

# 外源 DNA 导入木豆及其在育种上的应用\*

易 鹏 侯开卫 周家齐 马显达 张建云 王 芳

关键词 木豆、外源 DNA 导入、育种

木豆(*Cajanus cajan* (L.) Millsp.) 系南亚热带分布较广的具有较高经济价值的木本植物。国外对这一树种有专门的研究所进行综合性研究。国内这一树种属半野生状态, 品种杂乱, 多年来主要用于放养紫胶虫。近年来随着饲料工业的兴起, 木豆作为木本蛋白饲料来源已进行了一些开发研究。

近年来外源 DNA 的导入技术已在农作物育种上得到了广泛的应用。大量的研究表明, 利用花粉管通道可使外源 DNA 进入受体并参与其基因组的整合在其后代中得以表达。远缘鹰咀豆导入大豆获得不育材料<sup>[1]</sup>, 热带高粱(*Sorghum vulgare* Pers.) DNA 导入寒带高粱获得变异材料<sup>[2]</sup>, 导入黄瓜(*Cucumis sativus* Linn.) 获得新品种<sup>[3]</sup>, 导入水稻(*Oryza sativa* L.)<sup>[4]</sup>、大麦(*Hordeum vulgare* Linn.)<sup>[5]</sup>、小麦(*Triticum aestivum* Linn.)<sup>[6]</sup>、烟草(*Nicotiana* sp.)<sup>[7]</sup>、玉米(*Zea mays* L.) 等均获得了变异材料。这一技术还进行了 RAPD 分子验证<sup>[8-9]</sup>。结果表明, 在后代基因组中找到了供体具有而受体没有的特异 DNA 片段。直接从分子水平证明了外源 DNA 片段可以通过花粉管通道导入受体并与其基因组 DNA 整合, 在后代中得到表达和遗传。然而这一技术在林业育种中很少得到应用。本项研究通过直接导入外源 DNA, 将带有目的性状的供体 DNA 通过花粉管进入木豆胚囊, 实现了远缘基因的转移, 使大豆贮藏蛋白在木豆遗传背景中得以表达和遗传, 使木豆蛋白含量低的性能得以改良。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

大豆: 晋宁大白黄豆, 其蛋白含量为 43%, 由云南省农科院杂粮室提供。

木豆: 采用云南野生种, 黄花木豆和红紫花木豆, 其种子蛋白含量为 19%。

大豆 DNA 提取液。

### 1.2 方法

1.2.1 外源 DNA 的提取 大豆洗净, 加适量无菌水在 25℃ 下, 放置于黑暗中萌发 5~10 d。取黄化幼苗提取 DNA, 黄化幼苗经冰浴上冷磨, 溶剂提取, 高速离心分离, 柱层析分离等分离纯化技术提纯所得产品经紫外检测和 DNA 分子量测定达到导入要求的即可作为供体外源 DNA 使用。其标准是 DNA 分子量大于 30 kd、 $A_{260}/A_{230} > 2$ ,  $A_{260}/A_{280} > 1.8$ 。在此条件下 RNA

1995—12—08 收稿。

易鹏助理研究员, 侯开卫, 马显达, 张建云(中国林业科学研究院资源昆虫研究所 昆明 650216); 周家齐, 王芳(云南省农业科学院)。

\* 本项目属云南省科委自然科学基金课题(1992~1996年)。

已脱净, 蛋白含量低于 0.3%。

1.2.2 导入方法 在木豆受粉 12~24 h 后采用微量注射法通过柱头将外源 DNA 注入, 用量为 15  $\mu\text{L}$ /朵, 分两次滴注。导入后枝条上再出现的花一律剪除套袋以保证所结豆荚为导入外源 DNA 所得果实。导入当代  $D_0$  用于导入后代群体的建立, 及下一步导入受体的营建。

1.2.3 后代观察与选择 导入后所得材料从  $D_0$  起作好观察记录,  $D_0$  代以单花(即果荚)为单位, 每荚留一粒种子供遗传分析用, 其余全部都用来繁殖后代组建  $D_1$  代群体。

实验的目标是外源蛋白基因在受体上的表达, 故实验采用生化遗传学的方法, 直接在导入当代即  $D_0$  代, 通过与供体、受体间蛋白质多态性检测分析, 来判断是否发生了外源大豆 DNA 片段的整合。方法采用 SDS-PAGE 法, IEF 电泳图谱分析法。

供体、受体以及变异材料蛋白含量的测定, 采用凯氏定氮法按 GB2905-82 进行。

后代的选择, 经检测无整合, 变异的材料不再进行后代繁殖。

## 2 实验结果

### 2.1 处理当代的遗传分析

实验共处理 860 朵木豆花, 收获 602 个豆荚( $D_0$  代), 对所有材料进行了种子蛋白质可溶性组分的分析测定, 结果表明: 所有导入当代的种子蛋白质可溶性组分的相似性极高, 与其受体亲本的相似性也极高, 这是否意味着导入当代的种子贮藏蛋白主要受母体基因的控制, 外源基因难以表达。

### 2.2 第一代遗传分析

$D_0$  代种子大量用于  $D_1$  代的繁殖, 经观察  $D_1$  代植株其株型、株高等均无明显变化, 然而在  $D_1$  代中出现了一个豆荚中的种子, 种皮颜色各不相同的性状, 最多的同一个豆荚中出现了 3 种不同颜色种皮的种子。同一植株出现了两种或 3 种花色性状的变异, 这些现象在受体植株上是不曾出现的。变异率见表 1。

表 1 第一代的变异率

| 批号         | $D_1$ 代单株数 | 变异类型   | 变异株数 | 变异率(%) |
|------------|------------|--------|------|--------|
| FlJa- b- c | 810        | 花色、种皮色 | 15   | 1.8    |
| FlYa- b- c | 620        | 花色、种皮色 | 12   | 1.9    |
| YJa- b- c  | 900        | 花色、种皮色 | 17   | 1.9    |
| 总计         | 2 330      |        | 44   | 1.9    |

在 186 个第 1 代单株中, 经检测所有单株的蛋白质主成分相同, 与受体的主成分也相同, 而在次组成微量成分上有 8 个  $D_1$  代单株表现出变异, 这 8 个单株分属于 3 个  $D_0$  代亲本, 其中有 2 个出现了 1~2 条大豆供体的特有谱带, 其余 6 个材料出现了其它  $D_1$  没有, 其受体和供体亲本也没有的 1 条或 2 条蛋白质谱带。这说明供体中的蛋白质基因型开始在受体植株的遗传背景上表达。从带型的表现, 初步分析这种表达有单显性及杂合性两种方式。

### 2.3 第二代遗传分析

根据第 1 代的蛋白质分析结果, 选择了 8 个有变异的材料及同源受体后代共计 24 个材料进行了第 2 代群体的组建。

经第 2 代材料的分析筛选,再度选出了具有明显突变性状的单株后代 13 个家系进行繁殖。经蛋白质电泳分析从中发现了 5 个单株不同程度地出现了大豆蛋白质谱带的渗入。这一结果表明,某些大豆蛋白质的控制基因开始在木豆遗传背景中表达。

#### 2.4 第 3 代材料的遗传分析

根据第 2 代筛选组建了第 3 代群体共收获 42 个材料。这些单株归属于 5 个第 2 代亲本。对第 3 代进行蛋白质组分和含量分析结果见表 2。

表 2 第 3 代种子蛋白含量

(单位: %)

| 样号    | 供体大豆 | 受体木豆  | D <sub>3</sub> Y <sub>1</sub> -5 | D <sub>3</sub> Y <sub>1</sub> -9 | D <sub>3</sub> Y <sub>1</sub> -4 | D <sub>3</sub> Y <sub>2</sub> -3 | D <sub>3</sub> Y <sub>3</sub> -2 | D <sub>3</sub> Y <sub>4</sub> -1 | D <sub>3</sub> Y <sub>5</sub> -1 |
|-------|------|-------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| 蛋白含量  | 43   | 18.58 | 22.26                            | 21.65                            | 23.12                            | 20.57                            | 16.52                            | 18.44                            | 30.88                            |
| 增量    |      |       | 3.68                             | 3.07                             | 4.54                             | 1.99                             | -2.06                            | -0.14                            | 12.3                             |
| 增量百分率 |      |       | 19.8                             | 16.5                             | 24.43                            | 10.7                             | -11                              | -0.7                             | 66                               |

从表中数据可见,由大豆贮藏蛋白在木豆背景中表达其结果导致了木豆种子贮藏蛋白含量发生了变化,多数情况下木豆种子蛋白含量明显增加,最高的增加了 66%(与受体木豆含量相比),而个别也有种子蛋白含量下降的。

### 3 讨论

#### 3.1 探讨外源 DNA 直接导入木本植物的可能性

外源 DNA 直接导入农作物已取得了许多可喜的成果。然而外源 DNA 在林业育种方面由于植物单株体积大,筛选困难,突变性状难以断定等原因,这一技术受到了限制。本项研究的成功为林木育种提供了一条有效的途径,证明了外源 DNA 在木本植株上可进行复制并在其遗传背景中表达。

#### 3.2 外源供体 DNA 导入的效果

从实验情况来看外源 DNA 导入木豆可使其预期的效果得于实现。然而由于所导入的外源 DNA 片段大小不同,含有的遗传信息不同,加之导入 DNA 与受体基因组结合的随机性,致使其后代性状的转化可能存在各种情况。也许是单一性状的改变也许是几个性状同时转化,一般来说单一性状的转化机率较几个性状同时改变的机率为低。尽管转化存在着随机性,不定向性,但通过筛选总是可以得到特异性状的植物受体。与其它基因转移的方法比较外源 DNA 导入是一种简单而又实用的有效方法。

#### 3.3 远缘基因的转化

大豆和木豆虽同属蝶形花科(Papilionaceae),但为不同属,亲缘关系较远,采用常规育种手段实现两物种间的基因转移可能性很小且时间漫长。采用 DNA 分子导入打破了两物种间的生殖隔离障碍,实现了两物种间的基因转移。

#### 3.4 后代变异平缓

外源 DNA 导入当代变异很小,其后代的遗传性状变异易于稳定。目标性状的特异性转化现象更为明显,这可能是由于外源 DNA 与其受体基因组的遗传差异小,在复制转录过程中容易稳定。

## 参 考 文 献

- 1 赵丽梅. 外源 DNA 导入大豆获得不育材料. 大豆科学, 1995, 14(1): 83 ~ 87.
- 2 王黎明, 阴秀卿. 热带高粱外源 DNA 导入寒带高粱引起变异的研究. 生物技术, 1994, 4(6): 37 ~ 39.
- 3 郭亚华. 外源基因导入黄瓜获得突变新品系. 遗传, 1995, 17(2): 33.
- 4 张学文. 外源 DNA 完全酶解成分在水稻浸胚法导入中的诱变作用. 湖南农业学院学报, 1994, 20(6): 535 ~ 537.
- 5 吕敬先. 玉米 DNA 导入大麦的研究初报. 湖南农学院学报, 1994, 20(6): 546 ~ 549.
- 6 刘根齐, 张孔 钰. 外源 DNA 直接导入小麦及其在育种上的应用. 遗传学报, 1994, 21(6): 463 ~ 467.
- 7 吴中心, 张同庆. 外源 DNA 导入转移烟草抗赤星病性状的研究. 河南农业大学学报, 1995, 29(1): 71 ~ 75.
- 8 雷勃钧, 李希臣. 外源野生大豆 DNA 导入栽培大豆及 RAPD 分子验证. 中国科学(B 辑), 1994, 24(6): 596 ~ 601.
- 9 李希臣, 雷勃钧. 早熟大豆外源 DNA 导入的 RAPD 分子验证. 大豆科学, 1994, 13(2): 152 ~ 156.

## Technological Study on Introduction of Exogenous DNA into Pigeon Pea and Its Application in Breeding

*Yi Pong    Hou Kaiwei    Zhou Jiaqi    Ma Xianda  
Zhang Jianyun    Wang Fang*

**Abstract** An experiment has been made on the introduction of general DNA extracted from soy bean into 860 flowers of pigeon pea and 620 different individuals have thus been obtained. Single selection and succession breeding have been carried out and 13 family systems of progeny of the single plants developed with remarkable mutant characteristics. And according to the protein analysis of their seeds with SDS-PAGE, IEF, it has been found that five individual plants have shown the presence of a band spectrum of soy bean protein. The seeds of these different plants have been applied to establish D<sub>2</sub> and D<sub>3</sub> generation groups and their germination and survival rate have got up to 95% respectively. Finally, a varied material of pigeon pea with high protein contents has been obtained in the light of analysing the components and contents of the seeds of the plant of the D<sub>3</sub> generation. Its protein content is 30.88%, which is much more than that of the receptor, pigeon, by 66%. And the protein contents of the other four have reached above 20%. Through breeding for third generation of D<sub>3</sub>, it has shown that the features of these varied plants are relatively stable.

**Key words** pigeon pea, exogenous DNA introduction, breeding