

“匀浆互补法”测试杂种优势的研究 (IV)

——对水稻杂种优势的测试

杨福愉 邢菁如 陈文雯 张靖溥

(中国科学院生物物理研究所, 北京)

提 要

前曾报道,应用“匀浆互补法”替代“线粒体互补法”可以作为测试谷子、玉米和棉花杂种优势的一个生化方法。本文报道应用“匀浆互补法”测试八个水稻组合的杂种优势也获得理想的结果,准确率达85%。

关键词 匀浆互补, 杂种优势, 水稻, 氧化活性

杂交育种仍然是选育优良品种有效途径之一,但强优势杂交种的获得一般都是在大量杂交组合与多年产量比较的基础上才能实现。为

了减少育种工作的盲目性,缩短育种周期,减轻工作量,人们都试图找出一些有效的生理生化指标来进行预测,1966年美国McDaniel等^[1,2]曾

想,而滤纸则可完全将菌落转移。由于大菌落所包含的质粒拷贝数多于相应的小菌落,因此产生的杂交信号较强,减少了曝光时间(室温,2h)。此外,由于滤纸法省去了真空烤膜和预杂交操作,缩短了整个分析时间。

虽然滤纸法具有上述优点,但它并不能完全代替硝酸纤维素膜杂交法。尤其是对高密度菌落的杂交筛选。另外,滤纸的强度较差,操作过程中要仔细、小心。我们的结果表明,滤纸菌落原位杂交法在低密度菌落杂交筛选中,确为一种经济、有效的方法。

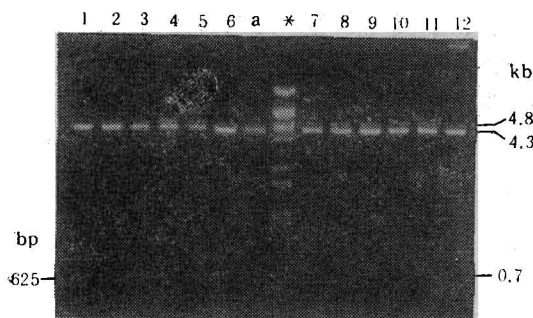


图2 快速质粒分析的电泳图谱
a: 载体转化菌落; 1—12: 杂交阳性菌落;
*: λ DNA-BstE II

图谱(图2)表明,12个阳性克隆都带有TNF cDNA(625bp)。说明杂交结果具有较好的特异性。图1中阳性杂交信号的强弱,可能与每一转化菌落的特性有关。我们发现具有较强信号的菌落在转膜后的重新生长中具有较快的生长速度。

硝酸纤维素膜对较大菌落的转移并不理

参 考 文 献

- 1 Grunstein M, Hogness D. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1975; 72: 3961
- 2 Maniatis T *et al.* *Molecular cloning*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1982: 314—315
- 3 Maxam A M, Gilbert W. *Methods enzymol.* New York: Academic Press, 1980; 65: 499—560
- 4 Berent S L *et al.* *BioTechniques*, 1985; 3: 208

[本文于1989年4月12日收到]

提出用“线粒体互补法”来预测杂种优势（即能产生杂种优势的两个亲本的幼芽线粒体于离体条件下混合时，它们的活性超过任何一个亲本）。但后来英、西德、中国等一些实验室并未获得如McDaniel所报道的那种理想结果^[3-9]。1977年我们实验室开始尝试用“匀浆互补法”替代“线粒体互补法”得到了比较理想的结果^[9-11]。具体的做法是，将作物黄化幼芽经研磨过滤制成匀浆（除线粒体外还包含细胞质的其它组分）然后把两个亲本的匀浆以1:1的比例进行混合，如果它们的氧化活性超过二个亲本的匀浆的氧化活性平均值，即称为“匀浆互补”现象。几年来，我们对玉米、谷子、棉花等杂种优势与亲本幼芽匀浆互补作用的相关性进行了研究。实验结果表明，大多数具有明显杂优组合的亲本幼芽匀浆在混合后它们的氧化活性均有显著的互补作用，而杂优不明显的组合则不表现出互补现象，测试准确率可达80—85%^[9-14]。“匀浆互补法”机理初步探明^[10,11]，杂优比较明显的亲本幼芽匀浆互补作用主要是由于两者内含的线粒体与上清液之间相互作用所致。我们还与坝下农科所协作应用“匀浆互补法”预测1000多个谷子组合，然后将室内试验结果通过田间验证，预测准确率达85%，从中筛选出两个强优谷子杂种：蒜系28×287，蒜系28×250，缩短了育种周期，获得了很好的经济效益^[13,14]。

本文用“匀浆互补法”对水稻杂种优势进行了测试，也获得理想的结果。

材 料 与 方 法

1. 具有明显杂优或无优的水稻种子组合都系经过小区实验和大量生产鉴定的种子。其中汕优63（珍汕97A×明恢63）、汕优64（珍汕97A×测64）系四川广汉县种子公司提供，秀优57（秀A×C57）系辽宁沈阳苏屯省农科院提供，V优64（VA20×测64）、汕优桂33（珍汕97A×桂33）、桂优25（7071A×外选25）系华南植物所提供，威优35（V20A×26窄早）、威优64（V20A×测64）、II-32A×测64系由湖南杂交水稻研究中心提供。

2. “匀浆互补法”的测试步骤

种子发芽时，先将干净种子用0.1%氯化汞浸泡10分钟灭菌，经清水冲洗半小时后在水中浸泡15小时左右，之后将其均匀平铺在有纱布的搪瓷盘内。在30℃的恒温箱中发芽2—3天。为了使亲本和杂交种萌发幼芽的长度尽可能一致，不同种子催芽的时间应根据具体情况加以掌握。在整个萌发过程中注意控制湿度。黄化幼芽剪下后在冰箱中放置1小时，然后倒入双层的尼龙袋中以1:3的比例加入匀浆介质（0.25mol/L蔗糖，0.067mol/L磷酸缓冲液pH7.2，0.005mol/L EDTA，0.75mg牛血清清蛋白/ml）在瓷钵中磨碎，过滤去残渣。上述操作都在低温下进行。之后将过滤液用低温离心机离心（1000g×10分钟）取上清液。两个亲本的幼芽匀浆按1:1比例在0℃互补30分钟。匀浆氧化活性的测定用瓦氏测压计。反应介质内含：匀浆介质1.3ml，匀浆1.3ml，0.2mol/L α-酮戊二酸0.2ml，0.06mol/L MgCl₂ 0.1ml，反应液总体积2.9ml 反应温度28℃，平衡5分钟，测定30分钟。

结 果 与 讨 论

我们应用“匀浆互补法”共测试了8个水稻组合，其中7个具有明显杂优，1个为无优组合。实验结果列于表1。

从表中可以看到，有优组合的杂交种（F）匀浆的氧化活性都高于亲本的平均值。优势杂种亲本匀浆在体外等比混合后除秀优57（秀A×C57）组合外均呈互补现象。无优组合（II-32A×测64）的杂交种匀浆的氧化活性既不大于亲本匀浆氧化活性的平均值，亲本匀浆在体外等比混合也没有互补效应。从总结果来看，测试杂优的准确率达85.5%。与谷子、玉米、棉花等作物的测试结果很接近（见表2）。

国内一些单位曾用同工酶法^[15,16]来测试水稻的杂种优势也获得了一定的结果。从我们对谷子、玉米、棉花、水稻的实验结果来看，“匀浆互补法”对测试（或预测）作物杂种优势的准确率还是比较高的（见表2）。它的效果要比

表 1 “匀浆互补法”测试水稻杂种优势

组合名称	氧化活性 微升 O ₂ /g 幼芽/小时	
		相对比值
V20A (A)	37.2	1.12
26 窄早 (R)	76.2	
V 优 35 (F)	61.5	
V20A + 26 窄早 (+)	69.3	
V20A (A)	27.7	1.69
测 64 (R)	32.7	
V 优 64 (F)	51.2	
V20A + 测 64 (+)	49.2	
珍汕 97A (A)	43.4	1.17
测 64 (R)	28.6	
汕优 64 (F)	42.2	
珍+测 (十)	47.7	
珍汕 97A (A)	27.2	1.07
明恢 63 (R)	25.8	
汕优 63 (F)	28.4	
珍+桂 (十)	45.3	
珍汕 97A (A)	63.2	1.11
桂 33 (R)	57.6	
汕优桂 33 (F)	67.1	
珍+桂 (十)	82.9	
秀 A (A)	160.9	1.45
C57 (R)	42.4	
秀优 57A (F)	147.9	
秀A + C57 (+)	70.6	
7071A (A)	134.4	1.18
外选 25 (R)	223.6	
7071A + 外选 (+)	211.7	
无 优 组 合		
I-32A (A)	50.2	0.97
测 64 (R)	36.2	
II-32A × 测 64 (F)	41.9	
II-32A + 测 64 (+)	37.6	

表中所列数据均系三次以上实验的平均值

(A): 不育系作为母本 (R): 恢复系作为父本

(F): 杂交种 (+): (A) + (R)

McDaniel 提出的“线粒体互补法”要明显得多。但值得指出的是,种子纯度,种子贮存条件和时间,萌发条件等因素都会影响互补作用的结果。在进行幼芽匀浆互补实验时应尽量用纯度较高的种子作实验材料。亲本种子最好是同一年制种的。种子萌发时,亲本的幼芽长度应尽

表 2 “匀浆互补法”测试农作物杂优的准确率

作物	测试组合	准确率	参考文献
玉米	14(有优 9) (无优 5)	12/14 (85.7%)	9,10 14
谷子	6(有优 3) (无优 3)	5/6 (83.3%)	13,14
棉花	6(有优 5) (无优 1)	5/6 (83.3%)	14
水稻	8(有优 7) (无优 1)	7/8 (85.5%)	本文

量一致。为了检验“匀浆互补法”测试与预测水稻的杂优,准备扩大测试组合的数目,并结合田间试验进行预测,但符合要求的种子来源比较困难,尤其是无优组合。此外,种子用量也还有进一步缩减的必要以利推广。最近我们对水稻亲本黄化幼芽能源物质——ATP 含量水平与杂种优势的相关性进行了探索。从初步获得的结果来看还比较理想。它与“匀浆互补法”相结合可能为测试(或预测)农作物提供准确率更高的综合指标。有关研究正在进行中。

参 考 文 献

- 1 McDaniel R G. *Science*, 1966; **152**: 1640
- 2 McDaniel R G. *Nature* (New Biology), 1972;**236**:190
- 3 Ellis J R S, Branton CJ, Palmer JM. *Nature*, 1973; **24** (5384): 45
- 4 Doney DL, Theurer JG, Wyse RE. *Euphytica*, 1975; **24**: 387
- 5 Van Gelder WMJ, Miedema P. *Euphytica*, 1974; **24**(2): 421
- 6 浙江农业大学植物生理教研组、植物学报, 1975;**17**(9): 41
- 7 广东植物研究所生理生化研究室. 植物研究, 1976;(4): 12
- 8 上海植生所光合作用研究室二组、植物学报, 1977;**19**(3): 216
- 9 中国科学院生物物理所三室二组、生物化学与生物物理进展, 1978;(1): 1
- 10 杨福愉等. 科学通报, 1978;**23**: 752
- 11 杨福愉等. 科学通报, 1979;**24**: 42
- 12 杨福愉等. 生物化学与生物物理进展, 1981;(6): 35
- 13 赵连元等. 生物化学与生物物理进展, 1982; (1): 7
- 14 杨福愉. 种子, 1982;(3): 2
- 15 罗泽民等. 湖南农业科技, 1980;(4): 4
- 16 肖翊华等. 湖北农业科学, 1981;(11): 1
- 17 杨福愉等. 植物学报, 1990

[本文于 1989 年 10 月 19 日收到]