

大豆总 DNA 经穗茎注射与花粉管 法导入春小麦的研究

赵亚华, 巫光宏, 佟传利, 何 平, 詹福建

(华南农业大学生物技术学院, 广东 广州 510642)

摘要: 采用穗茎注射、花粉管通道法, 将大豆总 DNA 导入春小麦品种宁春四号和宁春 16 号, 引起受体小麦穗长、穗粒数、粒型和化学品质等性状的广泛变异, 对变异株进行筛选, 获得了比受体蛋白质含量提高 2.0%~5.5% 的变异株系, 平均变异率为 3.5%。SDS-PAGE 结果显示变异株新增加的蛋白质相对分子质量为 78.5、38.0、33.7 的组分。

关键词: 大豆总 DNA; 春小麦; 性状变异; 蛋白质含量

中图分类号: Q789

文献标识码: A

宁夏地区是我国的小麦主栽区之一。宁春四号(N₄)和宁春十六号(N₁₆)春小麦品种多年来一直是生产上的当家品种, 受到大面积推广, 它表现高产、早熟、抗病虫害等优点而深受农民欢迎。1994 年以来, 笔者从小麦品质改良育种的需要出发, 采用穗茎注射、花粉管通道法 2 种方法, 将大豆总 DNA 导入春小麦宁春 4 号等品种, 经农艺性状考种, 蛋白质含量和组分分析, 结果表明: 受体春小麦蛋白质含量及其组分含量和营养品质方面明显提高, 并在杂交后代中获得了一批可稳定遗传的变异株系。为提高春小麦品种宁春 4 号等品种的蛋白质含量, 改良营养品质以及为远缘分子杂交和扩大育种范围, 提供有价值的种质资源开辟新途径。

1 材料与方法

1.1 供试材料

(1) 供体: 大豆宁豆 1 号蛋白质 $w=35\%$ 。采用苯酚-氯仿异戊醇-RNA 酶法提取大豆总 DNA^[1], 经岛津 UV-256 紫外检测, $A_{260}/A_{230}=2.15$, $A_{260}/A_{280}=1.83$, 经琼脂糖凝胶电泳检测片段大小接近 50 kb, 符合分子育种的要求^[1]。花粉管通道法大豆 DNA 导入质量浓度为 300 mg/L, 穗茎注射法大豆 DNA 质量浓度为 600 mg/L^[2,3,5]。

(2) 受体: 采用宁夏平原地区推广的当家品种宁春 4 号、宁春 16 号, w (蛋白质) 分别为 12.1%、12.4%, 于 1995 年春播种于宁夏农学院教学试验场。

1.2 导入方法

(1) 穗茎注射法: 开花前 1~7 d, 将供体宁豆一

号大豆总 DNA 稀释至 600 mg/L, 选主穗拨开倒数第二片叶鞘, 将微量注射器倾斜 30°, 再从一侧插入穗茎节下第 1 节间, 注入 50 μ L DNA 溶液, 挂上标签, 以 1 \times ssc 作为对照, 共处理 50 穗。

(2) 花粉管通道法: 在受体开花前 2~3 d 先按常规育种法整穗去雄套袋, 2 d 后人工授粉, 授粉后 4 h, 用特制的红细胞吸管在每个柱头上滴宁豆一号大豆总 DNA 5~10 μ L(300 mg/L), 套好纸袋, 过 2 h 后再滴一次, 以 1 \times ssc 作为对照, 套袋保湿, 共处理 50 穗。

1.3 化学分析和生化鉴定

(1) 蛋白质含量测定: 采用半微量凯氏定氮法测定所有供试品种的蛋白质含量, 筛选出比受体小麦蛋白质含量高的样品。

(2) 蛋白质组分分析: 采用分步离心提取法, 分离提取供、受体和变异株种子的清蛋白、球蛋白、醇溶蛋白和谷蛋白。用蒸馏水提取清蛋白, 用 0.5 mol/mL NaCl 溶液提取球蛋白, 用 $\varphi=70\%$ 的乙醇提取醇溶蛋白, 用 0.1 mol/L KOH 溶液提取谷蛋白。提取液中各类蛋白质含量采用考马斯亮蓝 G-250 分光光度比色法测定^[4]。

(3) 种子蛋白质亚基的分析: 采用 SDS-PAGE 法分离种子贮存蛋白质的亚基, w (分离胶)=12%, w (浓缩胶)=5%, 电极缓冲液 pH=8.3, 样品在稳压条件下以 30 mA 经过浓缩胶, 再以 60 mA 经过分离胶, 电泳 8~10 h。电泳后卸板, 染色, 脱色, 漂洗, 照相, 计算迁移率和相对分子质量, 照相, 用岛津 CS-930 全自动扫描仪扫描^[3,4]。

1.4 导入后代的筛选

收获的当代种子于第 2 a 按株系法种植, 并按常规育种程序进行田间调查, 单株收获考种. D_2 代按株系种植、筛选, 以后各世代均按株系种植, 调查考种, 观察变异情况. 于各代调查成株率, 结实率, 以后各代调查转化率.

2 结果

2.1 处理当代结实率

1995 年共收获处理当代种子 431 粒, 其中花粉管导入法收获 203 粒, 穗茎注射法收获 248 粒. 根据各处理导入的穗数及小花数基本是一致可认为不同处理间的结实率有较大的差异. 其中穗茎注射法的结实率显著高于花粉管导入法, 这可能是由于穗茎法不直接机械作用于花柱头所致. 总的来说, 各处理的结实率均低于常规人工有性杂交, 表明导入处理对正常授粉结实有较大影响, 但这种影响对于育种应用来说关系不大.

2.2 D_1 代农艺性状的变异

1995 年春季, 将各处理获得的当代种子播于大田, 秋季获得 D_1 代, 分别为 128 和 156 粒. 其田间性状株高、叶型与受体相似, 而穗长、穗粒数、粒型和化学品质等性状发生了变异, 穗平均延长 1.7~2.2 cm, 穗粒数增加 20 粒左右. 其中, 严格筛选出了保持原有 N_4 、 N_{16} 品种优良性状的蛋白质含量增加的单株 98 和 76 个. 1996 和 1997 年分别获得 D_2 、 D_3 代种子, 其田间农艺性状变异与 D_1 代基本上类似, 说明这些性状的遗传是相对稳定的.

2.3 D_3 代蛋白质含量变化

采用半微量凯氏定氮法逐一测定用前两种导入方法后获得的 D_3 代株系 501 个的蛋白质含量. 对其中 301 个株系样品的蛋白质含量进行统计, 高于受体蛋白质 2% 以上的变异株系约为 3.5%. 并测定了变异株系蛋白质各组分的质量分数, 清蛋白、球蛋白的含量均高于受体 (表 1), 变异品系清蛋白 w 比受体高 2%~5%.

表 1 不同品种(变异品系)种子蛋白质和组分的质量分数

Tab. 1 Quality fractions of protein and components of seeds in different varieties (variation strain)

品种(变异品系) varieties (variation strain)	w (全蛋白质 total protein)/%	w (蛋白质 protein)/%			
		清蛋白 albumin	球蛋白 globulin	醇溶蛋白 prolamine	谷蛋白 glutelin
宁豆 1 号 Ningxin soybean 1	35.0	18.3	64.4	3.4	13.9
宁春 4 号 Ningchun 4	12.1	21.8	18.4	21.7	38.1
宁春 16 号 Ningchun 16	12.4	19.3	18.4	16.5	45.6
97DN ₁₆ 29	17.1	23.7	21.0	16.8	38.5
97DN ₁₆ 40	15.1	23.4	19.7	15.7	41.2
97DN ₁₆ 41	16.4	22.9	19.5	15.6	42.0
97DN ₄ 74	14.5	23.0	21.1	21.5	34.4
97DN ₄ 100	15.7	26.7	19.2	20.4	33.6
97DN ₄ 177	15.5	25.3	20.5	21.0	33.2

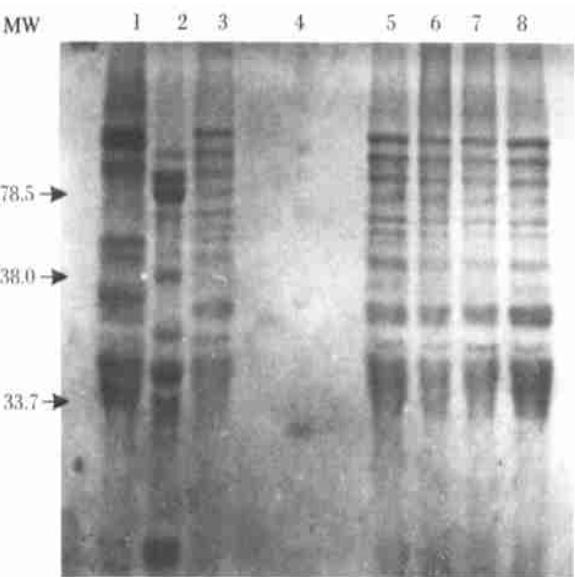
2.4 D_3 代种子贮藏蛋白质亚基分析

经 SDS-PAGE 分析 D_3 代种子贮藏蛋白质亚基组成发现, 穗茎注射法和花粉管法种子贮藏蛋白质新增加了相对分子质量为 78.5、38.0、33.7 的供体大豆具有的亚基条带 (图 1), 另外, 还有一些亚基的蛋白含量有所增加, 以穗茎注射法表现得较为明显.

3 讨论

3.1 外源 DNA 导入植物的可能性已在前人的许多研究中得到了证实^[1], 本研究所采用的杂交供、受体

是纲与纲之间的远源杂交, 2 个亲本的基因组差异很大. 大豆总 DNA 导入春小麦这种亲缘关系甚远的 2 个亲本基因组通过人为强化导入, 迫使受体细胞将供体某些片段在减数分裂到受精完成这一时期经渐渗吸收作用, 而被整合进入其基因组中, 并参与或影响遗传信息的遗传和表达, 这在一定程度上克服了基因组之间的不亲和性. 因此, 导入后引起了受体小麦穗长、穗粒数、粒型和蛋白质含量等性状的变异. 由于所导入的 DNA 片段大小不同, 所含的遗传信息与调控序列不同及其与受体基因组结合的随机性,



图中从左至右依次为: 1. 受体小麦 2. 供体大豆 3. 花粉管导入法 4. 标准蛋白 5. 6. 7. 8. 穗茎注射法
from left to right in file; 1. receptor wheat 2. donor soybean 3. D₃ obtained by introduction via pollen-tube pathway 4. standard protein 5. 6. 7. 8. D₃ obtained by earstem injection

图 1 两种导入法获得 D₃ 代种子 贮藏蛋白的 SDS-PAGE 电泳照片

Fig. 1 SDS-PAGE photograph of stored protein in D₃ seeds obtained by two different introductions

因此, 其后代性状发生了广泛的变异, 田间农艺性状的总变异是在受体的基础之上发生的, 这可能是由于决定这些性状的每一个基因的 DNA 片段与其受体基因相整合, 或这些基因的调控序列间接调控了受体基因组^[5,6]。

3.2 导入后代总蛋白质含量高于受体 2% 以上, 平均变异率为 3.5%, 可见, 选择蛋白质含量高的大豆作为供体是合适的。因为大豆种子的储藏蛋白质含量高, 说明其结构基因数量及拷贝数都高, 或其调控

序列中起动这些基因表达的机制较强所致, 将这些基因随机整合进入受体春小麦基因组中, 或多或少对后者的基因表达有影响, 若其中某个结构基因表达, 则在后代中出现新的蛋白质或其亚基, 若其某个结构基因与春小麦的基因同源性较强, 则可表现出一定的结构与功能的亲和性^[1], 其调控序列发挥作用使小麦的原有基因较高效表达, 则在后代中表现出原有某个蛋白质或亚基的含量增加。

分子育种过程避免了常规育种的两亲本基因组之间的全面重组, 因此, 后代分离小, 稳定快。另一方面, 由于带有目的性状在内的某些 DNA 片段与其受体基因组只是部分的重组, 因此, 其受精卵的遗传性基本上仍然由受体亲本决定。所以, 这种在维持受体品种其他特性基本不变的基础上, 特异性地获得某些所需性状的转化技术, 对于受体品种的进一步改进或增加少数优良性状是有效的。

参考文献:

[1] 周光宇. 农业分子育种研究进展[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 1993. 77—93.
[2] 徐德昌, 赵亚华. 植物总 DNA 和核 DNA 的提取及其纯度的研究[J]. 宁夏农学院学报, 1997, 18 (3): 57—61.
[3] 陈来同, 徐德昌. 生化工工艺学[M]. 北京: 北京大学出版社, 1997. 162—177.
[4] 张龙翔, 王镜岩. 生物化学原理与技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 1997. 85—106.
[5] 刘根齐, 张孔治, 孔繁瑞, 等. 外源 DNA 直接导入小麦及其在育种上的应用[J]. 遗传学报, 1994, 21(6): 463—467.
[6] BENDICK A J, BOLTON E J. Relatedness among plants as measured by the DNA-Agar technique[J]. Plant Physiol, 1976, 42: 959—965.

Study on Introducing Soybean Total DNA into Spring Wheat and Improving Wheat Protein Content by Earstem Injecting and the Pollen Tube Pathway

ZHAO Ya-hua, WU Guang-hong, TONG Chuan-li, HE Ping, ZHAN Fu-jian
(College of Biotechnique, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: Soybean total DNA was introduced into spring wheat varieties Ningchun No. 4 and No. 16 by pollen tube pathway and earstem injection technique; wheat characters of spike length, grain numbers per spike, seed shape and chemical quality were extensively varied. Through selecting, the strains were obtained which protein contents improved by 2.0%—5.5% compared with the receptors', and the mean variation ratio was 3.5%. The SDS-PAGE result showed that the new added protein of variant having a molecular weight of 78.5, 38.0, 33.7.

Key words: soybean total DNA; spring wheat; variation character; protein content

【责任编辑 柴 焰】