

芸豆和玉米总 DNA 导入大豆及后代 同工酶酶谱分析^{*}

卢翠华 雷勃钧 韩玉琴 刘昭军
李希臣 周思君 钱华

(黑龙江省农业科学院生物技术研究中心, 哈尔滨 150086)

摘要 本文报道了利用花粉管通道技术, 将芸豆、玉米的总 DNA 导入大豆的实验结果及采用不连续双垂直板聚丙烯酰胺凝胶电泳法, 对其导入后代进行过氧化物酶及多酚氧化酶的酶谱分析。结果表明: 远缘材料的外源总 DNA 导入大豆, 其后代发生明显变异, 过氧化物酶和多酚氧化酶酶谱发生了变化, 说明了外源遗传物质已转移到大豆基因组中, 并且得到表达。

关键词 大豆; 外源总 DNA; 转化; 同工酶酶谱

植物外源总 DNA 导入技术, 是在受体植株自花受粉后, 将带有目的性状的供体总 DNA 导入受体植株, 引起植株变异, 通过筛选获得目的基因表达的后代, 培育新品种或新种质, 为育种利用^[1]。该技术的优点是: 利用整体植株进行 DNA 转化, 可以省去细胞原生质体的培养及再生植株的诱导过程, 可以实现远缘或超远缘材料间的基因转移, 丰富遗传基础。

同工酶是基因表达的产物, 同工酶有差异, 说明相应的基因结构和功能有所不同。同工酶作为一种生化标记正在应用于作物育种领域, 在用以估测作物品种的遗传关系上与 RFLP 或 RAPD 所得结论吻合^[2]。

几年来, 我们将外源 DNA 直接导入技术应用于大豆、玉米、小麦等主要农作物, 获得了大量的变异材料和品系, 并已获得大豆品种一个。同工酶分析技术具有简便、经济、快速、准确等优点, 对导入后代进行同工酶酶谱分析, 可以从生化角度证明外源 DNA 片段被整合到受体基因组中, 为农业分子育种提供理论依据^[3]。

1 材料和方法

1.1 供试材料

受体: 栽培大豆黑农 35

^{*} 课题来源: 黑龙江省科委“九五”重大攻关项目, 省自然科学基金项目。

收稿日期 1999-11-17

Received on Nov. 17, 1999

供体: 大白芸豆 玉米

导入后代: D9310组合(黑农 35+ 大白芸豆) D₅ 8个株系, D9311组合(黑农 35+ 玉米) D₅ 13个株系, 详见表 1

1. 2 实验方法

1. 2. 1 供体总 DNA 的提取及导入

采用氯仿-异戊醇-苯酚-核糖核酸酶法, 提取芸豆及玉米的总 DNA, 对所提取的 DNA 经岛津 UV-265 紫外检测和琼脂糖凝胶电泳鉴定, 片段大小 50Kb 左右, 导入浓度 500 μ g/ml 在大豆自花受粉后 6-32 小时, 利用其形成的花粉管通道, 切柱头, 将供体总 DNA 直接导入受体黑农 35

1. 2. 2 后代的观察

收获导入的当代种子, 第二年种植田间, D₁ 代单株收获, D₂ 代按株行种植, 从 D₂ 开始选单株 种株行, 调查项目同常规育种。

1. 2. 3 酶液的制备 电泳及染色

将大豆种子发芽, 取 2g 芽, 加 3ml 0.3M 蔗糖-0.01M KCl-0.05M 磷酸缓冲液, 5000 转 分离 10 分钟, 取上清液冰冻备用。

采用薄层垂直板聚丙烯酰胺凝胶电泳法, 分离胶浓度为 7%, 浓缩胶浓度为 2.8%, 电流 25mA, 每板 25 个穴, 每穴点样 60 μ l 电泳过程在 4 $^{\circ}$ C 冰箱中进行, 时间 5-6 小时。过氧化物酶以醋酸联苯胺染色液染色, 谱带呈棕褐色。多酚氧化酶以邻苯二酚-对苯二胺为染色液, 谱带为茶褐色。

2 结果与分析

2. 1 导入后代的变异

2. 1. 1 D9310 组合是 93 年将大白芸豆的总 DNA 导入到栽培大豆黑农 35, 当年收获 4 粒种子, D₁ 代成活 3 株, 有 2 株发生变异, 植株高大繁茂, 叶片变大 变圆 荚变宽 熟期变晚, 百粒重达 38.4g 和 35.4g, 这些性状与供体大白芸豆相似 D₂-D₅ 代除百粒重略有下降, 熟期继续分离外, 其他性状到 D₅ 代已稳定 (见表 1)。

2. 1. 2 D9311 组合是将玉米的总 DNA 导入栽培大豆黑农 35, 收获 18 粒种子, D₁ 代成苗 8 株, D₃ 代 96-312 发生变异, 植株高大, 熟期变晚, 叶型变圆, 百粒重下降 D₄-D₅ 代除熟期继续分离外, 其它性状稳定 (见表 1)。

表 1 导入后代 D₅代与受体、供体农艺性状比较

Table 1 Comparison of agronomic characters between introduced progenies and recipient and donor								
编号 No.	材料 Materials	株高 Height of plant	叶形 Leaf shape	分枝数 No. of branches	节数 No. of nodes	单株荚数 No. of pods per plant	百粒重 (g) Weight of per hundred grains	种皮色 Color of seed skin
1	受体黑农 35 Recipient Heinong 35	85	长 long		14	34	20	黄 yellow
2	供体大白芸豆 Donor Kidney bean		圆 round					白 white
3	D9310 351- 1	104	圆 round	4	17	48	25	黄 yellow
4	D9310 357- 1	112	圆 round	4	24	70	30	黄 yellow
5	D9310 362- 1	110	圆 round	4	23	82	26	黄 yellow
6	D9310 363- 1	105	圆 round	4	20	65	27	黄 yellow
7	D9310 364- 1	100	圆 round	4	21	60	26	黄 yellow
8	D9310 365- 1	120	圆 round	4	23	55	25	黄 yellow
9	D9310 367- 1	112	圆 round	4	24	70	30	黄 yellow
10	D9310 371- 1	112	圆 round	5	23	70	32	黄 yellow
11	受体黑农 35 Recipient Heinong 35	85	长 long		14	34	20	黄 yellow
12	供体玉米 Mo17 Donor Corn Mo17							
13	D9311 423- 3	106	圆 round	1	22	161	15.5	黄、褐 Yellow and brown
14	D9311 425- 1	98	圆 round	2	20	115	14	褐 brown
15	D9311 427- 1	97	圆 round		22	112	14	褐 brown
16	D9311 430- 1	99	圆 round	1	19	106	18	黄 yellow
17	D9311 432- 1	102	圆 round	3	21	175	16	黄 yellow
18	D9311 434- 2	115	圆 round	2	21	145	16	黄 yellow
19	D9311 439- 1	100	圆 round	7	23	133	18	黄 yellow
20	D9311 442- 1	102	圆 round	4	23	116	16	黄 yellow
21	D9311 444- 1	110	圆 round	2	23	140	17	黄 yellow
22	D9311 447- 2	90	圆 round		16	92	19	绿 green
23	D9311 448- 1	104	圆 round	5	23	124	21	黄 yellow
24	D9311 450- 2	82	圆 round	2	18	102	16	黄 yellow
25	D9311 451- 1	94	圆 round	4	21	151	16	黄 yellow

2.2 过氧化物酶酶谱分析

D9310及 D9311组合的过氧化物酶酶谱示意图见图 1图 2 分析结果如下:

©1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

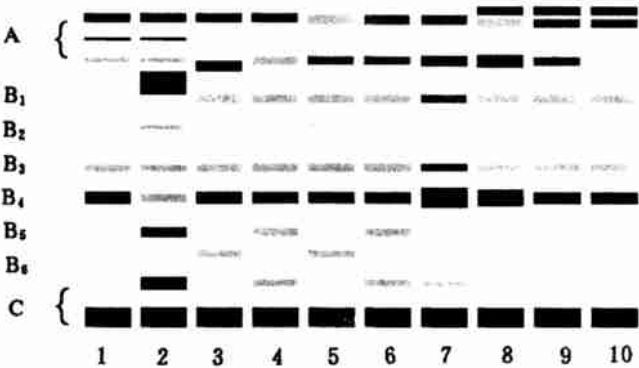


图 1 D9310组合大豆多酚氧化酶酶谱示意图
Fig. 1 D9310 peroxidaes isozyme patterns of soybean

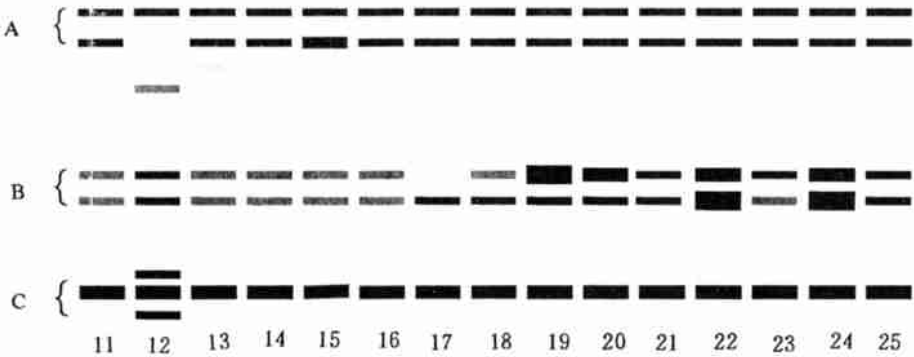


图 2 D9311组合大豆过氧化物酶酶谱示意图
Fig. 2 D9311 peroxidase isozyme patterns of soybean

2.2.1 将酶带按其相对迁移率及其集中的程度分为 A 区、B 区和 C 区。

D9310 组合的酶谱迁移率为 0.05–0.61, D9311 组合的酶谱迁移率为 0.09–0.63

2.2.2 两个组合的受体、供体及导入后代在 A 区和 C 区都有共同的谱带 A₁、A₂ 和 C, 差异主要发生在 B 区。

2.2.3 D9310 组合的受体有 6 条谱带, 供体有 10 条谱带, 差别较大。后代中谱带数目都多于受体。B₁ 带为供体所特有而受体不含有的谱带, 在后代中都具有 B₁ 这条谱带。虽然 B₄ 这条谱带, 供体和受体都含有, 但后代中 B₄ 这条谱带带型加宽颜色加深。除 8 号、9 号、10 号外, 后代都含有 B₄、B₅ 这两条供体所特有的谱带 (图 1)。

2.2.4 D9311 组合的受体与供体谱带也有较大差别, 受体含有 5 条谱带, 供体含有 7 条谱带, 虽然后代中谱带数与受体的谱带数相同, 都是 5 条, 但在 19–25 号材料中, B 区的谱带带幅加宽颜色加深, 不同于受体 (图 2)。

2.3 多酚氧化酶酶谱分析

D9310 组合及 D9311 组合的多酚氧化酶酶谱示意图及照片见图 3 图 4, 分析结果如下:



图 3 D9310组合大豆多酚氧化酶酶谱示意图

Fig. 3 D9310 polyphenol oxidase isozyme patterns

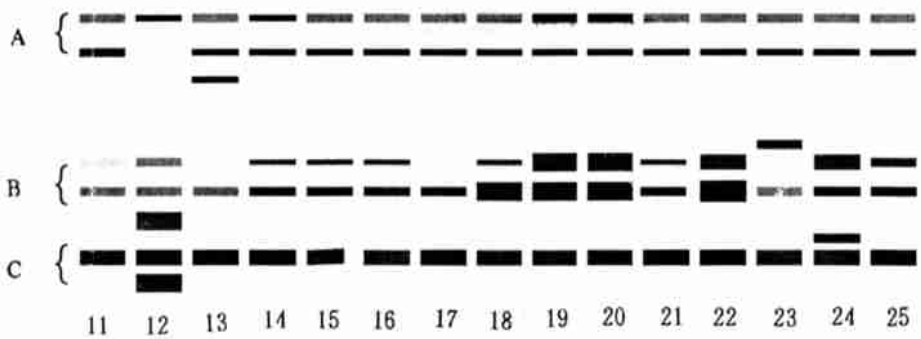


图 4 D9311组合大豆多酚氧化酶酶谱示意图

Fig. 4 D9311 polyphenol oxidase isozyme patterns of soybean

2.3.1 将酶带按其相对迁移率及其集中的程度分为 A区、B区和 C区。D9310组合的酶谱迁移率为 0.07- 0.70, D9311组合的酶谱迁移率为 0.16- 0.73

2.3.2 两个组合的受体、供体及导入后代在 A区和 C区都有共同的谱带 A₁ A₂ 和 C₁, 差异发生在 B区。

2.3.3 D9310组合的 8号材料含有供体所特有而受体不含有的 B₁ 谱带。C₁ 这条谱带在后代中表现为带型加宽, 颜色加深, 酶的活性增强 (图 3)。

2.3.4 D9311组合的 B区中, 后代的谱带不同于受体, 具有其独有的迁移率, 谱带加宽加深, 酶的活性提高。24号材料比受体增加 1条谱带, 13号和 17号材料比受体减少 1条谱带 (图 4)。

3 讨论

利用外源 DNA直接导入技术, 进行大豆分子育种, D9310组合在 D₁ 代就发生明显变异, 而 D9311组合是在 D₃ 代发生变异, 这不同于常规育种。利用该技术进行远缘材料

间的遗传物质转移,对丰富遗传基础,扩大变异类型,具有实践意义。

将芸豆及不同科的 C₄ 植物玉米的总 DNA 分别导入栽培大豆,获得了大粒的材料及植株高大晚熟的材料。这些变异的发生是外源 DNA 导入后,供体受体间遗传物质信息产生交流转化的结果。由于交流转化方式和程度的不同,包括插入、整合、调控、启动等,所以就产生了各种各样的变异和遗传。至于转化和遗传的确切机理有待进一步深入研究。

从同工酶分析的结果看,D9310和 D9311组合,在过氧化物酶及多酚氧化酶酶谱上都存在差异,有些后代含有供体所特有的谱带,有些后代增加了供体和受体所不具有的谱带,有些谱带的酶活性增强或减弱。这些酶谱的变化与后代材料在某些性状上的变异相吻合。这说明,利用花粉管通道技术,可以将外源基因引入受体材料,并在某些同工酶谱上有所反映。通过实验可以看出,过氧化物酶效果好于多酚氧化酶。生物体间酶系统的差异在一定程度上反映了生物体间遗传基础的差异。所以,从酶谱的差异及性状的变化可以推断:外源基因已进入受体基因组中,并在不同程度上得到了整合、表达和遗传。

参 考 文 献

- 1 马伯军等,植物外源总 DNA 导入技术在育种上的应用,中国农学通报,1991,7(1): 18- 21
- 2 赵坚义等,同工酶分子标记研究中国和欧洲栽培油菜的遗传差异,作物学报,1998,(2): 214
- 3 卢翠华等,外源 DNA 导入栽培大豆其后代过氧化物酶同工酶酶谱分析,中国油料,1991,(3): 35- 36

INTODUCTION OF TOTAL DNA FROM KIDNEY BEAN AND CORN INTO SOYBEAN AND ANALYSIS OF THE ISOZYME TYPE IN ITS PROGENIES

Lu Cuihua Lei Bojun Han Yuqin Liu Zhaojun Li Xichen Zhou Sijun Qian Hua

(*Biotechnology Research Center, Heilongjiang Academy of Agricultural Science, Harbin 150086*)

Abstract The total DNA of kidney bean and corn were introduced into soybean and the isozyme types of peroxidase and polyphond oxidase in the progenies were analysed. The results showed that the obvious variation was caused in soybean progenies by the introduction of total DNA of distant spieces. The change of the isozyme types indicated that the foreign genetic material has been introduced into soybean genome and expressed.

Key words Soybean; Foreign total DNA; Transformation; Isozyme type