

不同施肥方式对导入大豆 DNA 后 稻米蛋白质含量的影响*

李建粤¹, 王丽娟¹, 吕英海¹, 陆家安², 侯根宝², 张建明²

(1 上海师范大学 生命与环境科学学院, 上海 200234; 2 上海市农业科学院 作物育种栽培研究所, 上海 201106)

[摘要] 利用花粉管通道法, 再次将大豆 DNA 导入在生产上具有应用前景的高产粳稻 97 冬繁 10; 测定了在常规施肥基础上, 后期追施尿素氮肥, 整个生育时期只施有机肥和常规施肥 3 种施肥方式下种植的 97 冬繁 10, 导入大豆 DNA 后的 97 冬繁 10、97 冬繁 13 和优丰 4 种水稻的糙米蛋白质含量。结果显示, 在高氮、有机和常规 3 种施肥方式下, 已导入大豆 DNA 的 97 冬繁 10 水稻糙米蛋白质平均含量依次为 128.0, 123.7 和 102.1 mg/g, 分别比相同条件下对照提高 47.3, 48.0 和 33.3 mg/g; 虽然高氮和有机栽培的稻米蛋白质平均含量都比常规栽培稻米高, 但 4 种水稻糙米蛋白质平均含量增加程度及变异范围不同。经大豆 DNA 处理的水稻在高氮和有机栽培条件下, 糙米蛋白质平均含量增加最明显, 而且变异范围明显加宽。本研究结果进一步说明, 利用花粉管通道法导入大豆 DNA 能够提高水稻糙米蛋白质含量, 并且后期追施氮肥和早期施用有机肥栽培, 更有利于其糙米蛋白质含量的表达。

[关键词] 水稻; 外源 DNA 导入; 糙米蛋白质含量; 施肥方式

[中图分类号] Q 943.2; S511.2⁺ 2.062 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9387(2003)01-0049-04

水稻营养品质主要是指稻米的蛋白质含量, 据报道^[1-3], 稻米蛋白质含量较低, 一般仅为 8% 左右, 但与小麦、大麦、玉米等主要谷类作物相比, 稻米蛋白质中的氨基酸组成比较平衡, 蛋白价较高, 易于被人体消化吸收, 属于优质蛋白质^[4-6]。

在 20 世纪 70~80 年代, 水稻高蛋白育种多采用物理或化学因素诱变。20 世纪 90 年代李建粤等^[7,8]利用花粉管通道法和浸种及苗期浇灌法, 将大豆 DNA 导入日本越光粳稻, 结果发现能较大幅度地提高稻米蛋白质含量。由于越光粳稻产量较低, 不利于在生产上推广应用。为此, 笔者在近期又利用花粉管通道法, 将大豆 DNA 导入在生产上有应用前景的高产粳稻 97 冬繁 10 中。

有学者认为^[5,9]稻米蛋白质含量受施肥环境影响较大。为了解不同施肥方式对导入大豆 DNA 的水稻种子以及一般的普通水稻种子蛋白质表达的影响, 笔者设计了 3 种不同的施肥方式, 现将试验结果

报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

97 冬繁 13 和优丰普通水稻及采用花粉管通道法导入大豆 DNA 的 97 冬繁 10, 以 97 冬繁 10 为对照。

采用花粉管通道法导入大豆 DNA 的水稻及对照水稻的培育过程参照文献^[7]进行。

1.2 方法

1.2.1 施肥方式 在常规基础上, 设后期追施尿素氮肥(简称高氮施肥)、整个生育期只施有机肥(简称有机施肥)和常规施肥 3 种处理。具体见表 1。

1.2.2 试验材料种植概况 试验在上海市农科院试验田中进行, 土壤肥力中等偏上。采用对比试验法, 每一试验材料的种植小区面积均为 33.35 m²。同一种施肥处理的 4 个材料种植面积为 1 个大区,

* [收稿日期] 2002-01-21
[基金项目] 上海市科学技术发展基金项目(983113008)
[作者简介] 李建粤(1958-), 女, 广东省番禺人, 副教授, 主要从事植物遗传的研究。

周围做田埂防止不同大区之间的水流动。株行距为 13.2 cm × 19.8 cm, 每穴苗数 2~3 株。

1.2.3 稻米处理 每品种每处理随机选取 25 个穗子。在每穗的顶端各取 10 粒糙米, 用研钵碾磨成粉末, 于 60 °C 干燥 4 h 后, 置干燥器中待用。

1.2.4 蛋白质含量的测定 采用微量凯氏定氮法测定糙米蛋白质含量^[10]。

1.2.5 数据分析 糙米蛋白含量采用显著性测验进行统计分析^[11]。

表 1 3 种不同的施肥方式

Table 1 The differences in three kinds of applying fertilizer application

施肥方式 Fertilizer application	时间 Date	作用 Purpose	种类 Variety	施用量/ (kg · hm ⁻²) Quantity
高氮施肥 High nitrogenous fertilizer application	06-19	基肥 Basal application of fertilizer	碳铵 Ammonium hydrogencarbonate	600
	06-27	返青 Turning green again	碳铵 Ammonium hydrogencarbonate	450
	07-10	分蘖 Tillering	碳铵 Ammonium hydrogencarbonate	300
	08-04	促花 Accelerating blooming	尿素 Carbamide	75
	08-18	保花 Preserving bloom	尿素 Carbamide	60
	08-28	灌浆 Milking	尿素 Carbamide	75
	09-08	灌浆 Milking	尿素 Carbamide	60
	09-19	灌浆 Milking	尿素 Carbamide	90
	有机施肥 Organic fertilizer application	06-01	基肥 Basal application of fertilizer	绿肥 Green manure
06-26		返青 Turning green again	生物有机肥 Biological organic fertilizer	1 500
06-30		返青 Turning green again	棉籽饼 Cottonseed cake	1 125
07-03		分蘖 Tillering	棉籽饼 Cottonseed cake	750
07-26		促花 Accelerating blooming	棉籽饼 Cottonseed cake	1 125
常规施肥 Normal fertilizer application	06-19	基肥 Basal application of fertilizer	碳铵 Ammonium hydrogencarbonate	600
	06-27	返青 Turning green again	碳铵 Ammonium hydrogencarbonate	450
	07-10	分蘖 Tillering	碳铵 Ammonium hydrogencarbonate	300
	08-04	促花 Accelerating blooming	尿素 Carbamide	75
	08-18	保花 Preserving bloom	尿素 Carbamide	60

2 结果与分析

在高氮、有机和常规 3 种不同施肥方式下, 已导入大豆 DNA 的 97 冬繁 10 水稻糙米蛋白质平均含量依次为 128.0, 123.7 和 102.1 mg/g, 而 97 冬繁

10 对照水稻糙米蛋白质平均含量依次是 86.9, 83.6 和 76.6 mg/g (表 2)。方差分析及多重比较分析表明, 两种水稻材料在每一种施肥方式下, 对应的糙米蛋白质含量之间的差异都达极显著水平。

表 2 4 种水稻材料在 3 种不同施肥方式下籽粒蛋白质含量、变异范围和极差

Table 2 The protein contents, variable range and difference in the four kinds of rice seeds under 3 different fertilizer applications

水稻品种 Varieties	高氮施肥 High nitrogenous fertilizer application			有机施肥 Organic fertilizer application			常规施肥 Normal fertilizer application		
	平均含量 Average	变异范围 Variable range	极差 Difference	平均含量 Average	变异范围 Variable range	极差 Difference	平均含量 Average	变异范围 Variable range	极差 Difference
97 冬繁 10(CK) 97 Dongfan 10(CK)	86.9	74.6~103.3	28.7	83.6	72.1~98.9	26.8	76.6	64.1~85.0	20.9
优丰 Youfeng	95.0	87.6~106.5	18.9	88.1	80.9~95.5	14.6	77.9	70.2~82.0	11.8
97 冬繁 13 97 Dongfan 13	82.6	71.4~109.7	38.3	80.4	72.1~104.6	32.5	70.3	61.0~88.6	27.6
导入大豆 DNA 的 97 冬繁 10 97 Dongfan 10 to treated with DNA	128.0	82.2~175.7	93.5	123.7	83.8~170.1	86.3	102.1	72.2~138.3	66.1

注: 蛋白质平均含量值为 25 组数据的平均值。

Note: The protein contents are the average of 25 groups of data

比较 4 种水稻在高氮、有机和常规 3 种施肥条件下的糙米蛋白质含量 (表 2), 可以看出, 4 种水稻糙米蛋白质含量由高到低的施肥方式依次为高氮施

肥、有机施肥、常规施肥, 而且每种水稻品种 3 种施肥方式的糙米蛋白质含量的差异都达极显著水平。虽然此现象表明水稻糙米蛋白质含量的表现的确与

施肥方式有关, 后期增施氮肥和早期施用有机肥可以提高糙米蛋白质含量。但进一步分析不同施肥方式下, 3 种普通水稻糙米蛋白质平均含量的绝对增加值, 其中最高的是优丰在高氮施肥与常规施肥的差值, 也仅为 17.1 mg/g; 导入大豆 DNA 的 97 冬繁 10 水稻在 3 种施肥方式下糙米蛋白质平均含量的增加值, 高氮施肥比常规施肥高出 25.9 mg/g, 有机施肥比常规施肥高出 21.6 mg/g, 两组数据增加的幅度均比优丰品种及相应的对照(对照相应值是 10.3 和 7.0 mg/g)大。

分析不同施肥方式下糙米蛋白质含量的极差(表 2), 虽然 4 种水稻都是在高氮施肥方式下, 糙米蛋白质含量的极差相对较大, 其次是有机施肥, 常规施肥糙米蛋白质含量的极差最小, 但 4 种水稻中, 经过大豆 DNA 处理的 97 冬繁 10 不论采用何种施肥方式, 极差都比相同条件下种植普通水稻高出许多。

3 讨 论

以花粉管通道法直接导入外源 DNA 改良作物技术建立使用至今已有 20 多年, 在水稻^[7-9, 12, 13]、小麦^[14, 15]、玉米^[16]、大豆^[17]、棉花^[18, 19]等多种农作物改良中都有许多成功的报道。利用该技术提高稻米蛋白质含量研究, 最早报道的是方金良等^[9]将玉米 DNA 导入多个水稻品种, 培育的稻米蛋白质含量最高为 140.3 mg/g。洪亚辉等^[12]也采用浸胚法将玉米的总 DNA 导入优质早籼稻, 选育出蛋白质含量最高可达 149 mg/g 的株系。刘国华等^[13]还报道了采用浸胚法将大豆、高粱、玉米 DNA 导入水稻, 并从后代中筛选到蛋白质含量最高达 156.3 mg/g 的新品种。本试验又一次采用花粉管通道法将大豆 DNA 导入高产水稻 97 冬繁 10, 在 3 种施肥方式下, 经 DNA 处理后糙米蛋白质平均含量有明显提高。这些成功的例子均表明, 利用外源 DNA 直接导入法培育高蛋白水稻是可行的。在本研究中, 虽然后代稻米蛋白质含量最高可达 175.7 mg/g, 但与笔者已报道^[7]的将相同品种大豆 DNA 导入日本越光粳稻, 第一代蛋白质含量最高可达 257.3 mg/g 相比, 又明显降低了许多。这些现象表明, 利用 DNA 直接导

入技术培育高蛋白水稻, 供体 DNA 的来源以及水稻品种的选择都是很重要的。

汤圣祥^[5]认为, 稻米蛋白质含量存在着较大的环境变异。比较本试验在高氮施肥和常规施肥方式下收获的稻米, 3 种普通水稻中高氮施肥和常规施肥的糙米蛋白质含量差异都达极显著水平, 这进一步表明, 稻米蛋白质含量易受施肥方式的影响, 后期增施氮肥能够提高稻米的蛋白质含量。在王德仁等^[20]的研究中也有类似现象。比较 3 种普通水稻在不同施肥条件下糙米蛋白质平均含量的绝对增加值, 最高的优丰也仅为 17.1 mg/g, 这说明后期增施氮肥只能在较小的幅度范围内提高稻米蛋白质含量。此结果也说明, 若要较大幅度地提高稻米的蛋白质含量, 只有改变水稻的遗传组成。将大豆 DNA 处理的 97 冬繁 10 与相应施肥方式中的对照 97 冬繁 10 相比, 糙米蛋白质平均含量的差值分别是 41.1 mg/g(高氮施肥), 40.1 mg/g(有机施肥)和 25.5 mg/g(常规施肥)。在同一施肥方式中, 经大豆 DNA 处理的 97 冬繁 10 与对照 97 冬繁 10 之间, 糙米蛋白质平均含量的差值均大于任一种普通水稻品种在不同施肥方式间的差值。李木英等人^[21]曾提出稻米蛋白质含量与灌浆期间的氮素吸收率显著相关, 经大豆 DNA 处理的 97 冬繁 10 的蛋白质平均含量明显高于对照, 外源大豆 DNA 的导入可能提高了水稻对氮素的吸收率。

在高氮和有机施肥方式中, 经大豆 DNA 处理的 97 冬繁 10 的糙米蛋白质平均含量增加的幅度比常规施肥更明显, 而且高氮和有机两种施肥方式下, 糙米蛋白质含量变异范围也相对较宽。这一现象表明, 后期追施氮肥和早期施用有机肥, 更有利于糙米蛋白质含量的表达。

有机肥料有许多优点, 不仅成本低, 来源广, 更重要的是有机肥料含有丰富的氮、磷、钾等肥力因素, 可为农业持续增产提供良好的土壤环境。在农业生产中使用有机肥更有利于环境保护和人体健康。在本试验中, 既然经大豆 DNA 处理的 97 冬繁 10 在有机施肥方式中, 糙米蛋白质含量比对照有明显提高, 而且与高氮施肥时的 97 冬繁 10 差异不显著, 因此在其种植时建议使用有机肥施肥。

[参考文献]

- [1] Boulter D, Parthier B. Structure, biochemistry and physiology of proteins, nucleic acids and proteins in plants[M]. Berlin: Springer-Verlag, 1982.
- [2] Juliano B O, Antonio A A, Esnana B V. Effects of protein content on the distribution and properties of rice protein[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 1973, 24(1): 295- 306.
- [3] 甄海, 黄炽林, 陈奕, 等. 野生稻资源蛋白质含量评价[J]. 华南农业大学学报, 1997, 18(14): 16- 20.
- [4] 宋文昌, 李植良. 特种稻施肥与利用[M]. 北京: 科学出版社, 1997. 19- 20.
- [5] 闵绍楷, 申宗坦, 熊振民. 水稻育种学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1996. 322- 354.
- [6] 熊振民, 朱旭东, 罗玉坤. 稻米品质研究的新进展[J]. 水稻文摘, 1992, 12(3): 1- 6.
- [7] 李建粤, 周根余, 许燕, 等. 经大豆DNA溶液处理的水稻后代种子的粗蛋白和氨基酸含量分析初报[J]. 植物研究, 2000, 20(2): 189- 194.
- [8] 李建粤, 范士婧, 邹征, 等. 大豆DNA导入引起稻米蛋白质含量变异的遗传稳定性及赖氨酸含量分析[J]. 种子, 2001, (6): 3- 7.
- [9] 方金梁, 方宁, 肖红梅, 等. 高蛋白水稻育种的新进展[J]. 作物研究, 1994, 8(2): 6- 9.
- [10] 朱展才. 稻麦质量分析[M]. 北京: 中国食品出版社, 1988.
- [11] 童一中. 生物统计法[M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1986.
- [12] 洪亚辉, 萧浪涛, 董延瑜. 玉米DNA导入水稻选育高蛋白品系[J]. 湖南农业大学学报, 2000, 26(1): 28- 30.
- [13] 刘国华, 陈立云, 洪亚辉, 等. 外源DNA导入诱导水稻高蛋白变异的研究[J]. 湖南农业大学学报, 2000, 26(6): 415- 417.
- [14] 王亚馥, 陈克明, 焦成瑾, 等. 外源DNA导入小麦后的变异系生物学特性及胚乳蛋白的研究[J]. 作物学报, 1995, 21(4): 404- 411.
- [15] 朱新产, 赵文明. 豌豆花DNA导入小麦对籽粒蛋白质的影响[J]. 西北农业大学学报, 1995, 23(2): 103- 105.
- [16] 耿庆汉, 张海明, 莫力根, 等. 小麦DNA导入玉米引起性状变异的研究[J]. 内蒙古农牧学院学报, 1992, 13(1): 14- 21.
- [17] 雷勃钧, 卢翠华, 钱华, 等. 导入外源总DNA获得大豆早熟新品系[J]. 作物学报, 1996, 22(2): 173- 177.
- [18] 黄骏麒, 钱思颖, 刘桂铃, 等. 外源海岛棉DNA导入陆地棉性状的变异[J]. 遗传学报, 1981, 8(1): 56- 62.
- [19] Zhou G Y, Weng J, Zeng Y S. Introduction of exogenous DNA into cotton embryos[J]. Methods in Enzymology, 1983, 101: 433- 448.
- [20] 王德仁, 卢婉芳, 陈苇. 施氮对稻米蛋白质、氨基酸含量的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 2001, 7(3): 353- 356.
- [21] 李木英, 石庆华, 谭雪明. 水稻根系营养吸收特性及其与感温制生产和稻米品质关系的研究[J]. 江西农业大学学报, 1996, 18(4): 376- 382.

Effect of different fertilizer application on crude protein contents in variation rice seeds induced by exogenous DNA from soybean

L I J ian-yue¹, WANG L i-juan¹, L U Y i ng-hai¹, L U j i a-n², HOU Gen-bao¹, ZHANG J ian-m i ng²

¹ Department of Biology, Shanghai Normal University, Shanghai 200234, China;

² Institute of Crop, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201106, China

Abstract: The exogenous DNA from soybean was introduced into rice seeds through the pollen-tube pathway again. Three kinds of culture ways were designed: the culture in high nitrogenous fertilizer, the culture in organic fertilizer, the culture in conventional fertilizer. Four kinds of rice - two ordinary varieties, the variety induced by exogenous DNA from soybean and the contrast were respectively planted with the three kinds of culture ways. Crude protein contents in the four kinds of rice offspring's seeds were analyzed. The results indicated: (1) The average contents of crude protein in the seeds induced by exogenous DNA from soybean and planted in the high nitrogenous fertilizer, in the organic fertilizer and conventional culture were 128.0 mg/g, 123.7 mg/g and 102.1 mg/g, increasing separately by 473.0 mg/g, 479.7 mg/g and 332.9 mg/g over their contrasts planted in relevant soils; (2) Variable range of crude protein contents in the variation rice seeds was wider in high nitrogenous fertilizer culture and in organic fertilizer culture than in the conventional fertilizer. This research result confirms that introducing exogenous DNA through the pollen-tube pathway could increase crude protein content in rice seeds. The culture ways in high nitrogenous fertilizer and in organic fertilizer are advantageous to expression of crude protein content in the variation rice seeds.

Key words: rice; soybean; exogenous DNA introduction; crude protein content; fertilizer application pattern