



刘文林,张宏纪,孙岩,等. 平阳霉素对小麦雌雄配子诱变效果的研究[J]. 黑龙江农业科学, 2021(1):1-4,5.

平阳霉素对小麦雌雄配子诱变效果的研究

刘文林¹,张宏纪¹,孙岩¹,唐婧泉¹,杨淑萍¹,王翔宇¹,张宝辉²

(1. 黑龙江省农业科学院 作物资源研究所,黑龙江 哈尔滨 150086;2. 内蒙古呼伦贝尔市 特泥河农牧场,内蒙古 呼伦贝尔 021000)

摘要:为提高化学诱变剂的诱变效果,本研究采用叶鞘注入和颖壳注入的处理方法将浓度分别为 20,40 和 80 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的平阳霉素注入 2 个小麦品种的叶鞘和颖壳内,使其直接作用于小麦雌雄配子,调查平阳霉素诱变小麦后代的变异情况。结果表明:活体诱变处理的龙辐 06K508 和龙 06-6798 的 M_1 出苗率都随着平阳霉素浓度的增大而降低。小穗颖壳注入法在两个品种间半致死剂量存在差异,而叶鞘注入法没有达到半致死剂量。两种处理方式在 M_1 、 M_2 的株高、生育期和芒型等性状上均发生了变异。经数据分析显示,叶鞘注入法 M_1 代株高、穗长、分蘖数、小穗数和主穗粒重与 CK 相比变化不显著,而小穗颖壳注入法株高、穗长和小穗数与 CK 相比变化显著,叶鞘注入法 M_2 代穗长小穗数与 CK 相比变化显著,而小穗颖壳注入法株高和小穗数与 CK 相比变化达到显著和极显著水平。说明小颖壳注入法直接作用于雌雄配子,保湿效果好,药效时间长,在诱变后代中能产生丰富的变异,可以在诱变育种中加以利用。

关键词:小麦;化学诱变;平阳霉素;性状变异

自然界自发产生的突变虽然经常发生,但频率很低。利用化学诱变可以诱发创造出自然界和应用杂交方法不易获得的变异类型,丰富遗传资源,为育种者提供宝贵变异材料,是小麦遗传改良的重要途径之一^[1]。平阳霉素(PYM)是一种抗生素,能抑制细胞 DNA 的合成,影响细胞代谢功能,具有强烈的致染色体畸变效应,因此成为一种高效的化学诱变剂,现应用于大麦、小麦、水稻、烟草、菊花等许多作物的诱变育种中^[3-12],并取得了非常好的诱变效果。在以往的研究中,大多采用平阳霉素处理小麦种子、在培养基中添加平阳霉素和利用花粉管通道诱变幼胚等方法。为改善诱变处理方法,创造有效的诱变途径,本研究采用叶鞘和颖壳注射平阳霉素的方法诱导小麦雌雄配子,进而影响小麦开花授粉进程,以期诱发较高的突变频率,提高化学诱变剂的诱变效果,为丰富化学诱变育种提供有效途径。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为遗传性稳定的小麦品种龙辐

06K508 和龙 06-6798。其中龙辐 06K508,晚熟,无芒,大穗,丰产性好,但植株茎秆偏软,由大麦与小麦育种技术室提供;龙 06-6798 小麦品种,中晚熟,优质,高产,但千粒重略小,由黑龙江省农业科学院作物育种研究所小麦室提供。

平阳霉素(Pingyangmycin,简称 PYM),由天津太河制药厂生产。用 0.01 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液(pH7)分别配制浓度为 20,40 和 80 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的平阳霉素。

1.2 方法

1.2.1 小穗颖壳注入法 在温室内待小麦抽穗后(3 d),剪掉上下端小穗,留穗中部 4~5 对小穗做药剂处理,处理前,减去小花顶端,用微量注射器将不同浓度的药剂溶液注射到颖壳内,注满为止,每个小穗处理药液 10 μL ,使药物直接进入小麦体内,每个浓度处理 5 穗,然后药棉保湿、套袋,挂上标签,注明处理浓度及处理时间,成熟后按处理收获,单株脱粒。

1.2.2 叶鞘注入法 在温室内待小麦孕穗打包时,用注射器在叶鞘内注满处理液,注满为止,每个叶鞘内注射大约 100 μL ,使药物直接进入小麦穗内,挂上标签,注明处理浓度及处理时间,抽穗后,套上袋子,每个浓度处理 5 穗,成熟后按处理收获,单株脱粒。

1.2.3 后代材料调查与处理 按不同方法不同剂量在温室收获当代种子,下一年度田间单粒点

收稿日期:2020-11-02

基金项目:黑龙江省农业科学院“农业科技创新跨越工程”专项(HNK 2019CX04-06);国家重点研发计划(2016YFD 0102101)。

第一作者:刘文林(1976—),男,硕士,助理研究员,从事小麦生物技术和遗传育种研究。E-mail:2533383054@qq.com。

通信作者:张宏纪(1969—),男,博士,研究员,从事小麦遗传育种研究。E-mail:fumai@163.com。

播获得 M₁ 代,并种植龙辐 06K508 和龙 06-6798 对照材料,进行生长情况田间调查,不作选择,成熟后收获,进行室内考种,单株脱粒。第二年将收获的种子以株行点播,并种植对照材料,田间调查变异情况,在成熟后,按突变类型单株收获 M₂ 代,分株系收获,供室内考种。

1.2.4 数据分析 考种所得的数据用 DPS v3.0 统计软件处理,分析后代群体的变异情况。

2 结果与分析

2.1 处理材料当代情况及不同处理方式对 M₁ 出苗率的影响

叶鞘注入法和颖壳注入法两种处理方式获得的 M₀ 籽粒均变小、饱满程度差、发芽率降低。同一处理方式田间 M₁ 出苗率随着诱变剂浓度的增加而下降;同一诱变剂浓度水平上不同处理方式间出苗率存在差异,叶鞘注入法处理方式比颖壳注入法小麦出苗率高(表 1)。不同品种在不同诱变剂处理方式下田间出苗率也存在差异。龙辐 06K508 叶鞘注入法在 20 μg·mL⁻¹ 浓度下出苗率最高,达 91.25%,在 80 μg·mL⁻¹ 浓度下出苗率最低,为 80%。而颖壳注入法在 20 μg·mL⁻¹ 浓度下出苗率最高,为 63.75%,在 80 μg·mL⁻¹ 浓度下最低,为 18.8%;龙 06-6798 叶鞘注入法在 20 μg·mL⁻¹ 浓度下出苗率最高,达 92.50%,在 80 μg·mL⁻¹ 浓度下最低,为 75%。而颖壳注入法在 20 μg·mL⁻¹ 浓度下出苗率最高,为 80.7%,在 80 μg·mL⁻¹ 浓度下最低,为 43.8%。同一浓度相同处理方式上,龙 06-6798 比龙辐 06K508 出苗率偏高。在平阳霉素 40 μg·mL⁻¹ 浓度下,叶鞘注入龙辐 06K508 和龙 06-6798 的出苗率分别为 83.75%和 91.30%,相差 7.55 百分点;在平阳霉素 40 μg·mL⁻¹ 浓度下,颖壳注入龙辐 06K508 和龙 06-6798 的出苗率分别为 48%和 62%,相差 12 百分点,其原因可能是不同品种对平阳霉素的敏感性差异造成的。

2.2 平阳霉素对 M₁ 主要农艺性状的影响

由表 2 可知,无论诱变剂处理方式如何,所有 M₁ 株高随着浓度的增大而降低,变异程度较大,而穗长、分蘖数、小穗数和主穗粒重随着浓度的增大没有明显变化。叶鞘注入法和小穗颖壳注入法间存在差异,叶鞘注入法对龙辐 06K508 和龙 06-6798 株高、穗长、小穗数和主穗粒重影响均不显著,而小穗颖壳注入法对龙辐 06K508 和龙 06-6798 株高、穗长和小穗数影响变化显著。从表 2

中还可以看出,在小颖壳注入方式上龙辐 06K508 在平阳霉素浓度 80 μg·mL⁻¹ 时,株高、穗长和小穗数与 CK 达显著水平,而龙 06-6798 在诱变浓度为 40 和 80 μg·mL⁻¹ 时,株高、穗长、分蘖数和小穗数均与 CK 达显著水平。这表明小穗颖壳注入法这一处理方式上龙 06-6798M₁ 农艺性状的变异范围较龙辐 06K508 更宽。

表 1 不同处理方式对龙辐 06K508 和龙 06-6798 小麦 M₁ 代出苗率的影响

小麦品种	处理方式	处理浓度/ (μg·mL ⁻¹)	种植种 子数	出苗数	出苗 率/%
龙辐 06K508	不处理	CK	80	80	100.00
	叶鞘注入	20	80	73	91.25
		40	80	67	83.75
龙 06-6798	不处理	80	80	64	80.00
	颖壳注入	20	80	51	63.75
		40	75	36	48.00
龙 06-6798	不处理	80	16	3	18.80
	叶鞘注入	20	80	74	92.50
		40	80	73	91.30
龙 06-6798	不处理	80	80	60	75.00
	颖壳注入	20	52	42	80.70
		40	60	36	60.00
龙 06-6798	颖壳注入	80	32	14	43.80

2.3 平阳霉素对 M₂ 主要农艺性状的影响

从农艺性状考察上看,供试材料 M₂ 比 M₁ 变异程度明显,有株高、熟期、穗部畸形、芒型 4 个性状变化。将平阳霉素不同处理方式 M₂ 突变群体中随机选取 10 株,对株高、穗长、分蘖数、小穗数和单株粒重进行统计分析(表 3)。其中株高随着浓度增大而降低,变异程度比 M₁ 大,而穗长、分蘖数、小穗数和单株粒重变化也比较显著。叶鞘注入法和小穗颖壳注入法之间存在差异,叶鞘注入法对龙辐 06K508 在穗长和小穗数上与颖壳注入法间存在显著差异,两种方法在分蘖数、单株粒重上变化虽然较大,但差异均不显著;叶鞘注入龙 06-6798 在穗长、分蘖数和单株粒重上与颖壳注入法间虽然也有变化较大,但差异不显著,在株高和小穗数上与颖壳注入法间差异显著或极显著。颖壳注入法龙辐 06K508 在株高上与 CK 存在极显著差异,颖壳注入 80 μg·mL⁻¹ 平阳霉素的株高和穗长降低最为明显,而在分蘖数、小穗数和单株

粒重上颖壳注入与 CK 间差异不显著。颖壳注入法龙 06-6798 株高与 CK 存在极显著差异,颖壳注入 40 和 80 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 平阳霉素变化程度最大,而在穗长、分蘖数和单株粒重上颖壳注入与 CK 间差异不显著。

表 2 不同处理方式对龙辐 06K508 和龙 06-6798 小麦 M_1 农艺性状的影响

小麦品种	处理方式	处理浓度/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	株高/cm	穗长/cm	分蘖数/个	小穗数/个	主穗粒重/g
龙辐 06K508	不处理	CK	96.9 \pm 1.8 a	15.6 \pm 0.5 a	7.0 \pm 0.8 a	18.0 \pm 2.6 a	1.87 \pm 0.5 a
	叶鞘注入	20	98.1 \pm 4.1 a	14.5 \pm 1.1 a	6.9 \pm 0.8 a	19.0 \pm 2.4 a	2.02 \pm 0.4 a
		40	97.7 \pm 4.6 a	14.9 \pm 1.0 a	6.5 \pm 1.6 a	18.6 \pm 2.3 a	1.86 \pm 0.5 a
		80	94.5 \pm 5.8 a	14.6 \pm 1.0 a	6.4 \pm 0.9 a	18.5 \pm 1.8 a	1.95 \pm 0.5 a
	不处理	CK	96.9 \pm 1.8 a	15.6 \pm 0.5 a	7.0 \pm 0.8 a	18.0 \pm 2.6 abAB	1.87 \pm 0.5 aA
	颖壳注入	20	92.8 \pm 4.2 ab	15.3 \pm 1.3 a	8.2 \pm 2.4 a	17.3 \pm 2.1 bB	1.61 \pm 0.5 abAB
		40	89.0 \pm 2.2 b	15.2 \pm 0.2 a	7.7 \pm 4.0 a	23.0 \pm 1.4 aA	1.87 \pm 0.6 aA
		80	82.7 \pm 4.5 c	12.7 \pm 2.5 b	12.7 \pm 9.9 a	23.0 \pm 0.1 aA	0.78 \pm 0.7 bB
龙 06-6798	不处理	CK	95.4 \pm 1.5 a	13.8 \pm 1.1 a	6.8 \pm 1.6 a	18.2 \pm 1.1 a	1.94 \pm 0.5 a
	叶鞘注入	20	97.2 \pm 5.0 a	12.8 \pm 1.7 a	7.6 \pm 2.3 a	18.7 \pm 1.7 a	1.87 \pm 0.4 a
		40	95.8 \pm 3.7 a	13.0 \pm 1.4 a	8.3 \pm 2.3 a	18.4 \pm 1.3 a	2.03 \pm 0.5 a
		80	93.6 \pm 3.8 a	12.9 \pm 1.2 a	8.2 \pm 2.8 a	18.2 \pm 1.3 a	1.87 \pm 0.4 a
	不处理	CK	95.4 \pm 1.5 aA	13.8 \pm 1.1 aA	6.8 \pm 1.6 bB	18.2 \pm 1.1 aA	1.94 \pm 0.5 a
	颖壳注入	20	95.4 \pm 5.0 aA	14.2 \pm 0.8 aA	9.4 \pm 3.3 aA	18.2 \pm 1.1 aA	2.53 \pm 0.2 a
		40	92.4 \pm 5.2 bB	13.0 \pm 0.0 bB	9.0 \pm 2.3 aA	16.6 \pm 0.9 bB	2.14 \pm 0.7 a
		80	90.6 \pm 5.4 bB	13.0 \pm 1.6 bB	9.6 \pm 4.8 aA	18.1 \pm 12.2 aA	2.14 \pm 2.5 a

注:同列不同大小写字母表示材料内处理间差异达 0.01 或 0.05 显著水平。下同。

表 3 两种处理方式对龙辐 06K508 和龙 06-6798 小麦 M_2 农艺性状的影响

小麦品种	处理方式	处理浓度/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	株高/cm	穗长/cm	分蘖数/个	小穗数/个	单株粒重/g
龙辐 06K508	不处理	CK	94.8 \pm 2.6 A	11.75 \pm 1.0 a	6.3 \pm 0.95 a	22.8 \pm 1.5 a	8.24 \pm 0.5 a
	叶鞘注入	20	88.3 \pm 6.3 A	14.50 \pm 0.6 b	6.0 \pm 2.4 a	25.0 \pm 1.6 ab	12.12 \pm 0.4 a
		40	82.7 \pm 0.6 A	14.30 \pm 0.6 b	5.0 \pm 1.0 a	28.7 \pm 1.2 b	9.30 \pm 0.5 a
		80	82.1 \pm 10.5 A	12.25 \pm 2.1 ab	3.4 \pm 2.2 a	23.9 \pm 2.9 ab	6.63 \pm 0.5 a
	不处理	CK	94.8 \pm 2.6 A	11.75 \pm 1.0 b	6.3 \pm 1.0 a	22.8 \pm 1.5 a	8.24 \pm 0.5 a
	颖壳注入	20	96.3 \pm 1.0 A	12.30 \pm 2.3 ab	5.0 \pm 4.6 a	22.3 \pm 4.0 a	8.05 \pm 0.5 a
		40	80.4 \pm 14.5 AB	14.80 \pm 1.1 a	3.0 \pm 1.4 a	22.3 \pm 4.0 a	5.61 \pm 0.6 a
		80	72.2 \pm 6.4 B	10.40 \pm 1.5 b	4.6 \pm 2.6 a	27.8 \pm 4.0 b	3.59 \pm 0.7 a
龙 06-6798	不处理	CK	93.4 \pm 2.3 a	10.60 \pm 1.1 a	7.0 \pm 2.9 a	19.2 \pm 0.8 a	9.20 \pm 1.9 a
	叶鞘注入	20	88.1 \pm 4.6 a	11.80 \pm 0.7 a	6.3 \pm 1.4 a	19.3 \pm 1.3 a	10.70 \pm 2.2 a
		40	88.1 \pm 4.5 a	11.80 \pm 0.7 a	6.0 \pm 1.8 a	19.5 \pm 0.9 a	10.30 \pm 4.2 a
		80	87.7 \pm 1.1 a	11.40 \pm 1.3 a	7.0 \pm 2.3 a	18.7 \pm 1.4 a	11.40 \pm 3.6 a
	不处理	CK	93.4 \pm 2.3 aA	10.60 \pm 1.1 a	7.0 \pm 2.9 a	19.2 \pm 0.8 a	9.20 \pm 1.9 a
	颖壳注入	20	88.7 \pm 4.7 bB	11.60 \pm 1.3 a	5.5 \pm 1.0 a	18.9 \pm 0.9 a	8.00 \pm 2.0 a
		40	85.7 \pm 3.3 bcB	11.60 \pm 1.0 a	5.7 \pm 1.5 a	18.0 \pm 0.9 b	8.50 \pm 2.2 a
		80	83.7 \pm 2.3 cB	10.90 \pm 1.1 a	5.9 \pm 2.0 a	18.9 \pm 0.8 a	10.50 \pm 2.9 a

3 讨论

对本研究中两个诱变处理方法来看,平阳霉素小颖壳注入法比叶鞘注入法诱变效果好,小颖壳注入法在 M_1 用浓度为 40 和 80 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 剂量就可达到半致死剂量, M_1 和 M_2 均出现显著和极显著差异,可产生较高突变程度。原因可能是颖壳注入法平阳霉素药剂可直接作用于小麦雌雄配子,经过保湿,药效时间长,因此诱变效果差异较明显,而叶鞘注入法注入后需要经过试剂慢慢侵入,药剂才能作用于小麦雌雄配子,药效时间短,因此诱变效果差异不明显。平阳霉素小颖壳注入法比叶鞘注入法步骤稍繁琐,籽粒结实率低,而叶鞘注入法诱变处理后产生籽粒结实率高,步骤简单,但产生的变异程度没有小颖壳注入法高。

本研究通过平阳霉素处理活体小麦品系龙辐 06K508 和龙 06-6798 的雌雄配子,获得株高突变体、生育期突变体、芒型突变体和穗部突变体等,获得的突变类型十分丰富,这与前人的研究结果相一致^[4-11]。此方法同前人诱变方法相比,如在培养基添加平阳霉素操作方法更简单;同平阳霉素浸泡种子的进行诱变处理相比,所用试剂用量小,可以节约成本;同利用花粉管通道法诱导幼胚相比,省工省力。在今后的诱变育种中可以采用小颖壳注射法进行诱变处理,是一种值得推广应用的新技术。此外,小麦雌雄配子对化学诱变剂比较敏感,可以提高变异频率和变异类型。

对本研究采用两个供试材料的后代诱变程度和类型来看, M_1 产生不同的半致死剂量,在 M_1 和 M_2 诱变世代,龙辐 06K508 与龙 06-6798 变异程度产生不同的变异类型和变异程度,在品种之间存在差异,这可能是由于不同的品种遗传背景不同,对药物的敏感性也不同造成的,小麦上张秋英采用平阳霉素注射小麦叶脉诱变结果也曾有相类似的报道^[11-13],可能与不同品种对化学诱变剂的敏感程度不同,导致不同材料最终的诱变效果不同。

在化学诱变育种中,大多数遗传育种工作者都采用甲基磺酸乙酯(EMS)、硫酸二乙酯(DES)、乙烯亚胺(EI)等试剂对种子处理、植株等,这些诱变剂毒性强,并且容易造成环境污染,还可能会造成人体的严重伤害。而平阳霉素是一种较高诱变效应的新型诱变剂,对人体的毒性相

对较小,而对作物作用的有效期较长,容易操作,对设备的要求不太高,安全性好^[14-16]。

4 结论

本研究将平阳霉素通过叶鞘注入法和小颖壳注入法两种方法处理活体小麦材料的雌雄配子,发现 40 和 80 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度的小颖壳注入法在 M_1 代达到半致死剂量,说明不同的材料对平阳霉素的敏感程度差异很大,在 M_1 和 M_2 诱变后代中均能产生丰富变异,可以为诱变育种提供有效的途径^[17]。

参考文献:

- [1] 张月学. 诱变在作物育种中的应用[J]. 黑龙江农业, 1994(3): 43-44.
- [2] 林赴田, 李电东, 杨小平, 等. 平阳霉素的抗肿瘤作用与临床前药理研究[J]. 中华肿瘤杂志, 1979, 1(3): 161-166.
- [3] 赵丽梅, 许耀奎. 平阳霉素 Pingyangmycin 对大麦的诱变效应[J]. 核农学报, 1990, 4(4): 199-205.
- [4] 孙德全. 穗茎注射平阳霉素对小麦诱变效果的研究. 核农学报, 1999, 13(6): 321-324.
- [5] 夏英武, 吴关庭, 舒庆尧, 等. 平阳霉素对水稻诱变效应的研究[J]. 核农学报, 1997, 11(1): 26-30.
- [6] 朴铁夫, 原亚萍, 李全国, 等. 平阳霉素(pingyangmycin)对小麦诱变效应的研究[J]. 核农学报, 1998, 12(3): 139-145.
- [7] 王红, 陈发棣, 赵宏波, 等. 平阳霉素对盆栽小菊意大利红的诱变效应[J]. 南京农业大学学报, 2007, 6(1): 7-8.
- [8] 王红. 平阳霉素对离体培养条件下小菊品种诱变效应研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2006.
- [9] 原亚平, 许耀奎. 平阳霉素(pingyangmycin)对大豆诱变效应的研究[J]. 作物学报, 1993, 19(1): 7-16.
- [10] 黄丽华, 赖宇文, 陈庭俊. 平阳霉素对烟草诱变作用的初探[J]. 作物杂志, 1998, 8(4): 7-9.
- [11] 张秋英, 叶定生, 金美玉, 等. 平阳霉素诱导小麦农艺性状变异的研究[J]. 麦类作物学报, 2002, 8(4): 15-17.
- [12] 赵明霞, 隋炯明, 王晓杰, 等. 平阳霉素对花生体细胞胚胎发生的影响[J]. 核农学报, 2011, 25(2): 242-246.
- [13] 吴关婷, 夏英武, 舒庆尧, 等. 平阳霉素对不同水稻品种的生物效应[J]. 浙江农业大学学报, 1997, 23(1): 1-6.
- [14] 王晶珊, 姜亚男, 尹秀波, 等. 离体诱变定向培育高油花生新品种宇花 9 号[J]. 生物工程学报, 2019, 5(7): 1277-1285.
- [15] 陈洋, 高兰英, 邵艳军, 等. EMS 诱导小麦易位系 YW642 突变体的鉴定与分子标记分析[J]. 核农学报, 2011, 25(4): 617-621.
- [16] 姚恒, 白戈, 谢贺, 等. EMS 对烤烟 K326 种子发芽率及幼苗成活率的处理效应[J]. 分子植物育种, 2019(14): 261-267.
- [17] 乔利仙, 隋炯明, 赵丽兰, 等. 平阳霉素离体诱变花生 M2 农艺性状分析[J]. 核农学报, 2014, 28(6): 955-960.



田平雅,吕苗苗,杨光耀,等.重叠延伸 PCR-酶切连接法构建链霉菌表达载体[J].黑龙江农业科学,2021(1):5-10.

重叠延伸 PCR-酶切连接法构建链霉菌表达载体

田平雅,吕苗苗,杨光耀,马次郎,牛 春,张 萍

(宁夏泰瑞制药股份有限公司,宁夏 银川 750101)

摘要:在功能基因组学时代,对基因的功能研究将涉及到大量的载体构建,为建立一种链霉菌外源基因多拷贝表达的载体构建方法,本研究采用重叠延伸 PCR 与双酶切结合的连接方法,构建链霉菌表达载体,以红霉素工业生产菌红色糖多孢菌(*Saccharopolyspora erythraea*)基因组 DNA 为模板,扩增红霉素合成相关的甲基化酶基因(erythromycin O-methyltransferase, *eryG*)和羟基化酶基因(erythromycin C-12 hydroxylase, *eryK*),以及启动子 *permE* 基因,采用重叠延伸 PCR 及 *EcoR* V、*Not* I 和 *Xba* I 酶切位点相结合的连接方法构建含有多个基因片段的链霉菌重组表达载体。成功构建了携带外源基因的表达载体 pSET001、pSET002 和 pSET003,最终获得含有多个基因的重组质粒。双酶切载体构建时载体或 DNA 片段上可用的限制性酶切位点受到限制,通过结合重叠延伸 PCR 技术,可以利用较少的内切酶快速构建含有多个基因片段的重组载体,为红霉素生产菌的改造提供了重组载体。

关键词:重叠延伸 PCR;pSET152 载体;酶切;连接

微生物中代谢产物表达量的高低往往与其生物合成关键基因的拷贝数密切相关^[1]。通过体外构建多拷贝数基因序列,导入到宿主菌中来实现目标产物增高的相关研究在逐渐增多,而生物合

成关键基因的研究同时涉及到了大量的载体构建,因此载体系统的开发和构建策略的创新对加速基因功能的研究具有重要意义。酶切连接载体构建策略是一种经典的载体构建方法,它依赖于质粒上的多克隆位点,使用限制性内切酶和 DNA 连接酶等实现外源 DNA 片段的插入。酶切连接载体构建策略对少数几个基因的载体构建稳定可靠,但当遇到长片段基因或多基因片段组装到一

收稿日期:2020-09-13

第一作者:田平雅(1993—),女,硕士,助理工程师,从事微生物种发酵研究。E-mail: 564967039@qq.com。

Effects of Pingyangmycin on Mutagenesis of Male and Female Gametes in *Triticum aestivum* L.

LIU Wen-lin¹, ZHANG Hong-ji¹, SUN Yan¹, TANG Jing-quan¹, YANG Shu-ping¹, WANG Xiang-yu¹, ZHANG Bao-hui²

(1. Crop Resources Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, China; 2. Tenihe Farm of Hulunbuir of Inner Mongolia Autonomous Region, Hulunbuir 021000, China)

Abstract: In order to improve the mutagenic effects of chemical mutagens, pingyangmycin (20, 40 and 80 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) were injected into the glume and sheath of two wheat varieties and made a direct effect on wheat gametes by husk and sheath injection. Agronomic traits of wheat genetic offspring was investigated. The results showed that *in vivo* mutagenesis treatment, the emergence rate of the M_1 of both Longfu 06K508 and Longfu 06-6798 decreased with the increase of concentration. There was a difference in the lethal dose between the two varied by glume injection, but the median lethal dose was not achieved by leaf sheath injection. The two treatments showed variation in plant height, growth period and awn type of M_1 and M_2 . Data analysis showed that the plant height, ear length, and spikelet number of M_1 generation was significantly different to CK by glume injection method. However, the method of leaf sheath injection was not significant. Compared with CK, the ear length and spikelet number of the M_2 by leaf sheath injection method changed significantly, while the plant height and spikelet number of the glume injection method changed significantly and extremely significantly compared with CK. It indicated that the glume injection method has direct effect on male and female gametes, it was a good moisturizer and the effect time was long. It could produce abundant variations in mutagenesis progeny and be used in mutation breeding.

Keywords: wheat (*Triticum aestivum* L.); chemical mutagenesis; pingyangmycin; character variation