

辐照外源 DNA 直接导入大豆诱变效果的研究^{*}

韩玉琴 卢翠华 李希臣 周思军 刘昭军 雷勃均 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 提取农作物总 DNA, 采用软 x 射线, 剂量为 2Gy、20Gy、200Gy 和 ⁶⁰Coγ 射线, 剂量为 1Gy、3Gy 和 5Gy 进行照射, 利用花粉管通道技术将其直接导入大豆。以导入不经照射的 DNA 为对照, 实验结果表明: 导入受照射的 DNA 明显的降低了 D₀ 代的结实率和 D₁ 代的成苗率, 但后代材料的变异率明显提高, 并且出现了供体和受体都不具备的新性状。

关键词 大豆; 外源 DNA; 辐照

中图分类号 S651.103.52 文献标识码 A 文章编号 1000-9841(2001)04-0254-03

外源 DNA 直接导入是 80 年代初兴起的一门分子育种新技术, 具有快速、简便、并可打破物种界限, 缩短育种年限等优点, 现已被应用于育种实践。辐照处理可以使染色体断裂, 诱导其结构变异, 从而扩大变异幅度。将辐照技术与外源 DNA 导入技术结合起来用于物种改良, 在小麦作物上取得了较好的效果^[1,5], 但在大豆上尚未见报导。我们进行此项研究的目的在于扩大 DNA 导入后代的变异幅度, 拓宽遗传基础, 提高有益变异, 为改良大豆品种提供一个新的方法和途径。本文即报道辐照 DNA 直接导入后代的诱变效果。

1 材料和方法

1.1 供试材料

供体: 虎林绿草豆(种皮绿色)、半野生大豆龙 79-3433-1(高蛋白、抗逆性强)、双高大豆品系(高蛋白、高脂肪)、垦农 7 号(高产、抗病)、玉米黑 301(高产、优质)。

受体: 黑农 35 号、绥农 14 号、绥农 10 号、垦农 4 号、合交 88-910 等均为纯系材料, 其做为本试验用纯度已达 100%。

1.2 实验方法

1.2.1 供体总 DNA 提取及辐照

采用氯仿-异戊醇-苯酚-核糖核酸酶法, 提

取供体总 DNA, 经岛津 UV-265 紫外检测和琼脂糖凝胶电泳检测, 均符合标准。用软 x 射线和 ⁶⁰Coγ 射线照射, 软 x 射线剂量为 2Gy、20Gy 和 200Gy; ⁶⁰Coγ 射线, 剂量为 1Gy、3Gy 和 5Gy, 以未经照射的 DNA 为对照; 以 λDNA + Hind III 为标准长度 DNA 进行琼脂糖凝胶电泳, 观察 DNA 降解效果。以未照射的为对照进行紫外检测, 观察紫外线吸收值的变化。导入 DNA 的浓度为 500μg/ml。

1.2.2 辐照外源 DNA 的导入

在受体材料大豆盛花期, 选择其自花受粉 6-32 小时的花, 切去柱头, 用微量注射器将总 DNA (约 10μl) 滴于柱头, 利用花粉管通道使总 DNA 进入子房。

2 结果与分析

2.1 辐照外源 DNA 对 D₀ 代结实率的影响

从表 1 的结果可以看出, 外源 DNA 经软 x 射线和 ⁶⁰Coγ 射线照射后, D₀ 代的平均结实率为 20.1% 和 21.5%, ⁶⁰Coγ 射线照射的材料以 1Gy 剂量的结实率最高, 为 22.5%, 软 x 射线照射的材料以 2Gy 剂量的结实率最高, 为 23.4%, 未经照射的对照结实率为 28.4% (见表 1)。表明经软 x 射线和 ⁶⁰Coγ 射线照射后降低了 D₀ 代的结实率, 且结实率随着剂量的增加有降低的趋势。

* 收稿日期: 2001-12-11

基金项目: 黑龙江省自然科学基金资助项目。

作者简介: 韩玉琴(1956-)女, 副研究员, 从事生物技术研究

表 1 不同剂量的软 x 和⁶⁰Coγ 射线照射外源 DNA 对 D₀ 代结实率的影响

Table 1 Effects of foreign DNA with different dose treatment of x or γ-ray on the seed rate of D₀

射线种类 Sorts of ray	剂量 Dose	导入组合(受体+ 供体) Combinations (receptor + supplier)						
		绥农 14+ 双高品系 Suinong14+ Double high line	黑农 35+ 龙 79— 3433— 1 Heinong35+ Long79— 3433— 1	绥农 10+ 虎林绿草豆 Suinong10+ Hulinlucadou	黑农 35+ 玉米黑 301 Hanong35+ Corn Hei301	合交 88— 910+ 垦农 7 Hejiao88— 910+ Kennong7	垦农 4 号+ 双高品系 Kennong4+ Double high line	平均 Average of ray
x	CK	27. 6	29. 6	28. 5	34. 5	23. 6	26. 7	28. 4
	2Gy	19. 1	21. 6	13. 4	31. 6	21. 5	27. 5	22. 5
	20Gy	23. 2	13. 3	21. 7	28. 3	19. 6	21. 8	21. 3
	200Gy	15. 0	23. 8	21. 7	18. 3	14. 1	19. 1	18. 7
Coγ	1Gy	17. 9	29. 5	20. 6	25. 5	22. 2	24. 6	23. 4
	3Gy	28. 3	21. 2	18. 4	17. 7	18. 9	26. 6	21. 9
	5Gy	21. 6	15. 4	17. 9	15. 6	21. 5	22. 5	19. 1

2.2 辐照外源 DNA 对 D₁ 代出苗率的影响

表 2 结果可以看出, 导入受照射的 DNA 对 D₁ 代的成苗率有较大的影响, 其影响效果因射线种类和剂量不同而异。经软 x 射线处理的材料平均出苗率为 48. 4%, 最高的是 20Gy, 为 52. 6%。未经处理的对照为 57. 3%; 经⁶⁰Coγ 射线处理的材料平均出苗率为 45. 1%, 最高的为 3Gy, 55. 4%, 对照为 64. 4%, (见表 2)表明射线照射引起了出苗率下降。

表 2 不同剂量的软 x 和⁶⁰Coγ 射线照射对 D₁ 代成苗率的影响

Table 2 Effects of foreign DNA with different dose treatment of x or γ-ray on the germination rate of D₁

射线种类 Sorts of ray	D ₁ 代成苗率%							
	软 x 射线 x-ray				Coγ 射线 γ-ray			
	CK	2Gy	20Gy	200Gy	CK	1Gy	3Gy	5Gy
播种粒数 No. of seed planted	96	156	116	120	73	139	112	108
成苗株数 No. of plants	55	73	61	55	47	57	62	42
成苗率% The germination rate	57. 3	46. 8	52. 6	45. 8	64. 4	41. 0	55. 4	38. 8
平均成苗率% Average	57. 3		48. 4		64. 4		45. 1	

2.3 软 x 射线照射外源 DNA 对 D₂ 代变异的影响

实验结果可见, 导入未照射的外源 DNA 产生的平均变异率为 1. 7%, 而经软 x 射线照射过的 DNA 导入 D₂ 代的变异率为 4. 2%、2. 4% 和 7. 6%, 都明

表 3 不同剂量软 x 射线处理外源 DNA 对 D₂ 代植株变异率的影响

Table 3 Effects of foreign DNA with different dose treatment of x-ray on the mutation rate in the later generations

处理 Treatment	D ₂ 代变异率%			
	CK	2Gy	20Gy	200Gy
绥农 14+ 双高品系 Suinong14+ Double high line	0	5. 6	0	10. 0
垦农 4+ 双高品系 Kennong4+ Double high line	3. 3	5. 9	4. 9	0
绥农 10+ 虎林绿草豆 Suinong10+ Hulinlucadou	3. 4	0	4. 8	10. 0
黑农 35+ 龙 79— 3433— 1 Heinong35+ Long79— 3433— 1	0	5. 3	—	10. 5
平均变异率% Average(%)	1. 7	4. 2	2. 4	7. 6

显高于对照, 200Gy 的处理效果最明显, 达到 7. 6%, 高出对照 4 倍以上。表明导入照射过的外源 DNA 能明显提高后代的变异频率, 以 200Gy 剂量效果好 (见表 3)。

经田间调查和室内考种结果可见, 导入 D₂ 代材料变异多种多样。包括熟期、结果习性、花色、叶型、种皮颜色、百粒重等。如黑农 35+ 龙 79— 3433— 1 后代出现了无限结荚习性类型, 植株变高类型。垦农 4 号+ 双高品系也出现了无限结荚习性类型。绥农 10 号+ 虎林绿草豆出现了圆叶类型、晚熟类型。有的组合还出现了供体和受体都不具备的性状, 如绥农 14+ 双高品系, 软 x 射线 200Gy 照射 DNA 的导入后代出现了大粒型材料, 百粒重达 30g。

2.4 不同剂量⁶⁰Coγ 射线照射外源 DNA 对 D₂ 代变异率的影响

实验结果可见, 导入未照射的外源 DNA D₂ 代的平均变异率为 1. 8%。经⁶⁰Coγ 射线照射 DNA 的导入后代变异率分别为 2. 5%、5. 5% 和 5. 7%, 都高

于对照。其中以 3Gy 和 5Gy 剂量照射的材料高出对照近 3 倍(见表 4)。表明经⁶⁰Co γ 射线照射 DNA 能明显提高后代材料的变异频率。以 3Gy 和 5Gy 剂量处理效果较好。

经田间调查和室内考种结果可见, 导入后代材料的变异性状很多: 包括熟期、株高、花色、种皮颜色、脐色、百粒重等。如黑农 35+ 玉米黑 301 出现晚熟、植株繁茂类型。黑农 35+ 龙 79-3433-1 出现了花色变异和小粒型材料。合交 88-910+ 垦农 7 号出现了黄色脐类型、同供体。

表 4 不同剂量⁶⁰Co γ 射线处理外源 DNA
对 D₂ 代材料变异的影响

Table 4 Effects of foreign DNA with different dose
treatment of ⁶⁰Co γ - ray on the mutation
rate in the later generations

处理 Treatment	D ₂ 变异率%			
	CK	1Gy	3Gy	5Gy
绥农 10+ 虎林绿草豆 Suinong 10+ Hulinkuacodou	0	3.7	6.3	7.1
合交 88-910+ 垦农 7 Hejiao 88-910+ Kenmong 7	4.0	3.8	—	11.1
黑农 35+ 龙 79-3433-1 Heinong 35+ Long 79-3433-1	0	—	3.8	0
黑农 35+ 玉米黑 301 Heinong 35+ Corn Hei 301	3.2	0	5.3	4.5
平均变异率% Average(%)	1.8	2.5	5.1	5.7

3 讨论

STUDIES ON THE MUTATION EFFECTS INDUCED BY DIRECT
INTRODUCTION OF IRRADIATED FOREIGN DNA INTO SOYBEAN

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

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

Abstract Foreign total DNA of crop was irradiated with soft x-ray in doses of 2Gy, 20Gy amd 200Gy respsectivelg and ⁶⁰Co γ - ray in dosages of 1Gy, 3Gy and 5Gy respectively, and was introduced into soybean through pollen tube channel. The same foreign DNA without irradiation treatment also introduced into the soybean was used as CK. the results indicated, although the seed rate of D₀ and the germination rate of D₁ were lower than its CK, the mutation rate of the later generations was increased compared with CK. Moreover, some new characters which were different from the supplier and the receptor were produced in the descendants.

Key words Soybean; Foreign DNA; Irradiation

利用花粉管通道技术导入外源 DNA, 为农作物育种提供了又一条育种新的途径。并已在棉花、水稻、小麦、大豆、玉米等作物上获得成功^[3-5]。本研究把外源 DNA 导入技术同辐射技术结合起来, 提高了导入后代的变异频率, 丰富了后代的遗传类型。这和辐照外源 DNA 导入小麦的诱变效果是一致的^[1]。辐照 DNA 导入后代不仅增加了供体的转化率和后代的变异率, 而且出现了供体和受体都不具备的新性状, 如绥农 14+ 双高品系出现了大粒型材料, 百粒重达 30g。这种现象在小麦上也存在^[7]。作者认为可能是受体整合了辐照损伤的外源 DNA 或是由外源 DNA 的”诱变”及部分”调控作用”所致。

总之, 辐照外源 DNA 虽然降低了 D₀ 代的结实率和 D₁ 代的出苗率, 但明显的提高了后代的变异率扩大了遗传类型, 这对育种是有利的。有关辐射 DNA 导入后代的变异机理有待进一步研究。

参 考 文 献

1 李忠杰, 孙光祖, 王广金, 等. 辐照外源 DNA 导入小麦诱变效果的研究[J]. 核农学通报, 1996, 17(4): 151-154.
2 卢翠华, 韩玉琴, 李希臣, 等. 辐照外源 DNA 导入大豆的研究初报[J]. 黑龙江农业科学, 2000, (2): 17-18.
3 周光宇, 翁坚, 龚蓁蓁, 等. 农业分子育种受粉后外源 DNA 导入植物的技术[J]. 中国农业科学, 1988, 21(3): 1-6.
4 雷勃钧, 尹光初, 王树林, 等. 外源野生大豆 DNA 导入栽培大豆引起的变异[J]. 中国油料, 1989, (3): 11-13.
5 李忠杰, 孙光祖, 王广金, 等. 辐照外源 DNA 导入小麦诱变效果初探[J]. 核农学通报, 1995, 16(1): 1-4.