

科研报告

利用花粉管通道法将编码优质 HMW—GS 基因导入小麦进行品质改良的研究

王广金¹, 李忠杰¹, 张晓东², 唐凤兰¹, 张宏纪¹, 孙 岩¹

(1. 黑龙江省农科院育种所, 哈尔滨 150086; 2. 北京农林科学院生物技术中心, 北京 100081)

摘要: 利用花粉管通道法将编码麦谷蛋白 HMW—GS 1Dx 和 1Dy10 基因导入了小麦, 经抗 PPT 筛选、PCR 检测和 HMW—GS 组成分析等, 选出了高产优质的转基因品系 21K867。此外还讨论了提高花粉管通道法导入目的基因的遗传转化率和转基因系性状多样性等问题。

关键词: 花粉管通道法; 转基因; 小麦品质改良

中图分类号: S 512.103.53 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-2767(2002)06-0001-03

Production of Transgenic Wheat Line Via Pollen Tube Path Way Transferring Wheat HMW Glutenin Subunit Gene

WANG Guang-jin¹, LI Zhong-jie¹, ZHANG Xiao-dong², TANG Feng-lan¹,
ZHANG Hong-ji¹, SUN Yan¹

(1. Crop Breeding Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086;
2. Beijing Academy of Agricultural Sciences Bio-technique Center Beijing 100081)

Abstract: High quality wheat HMW gluten subunit gene was introduced into wheat via pollen tube path way. High yield and high quality wheat line 21K867 was selected through herbicide resistant trial, PCR method and HMW—GS 5+10 analysis. Wheat line 21k867 possesses HMW—GS 5+10 gene, yield is 3.2% higher than receptor.

Key words: pollen tube path way; transferring gene; improvement wheat quality

小麦是我省重要的粮食作物之一,对国家的粮食安全和人们的膳食需求都具有重要作用。小麦主栽品种品质较差,是小麦生产经济效益下滑的主要原因。改良小麦品质已成为提高小麦市场竞争力和经济效益的重要措施。大量的研究表明,小麦高分子量麦谷蛋白亚基(HMW—GS)组成与小麦品质关系密切,其中 1Dx5 和 1Dy10 亚基对品质的贡献率最高^[1~4]。麦谷蛋白 HMW—GS 是由相应的编码基因控制的,为此将编码优质 HMW—GS 5+10 的基因导入小麦,并成功地完成遗传转化,对小麦的品质改良将具有重要意义。张晓东等人^[5]利用基因枪法将麦谷蛋白 HMW—GS 5+10 基因导入小麦,获

得了转基因植株。由于基因枪法介导成本较高,转化率较低,在实际应用上有一定困难,本试验利用花粉管通道法将编码麦谷蛋白 HMW—GS 5+10 基因与除草剂 Basta 抗性的 Bar 基因重组质粒导入小麦,以获得转基因小麦植株,进而选育出优质的小麦新品系。

1 材料与方法

1.1 材料

龙辐 10 号(麦谷蛋白 HMW—GS 组成为 1,7+8,2+12)、龙辐 92K809(麦谷蛋白 HMW—GS 组

· 收稿日期: 2002-07-16

基金项目: 国家转基因植物研究和产业化专项—转基因抗病优质春小麦新品系选育与示范。

第一作者简介: 王广金(1962—),男,黑龙江省海伦市人,研究员,在读博士,从事小麦诱变与生物技术育种研究。

成为 1,7+9,2+12)、新克早 9 号(麦谷蛋白 HMW-GS 组成为 1,7+9,2+12)。

1.2 方法

1.2.1 质粒构建 质粒 PBARGUS 用 Hind III 酶切, Klenow 酶补平 2hP(dG, dA), 回收 2.0kb 片段, 该片段含 CaMV35S 启动子 + ADHI 内含子 (0.55kb) + bar 基因 + NOS3 终止子 (0.26kb), 插入 PBC4 经 XbaI 酶切并补平 2bp(dc, dT) 的位点, 获得正向、反向插入的重组质粒 PBPC30f (11kb) 和 PBPC30r。

1.2.2 辐射处理与花粉管通道介导 试材进行盆栽, 常规管理, 抽穗期用 500Rad 的 γ 射线照射。植株开花 30~45 min 后剪去柱头, 用滴入法导入重组质粒 PBPC30。调查结实率和子粒发育情况。

1.2.3 抗除草剂的浓度筛选 分别将供试品种(系)的 100 粒种子浸在 PPT 浓度为 10、15、20、25 mg/L 的溶液中, 经 8 h 后捞出做发芽试验, 以确定抗性的筛选浓度。然后将导入获得的 D_0 种子在一定浓度的 PPT 溶液中浸泡 8 h, 捞出后做发芽试验, 根据发芽情况进行抗性筛选。

1.2.4 PCR 检测 常用法提取麦苗的总 DNA。Bar 基因引物: 引物 1: 5'-CCATCGTCAACCAC-TACATCGAG-3'; 引物 2: 5'-CTAAAGTC-CAGCTGCCAGAAAG-3'。以提取的总 DNA 为模板, 加上 Bar 基因引物、反应缓冲液、dNTP 和 Tag 酶后, 进行 PCR 扩增。将扩增产物在 1% 琼脂糖凝胶电泳上电泳, EB 染色并照相。

1.2.5 麦谷蛋白 HMW-GS 5+10 检测 用 SDS-PAGE 法测定子粒的麦谷蛋白 HMW-GS 组成, 检测其中的 5+10 亚基。

1.2.6 转基因品系的农艺性状与产量鉴定 将转基因品系纳入品系的产量鉴定试验; 小区面积 6 m², 3 次重复, 保苗数 600 万株/hm², 正常管理。调查生育状况, 实收计产, 并进行考种。

1.2.7 子粒品质分析 按照相应的国内和国际标准, 测定入选品系及其受体子粒的蛋白质含量、湿面筋含量、Zeleny 沉降值和面团形成时间及稳定时间等。

2 结果与分析

2.1 导入后代的结实率和变异

受体经低剂量 γ 射线照射后, 通过花粉管通道导入编码 HMW-GS 5+10 基因的 D_0 代结实率(见表 1)。

由表 1 看出, 受体经 γ 射线照射后 D_0 代的结实

表 1 D_0 代的结实率

材料与处理	导入小花数(个)	结实数(个)	结实率(%)
龙辐麦 10 号	90	31	34.4
γ 龙辐麦 10 号	143	31	21.7
龙辐 92K809	306	81	26.5
γ 龙辐 92K809	362	64	17.7
新克早 9 号	352	92	26.1
γ 新克早 9 号	368	73	19.8

率皆低于不照射对照。 D_0 代结实率在不同受体上还存在差异, 其中龙辐麦 10 号的结实率最高。调查还发现, 经花粉管通道导入质粒后, D_0 代种子都较瘦秕, 说明导入质粒会影响胚乳的正常发育。 D_1 代植株一般与受体无明显差异, 只是龙辐 92K809 导入的 D_1 代中出现了顶芒株, 其顶芒株率为 9.1%, 其它性状均无变化。在顶芒株的 D_2 代群体中, 出现了无芒、有芒、顶芒和短芒等分离, 其比率分别为 63.7%、0.5%、14.7% 和 20.1%。调查还发现, 受体经 γ 射线照射后的导入后代和未照射的导入后代, 其植株长相基本相同, 表明低剂量 γ 射线照射并未引起后代的变异。

2.2 抗除草剂抗性筛选

供试品种(系)龙辐麦 10 号、龙辐 92K809 与新克早 9 号经浓度为 10~15 mg/L 的 PPT 溶液处理后, 其发芽势、发芽率和幼芽生长状况与水浸对照无明显差别; PPT 溶液浓度为 20 mg/L 时, 供试品种(系)的发芽势和发芽率明显降低, 幼芽变褐, 溶液浓度为 25 mg/L 时, 所有供试品种(系)基本都不发芽。因此, 将 PPT 溶液浓度 25 mg/L 定为导入后代的除草剂抗性筛选浓度。

经导入获得的 5 860 粒 D_0 种子在 25 mg/L 浓度的 PPT 溶液中进行了抗性筛选, 共得到 382 个 D_1 代单株。

2.3 PCR 检测

除草剂 PPT 筛选出的 382 个单株, 经 PCR 检测共获得 5 个阳性株(见图), 其中 4~5 为编码 5+10 亚基基因导入新克早 9 号的后代, 6~7 为编码 5+10 亚基基因导入龙辐麦 10 号的后代, 8 为编码 5+10 亚基基因导入龙辐 92K809 的后代。

2.4 麦谷蛋白 HMW-GS 检测

PCR 阳性株的种子经 SDS-PAGE 电泳检测, 发现有 3 个株系的 HMW-GS 中含有 5+10 亚基。将含有 5+10 亚基的株系南繁加代, 并在田间进行农艺性状和抗病性等综合表现选择, 最后从 5+10

导入新克早 9 号的后代中决选出高产抗病的新品系 21K867。

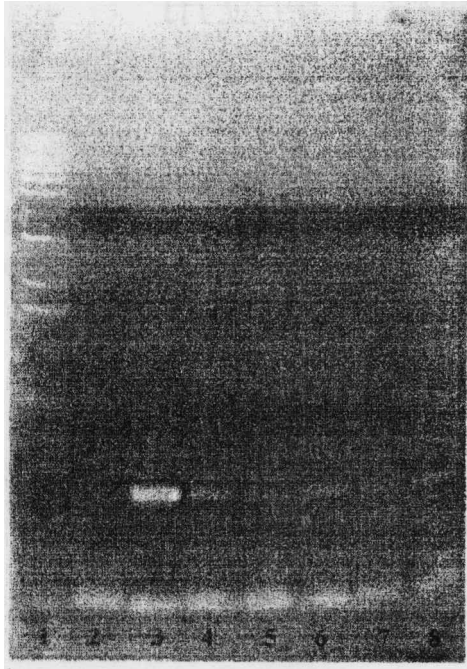


图 PCR 检测结果

注:1 为 Marker;2 为阴性对照;3 为阳性对照;4~5 为编码 HMW-GS 5+10 基因导入新克早 9 号的后代;6~7 为编码 HMW-GS 5+10 基因导入龙辐麦 10 号的后代;8 为编码 HMW-GS 5+10 基因导入龙辐 92K809 的后代。

表 2 转基因系 21K867 主要农艺性状与产量

材料	生育日数 (d)	株高 (cm)	穗长 (cm)	主穗小穗数 (个)	千粒重 (g)	容重 (g/L)	产量 (kg/hm ²)	增产 (%)
21K867	94	111.2	9.4	17.6	33.8	794	5516.7	3.2
新克早 9 号	90	94.6	8.4	16.5	34.1	752	5345.8	—

质量,而麦谷蛋白 HMW-GS 1Dx5 和 1Dy10 又与面筋质量有关。因此可以认为,转基因系龙辐

2.5 转基因品系的农艺性状和产量

转基因 21K867 的主要生物学特性为:苗葡伏,发育缓慢,叶片较窄,植株较繁茂,株高 110 cm 左右,秆较强,抗倒伏,生长整齐,无芒,黄壳,红粒,千粒重 34 g 左右,晚熟,生育日数 90 d 左右,秆锈免疫,高抗叶锈,抗根腐病、白粉病,赤霉病轻。谷麦蛋白 HMW-GS 组成为 1,7+9,5+10。21K867 的产量鉴定与考种结果(见表 2)。

由表 2 可知,转基因系 21K867 较受体新克早 9 号晚熟 4 d,植株高 6.6 cm,除千粒重外,穗长等产量性状也较新克早 9 号有不同程度的改善。21K867 的容重较 92K809 提高 42 g,产量增加 3.2%。转基因系 21K867 较受体新克早 9 号增产的主要原因是穗粒数的增加。

2.6 转基因品系的品质

转基因系 21K867 及其受体新克早 9 号的品质分析结果(见表 3)。

由表 3 的结果看出,转基因系龙辐 92K867 的主要品质性状均较受体新克早 9 号有不同程度的提高,其中沉降值增加 8.9 mL,稳定时间增加 1.3 min;延伸性增加 1.4 cm,面积增加 5.1 cm²。一般认为,沉降值、稳定时间、面积等指标主要反映面筋

92K867 的品质改良是由于转化编码 HMW-GS 5+10 的基因造成的。

表 3 转基因系 21K867 以及受体的品质分析结果

材料	粗蛋白 (%)	湿面筋 (%)	沉降值 (mL)	吸水率 (%)	形成时间 (min)	稳定时间 (min)	评价值	最大阻力 (E. U)	延伸性 (cm)	面积 (cm ²)
龙辐 92K867	14.32	24.8	49.4	61.8	1.9	2.4	35	330	13.8	58.9
新克早 9 号	14.01	25.6	40.5	62.8	1.7	1.1	32	338	12.4	53.8

3 讨论

3.1 利用花粉管通道法将编码麦谷蛋白 HMW-GS 5+10 的基因导入小麦,完成了目的基因的遗传转化,获得了品质好的转基因系 21K867,可见通过花粉管通道实现目的基因介导和遗传转化是可能的。但该法的遗传转化率较低,在本试验中若以 PCR 阳性株为转化标准计,转化率为 0.08%。造成这种情况的原因,我们认为主要是授粉时因气温等环境条件影响花粉管通道形成的时间不易掌握以

及操作技术不熟造成的。以前的研究证明,导入前用低剂量的 γ 射线照射受体,可以导致受体 DNA 的无规则合成,提高外源 DNA 的整合率^[6]。由此可以认为,导入前受体进行低剂量 γ 射线照射,控制授粉条件、正确掌握花粉管通道的形成时间,改进操作技术可以提高花粉管通道法的遗传转化率。

3.2 转基因后代不仅表达目的基因的特性,还出现了一些新的性状。转基因后代的性状多样化,可能是由于插入 DNA 片段的位置效应和基因的互作造

光合细菌菌肥在蔬菜种植上的应用

谷 军¹, 杨 旭¹, 堀内勲²

(1. 黑龙江省科学院应用微生物研究所, 哈尔滨 150010; 2. 日本株式会社応微研, 日本 〒406-0045)

摘要: 光合细菌作为生物肥料使用, 不仅可以使辣椒、番茄的产量分别提高 13.5%、12%, 而且可以改善作物的品质。提高作物叶绿素含量、维生素 C 的含量, 降低蔬菜中亚硝酸盐的含量, 延长作物的保存期。

关键词: 光合细菌; 辣椒; 番茄

中图分类号: S 114 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-2767(2002)06-0004-03

Application of Photosynthetic Bacteria Fertilizer on Vegetable

GU Jun¹, YANG Xu¹, ISAO Horiuchi²

(1. Institute of Application of Microgerm of Heilongjiang Academy of Science Harbin 150086;
2. Applied Microbiology Research Institute LTD JAPAN 〒406-0045)

Abstract: Photosynthetic bacteria fertilizer had the effect on yield increase of cayenne pepper and tomato, which were 24% and 18% respectively compared with CK and improve crop quality. It can increase chlorophyll and vitamin C content, decrease nitrate content in vegetable and lengthen storage life of vegetable.

Key words: photosynthesis bacteria; tomato; cayenne pepper.

目前, 蔬菜生产已成为农业的一项主要产业, 而且随着生活水平的提高, 使人们对蔬菜的要求不仅局限于数量和品种, 更注重质量。尤其连续多年种植蔬菜的老菜地和保护地, 由于为了增产大量施用化肥, 引起蔬菜硝酸盐含量过高, 人体摄入过多的硝酸盐会产生大量亚硝胺, 破坏血液吸氧能力, 还能引

起癌变。针对这种情况, 我们进行了光合细菌肥料的研究。这种生物肥喷施于蔬菜上, 光合细菌可利用小分子有机物合成作物所需的养分, 并产生促生长因子, 激活植物细胞的活性, 提高光合作用的能力, 增加产量。另外这种肥料可降低蔬菜中的硝酸盐含量, 增加叶绿素、维生素 C 含量, 从而提高产品

* 收稿日期: 2002-07-04

基金项目: 黑龙江省科学院基金项目。

第一作者简介: 谷军(1964-), 男, 哈尔滨市人, 高级工程师, 从事微生物发酵方面的研究。

成的。这种性状的多样性现象对育种是有利的, 人们在获得目的性状的同时, 可以得到各种变异, 大大增加了选择机遇。

3.3 本研究获得了转基因品系, 使受体的品质性状也得到改善。但转基因后代 DNA 分子生物学方面的检测尚不完善, 有关 Souther 等检测工作还在进行中。

参考文献:

[1] Payne P. L. Genetics of wheat storage proteins and effect of allelic Variation on bread making quality, Ann Rev[J]. Plant physiol, 1987, 38:141-153.

[2] 赵友梅, 王淑俭. HMW 麦谷蛋白亚基图谱在小麦品质研究中的应用[J]. 作物学报, 1990, 16(3):208-218.

[3] 傅宾孝, 赵友梅. 小麦高谷子量谷蛋白亚基与面粉品质[J]. 郑州粮食学院学报, 1989, 10(1):1-15.

[4] 王金水, 赵友梅. 小麦高分子麦谷蛋白与其加工品质的关系[J]. 郑州粮食学院学报, 1994, 15(4):61-66.

[5] 张晓东, 李冬梅, 徐文莫, 等. 利用基因枪将 HMW 谷蛋白亚基基因与除草剂 Basta 抗性基因导入小麦不同外植体获得转基因植株[J]. 遗传, 1998, 20(增刊):3-8.

[6] 李忠杰, 孙光祖, 王广金, 等. 辐照外源 DNA 导入小麦诱变效果初探[J]. 核农学通报, 1995, 16(1):1-4.