

通过直接引入外源DNA 育成高产、优质、高蛋白大豆新品种 黑生 101^X

雷勃钧¹ 钱 华¹ 李希臣¹ 卢翠华¹ 周思君¹ 韩玉琴¹ 刘昭军¹
刘广阳² 杨兴勇² 董全中² 赵 凯² 赫世涛²

(¹黑龙江省农业科学院生物技术研究中心, 黑龙江省哈尔滨 150086; ²黑龙江省农业科学院克山小麦研究所, 黑龙江省克山 161606)

提 要 本文报道了利用花粉管通道技术, 将野生大豆DNA 直接导入受体栽培大豆。经分析、鉴定、选择、育成了集高产、优质、高蛋白于一体的新品种黑生 101, 并经 RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) 分子验证, 证明供体DNA 片段确已进入受体。经连续 7 年分析, 黑生 101 蛋白质含量超过 45%, 平均比受体高 1.76 个百分点; 球蛋白总量比受体高近 10 个百分点, 11S 球蛋白超过了 70%; 产量比标准品种提高 9.8%, 已于 1997 年正式推广。

关键词 大豆; 外源DNA; RAPD; 高蛋白

Breeding of a High-yielding, High-quality and High-protein Content Soybean Cultivar-Heisheng 101 through Direct Introduction of Alien DNA

LEIBO Jun¹ QIAN Hua¹ LIXI Chen¹ LU Cuihua¹ ZHOU SiJun¹ HAN YuQin¹ LIU ZhaoJun¹
LIU GuangYang² YANG XingYong² DONG QuanZhong² ZHAO Kai²
HAO ShiTao²

(¹Biotechnology Research Centre, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086; ²Keshan wheat Institute, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences Keshan, 161606)

Abstract This paper describes that an alien DNA of wild soybean was directly introduced into a cultivated soybean by "Pollen Tube Path". According to the result of analysing, appraising and selecting, a new cultivar with high yielding, high quality and high protein content Heisheng 101 was developed. Moreover, it was confirmed that the alien DNA sequence from the wild soybean had been introduced into the acceptor. Based on the analysis for the past seven years, the protein content of Heisheng 101 was over 45% and average was 1.76% high than that of its acceptor. The total content of globe proteins was 10% higher than that of its acceptor. The 11S globe protein was more than 70%. The yielding of Heisheng 101 raised 9.8% compared with standard cultivars. This new cultivar was named as and expended formally in 1997.

Key words Soybean; Alien DNA; RAPD; High protein content

X "九五"国家重点科技攻关项目
参加本项研究工作的还有王树林、吕云波, 英文摘要由吕晓波提供, 一并致谢。
收稿日期: 1999205225, 接受日期: 1999212210

植物蛋白的研究与开发,近20年来已受到普遍的关注,越来越多的研究表明,植物蛋白具有很高的营养价值和保健作用,其中尤以大豆蛋白为最佳。据有关资料:美国、日本均曾育成蛋白质超过47%的品种,如美国的Siow x、日本的白莱1号等。我国大豆蛋白质含量平均在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%,有的高达47%以上。但在北方主产区黑龙江省平均含量还不到40%。一般国内专家认为,在高纬度地区育成高蛋白品种较困难。高蛋白常规育种最大难度是蛋白含量与产量呈负相关,虽然近年也不断育成一些蛋白含量较高的品种,但在品质、产量等指标上仍不够理想。

外源DNA直接导入技术的应用实现了农作物分子育种,成为目前生物技术中最具生命力的生长点。近年来,我们利用该技术对栽培大豆品种进行了品质改良的研究^[1],并对转化后代进行了RAPD分子验证^[2],进而育成了第一个大豆新品种——高产、优质、高蛋白大豆黑生101。现将结果报道如下。

1 材料与方 法

1.1 供试材料

受体:栽培大豆629623

供体:野生大豆龙792343321(黑龙江省收集的蛋白含量50%以上特高蛋白材料)

1.2 试验方法

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,并经岛津UV 2265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浓度达到500 Lg μ mL左右。

导入及选择:在大豆自花受粉后6~32 h内,采用切柱头涂抹法,将供体DNA直接导入受体。所获导入后代基本按常规育种程序进行田间种植、选择和考种鉴定。

后代鉴定:对受体、供体和转化后代同时进行化学分析和RAPD鉴定。

2 结果与分析

2.1 导入后代蛋白质、脂肪含量分析

通过直接导入在1989年的D₂代就获得许多高蛋白株系,它们的脂肪含量(FC)虽然较受体稍低,但蛋白含量(PC)却明显高于受体,其中有4个株系PC超过46%(见表1)。

表1 4个D₂代株系的蛋白、脂肪含量
Table 1 The protein and fat content of 4D₂ strains

材料 Material	蛋白含量 Protein content (%)				脂肪含量 Fat content (%)			
	1989	1990	1991	平均 Average	1989	1990	1991	平均 Average
受体 629623	44.34	42.78	44.34	43.82	16.78	19.09	18.14	18.00
供体 792343321	51.01 ³			51.01	10.55 ³			10.55
后代 D892977	48.18	43.69	45.76	45.88	15.32	19.30	18.12	17.58
后代 D892978	46.90	43.64	46.25	45.60	15.48	20.00	18.80	18.09
后代 D892979	47.78	43.89	45.72	45.80	15.55	20.03	17.75	17.78
后代 D8929822	47.58	44.17	46.14	45.96	16.27	19.18	18.13	17.86

3 数据来自中国野生大豆资源目录,其余数据来源见表2注。

根据3年化学分析,其中D8929822年平均值为最高。PC为45.96,FC为17.86,平均PC(45.96)和PC+FC(63.82)已超过受体2个百分点且性状稳定,选其作为优系继续进行PC和FC跟踪分析(见表2)。

7 年跟踪分析导入后代品系 D 8929822 的 PC 最高年份达 47.58%，平均为 45.44%，比受体平均高 1.76 个百分点。PC + FC 为 63.31%，比受体 61.95% 高 1.36 个百分点。证明该品系高蛋白特性是稳定的。

众所周知，大豆品质不仅决定于其蛋白质含量的高低，更主要的是与其可溶性蛋白含量即球蛋白总量及其含硫氨基酸有

关的 11S 球蛋白含量的高低有关。为此，于 1994 年对该品系及受体进行了有关分析。（由于分析价格上涨和经费所限，当年对上百份与高蛋白选择有关材料只做了一项蛋白分析）。

1994 年利用等电点法（重量法）和盐析法，对受体和 D 8929822 品系的球蛋白总量及其组分 11S 球蛋白进行分析^[3]结果 D 8929822 球蛋白总量比受体 629623 高近 10 个百分点，11S 球蛋白总量比例高达 72.9%。（11S 球蛋白比例极少有超过 70% 的）。

通过 T 检验说明后代与受体之间蛋白质含量差异明显^[4] $t = 5.9797^{3.3}$ ($t_{0.05} = 2.36$, $t_{0.01} = 3.5$)。

2.2 决选高蛋白品系产量分析鉴定

作为优系的 D 8929822 在进行 PC 跟踪分析的同时，于 1992 年决选品系进入品比，异地鉴定，区试和生产试验。试验结果见表 3。

表 3 D 89-9822 在不同产量评比试验中的表现

试验名称 Name of yield trials	年度 Year	产量 Yield (kg/öhm ²)	为对照之% % of CK	对照名称 Name of CK	为受体之% % of recipient
品种比较 Yield trial	1992~ 1994	2254.5	98.0	黑农 33 Heinong 33	143.1
异地鉴定	1993~ 1994	2595.0	111.3	丰收 22 Fengshou 22	146.8
Test at alien sites					
区域试验 Regional test	1995~ 1996	2230.7	109.2	丰收 22 Fengshou 22	—
生产试验 On farm test	1996	2198.9	109.8	丰收 22 Fengshou 22	—

5 年 4 种产量比较试验结果，除品种比较试验（在育成区试验）产量稍低于对照外，其余 3 个试验（在适宜区试验）比对照增产 9.2% ~ 11.3%。比受体增产幅度分别高达 43.1% 和 46.8%。此外该品种还具有秆强、株型收敛、适宜密植、抗逆性强、适应性广等特点。为此，决定作为新品种在适

表 2 D 89-9822 连续 7 年的蛋白及脂肪含量

年份 Year	蛋白含量 Protein content (%)			脂肪含量 Fat content (%)		
	629623	D 8929822	比供体增加 Increase over recipient	629623	D 8929822	比供体增加 Increase over recipient
1989	44.34	47.58		16.78	16.27	
1990 ³	42.78	44.17		19.09	19.18	
1991 ³	44.34	46.14		18.14	18.13	
1992	40.67	43.00		19.38	19.00	
1993 ³	44.55	45.20		18.42	17.96	
1994 ³	44.81	45.72		—	—	
1995 ³	44.31	46.29		17.83	16.69	
平均	43.68625	45.4425	1.76	18.27	17.87	- 0.40
SD	1.3717	1.3884				
C.V %	3.14	3.055				

注：3 数据来自黑龙江省农业科学院谷物分析中心，其他数据来自黑龙江省农业科学院大豆所品质分析室。

3 Data obtained from Grain Analysis Center of HAAS, other data obtained from Quality Analysis Department of Soybean Research Institute of HAAS

宜区正式推广, 1997年初审定命名为黑生 101(见图 2)。

2.3 对黑生 101 进行 RAPD 鉴定

为了核实外源DNA 是否确实导入受体, 利用 RAPD 技术进行核查。结果发现所用随机单引物 132 个, 扩增出多态性的引物有 3 个(OPB₀₇, OPB₁₈, OPC₀₈)占所用引物的 2.27%。其中引物OPB₀₇扩增产物在 700 bp 处(见图 121), OPC₀₈扩增产物在 1300 bp 和 1200 bp 处(见图 122), 黑生 101 均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。所用 4 对双引物中有 1 对双引物OPA₁₁+ OPC₁₂在 500 bp 处(见图 123), 黑生 101 扩增出一条与供体相同, 而受体没有的特异带。上述结果说明黑生 101 确实是引入外源DNA 的产物^[5]。

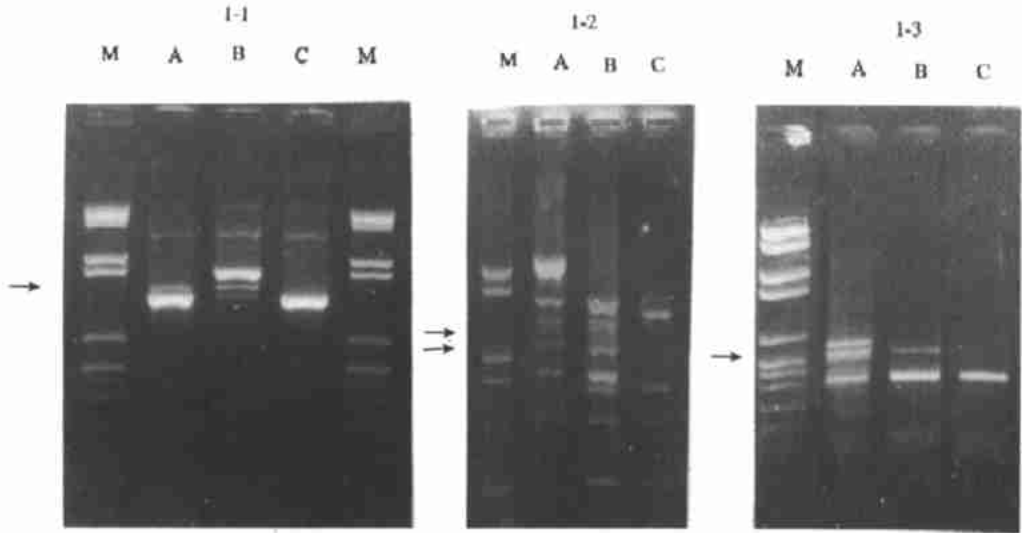


图 1 引物OPB₀₇、OPC₀₈和OPA₁₁+ OPC₁₂的扩增结果(箭头显示为差异片段)

Fig. 1 Amplified products by primer OPB₀₇, OPC₀₈ and OPA₁₁+ OPC₁₂

M: DNA 分子量标记 DNA molecular weight marker

121、122: pBR322 *Hinf*I + pBR322 *Bst*NI 片段长度: 1857, 1633, 1058, 929, 517, 506, 396, 344, 298 bp...

123: pBR328 *Bgl*I + pBR328 *Hinf*I 片段长度: 2176, 1766, 1230, 1033, 653, 517, 453 bp

A: 供体龙 792343321 Donor long 792343321; B: 后代黑生 101 Progeny Heisheng 101; C: 受体 629623 Recipient 629623

121 引物OPB₀₇扩增结果, 引物序列 5'GGTGACGCA G23

121 Amplified products by primer OPB₀₇, The sequence of this primer is 5'GGTGACGCA G23

122 引物OPC₀₈扩增结果, 引物序列 5'TGGACCGGTG23

122 Amplified products by primer OPC₀₈, The sequence of this primer is 5'TGGACCGGTG23

123 引物OPA₁₁+ OPC₁₂扩增结果, 引物序列: OPA₁₁5'CAA TCGCCGT23 OPC₁₂5'TGTCA TCCCC23

123 Amplified products by primer OPA₁₁+ OPC₁₂, The sequence of this primer: OPA₁₁

5'CAA TCGCCGT23 OPC₁₂5'TGTCA TCCCC23

3 讨论与结语

3.1 野生资源的利用

野生大豆的高 PC 特性是育种家所非常期盼的有利性状, 加之抗逆性强等优点而长期被作为一种宝贵的资源加以保存和利用。但它们也有许多不良农艺性状(如株型呈爬蔓状, 多分枝, 茎细软, 籽粒小皮色黑或褐等等)。80 年代初, 我们曾利用常规有性杂交的方法使高

PC(超过 48%)野生大豆与栽培大豆杂交,获得的许多杂交后代中不少材料PC 超过 45%,但它们往往伴随着许多不良农艺性状而难以利用。因此,不得不另辟新路采用直接导入野生大豆DNA 的技术进行高 PC 特性转移,事实证明转移极易获得成功。10 几年来我们做了大量组合,所选野生大豆 PC 均在 48% 以上最高达 51%。导入所获后代的 PC 含量均获得不同程度的提高^[6],且后代保持了栽培大豆性状,从中我们曾选获许多品系,黑生 101 的育成只是其中之一。这可能为其它作物野生资源快速利用带来新的启示。



图 2 高产、优质、高蛋白大豆新品种黑生 101

Fig. 2 A new soybean cultivar Heishen 101 with high yielding, high quality and high protein content

3 2 打破某些相关性

黑生 101 的育成结果说明通过外源DNA 直接导入技术可以突破高蛋白育种的产量指标(蛋白超过 45% 产量要提高 3%, 而黑生 101 提高了 9.8% 已接近高产育种指标),并能得到 PC 提高但农艺性状又未恶化的个体。看来直接引入外源DNA 起到了染色体小片段易位的效果,故能打破高 PC 与劣农艺性状间的连锁。这一现象从分子生物学角度考虑,我们也可以这样解释:由于导入受体的只是少量的DNA 片段,因而容易打破某些基因片段的连锁^[7],有可能在个别受体的后代中选到具有目标性状而野生性状较少的个体,从而克服了大豆蛋白质含量和产量的负相关性,进而实现了高纬度地区育成高产、高蛋白的大豆品种。

该理论和技术同样适用于其它作物。

3 3 分子验证

外源DNA 直接导入技术以其简便、易行、高效为特点,已被许多作物的育种者所采用,育成的棉花、水稻、大豆等各作物已进入应用^[8],但同时也在不断寻找对这些育成品种或品系的分子验证技术。90 年代初产生的 RAPD 技术,其作用之一就是可以追踪外

源DNA 片段。本研究曾利用 RAPD 技术对导入后代进行外源DNA 追踪方面作了大量工作^[9, 2]。在对黑生 101 的 RAPD 分析中也发现,在外部性状相同的情况下,却在分子水平上找到与受体不同的DNA 片段,而该片段只有供体中存在。说明黑生 101 与受体在分子水平上存在明显差异而不是同一个体。下步对该片段可做深入分析。

3 4 品质改良

随着对大豆营养价值的关注,对大豆蛋白组分的研究也越来越深入。80 年代就已知大豆贮存蛋白是大豆种子蛋白的主要部分,而 11S 球蛋白不但是贮存蛋白的主要成分,并与含硫氨基酸以及豆腐的产出率有密切关系。研究者也发现,在大豆属中球蛋白总量一般在 65% 左右,其中 11S 球蛋白占球蛋白比例为 50% ~ 60%,极少有超过 70% 的。本文作者曾对大豆属

(野生大豆、半野生大豆和栽培大豆)做过分析,只发现一份半野生大豆龙7920620 11S球蛋白达到80%以上^[10],而后曾以其作为父本和栽培大豆杂交,但未能实现这一特性的转移。通过外源DNA直接导入的方法,却获得了球蛋白总量和11S球蛋白所占其比例均超过70%的一个高蛋白、高产的宝贵材料,并在短时期内育成第一个大豆新品种黑生101。该品种育成实际时间只用了5年。说明通过直接引入外源DNA是实现大豆高产、优质、高蛋白育种和迅速实现生物技术产业化的一项可行技术。

参 考 文 献

- 1 雷勃钧,尹光初,卢翠华等.大豆科学,1991,10(1):58~62
- 2 雷勃钧,李希臣,卢翠华等.中国科学(B),1994,24(6):596~641
- 3 钱华,雷勃钧,卢翠华等.哈尔滨师范大学学报,1994,10(6):48~52
- 4 钱华,雷勃钧,卢翠华等.大豆科学,1998,17(2):182~185
- 5 李希臣,雷勃钧,卢翠华等.大豆科学,1999,18(3):231~237
- 6 雷勃钧,卢翠华,钱华等.大豆科学,1995,14(3):203~208
- 7 周光宇,翁坚,龚蓁蓁等.中国农业科学,1988,21(3):1~6
- 8 黄骏麒,钱思颖,刘桂玲等.中国农业科学,1986,19(3):32~36
- 9 李希臣,雷勃钧,卢翠华等.大豆科学,1994,13(2):152~156
- 10 刘红军,林忠平,雷勃钧等.科学通报,1984,29(8):512