. 授粉后外源 DNA 导入植物技术——DNA 通过花粉管道进入胚囊. 中国科学(B), 1988, (6): 611~614
- 11 陈永强. 植物组织 DNA 提取的一种快速方法. 遗传, 1979, 1(1): 39~40

(责任编辑:任 禾)