

外源 DNA 直接导入大豆的研究*

雷勃钧 尹光初 卢翠华 钱 华
张开旺 周思君 王树林

(黑龙江省农业科学院大豆所)

提 要

本文报道了在大豆自花授粉后,利用其形成的花粉管通道,将外源 DNA 直接导入栽培大豆的研究结果。

通过对 10 组大豆实验材料进行外源 DNA 导入的结果看出:转化的后代主要表现在熟期、株型、花色、种皮色、百粒重和蛋白质含量的变异;变异的 D₂代单株或株系的过氧化物同功酶酶谱和酶活性显示了明显的差异,其中发生“疯狂分离”的单株,其酶带显示不规律;表型变异不明显而蛋白质含量高于受体的 8701 组合的 D₂代各株系,其酶活性明显增强,并主要表现在 A₁和 B 区。

实验结果表明:外源 DNA 片段直接导入受体植物卵细胞、合子或早期胚细胞,部分片段可以被受体细胞 DNA 整合和表达。还表明:利用花粉管通道途径来实现外源 DNA 直接导入大豆,进行大豆种质创新和品质改良也是可能的。

关键词 大豆;外源 DNA 导入;花粉管通道

利用开花植物授粉后形成的花粉管通道,直接导入外源 DNA 来转化尚不具备正常细胞壁的卵、合子或早期胚胎细胞、进而实现某些目的基因转移的技术,自 70 年代由我国学者周光宇先生提出后^[1],相继在多种作物上进行了实验研究。中国科学院上海生化所与江苏农科院经济作物所,中国农科院作物育种栽培研究所合作,首先在棉花和水稻上运用了这一技术^[2,3],经过 11 年艰难探索,获得了可喜进展,使我国分子育种进入了应用阶段^[4]。这一研究成果引起了国际科学界的瞩目,并不断被国内外研究者进行了重复实验和分子验证^[5,6]。此项技术实用可行,不仅为研究外源 DNA 导入植物提供了一个良好的实验系统,而且为扩大植物变异范围,丰富遗传基础,提供了一项新技术,特别是为我国农业分子

* 本研究得到国家自然科学基金的资助,并得到中国科学院上海生化所周光宇先生的指导谨致谢忱。

本文于 1990 年 8 月 9 日收到。

This paper was received on Aug. 9, 1990.

育种,开辟了一条切实可行的途径。

材料和方法

(一)供试材料

受体:栽培大豆(*Glycine max*)八份

供体:野生大豆(*G. soja*)两份,半野生大豆(*G. gracilis*)两份,栽培大豆一份。均为高蛋白材料。还有白小豆(Azuki bean)一份。详见表 1

表 1 材料与组合

Table 1 Materials and combination

编号	组合号	<i>G. max</i> 受体	供体			
			<i>G. soja</i>	<i>G. gracilis</i>	<i>G. max</i>	Azuki bean
1	D8701	黑农 35		龙 79-3433-1		
2	D8702	黑农 26	龙 79-5404			
3	D8703	9440	龙 79-5404			
4	D8704	黑农 32		龙 79-4204-4		
5	D8705	虎林绿草豆		龙 79-4204-4		
6	D8706	黑金元			国育	
7	D8801	黑农 34				白小豆
8	D8803	黑农 32	龙 79-3311			
9	D8805	吉林 20	龙 79-3311			
10	D8806	吉林 20				白小豆

(二)试验方法

1. 外源 DNA 的制备:采用氯仿—异戊醇—核糖核酸酶法。
2. 导入时期和方法:采用在大豆自花授粉后 6—32 小时,切柱头滴 DNA 于切口处的方法。
3. 生化鉴定和化学分析:采用聚丙烯酰胺凝胶电泳法,取 D₂代萌动种子幼芽进行过氧化物同功酶的酶谱分析。采用凯氏法,对 D₂代种子进行粗蛋白含量分析。

试验结果

根据三年的实验观察,10 个组合平均导入成活率为 31%;成株率为 58%;转化率为 8%。

D₀代种子特征基本同受体,但瘪粒占 50%。D₁代形态变异大的单株有 D8705-2-9, D8705-2-10 和 D8705-3-5。D₂代全部种下,其中 D8705-2-9 和 D8705-2-10 共得到 192 株,田间观察和室内考种发现性状“疯狂分离”现象。见表 2。D₁代植株部分性状如熟期、单株荚数、百粒重等发生变异的 D8702(D8721)组合有 3 株, D8703(D8791)组

合有2株,D8704(D8732)组合有1株^[7]。这些变异单株到D₂代未发现有明显的性状分离现象。而D8701和D8706组合,在D₁代表型变异不明显,其中D8706组合在D₂代一株系中出现种皮颜色的分离。

表2 变异株D₁D₂代与对照亲本的主要性状比较

Table 2 Main characters comparison of variant D₁, D₂ and CK parents

组 合 状	性 状	熟 期	生 长 习 性	结 荚 习 性	株 高	单 株 荚 数	叶 形	花 色	茸 毛 色	种 皮 色	脐 色	百 粒 重
虎林绿草豆(受体)		9、30	直立	有限	60	34	大园	白	棕	淡绿	褐	30.0
龙79-4204-4(供体)		9、28	爬蔓	无限	150	167	小园	紫	棕	褐	褐	7.5
D8705-2-9-D ₁		9、20	直立	无限	130	240	中园	紫	棕	花	褐	9.0
D8705-2-9-1-D ₂		9、20	直立	无限	65	36	长园	紫	棕	淡绿	褐	6.0
D8705-2-9-2-D ₂		9、20	直立	有限	90	46	长园	白	灰	棕	褐	8.0
D8705-2-9-3-D ₂		9、20	直立	有限	90	104	长园	白	灰	花	褐	10.0
D8705-2-9-7-D ₂		9、20	半直立	无限	130	107	长尖	白	灰	花	黄	9.2
D8705-2-9-9-D ₂		9、20	直立	无限	114	156	长园	白	灰	棕	褐	10.0
D8705-2-9-10-D ₂		9、20	半直立	无限	100	147	长园	白	灰	淡绿	褐	8.8
D8705-2-9-12-D ₂		9、20	半直立	无限	85	39	长园	白	灰	棕	褐	9.2
D8705-2-10-D ₁		9、20	直立	亚有限	83	75	中园	紫	棕	褐+绿	褐	12.3
D8705-2-10-1-D ₂		9、20	直立	亚有限	92	56	长园	白	棕	褐+绿	褐	8.3
D8705-2-10-2-D ₂		8、20	直立	有限	47	57	长园	—	棕	绿+褐	褐	6.8
D8705-2-10-3-D ₂		8、20	直立	有限	65	49	长园	—	棕	褐+绿	褐	7.3
D8705-2-10-4-D ₂		8、20	直立	亚有限	75	35	长园	—	棕	褐+黄	褐	—
D8705-3-5-D ₁		9、22	直立	有限	51	109	大园	白	棕	绿褐	褐	20.0
D8705-3-5-D ₂		9、22	直立	有限	47	54	大园	白	棕	绿褐	褐	20.0

D₂代种子的同功酶鉴定和化学分析,后代与受体之间差异明显。见表3和表4。表中只列出表型变异大的D8705-2-9, D8705-2-10的D₂代部分单株和D8701的D₂代部分株系(因种子量不够)。其中表型变异大的单株D8705-2-9和D8705-2-10D₂代各单株,其酶谱差异很大,酶带显示不规律。有的单株其酶谱增加了供体所具有而受体没有的一条酶带B₁,有的单株却减少了受体所具有的一条酶带A₁或A₂或B₃,表型变异不明显而蛋白质含量明显高于受体的D8701组合的D₂代株系。其酶活性明显增强,并主要表现在A₁和B区。

D8705组合的两个变异株的后代,其表型性状分离很大,其蛋白质含量差异也很大。192个单株分析了146株,其中含量在47%以上的占1.4%,含量在45%以上的占12.3%,超过受体虎林绿草豆蛋白质含量的单株总计为78.1%。

表3 D₂代单株(系)过氧化物同功酶的表达Table 3 D₂ single-plant (line) peroxidase isoenzyme expression

材料	酶带号	A区		B区		
		A ₁	A ₂	B ₁	B ₂	B ₃
虎林绿草豆 受体		++	+++		++	+
龙79-4204-4 供体		+	+	+++		
D8705-2-9-1 D ₂		-	+		+	-
D8705-2-9-2 D ₂		+	++		+++	++
D8705-2-9-3 D ₂		-	+		+	++
D8705-2-9-4 D ₂		+	++		++	++
D8705-2-9-5 D ₂		++	+		+	+
D8705-2-9-6 D ₂		++	+++	+++	++	+
D8705-2-9-7 D ₂		++	++		+	-
D8705-2-9-8 D ₂		+	++		++	+
D8705-2-9-9 D ₂		+	+++		+++	+++
D8705-2-9-10 D ₂		+	-		+++	+
D8705-2-9-11 D ₂		+	++		+++	+
D8705-2-9-12 D ₂		+	++		+++	+
D8705-2-10-1 D ₂		+	++	++	++	++
D8705-2-10-2 D ₂		+	++	+++	+	++
D8705-2-10-3 D ₂		+	++	+++	+	+
D8705-2-10-4 D ₂		+	++		++	+
黑农35 受体		+	+++	+	+	++
龙79-3433-1 供体		+	+	+	+	+
D8701-2 D ₂		++	+++	+	+++	++
D8701-6 D ₂		++	+++	++	++	+++
D8701-8 D ₂		++	+++	++	+++	++
D8701-9 D ₂		++	+++	+	++	++

注:酶活性 +++>++>+ 减少带-

表4 D₂代变异株(系)籽粒粗蛋白分析结果Table 4 Crude protein analysing results of D₂ variation plant seeds

项目	组合	粗蛋白含量	组合	粗蛋白含量	单株数
受体	黑农35	44.34	虎林绿草豆	39.42	
供体	龙79-3433-1	51.50	龙79-4204-4	46.29	
	D8701-1	45.54	D8705-2-9	45+	12
	D8701-2	45.84		44+	16
	D8701-3	48.18		43+	29
	D8701-4	46.90		42+	45
	D8701-5	45.83		41-	32
	D8701-6	47.28	D8705-2-10	47+	2
	D8701-7	46.71		45+	6
	D8701-8	47.58		44+	1
	D8701-9	44.22		43+	3
				未分析单株	46

注:D8705组合D₂代2株变异株第二年全部种下获得192株,其分析结果不能一一列出,本表中只统计相同含量的总株数,+示以上。D8701组合按各株系分析。

讨 论

实验结果表明:栽培大豆导入外源 DNA 以后不但在 D_1 代可以表现出明显的变异,而且在 D_2 代出现了“疯狂分离”的现象,同功酶酶谱比较和蛋白质含量分析,均显示了与受体的明显差异。这与常规育种的有性杂交 F_1 代及 F_2 代的分离完全不同,这是由于外源 DNA 片段转化的结果,这种转化是随机的,也可能是种间异源可动元件转移作用的结果,因此,产生了这种非孟德尔遗传的分离现象。确切地解释这一现象,需进一步从细胞学和分子生物学的角度进行研究。

从本实验中还发现,没有明显表型性状变异的 D8701 组合株系,对 D_2 代种子粗蛋白分析和同功酶鉴定,蛋白质含量也明显高于受体,过氧化物酶活性增强。

因此,利用此项技术进行大豆种质的创新和遗传基础的拓宽,特别是迅速提高现有推广品种的蛋白质含量提供了一条可能的途径。

有关导入后代蛋白质含量变化和同功酶鉴定分析的详细结果,将另文报道。

参 考 文 献

- [1] 周光宇,1978,从生物化学角度探讨远缘杂交的理论,《中国农业科学》,(2) 16—20
- [2] 黄骏麒等,1986,外源抗枯萎病 DNA 导入感病棉的抗性转移,《中国农业科学》(3) 32—36
- [3] 段晓岚等,1985,外源 DNA 导入水稻引起的性状变异,《中国农业科学》(3) 6—10
- [4] 周光宇等,1988,农业分子育种,《中国农业科学》21 (3) 1—6
- [5] 龚毓葵等,1988,受粉后外源 DNA 导入植物技术,《中国科学》B 辑 (6) 611—614
- [6] 翁坚等,1984,外源 DNA 导入棉花的分子验证,《生物化学与生物物理学学报》16 (3):325—326
- [7] 雷勃钧等,1989,外源野生大豆 DNA 导入栽培大豆引起的变异,《中国油料》(3):11—13

STUDY OF EXOGENOUS DNA DIRECTLY TRANSFERED INTO SOYBEAN

Lei Bojun Yin Guangchu Lu Cuihua Qian Hua
Zhang Kaiwang Zhou Sijun Wang Shulin

(*Soybean Research Institute HAAS Harbin China*)

Abstract

This paper reports the methods and results of Exogenous DNA directly transferred into cultivar soybeans through formed passage of the soybean pollen tube after self-pollination.

Through studies on the different transferring stage and methods of 517 flowers of 10 groups of soybean. Results show that the survival rate is 31%; the plant forming rate is 58%; the transformed rate is 8% that cutting the stigma off and putting DNA extraction on the cut after soybean self-pollinating 6—32 hours. By ejecting the ovary after soybean self-pollination the survival rate is 1.3%. Plant forming rate is 0. The transformed off spring shows variations in mature stage, plant type, flower colour, skin colour of seed, hundred-seed weight and protein content of soybean. The single-plants or plant-lines of D_2 were analysed with isoenzyme, the bands and activity of D_2 peroxidase isoenzyme show significant difference. Both plants of D8705—2—9 and D8705—2—10 with significant variation in D_1 occurred "Frenzeid separation". Their enzyme bands show unregulay. The D_2 plant-line enzyme activity of D8701 whose protein content is higher than the receipt out the phenotype has no clear variation shows significant increasing and mainly concentrates on A_1 and B zone.

The results indicate that, directly transferring foreign DNA into host plant egg cell, Zygote or early stage embryo, some segments can be inserted into host plant DNA and can express. The results also indicate that it is possible to improve soybean quality by using the pollen tube passage to transfer foreign DNA into soybean.

Key words Soybean; Exogenous DNA transferred; Pollen tube passage

* This research was granted by the National Natural Science Fund. Our acknowledge to Zhou Guangyu for help.