

# 导入外源总 DNA 获得优质高蛋白 和双高大豆新品系\*

雷勃钧 卢翠华 钱 华 李希臣 吕云波

(黑龙江省农业科学院生物技术研究中心)

赵 凯 刘广阳 杨兴勇

(黑龙江省农业科学院小麦研究所大豆室)

## 摘 要

本文报道了利用大豆自花受粉后形成的花粉管通道,将外源野生大豆总 DNA 直接导入受体栽培大豆品种中,其中一组合(D8701)获得的导入后代 D89-982,蛋白质含量比受体提高了近 2 个百分点,球蛋白总量提高近 10 个百分点,并使其与大豆加工品质密切相关的 11S 球蛋白组分所占比例超过了 70%,该品系经品比和异地鉴定,产量比标准品种提高 11%,于 1995 年进入省区域试验;另一组合(D8705)的导入后代 D90-1217,平均蛋白质含量比受体提高 9 个百分点,达 48.47%,脂肪含量达 18.34%,蛋白质含量+脂肪含量达到了 66.7%以上。

**关键词** 大豆;外源 DNA 导入;高蛋白;11S 球蛋白

利用开花植物受粉后形成的花粉管通道,直接导入外源总 DNA,进而实现某些目的基因转移,实现农作物的分子育种技术,已被世人所公认,并不断在扩大它的应用范围 and 对其理论问题的深入探讨。

我们利用外源 DNA 直接导入技术,进行了高蛋白野生大豆总 DNA 直接导入栽培大豆的深入研究<sup>[1,2]</sup>,在提高大豆蛋白质含量及球蛋白组分含量方面取得较大进展的基础上,近年来,在同时提高大豆品系的蛋白质和脂肪含量方面又获得了明显结果。

\* 本文于 1995 年 3 月 31 日收到。

This paper was received on March 31, 1995.

## 1. 供试材料

受体:栽培大豆 黑龙江省推广品种黑农 35,虎林绿草豆

供体:半野生大豆 黑龙江省收集的高蛋白材料:龙 79-3433-1(51%)和龙 79-4204-4(48%)

## 2. 试验方法

1)外源 DNA 的制备:采用氯仿-异戊醇-核糖核酸酶法对供体进行总 DNA 的提取,提取的 DNA 要经岛津 UV-265 紫外检测和琼脂糖凝胶电泳进行纯度、浓度和片段大小的鉴定。导入大豆的 DNA 浓度应达 500 $\mu$ g/ml。

2)导入时期和方法:在大豆开花季节,选择适当的花蕾,即当花冠高于最高花萼 0.5-1mm 时,采用切柱头滴 DNA 于切口处的方法,并用 DNA 稀释液 1 $\times$ SSC 作对照,3 天后和结荚期内进行成活率调查,并随时去掉新长出的花芽。

3)后代处理与观察:收获的 D<sub>0</sub> 代种子第二年按组合全部单粒点播,D<sub>1</sub> 代按单株调查、收获和考种,下年按株系种植,D<sub>2</sub> 代按株系进行调查、收获和考种。以后各世代均按选择株系种植,观察变异和遗传。并于 D<sub>1</sub> 代调查成株率,D<sub>1</sub> 或 D<sub>2</sub> 代调查变异率,无变化的组合可于 D<sub>3</sub> 或 D<sub>4</sub> 代淘汰。上述田间调查全部按常规育种项目进行,稳定品系进行品比和异地鉴定。

4)化学分析和生化鉴定:从 D<sub>1</sub> 或 D<sub>2</sub> 代开始(视种子量而定)由黑龙江省农科院中心化验室测定蛋白质和脂肪含量。用聚丙烯酰胺凝胶电泳法,对受体、供体及其导入后代进行过氧化物酶、酯酶等同工酶分析,用等电点法(重量法)和盐析法对高蛋白组合亲本及后代进行球蛋白总量和 11S 球蛋白含量的分析。

## 3. 结果

黑农 35 品种导入了半野生大豆龙 79-3433-1 的总 DNA,D<sub>1</sub> 代获得 9 个单株,后代表型变异不明显基本同受体。D<sub>2</sub> 代按株系收获后进行了化学分析,保留了 4 个蛋白质含量较高的株系,经过 3 年以上的观察和分析(表 1)

其中 1 个株系 D89-982 除蛋白质含量比受体高出近 2 个百分点外,产量性状优良。经品比和异地鉴定,在克山异地产量鉴定比标准品种(对照)提高 11.3%,比参考品种(受体)提高 46.8%,生育日数 120 天,具有抗灰斑病,秆强不倒等优点(表 2)。

虎林绿草豆导入了半野生大豆龙 79-4204-4 的总 DNA,D<sub>1</sub> 代获得 19 个单株,其中有两株在花色、叶型、株型及籽粒等方面表现中间类型。1989 年,D<sub>2</sub> 代这两个变异株均发生了“疯狂分离”,共得到 192 个单株。因分离群体过大,每株种子量有限,进行化学分析时,只做了 146 株。其中蛋白质含量超过 45%的有 20 株,占 13.7%,1990 年,D<sub>3</sub> 代继续按株系进行化学分析,发现另有 3 个株系(D90-1217、D90-1220、D90-1236)的蛋白质和脂肪含量的总数超过了 66%(表 1),从 D<sub>4</sub> 代起性状开始稳定。D90-1217 的主要农艺性状为:直立、无分枝、株高 70cm 左右、花种皮、百粒重 15g 左右。可作为育种材料利用。

对上述两个高蛋白品系,利用等电点法(重量法)和盐析法,进行了球蛋白总量和 11S 球蛋白组分的分析(表 3)。

表 1 4 个高蛋白品系化学分析结果

Table 1 Chemical analysis results of four high protein strains

组合号 No. of combination	蛋白质,脂肪含量(%) Content of protein and fat										平均 Average		
	1989		1990		1991		1992		1993				
D8701	黑农 359 受体 Heimong 35 (Recipient)	44.34	16.78	42.78	19.09	44.34	18.14	41.39	19.40	44.55	18.42	43.48	18.37
	龙 79-3433-1(供体) Long79-3433-1 (Donor)	51.01	10.55										
	后代(Progeny)												
	D89-977	48.18	15.32	43.69	19.30	45.76	18.12	42.87	20.00	—	45.13	18.19	
	D89-978	46.90	15.48	43.64	20.00	46.25	18.80	44.60	19.35	45.20	17.96	45.32	18.32
	D89-979	47.78	15.55	43.89	20.03	45.72	17.75	42.33	19.75	—	44.93	18.27	
	D89-982	47.58	16.27	44.17	19.18	46.14	18.13	43.00	19.00	45.72	45.32	18.15	
	虎林绿草豆(受体) Hulinhucaodo (Recipient)	39.42	19.19										
	龙 79-4204-4(供体) Long79-4204-4 (Donor)	48.96											
	后代(Progeny)												
D8705	D90-1217			48.47	18.34					52.44	17.83	50.46	18.09
	D90-1220			48.34	17.98								
	D90-1236			49.02	17.45								
	分离株系间幅度	45-47	14-16	46-49	15-18	—		45-47	45-52	-17			

表 2 D89-982 株系产量鉴定试验结果

Table 2 Yield test results of the strain D89-982

试验地点 Test place	年度 Year	平均产量 (公斤/公顷) Average yield (kg/ha)	较对照(%) Compare with CK (%)	较参考(%) Compare with consult (%)	对照品种 CK	参考品种 Consult	抗病性 鉴定 Resistance test
哈尔滨 Harbin	1992	1965	85.3	154.8	黑农 33 Heinong 33	黑农 35 Heinong 35	
	1993	2400	102.1	141.1	黑农 33 Heinong 33	黑农 35 Heinong 35	
	1994	2400	106.7	133.3	黑农 33 Heinong 33	黑农 35 Heinong 35	
	平均 Average	2254.5	98.0	143.1			
克山 Keshan	1993	2563.5	106.2	136.2	丰收 22 Fengshou 22	黑农 35 Heinong 35	* 抗灰斑病、霜霉病
	1994	2626.5	116.4	157.3	丰收 22 Fengshou 22	黑农 35 Heinong 35	** 抗霜霉病、细菌性斑点病
	平均 Average	2595	111.3	146.8			

Notes: \* Frogeye leaf spot and Downy mildew resistance.  
\* \* Downy mildew and Bacterial spot disease resistance.

D89—982 球蛋白总量为 78.31%，比受体黑农 35 提高了近 10 个百分点，11S 球蛋白所占比例达 72.90%，而 11S 球蛋白比例超过 70%，已属罕见<sup>[3]</sup>。

表 3 D89—982、D90—1217 蛋白及蛋白组分的测定结果

Table 3 Test results of protein and protein components of D89—982,D90—1217

组合号 No. of combination	材料名称 Material name	总蛋白(%) Total protein(%)	球蛋白总量(%) Total globin(%)	11S 球蛋白占球蛋白总量的比例(%) Proportion of 11S globin in total globin(%)
D8701	黑农 35(受体) Heinong 35 (Recipient)	44.55	68.56	
	D89—982(后代) (progeny)	45.72	78.31	72.90
D8705	虎林绿草豆(受体) Hulinlucaodou (Recipient)	39.42	63.32	
	D90—1217(Progeny)	52.44	69.26	64.81

注：为 1994 年分析的数据      Note: All of datas were analysed in 1994.

对上述高蛋白品系的过氧化物酶同工酶分析结果(表 4)。

从过氧化物酶谱上可以明显看到凡蛋白质含量高的材料，其酶谱带在数量上基本没有变化，但颜色加深十分显著，且主要在 B 区。

表 4 D<sub>2</sub> 代单株(系)过氧化物同工酶的表达

Table 4 D<sub>2</sub> Single—plant(Unc) Peroxidase Isoenzyme expression

组合号 No. of combination	酶 代 号 No. of band	A 区 A district				B 区 B District			
		A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>	A <sub>4</sub>	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	B <sub>3</sub>	B <sub>4</sub>
黑农 35(受体) Heinong 35 (Recipient)		+	+++			+	+	+	
	龙 79—3433—1(供体) Long 79—3433—1 (Donor)	+	+			+	+	+	
	D8701—2	++	+++			+	+++	++	
	D8701—4	++	+++			++	++	+++	
	D8701—8	++	+++			++	+++	++	
	D8701—9	++	+++			+	++	++	
虎林绿草豆(受体) Hulinlucaodou (Recipient)		+	++	+++		+	++	+	
	龙 79—4204—10(供体) Long 79—4204—4 (Donor)		+	+		+++		+++	
	D8701—9—5		++	+++		++		+++	
	D8701—9—9	++	+++	+++		+	++	+++	
	D8701—9—13	+		+++		+++	+++	+++	
	D8701—10—2	+	+++	+++		+++	+++	+++	
	D8701—10—6			++		+++		+++	

注：表中材料 D8701—8 为 D89—982，D8705—10—2 为 D90—1217，“+”多少表示酶活性的大小

Note: Materials in table D8701—8 is D89—982, D8705—10—2 is D90—1217. Number of “+” show strong or weak of enzyme activity.

4. 讨论

据国内外多年来常规育种的研究表明，大豆蛋白质含量遗传一般以基因加性效应为

主,孟庆喜<sup>[4]</sup>认为杂交后代蛋白质含量主要受高蛋白亲本影响。即与双亲蛋白质含量的平均值呈显著或极显著的正相关,亲本蛋白质含量越高则杂交后代的蛋白质均值也越高,且超亲个体普遍存在。正是基于这种理论,我们在进行外源 DNA 导入研究时,注意选择了高蛋白的半野生大豆为供体,研究结果表明与有性杂交具有基本相同的结论,所不同的是超亲个体的出现有时在 D<sub>1</sub> 代发生<sup>[1]</sup>,并能迅速稳定。

黑龙江省栽培大豆品种蛋白质和脂肪总含量平均为 62.14%,幅度为 58.39—65.61%<sup>[6]</sup>,大多数品种在 60%左右,总含量最高品种为嫩丰 10 号(43%+22.61%)为 65.61%。达到或突破 66%是很困难的<sup>[6]</sup>,即使在半野生或野生大豆中也没有达到此指标的品系。野生大豆一般以高蛋白著称,但脂肪含量均较低(15%左右)。本项研究在 D8705 组合中获得了 3 个株系其总量均达到 66%以上。这表明可能是基因转移的一个独特效果,经导入高蛋白半野生大豆 DNA 后,既提高了受体的蛋白质含量,又保留了原脂肪含量,因而使其总量超过了 66%。

大豆蛋白质的品质问题,除必需氨基酸组成和氨基酸构成的平衡性及抗营养因素等,还包括大豆蛋白质加工过程中可利用的那一部分蛋白质的数量与质量<sup>[7]</sup>。大豆种子主要是贮存蛋白,而贮存蛋白中球蛋白含量最高,约占全蛋白的 65%左右,而球蛋白中所占比例最高的是 11S 球蛋白,一般为 50—60%,极少有超过 70%的。1984 年雷勃钧等<sup>[9]</sup>在进行大豆球蛋白及组分的分析筛选中,曾在半栽培大豆中发现一个 11S 球蛋白达 80%的材料。而据西安油脂化工研究所研究表明:11S 球蛋白含量的高低极大影响着豆腐加工的产量和品质。武天龙等<sup>[10]</sup>人研究也发现,可溶性蛋白含量较粗蛋白含量与豆腐数量和品质的关系更密切。因此,在提高大豆蛋白质含量的同时,必须注意提高 11S 球蛋白含量<sup>[11]</sup>。本项研究所获的一个高蛋白品系,球蛋白总量及 11S 球蛋白组分均高于一般品种,且产量又高于标准品种,因此这个品系可确定为优质高蛋白品系。本项研究所获结果表明,利用外源 DNA 直接导入技术可以迅速将高蛋白半野生大豆 DNA 转移到栽培大豆,并能产生优良的高蛋白品系。这是有性杂交育种技术不易实现的。

## 参考文献

- [1] 雷勃钧等,1994,中国科学(B),24(6),596—601
- [2] 雷勃钧等,1991,大豆科学,10(1),58—63
- [3] 雷勃钧等,1986,黑龙江农业科学,第 1 期,7—13
- [4] 孟庆喜等,1988,大豆科学,7(3),183—191
- [5] 陈 霞,1992,大豆科学,11(1),92
- [6] 杨 琪等,1994,大豆科学,13(3),200—205
- [7] 周新安等,1992,大豆科学,11(3),191—196
- [8] 周新安等,1992,大豆科学,11(4),283—289
- [9] 雷勃钧等,1984,大豆科学,3(1)
- [10] 武天龙等,1986,大豆科学,5(3),189—195
- [11] 邱丽娟等,1991,大豆科学,10(2),93—97
- [12] 胡志昂等,1986,大豆科学,5(3),204—209

## NEW SOYBEAN STRAINS OF HIGH PROTEIN AND DOUBLE HIGH CONTENT OBTAINED FROM INTRODUCTION OF EXOGENOUS TOTAL DNA

Lei Bojun Lu Cuihua Qian Hua Li Xichen Lu Yunbo

(*Biotechnology Research Center, Heilongjiang Academy of Agri. Sci.*)

Zhao Kai Liu Guangyang Yang Xingyong

(*Wheat Research Institute, Heilongjiang Academy of Agri. Sci.*)

### Abstract

This paper reports that the wild soybean exogenous total DNA was introduced into cultivated soybean through pollen tube channel. The receptor progeny (D89—982) was obtained from the combination D8701. Its content of protein increased about 2 percent more than the recipient and its globin increased about 10 percent. The proportion of 11S globin which was most in relation with the processing quality of soybean was higher than 70%. The yield of this strain was 11% higher than the standard variety by varietal comparison and regional test, and as an entry in provincial district test of 1995. The average protein content of the receptor progeny (D90—1217) of another combination increased 9 percent more than recipient. The content of protein was 48.4%, the fat was 18.34%, the total content of protein and fat was higher than 66.7%.

**Key words** Soybean; Introduction of exogenous DNA; High protein; 11S globin

### 欢迎订阅 1996 年《中国油料》

《中国油料》是中国农科院油料作物研究所主办的油料作物专业科技刊物。公开发行，季刊。主要刊登油菜、大豆、花生、芝麻、向日葵、胡麻、红花及其它油料作物有关品种资源、遗传育种、耕作栽培、生理生化、综合加工利用以及品质测试技术方面的论文、研究报告、应用技术、综述、动态等文稿。可供农业科研、教学和生产部门的技术人员参考。

每期定价 2.50 元，全年 10.00 元。国内代号：38—13，全国各地邮局均可订阅，漏订者可直接寄款本刊编辑部订购。

地址：湖北 武汉市 武昌保集安 油料所 邮编：430062