

将西洋参 DNA 导入大豆实现遗传转化的研究

I . 导入后代形态性状变异的分析

湖南农业大学植物科技学院(长沙 410128) 麻浩* 江巨鳌 田森林 邹冬生
湖南中医学院中药鉴定室 刘塔斯

摘要 用西洋参作 DNA 的供体,用栽培大豆品种作为受体,利用分子育种导入技术之一的“浸种法”进行外源 DNA 导入,试图在继续保持大豆营养价值和具有的医疗保健作用的前提下,提高其已有的药用成分的含量和导入新的药用成分,培育出具更高药用价值或保健作用的栽培大豆新材料和新品系。目前导入后代在形态、品质和药物成分含量等性状方面产生了广泛的变异。本文报道了导入后代形态上的变异。
关键词 西洋参 大豆 脱氧核糖核酸 浸种法 性状变异

Genetic Transformation of Soybeans by Soaking Its Seeds with the Total DNA of America Ginseng (*Panax quinquefolium*) I . Analysis on the Variation of Soybean Morphologic Characters Induced by Foreign DNA Uptake

College of Plant Science and Technology, Hunan Agriculture University (Changsha 410128) Ma Hao, Jiang Ju ao, Tian Senlin and Zou Dongsheng

Department of Identification of Chinese Materia Medica, Hunan College of TCM Liu Tasi

Abstract Soybean, besides its high nutritional value, has been long known to contain saponins and isoflavones with medicinal activities. For the purpose to increase the existing nutrients and to impart certain new constituents with pharmacologic actions, experiments for its genetic transformation by the “seed soaking method” were carried out since 1994. American ginseng, *Panax quinquefolium* L., was used as the DNA donor and soybean “Xiangchudou 10” as the DNA acceptor. Results showed that the transformed rate by the “seed-soaking method” was 22.6%. The transformed off spring showed morphologic and seed quality variations in mature stage, plant height, number of pods per plant, weight per 100-seeds, leaflet and seed shape, color of seed, pod, and villi, and grain protein content, etc.. The results indicated that “seed-soaking method” can transfer foreign DNA into the recipient and induce variations. The results also indicated that the method is very effective, simple, and economical, and may be used to create new germplasms and realize gene exchangement of different species, genera, and families.

Key words *Panax quinquefolium* L. soybean deoxyribonucleic acid seed-soaking method variation of the character

大豆是世界粮油兼用作物,同时大豆还富含大豆皂苷和异黄酮类药物成分,是大豆及其制品具有医疗保健作用的重要因素^[1]。自从 70 年代周光宇教授提出 DNA 片段杂交假设以来,应用“花粉管通道法”等方法将外源 DNA 导入农作物从而拓宽其遗传基础的分子育种技术已成为一种新的有效的育种方法^[2]。作为分子育种导入技术之一的“浸种法”已在水稻、大麦、大豆、蚕豆等作物中得到了实际应用,并实现了遗传转化^[3-7]。特别是成功地将玉米 DNA 导入到水稻中培育出集多穗、大穗、高结实率为一体的水稻新品系,并经分子检测证实玉米 DNA

特异片段进入了水稻^[8],这项研究成果被国内专家鉴定显国际领先水平。笔者从 1994 年开始应用“浸种法”试图将西洋参的 DNA 导入到栽培大豆中,其目的是在继续保持大豆营养价值和具有的医疗保健作用的前提下,提高其已有的药用成分的含量和导入新的药用成分,培育出具更高药用价值或保健作用的栽培大豆新材料和新品系。现导入后代在形态、品质和药物成分含量等方面已产生广泛的变异。我们首先将导入后代形态变异结果报道如下:

1 材料和方法

1.1 供试材料: DNA 受体为湖南省大面积推广品

* Address: Ma Hao, College of Plant Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha

种湘春豆 10号; DN A 供体材料为湖南省栽培的西洋参 *Panax quinquefolium* L.

1.2 导入方法: 1) DN A提取方法: 按陈永强介绍的方法提取西洋参幼叶的 DN A^[9],再用紫外分光光度计检测 $A_{260} / A_{280} = 2.23$, $A_{260} / A_{230} = 2.65$,表明 DN A中蛋白质污染少,纯度符合要求. 2)导入方法: 采用“浸种法”用西洋参 DN A溶液浸泡大豆种子,浸泡时间为 6 h,然后用清水洗净,室内发芽,长成幼苗后移入大田.

1.3 导入后代种植和考种方法: 1994年春播处理当代 (D₀代),成熟时按单株收获,当年长沙秋繁加代种植 D₁代; 1995年春播 D₂代,选单株后,按处理 D₀代的单株后代分别混收: 1996~ 1998年每年春播种植成株行圃 (D₃~ D₅),并继续选株稳定. 每个株系按统一密度种植,大田栽培管理按普通栽培管理方式进行. 每个稳定株系考种 20株,株高是测量子叶节至主茎顶端的长度.

2 结果分析

1994年处理当代 D₀代,有 53粒种子长成植株并结实,单株收获, D₁代种成 53个株系, D₂代出现分离现象, D₃, D₄代出现疯狂分离, D₅代仍有部分株系表现出分离. 追根朔源, D₀代有 12个单株的后代出现明显的形态变异,故外源 DN A导入引起的形态变异频率为 22.6%.

2.1 导入后代变异株系: 表 1中列出部分导入后代经多代选择已经稳定的变异株系. 表中叶形项列出两种叶形的表示植株上部叶为长叶或椭圆叶,下部叶为卵圆形叶. 从表中可以看出,与导入受体湘春豆 10号相比,导入后代许多株系在生育期、株高、百粒重、叶形、粒形、种脐颜色、荚色和茸毛色等方面都产生了明显的变异.

2.2 导入后代株系主要农艺性状的变异特点: 分析了导入后代约 55个已稳定的变异株系的主要农艺性状,其变异特点如下:

表 1 变异株系与受体亲本主要形态性状的比较

株系	生育期 (d)	株高 (cm)	单株荚数	百粒重 (g)	叶形	粒形	种脐颜色	荚色	茸毛色
湘春豆 10号	100	36.4	26.3	21.5	椭圆	椭圆	黑色	黄色	灰
Y10-7-1	95	30.9	23.0	19.8	椭圆、卵圆	椭圆	黑色	黑褐	灰
Y10-10-3	103	39.0	21.4	21.5	椭圆	椭圆	黑色	黄色	灰
Y10-11-5	92	28.9	18.6	19.3	长叶、卵圆	椭圆	黑色	黑褐	灰
Y10-11-6	92	33.3	24.3	20.0	椭圆、卵圆	椭圆	黑色	黑褐	灰
Y10-11-7	88	31.2	20.5	18.1	椭圆、卵圆	椭圆	黑色	黑褐	灰
Y10-11-8	99	40.4	30.0	20.8	长叶	椭圆	黑色	黄色	灰
Y10-12-1	97	33.5	25.5	20.6	椭圆、卵圆	圆	淡褐	黑褐	灰
Y10-12-2	98	30.6	21.8	18.8	椭圆、卵圆	圆	淡褐	黑褐	灰
Y10-12-3	90	26.5	16.6	18.5	椭圆	椭圆	黑色	黑褐	灰
Y10-12-4	103	36.5	24.0	17.5	椭圆	圆	黑色	黄色	棕
Y10-13-1	90	33.1	18.6	17.0	长叶	椭圆	黑色	黑褐	灰
Y10-14-4	90	26.1	23.0	16.4	椭圆、卵圆	椭圆	黑色	黑褐	灰
Y10-15-3	99	32.7	20.7	20.7	椭圆	椭圆	黑色	黄色	灰
Y10-25-1	99	38.9	22.6	20.0	长叶	圆	淡褐	黑褐	灰
Y10-30-1	98	32.0	21.0	19.0	椭圆、卵圆	圆	淡褐	黑褐	灰
Y10-30-2	98	30.3	31.8	19.5	椭圆、卵圆	圆	淡褐	黑褐	灰
Y10-30-3	99	30.7	28.6	20.3	椭圆	椭圆	黑色	黄色	灰
Y10-42-1	100	38.2	27.1	21.6	椭圆	椭圆	黑色	黄色	灰
Y10-43-2	99	32.1	29.1	21.4	椭圆	椭圆	黑色	黄色	灰

2.2.1 变异株系的株高、节数、单株结荚数、单株产量和百粒重等皆呈递减趋势,见表 2 表中数据是原始数据先按马育华^[10]所述统计分组方法分组,再按 3种类型统计百分率所得. 受体亲本湘春豆 10号的株高、节数、单株结荚数、单株产量、百粒重等分别为 36.4 cm、11.9个、26.3个、11.5 g和 21.5 g.

2.2.2 导入后代变异株系的生育期呈变短趋势,大部分株系比受体亲本要早熟 2~ 10 d,比受体亲本迟熟的株系较少. 分离出现的最早熟株系为 Y10-11-

7,比亲本早熟 12 d. 最迟熟的株系仅比受体亲本迟熟 3 d (Y10-10-3).

2.2.3 导入后代出现蛋白质含量较高的变异株系. 对部分变异株系的总蛋白质含量进行了分析,结果发现出现蛋白质含量较高的株系. 如: Y10-10-3其蛋白质含量为 44.61%,比亲本湘春豆 10号高出 3.738%.

2.2.4 部分株系在高世代 (D₅代)仍表现出分离. 如原表现为有限结荚习性的 Y10-10-4株系分离出

许多亚有限和无限结荚习性的单株;另一个株系 Y10-10-5有熟期分离

表 2 导入后代变异株系主要农艺性状的变异分布

形 状	低于	与受体	高于
	受体亲本的	亲本基本一致的	受体亲本的
株高	25.0~ 34.51 cm 59.3%	34.52~ 37.68 cm 22.2%	37.69~ 44.02 cm 18.5%
节数	9.0~ 11.50个 51.9%	11.5~ 12.50个 40.7%	12.5~ 14.00个 7.4%
单株结荚数	16.0~ 24.37个 58.2%	24.38~ 27.48个 16.4%	27.49~ 36.81个 25.4%
单株产量	6.0~ 10.44 g 66.0%	10.45~ 12.14 g 18.0%	12.15~ 17.25 g 16.0%
百粒重	16.0~ 21.03 g 74.0%	21.04~ 22.06 g 24.0%	22.07~ 23.10 g 2.0%

2.3 棕色茸毛的遗传分析:为了研究导入引起的变异性的遗传,笔者用已表现稳定的具棕色茸毛的株系 Y10-12-4与具灰色茸毛的亲本湘春豆 10号(组合 1)和另一个湖南大面积推广品种湘春豆 15号(组合 2)进行回交以研究棕色茸毛的遗传。结果如表 3,说明导入后代中出现的棕色茸毛性状属于显性单基因遗传,其遗传符合孟德尔遗传规律

表 3 两个组合 F₂植株和 F₃家系茸毛色分离比例和 X²测验

项 目	总计	棕色茸毛类型		X ² (3: 1)	概率值
		棕色茸毛类型	灰色茸毛类型		
组合 1	F1	5	0		
	F2	120	97	1.8778	0.25~ 0.10
	F3	55	40	0.0546	0.90~ 0.75
组合 2	F1	4	0		
	F2	83	61	0.0362	0.90~ 0.75
	F3	44	34	0.0303	0.90~ 0.75

3 讨论

3.1 笔者采用“浸种法”将西洋参的 DNA 导入到栽培大豆中,其后代在株高、生育期、叶形、粒形、种脐颜色、单株荚数、节数、百粒重和蛋白质含量等形态、品质性状方面产生了广泛的变异。表明利用“浸种法”进行大豆种质的创新和拓宽大豆的遗传基础,

培育新种质和新材料是可行的。我们将进一步采用分子检测方法验证西洋参的 DNA 片段已导入到受体大豆中

3.2 刘春林等曾利用扫描电镜和透射电镜观察用外源 DNA 浸泡的水稻种子,证实浸泡过程中水稻种子发生了种皮破裂,形成细胞表现孔洞和胞间通道等一系列显微与亚显微结构的变化,这有利于种子细胞与周围环境进行物质交流。他们进一步以 pBI121作外源 DNA 供体,水稻品种作为受体,浸泡处理的种子经培养获得抗性苗后,再做 Southern blot 分子杂交实验,结果证明外源 DNA 能通过浸泡的方式进入到水稻受体分生组织细胞内,进而整合到受体基因组中并得到表达^[11,12]。这初步地为“浸种法”提供了可行性的依据。

3.3 本试验中采用的“浸种法”具有简便、经济、易于操作的特点,可以处理大量样本且不受环境条件影响。导入所引起的变异,大部分能迅速稳定遗传形成基本一致的群体,这有利于加速育种进程,缩短育种周期。导入引起的棕色茸毛变异其遗传符合孟德尔遗传规律

参 考 文 献

- 1 江苏新医学院编写. 中药大辞典. 上海:上海人民出版社, 1977: 2382, 2045
- 2 周光宇,等. 遗传学报, 1979, 6(4): 405
- 3 万文举,等. 湖南农业科学, 1992, (3): 6
- 4 麻浩,等. 湖南农业大学学报, 1996, 22(1): 13
- 5 朱秀英,等. 福建农学院学报, 1988, 17(1): 15
- 6 季慧强,等. 福建农学院学报, 1988, 17(4): 285
- 7 吕敬先. 湖南农业大学学报, 1994, 20(6): 546
- 8 陈信波,等. 湖南省科学技术协会第二届青年学术年会论文集(农科分册). 长沙:湖南科学技术出版社, 1995: 129
- 9 陈永强. 遗传, 1979, (1): 39
- 10 马育华. 试验统计. 北京:农业出版社, 1985: 32
- 11 阮颖,等. 湖南农业大学学报, 1997, 23(2): 113
- 12 刘春林,等. 湖南省科学技术协会第二届青年学术年会论文集(农科分册). 长沙:湖南科学技术出版社, 1995: 182

(1999-02-09 收稿)

植物活性成分数据库简介

植物活性成分数据库系天津药物研究院信息室开发的一个动态性信息资源库。作为国家 1035 工程的一个组成部分,得到了国家科技部生命中心的支持。本库现收录 1982 年以来 300 余种中外书刊上的植物活性成分 3 000 余个,约 350 万个字符(不包括化学结构)。每个成分由 14 项数据(中文名、英文名、别名、化学物质名、CAS 登录号、结构图形、分子式、分子量、化学分类、植物来源、物理性状、生物活性、专利状况及参考文献)组成。用户可以在计算机上通过多途径检索所需信息。

本数据库的建立将为新药研究和管理人员选题、立项、准确评价成果和中药现代化研究提供快速、简便、有效的检索途径,也为植物化学及相关学科中从事研究、开发、教学、管理、生产的人员提供综合、系统、有价值的信息。欢迎查询。

联系地址:天津市鞍山西道 308 号 天津药物研究院信息室 植物活性成分数据库 邮编:300193

电话:(022)27429434 传真:(Fax) (022)27381305 E-mail tip@tjlink.tisti.ac.cn 联系人:周北君