

外源 DNA 直接导入 (DIED) 法的大豆分子育种成效^{*}

雷勃钧

(黑龙江省农业科学院生物技术研究中心 哈尔滨 150086)

摘要 本文以高产优质高蛋白大豆黑生 101 品种的育成为例,介绍了我国创立的花粉管通道转移总 DNA 的技术,并就该技术与现有体外重组 DNA 技术进行对比,拟提出我国目前转基因技术路线和产业化发展策略。

关键词 大豆;高蛋白;外源 DNA 直接导入;体外重组 DNA;转基因作物

中图分类号 S565.035.3 **文献标识码** A **文章编号** 1000-9841(2001)01-0026-04

目前在日本、美国均有育成蛋白质含量超过 47% 的品种,如 Sioux 白荚 1 号等。我国大豆蛋白质含量平均只有 40% 左右,分布呈现南高北低趋势。南方地区大豆品种蛋白质含量平均达 44.6%,有的可达 47% 以上。但在北方主产区东北三省,近 20 年推广的品种平均蛋白质含量只有 41.14%,而黑龙江省平均含量为最低^[1,2]。

一般认为:大豆蛋白质和油份含量均与地理分布有关:高纬度大豆含油量高,蛋白质含量低^[3]。在高纬度地区育成高蛋白(45% 左右)品种较困难;高蛋白常规育种的难度还在于蛋白含量与产量呈负相关,特别是与主要产量性状呈显著负相关^[4,5]。因此,虽然近年也不断育成一些蛋白质含量较高的品种,但在某些农艺性状特别是产量性状上仍不够理想。

生物技术给作物品种改良辟出一条新路,它通过 Genetically Modified Crops(简称 GMC)的方式突破了常规育种的难度并缩短了育成一个品种的时间,因此,再和常规育种相结合,即可快速实现农作物分子育种的品种改良。其中黑龙江省农业科学院利用由周光宇先生创立的花粉管通道法进行遗传转化技术即外源 DNA 直接导入(Direct Introduction Exogenous DNA 简称 DIED)技术,将高蛋白野生大豆总 DNA 直接导入栽培大豆育成了第一个大豆新品种——高产优质高蛋白大豆黑生 101^[6]。

国际国内发文^[7]所称基因工程(简称 GE)所指导入受体的是体外重组 DNA,所获转化体叫遗传工程体(Genetically Modified Organisms 简称 GMO),植物就叫遗传工程体植物,或称转基因作物(GMC)而利用 DIED 技术所导入的是总 DNA,因此,所获转化体不被国外及国内一些专家认为是 GMC。在我国《农业生物基因工程安全管理实施办法》中就没列在适用部分中,但也未列在不适用部分中。大豆黑生 101 品种(品系号 D89-9822 以下称 D9822)育成意义在于不仅为大豆品质育种特别是高蛋白育种建立了一条有效的技术途径,而且可作为我国 GMC 研制方式之一。因此,十分有必要通过 DIED 技术的具体实例与 GE 技术的对比,来进一步阐明 DIED 技术实质和效果及对发展我国基因工程研究与应用的重要现实和长远意义。

1 DIED 技术原理及技术流程

1.1 DIED 技术原理

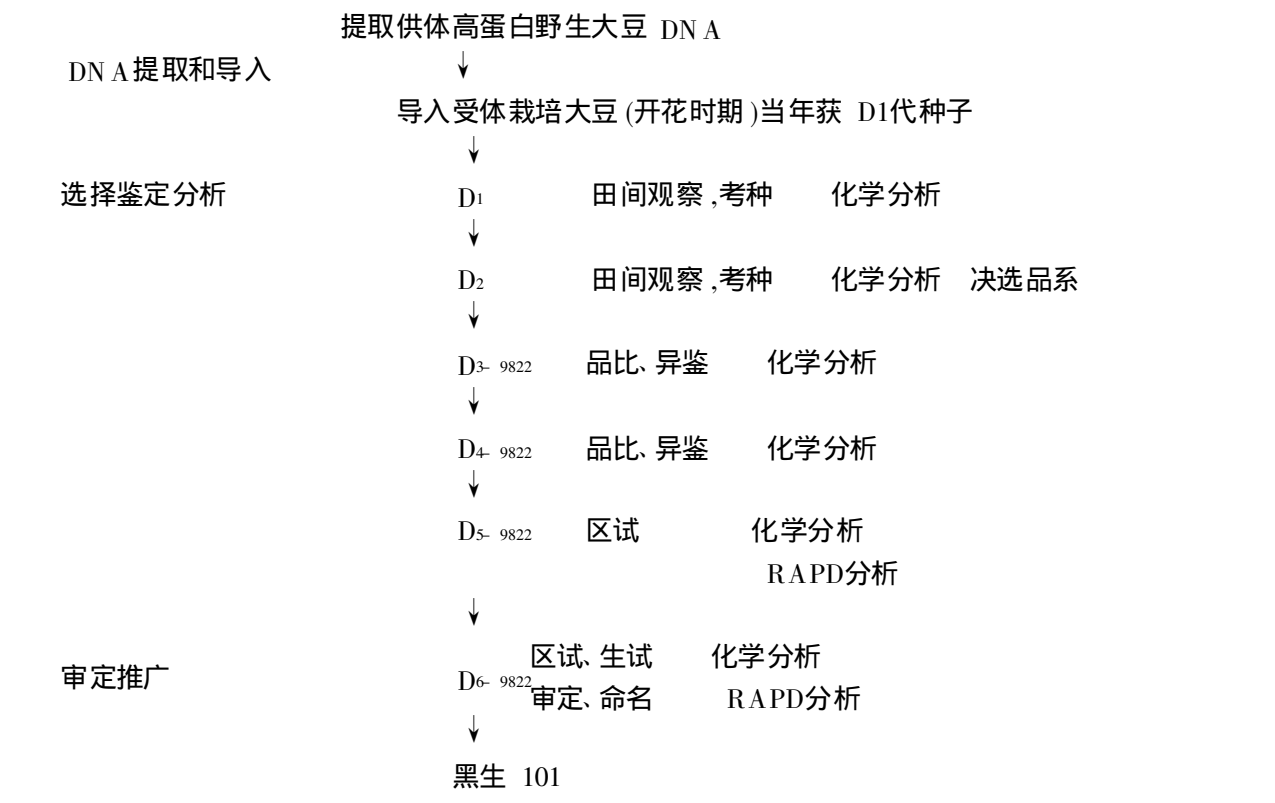
利用开花植物授粉后形成的花粉管通道,直接导入外源 DNA(DIED)转化尚不具备正常细胞壁的卵合子或早期胚胎细胞,达到某些目的基因的转移^[8]。

1.2 DIED 技术流程(以黑生 101 的育成过程为例):

* 收稿日期: 2000-07-03

项目来源:黑生 101 大豆选育推广为国家“九五”科技攻关项目内容。

作者简介:雷勃钧,女(1944-),研究员,研究方向农业生物技术。



2 DIED转化效果

综合 10 年大豆 DIED 转化的研究,可以明显看出如下效果:

2.1 高蛋白 DNA 转化效果

通过直接导入高蛋白野生大豆总 DNA 在 D₂ 代就获得许多高蛋白株系,蛋白质含量 (PC) 明显高于受体,其中 D9822 株系达到 47.58%,连续 7 年分析平均达到 45.44%,比受体平均高 1.76 个百分点,球蛋白总量比受体高近 10 个百分点,11S 球蛋白比例超过 70%^[6]。

根据我们的经验,一般转移高蛋白供体 DNA 的受体后代,PC 均有不同程度的提高 (1–6 个百分点不等),当然,其它农艺性状也有不同程度的改变^[9],而 D9822 品系与受体相同,但产量性状、抗病特性等均优于受体。DIED 转化效果为其它作物野生资源快速利用带来新的启示。

2.2 产量效果

D9822 品系 5 年 4 种产量比较结果,除品种比较试验 (在育成区) 产量稍低于对照外,其余 3 个试验 (在适宜区) 比对照增产 9.2–11.3%,比受体增产 40% 以上^[6]。产量提高幅度已达到高产育种指标,大大超过省品种审定委员会规定的蛋白质含量

达到 45%,产量只需提高 3% 的标准。这在常规育种中是难以达到的。产量比较结果说明 DIED 技术可打破某些基因连锁。

2.3 对黑生 101 (D9822 品系) 的 RAPD 分析结果

RAPD 分析是目前追踪外源 DNA 片段的较好方法,已对 DIED 转化的典型组合材料做过分析报道^[10]。在对黑生 101 及其供体、受体同时进行了 RAPD 技术分析中发现: 扩增出多态性的单引物有 OPB₀₃、OPB₁₈、OPC₀₈ 和双引物 OPA₁₁+ OPC₁₂,均使黑生 101 表现出与供体相同的特异带,而该带在受体扩增产物中不存在。说明在外部性状相同情况下,在分子水平上找到了与受体不同的 DNA 片段,而该片段只在供体中存在^[11],证明黑生 101 与受体在遗传组成上存在差异。

2.4 转化品种黑生 101 审定推广及育成意义

D9822 品系在 D₆ 代审定命名为黑生 101 正式推广,比常规育种缩短近一半时间。据不完全统计五年累计推广面积已达 260 余万亩。该品种的推广列为“九五”国家重点科技攻关 (96–C01–01–04) 和黑龙江省省长创新工程项目中主要农作物生物技术育种专题唯一一个大豆品种。在我省东部地区建三江垦区示范结果表现良好^[12]。

DIED 技术在大豆上的应用已申请国家发明专利,专利号为: 98121507.6。

大豆黑生 101品种的育成是首次利用 DIED生物技术实现了大豆分子育种,育成了我国第一个高产、优质、高蛋白大豆新品种;并在我国高纬度地区实现了大豆高蛋白育种;是对常规高蛋白育种中蛋白与产量负相关矛盾的一个突破;是常规育种周期缩短的先例;也是我国创新的 GMC成果。当前国际上在不停地对 GMC及其食品进行争议和抵制的形势下,而被带有国外意识的专家们不承认 GMC的黑生 101大豆却可以其独具的天然性、安全性在顺利推广。

3 我国 GMC研制应采取何种技术路线

通过 DIED技术的研究应用和对其产生效果的分析,针对国际上 GMC的发展形势,如何认识由我国创立的这项 DIED技术的实质和现实意义;如何理解 DIED技术和 GE技术之间的区别,从而确立我国 GMC研制的切实可行的技术路线。这对 GMO产品的推广和产业化及实现“十五”乃至更长远目标是十分必要的。

表 1 DNA分子水平遗传转化技术对比

Table 1 Compare of DNA genetic transformation techniques in molecular level

对比内容	体外重组 DNA转移 (GE技术)	总 DNA转移 (DIED技术)	对比内容	体外重组 DNA转移 (GE技术)	总 DNA转移 (DIED技术)
1. DNA来源	人工重组、限制	自然、广泛	8.安全性鉴定	需要	不需要
2.体外重组	需要	不需要	9.人们接受其产品难易	难	易
3.抗性标记	需要或有	不需要、无	10.条件设备	要求高、昂贵	简易
4.导入技术	基因枪、农杆菌介导等	花粉管通道(天然)	11.知识产权	大部分不自主	自主
5.受体培养再生	需要	不需要	12.无抗原等目标性的选择难易	较易	较难
6.表达	环节多、易丢失	直接	13. GMC主要效果	目标基因转化效果为 GMC	蛋白特性、百粒重、熟期、种皮色、株叶型等其中 1项或 2项或多项转化为 D- GMC
7.分子验证	Southern PCR等	RAPD(PCR)等	14.解决某些相关性如高蛋白与产量等	未知	可以

通过 GE和 DIED技术的对比,我们可以明确看出 DIED技术过程及所获 D- GMC与 GE技术过程及所获 GMC存在许多区别(1- 14),正是这种区别使 DIED技术具有了更多的优越性,并且这种优越性将会对 GMC的产业化发展带来不可估量的影响。

3. 1 DIED技术的实质及优越性

从技术实质看, DIED技术有别于传统常规有性杂交技术而属生物技术领域是毫无疑问的。而生物技术领域核心技术是 DNA分子水平的遗传操作和遗传转化,因此,体外重组 DNA即目的基因的转化过程为转基因,其获得的产品为 GMC。而含有目的性状的总 DNA通过遗传操作转入受体实现转化并获得目的性状的表达的过程也属转基因,它完全符合本文所引^[13,14]英文缩写 GMC的概念。因此,通过 DIED技术的操作,使外源 DNA片段稳定整合到受体基因组,使受体的遗传组成发生了部分改变,而成为另一种新个体,这个新个体带有供体某个性状并能稳定遗传表达这就是 GMC或叫 GMO。为与前者相区别暂称为 D- GMC。所以, DIED技术与 GE技术的实质应是相同的,均属于 DNA分子水平的遗传转化生物技术。只是所采取的技术路线不同(主要是 DNA来源不同和导入方式不同),并使转化效果和所获 GMC在本质上有所不同。而这种不同正是我国科学家在基因工程上的创新点。现将两者技术主要环节对比如表 1。

3. 2 确立以 DIED为主的 GMC研制发展的技术路线

目前,在进行我国 GMC研制时,无非有两条技术路线,一是跟踪 GE技术体系主要是由美国建立的,跟踪的初期国内落后约 10年,跟踪的利是:可与国际水平保持同步,可节省时间,少走弯路,因此,跟

踪是必要的,但更有其不利的方面,并随着研究的深入而逐渐显现出来:因国情不同,其高投入的深入研究受到一定限制;特别是无法被大多数应用研究单位所接受;当出现不安全因素时,我们也要重蹈覆辙浪费了财力和时间;过多的跟踪引入还要受到专利的制约等等。二是创新。这是科技发展的永恒课题。

DIED技术是周光宇先生不盲目跟踪而是根据国情创立的一项遗传转化技术。该技术发展近 20年中,已广泛用于多种作物,它以其安全、简便、快捷、高效的特点深受广大从事生物技术应用和育种者的欢迎^[15]。实践证明,在应用中它具有 GE所不能具备的许多优越性,因此在 GMC研制中,我们一定要立足于创新,在跟踪中去创新的同时,大力发展我国这项已有的成熟的创新技术优势。

3.3 “十五”计划建议

在 21世纪初的 5- 10年内,重点搞好: A 加速 DIED技术的应用及产业化,扩大分子育种的作物,如我们已有充分研究基础并已获得可利用的后代材料的玉米、亚麻、高粱等。继续完成又获大豆新品系如高蛋白、高产及抗孢囊线虫病品质优良高产等的大豆品系鉴定和推广。 B 加大投入深入研究探讨其机理,寻找更准确的验证技术,搞好基础研究使 DIED技术更加完善。 G 在已有大量工作的基础上开展目标基因的识别和分离,建立起我国自己的植物基因工程技术体系,生产出人类放心的安全的高蛋白、高产及抗孢囊线虫病品质优良高产等的大豆品系。 C 在已有大量工作的基础上开展目标基因的识别和分离,建立起我国自己的植物基因工程技术体系,生产出人类放心的安全的高蛋白、高产及抗孢囊线虫病品质优良高产等的大豆品系。 D 在已有大量工作的基础上开展目标基因的识别和分离,建立起我国自己的植物基因工程技术体系,生产出人类放心的安全的高蛋白、高产及抗孢囊线虫病品质优良高产等的大豆品系。 E 在已有大量工作的基础上开展目标基因的识别和分离,建立起我国自己的植物基因工程技术体系,生产出人类放心的安全的高蛋白、高产及抗孢囊线虫病品质优良高产等的大豆品系。 F 在已有大量工作的基础上开展目标基因的识别和分离,建立起我国自己的植物基因工程技术体系,生产出人类放心的安全的高蛋白、高产及抗孢囊线虫病品质优良高产等的大豆品系。 G 在已有大量工作的基础上开展目标基因的识别和分离,建立起我国自己的植物基因工程技术体系,生产出人类放心的安全的高蛋白、高产及抗孢囊线虫病品质优良高产等的大豆品系。 H 在已有大量工作的基础上开展目标基因的识别和分离,建立起我国自己的植物基因工程技术体系,生产出人类放心的安全的高蛋白、高产及抗孢囊线虫病品质优良高产等的大豆品系。 I 在已有大量工作的基础上开展目标基因的识别和分离,建立起我国自己的植物基因工程技术体系,生产出人类放心的安全的高蛋白、高产及抗孢囊线虫病品质优良高产等的大豆品系。 J 在已有大量工作的基础上开展目标基因的识别和分离,建立起我国自己的植物基因工程技术体系,生产出人类放心的安全的高蛋白、高产及抗孢囊线虫病品质优良高产等的大豆品系。 K 在已有大量工作的基础上开展目标基因的识别和分离,建立起我国自己的植物基因工程技术体系,生产出人类放心的安全的高蛋白、高产及抗孢囊线虫病品质优良高产等的大豆品系。 L 在已有大量工作的基础上开展目标基因的识别和分离,建立起我国自己的植物基因工程技术体系,生产出人类放心的安全的高蛋白、高产及抗孢囊线虫病品质优良高产等的大豆品系。 M 在已有大量工作的基础上开展目标基因的识别和分离,建立起我国自己的植物基因工程技术体系,生产出人类放心的安全的高蛋白、高产及抗孢囊线虫病品质优良高产等的大豆品系。 N 在已有大量工作的基础上开展目标基因的识别和分离,建立起我国自己的植物基因工程技术体系,生产出人类放心的安全的高蛋白、高产及抗孢囊线虫病品质优良高产等的大豆品系。 O 在已有大量工作的基础上开展目标基因的识别和分离,建立起我国自己的植物基因工程技术体系,生产出人类放心的安全的高蛋白、高产及抗孢囊线虫病品质优良高产等的大豆品系。 P 在已有大量工作的基础上开展目标基因的识别和分离,建立起我国自己的植物基因工程技术体系,生产出人类放心的安全的高蛋白、高产及抗孢囊线虫病品质优良高产等的大豆品系。 Q 在已有大量工作的基础上开展目标基因的识别和分离,建立起我国自己的植物基因工程技术体系,生产出人类放心的安全的高蛋白、高产及抗孢囊线虫病品质优良高产等的大豆品系。 R 在已有大量工作的基础上开展目标基因的识别和分离,建立起我国自己的植物基因工程技术体系,生产出人类放心的安全的高蛋白、高产及抗孢囊线虫病品质优良高产等的大豆品系。 S 在已有大量工作的基础上开展目标基因的识别和分离,建立起我国自己的植物基因工程技术体系,生产出人类放心的安全的高蛋白、高产及抗孢囊线虫病品质优良高产等的大豆品系。 T 在已有大量工作的基础上开展目标基因的识别和分离,建立起我国自己的植物基因工程技术体系,生产出人类放心的安全的高蛋白、高产及抗孢囊线虫病品质优良高产等的大豆品系。 U 在已有大量工作的基础上开展目标基因的识别和分离,建立起我国自己的植物基因工程技术体系,生产出人类放心的安全的高蛋白、高产及抗孢囊线虫病品质优良高产等的大豆品系。 V 在已有大量工作的基础上开展目标基因的识别和分离,建立起我国自己的植物基因工程技术体系,生产出人类放心的安全的高蛋白、高产及抗孢囊线虫病品质优良高产等的大豆品系。 W 在已有大量工作的基础上开展目标基因的识别和分离,建立起我国自己的植物基因工程技术体系,生产出人类放心的安全的高蛋白、高产及抗孢囊线虫病品质优良高产等的大豆品系。 X 在已有大量工作的基础上开展目标基因的识别和分离,建立起我国自己的植物基因工程技术体系,生产出人类放心的安全的高蛋白、高产及抗孢囊线虫病品质优良高产等的大豆品系。 Y 在已有大量工作的基础上开展目标基因的识别和分离,建立起我国自己的植物基因工程技术体系,生产出人类放心的安全的高蛋白、高产及抗孢囊线虫病品质优良高产等的大豆品系。 Z 在已有大量工作的基础上开展目标基因的识别和分离,建立起我国自己的植物基因工程技术体系,生产出人类放心的安全的高蛋白、高产及抗孢囊线虫病品质优良高产等的大豆品系。

参 考 文 献

1 孟祥勋,东北大豆高蛋白育种问题,中国东北大豆, [M] 黑龙江科学技术出版社, 1999, 296- 304

2 王培英,张军政,郭宇虹,大豆高蛋白质含量变异拓宽的研究, [J] 大豆科学 1994, (1): 5- 8

3 费家骅,祝其昌,凌以禄等,有关化学成分相关性生态地理分布和形成机理的初步探讨, [J]大豆科学 1983, (1): 15- 23

4 杨琪,王彬如,翁秀英等,大豆蛋白质含量与主要农艺性状及生理性状的相关性研究,东北大豆种质资源拓宽与改良, [C]黑龙江科学技术出版社, 1994, 109- 113

5 J. R. Wilcox,大豆蛋白质和脂肪质量, [J]国外农学 - 大豆 1990, (3): 1- 7

6 雷勃钧,钱华,李希臣等:通过引入外源 DNA 育成高产优质高蛋白大豆新品种黑生 101, [J]作物学报, 2000, (6)

7 中华人民共和国农业部令, [S]《农业生物基因工程安全管理实施办法》, 1996

8 周光宇,翁坚,龚蓁蓁等,农业分子育种 - 授粉后外源 DNA 导入植物的技术, [J]中国农业科学, 1988, (3): 1- 6

9 钱华,雷勃钧,卢翠华等,高蛋白大豆品种育成及其技术拓宽研究, [J]大豆科学, 1998, (2): 182- 185

10 雷勃钧,李希臣,卢翠华等,外源野生大豆 DNA 导入栽培大豆及 RAPD 分子验证, [J]中国科学, 1994, (6): 596- 600

11 李希臣,雷勃钧,卢翠华等,外源 DNA 导入大豆品种黑生 101 RAPD 初探, [J]大豆科学, 1999, (3): 230- 235

12 刘玉平,张合予,张永华,大豆黑生 101 在建三江地区的实验示范, [J]黑龙江农业科学, 2000, (4): 37- 38

13 贾士荣,转基因作物的安全性争论及对策, [J]生物技术通报, 1999, (6): 1- 7

14 朱祯,刘翔,转基因作物 - 恶魔还是救星, [J]农业生物技术学报, 2000, (10): 1- 5

15 周光宇,植物分子育种的兴起与展望,农业分子育种研究进展, [M] 中国农业科技出版社, 1993, 1- 11

SOYBEAN BREEDING EFFECTIVE METHOD- DIED

Lei Bojun

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

Abstract Based on the breeding of Heisheng 101 a new soybean variety with high yield, good quility and high protein. The paper describes the technique of Introducing Exgenous Total DN A (IETD) by pollen Tube path that was set up in China. It also compares this method with gene engineering and conventional breeding methods. Developmental strategies of gene transformation techniques in China are discussed.

Key words Soybean; High protein; DIED (Divect Introduction Exogenous DN A); DN A recombination in vitro; GMC (genetically modified crops)