

花粉管通道法转基因改良小麦品质的初步研究

陈国庆¹, 王武源², 李忠超¹, 王小兰^{1*}

(1. 中国科学院华南植物园, 广东广州 510650; 2. 江西省农业工程职业学院, 江西樟树 343700)

摘要: 为在短期内提高小麦品质, 本研究构建了一个含有反义蜡质基因、HMW-GS 1Dy10 基因和抗除草剂基因的重组质粒 pWXAB, 以优良小麦品种(冀麦-24、白玉 149、9411 等)为材料, 采用花粉管通道法进行转基因研究。对转基因后代进行除草剂筛选和 SDS-PAGE 电泳。结果表明, 除草剂基因及反义蜡质基因已经整合到小麦基因组中, 从抗性水平而言, 其转化频率为 0.5%。

关键词: 品质改良; 花粉管导入法; 质粒

中图分类号: Q943 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2005)03-0245-04

Study on the improving of wheat quality by pollen tube pathway transgene

CHEN Guo-qing¹, WANG Wu-yuan², LI Zhong-chao¹, WANG Xiao-lan^{1*}

(1. *South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China;*

2. *Jiangxi Agricultural Engineering Vocational College, Zhangshu 343700, China*)

Abstract: By pollen tube pathway, plasmid pWXAB containing anti-sense waxy genes, HMW-GS 1Dy10 gene and selective marker gene of bar were transferred into three wheat lines(JM-24, BY-149 and 9411). Half of the wheat seeds were used to examine waxy protein by SDS-PAGE, and the result indicated that anti-sense waxy genes had integrated into wheat genome. Other seeds were cultured and screened by herbicide, and then 12 transformed plants were obtained. For resistance to herbicide, the transformation rate was 0.5%.

Key words: quality improving; pollen tube pathway; plasmid

小麦作为世界上最重要的粮食作物之一, 其品质改良是育种工作领域的一个热点。研究表明, 蛋白质构成影响面包的烘烤品质和营养品质(安室喜正, 1991), 而淀粉特性影响小麦籽粒的加工品质和食用品质(Miura 等, 1994)。目前在小麦品质改良领域中主要有两个热点, 一是通过特异地改变某些亚基的构成与比例, 增加小麦中蛋白质及必需氨基酸含量来改良其营养品质, 进而提高烘烤品质。二是调节淀粉生物合成途径, 以培育直链淀粉含量少甚至没有的蜡质小麦品种, 提高其加工品质。

蜡质蛋白(Wx 蛋白)为结合于淀粉颗粒上的合成酶(GBSS), 是除麦谷蛋白、麦醇溶蛋白等蛋白成

份之外的又一种储存蛋白, 其含量是谷类作物食用和加工品质的重要决定因素。它的分子量约为 60KD, 由 3 个亚基构成, 表达受基因控制, 在籽粒充实期表达丰富, 与直链淀粉的合成密切相关, 其隐性突变体籽粒中直链淀粉含量降低, 支链淀粉含量增加(Nakamura 等, 1993), 从而改变小麦的淀粉构成, 影响面粉品质、面团加工及食用品质。Wx 基因突变会导致小麦品质的改变, 但由于多倍体麦类作物有多个染色体组, 在自然界中尚未发现像玉米、水稻等作物的天然糯性突变体。

研究表明, 麦谷蛋白(HMW-GS)1Dy10 亚基与小麦的加工品质呈正相关(谢启光等, 2000)。安室

收稿日期: 2004-04-02 修订日期: 2004-07-20

基金项目: 广东省自然科学基金项目(04300465); 国际 IFS 资助。

作者简介: 陈国庆(1979-), 女, 河北邢台市人, 在读博士, 从事珍稀濒危植物的保护遗传学研究。* 通讯作者

喜正(1991)则认为 HMW-GS 1Dx5 和 1Dy10 能提高小麦烘烤品质。Barro 等(1997)通过转基因也证实 1Dx5 和 1Dy10 能提高小麦的加工品质。与美国、加拿大小麦相比,中国小麦蛋白质含量也较高,但蛋白质的质量较差,故烘烤后品质较差。这一状况主要受制于品种的遗传基础(如缺乏控制高分子谷蛋白亚基 5+10 的优质基因等等)。

随着分子生物学技术的发展,水稻的蜡质基因已经分离并克隆(Shimada 等,1993)。Visser 等(1991)通过反义 RNA 技术和转基因技术,已成功地将反义 GBSS 基因导入马铃薯,并得到块茎直链淀粉含量降低的品种。这些研究为应用基因工程技术改良小麦淀粉含量奠定了基础。为了综合提高小麦的加工品质,本研究在构建融合质粒的基础上,利用花粉管通道导入法,将 HMW-GS 1Dy10 亚基基因和反义蜡质基因同时转入小麦基因组,通过除草剂筛选得到了转基因植株。通过 SDS-PAGE 电泳分析了转基因小麦的蜡质蛋白表达情况,为基因工程培育优质小麦品种奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 菌株和质粒

菌株 *Escherichia coli* Jm109 和载体 pUC119 为本室保存,质粒 pWXA23(Shimada 等,1993)和 p5+10 分别由日本 Shimada 教授和北京市农林科学院张晓东教授惠赠。pWXA23 包含 *Gus* 报告基因,它编码 β -半乳糖苷酶,在 X-Gluc 底物作用下显兰色。另外,此质粒还含有 1.0kb 的反义蜡质基因。p5+10 质粒包含 1Dy10 亚基基因及编码抗除草剂的 *bar* 基因。*bar* 基因是单子叶植物转化常用的选择标记,编码的 PPT 是一种谷氨酰胺合成酶的竞争性抑制剂。

1.2 植物材料

冀麦-24(JM-24)、白玉 149(BY-149)、9411 等品种由河北省杂交小麦研究所提供。

1.3 工具酶及分子生物学试剂

各种限制性内切酶、T₄ DNA 连接酶、Marker 等均购自华美公司,其它各试剂均为进口或国产分析纯试剂。

1.4 反义蜡质基因的构建

质粒 DNA 的提取和纯化、目的片段的酶切和连接、重组质粒的鉴定等均参照 Sambrook(2001)的方法。

1.5 DNA 片段的回收(采用冻融法)

将包含目的片段的质粒酶切、琼脂糖凝胶电泳,并在紫外灯下切胶,放入 1.5 mL 的离心管中,加入 0.1 mL 无菌 ddH₂O,用玻棒捣碎凝胶,加入无菌 ddH₂O 至 0.5 mL 左右,加等体积的酚,震荡至无明显块状物。将离心管置液氮中 5 min,取出,室温放置片刻后置 37 °C 水浴至融解。反复操作 3 次。旋涡震荡均匀,12 000 rpm 离心 10 min。取上清,加入等体积的酚/氯仿/异戊醇(25:24:1)抽提。取上清,加入 2 倍体积的无水乙醇,1/10 体积的 3 mol/L NaAc(pH7.0),混匀,-20 °C 静置,12 000 rpm 离心 20 min,去上清,沉淀风干。加入 10 μ L 无菌 ddH₂O,溶解 DNA。

1.6 花粉管通道法转基因

选取刚刚抽穗、花药仍为绿色的冀麦-24,白玉 149,去雄,套袋隔离,在人工授粉 4 h 后,用注射器拨去柱头或者用剪刀剪去柱头的 1/3,将用 1 \times SSC 稀释的浓度为 1 μ g/ μ L 的质粒 DNA 滴在断面上。套袋,隔离至种子成熟。

1.7 小麦植株的除草剂抗性筛选

播种由花粉管导入法得到的种子,植株长至 3~4 叶期,用 5mg/L Basta 涂叶片两侧(张晓东等,1997),半小时后再涂一次,3~7 d 后观察。

1.8 籽粒的蛋白电泳检测

蜡质蛋白的提取主要参照 Zhao 等(1994)的方法。取花粉管导入法获得的小麦粒的远胚端的半粒种子夹碎,蒸馏水浸泡过夜,离心,取沉淀。用洗液(55 mmol/L Tris-HCl pH6.8;2.3% SDS 5% 2-巯基乙醇)洗 3~4 次,每次用 1 mL 洗液。蒸馏水洗 3 次,常规离心,弃上清。再用丙酮或 70%酒精洗一次,将所得淀粉颗粒室温风干,4 °C 保存备用。将所得淀粉粒加提取液(68 mmol/L Tris-HCl pH6.8 2.3% SDS 5% 2-巯基乙醇 10%甘油 0.005%溴酚兰)200~300 μ L,沸水中煮 4~5 min,冷却,12 000 rpm 离心 10 min,取上清 25~30 μ L。在垂直板凝胶电泳系统上电泳(20 mA 16 h 或 300 v 6 h)。浓缩胶 Acr:Bis=30:0.135,凝胶系统及银染方法参照王子宁等(2000)加以改进的方法。

2 结果与分析

2.1 质粒 pWXAB 的构建

用 *Hind* III 及 *Eco*R I 酶切 pWXA23,冻融法回

收 4.2kb 的 DNA 片段,克隆到 pUC119 的 *Hind* III 及 *Eco*RI 酶切位点之间,得一中间质粒 pWX1。用 *Eco*RI 完全酶切 p5+10,回收 p5+10 上含抗除草剂的片段,大小为 4.5kb,并克隆到质粒 pWX1 的 *Eco*RI 酶切位点,经酶切验证,得到含有反义蜡质基因和抗除草剂基因的新质粒,命名为 pWXAB,其大小为 11.7kb(图 1)。

2.2 除草剂筛选转基因植株

转基因麦粒的筛选,采用除草剂和籽粒蜡质蛋白电泳同时进行。将花粉管通道导入法获得的 1 176 粒种子的一半即 676 粒种子种入花盆,待长到 3~4 叶期时,用 5 mg/L 的除草剂(Basta)涂叶子两侧,绝

大多数叶子在涂抹除草剂 3d 后开始萎蔫变黄,只有 12 棵植株的叶片仍为绿色(图版 I:A),将得到的 12 棵抗性植株移入温室盆栽。为排除由于人为误差造成的假阳性,两周后,再进行一次筛选,且以未进行转基因的植株作对照,结果未进行转基因的植株全变黄,而这 12 棵植株无异常变化。同时,提取可能的转基因植株叶片总 DNA,对 *bar* 基因进行 PCR 检测,结果表明,在转入了外源基因的植株及质粒中均扩增得到大小相同的 *bar* 基因条带,而对照中无扩增带(图版 I:B),由此表明外源基因已经整合到小麦基因组中,且 *bar* 基因得到了表达,使得植株获得除草剂抗性。

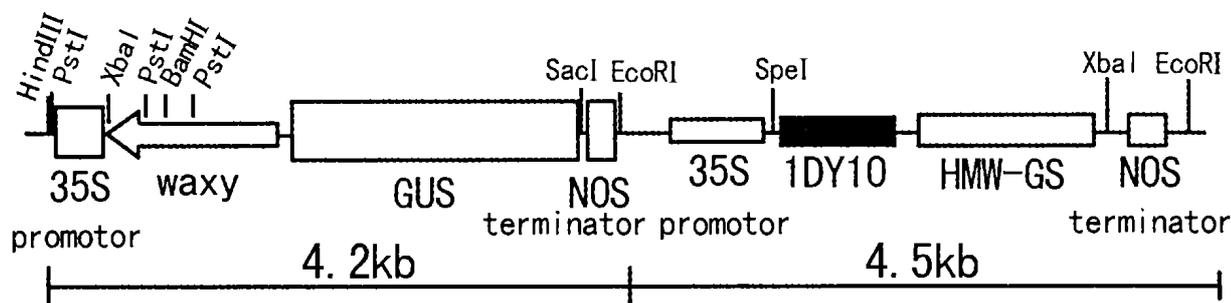


图 1 pWXAB 质粒结构图

Fig. 1 The structure of the plasmid pWXAB

2.3 花粉管通道法所获籽粒的蜡质蛋白检测

另外的近 500 粒种子,采用半粒法即切取远胚端半粒籽粒提取蜡质蛋白进行电泳,带胚端半粒保留。SDS-PAGE 电泳结果表明,其中的两粒种子缺少了三条蜡质蛋白带中的 W-B1 条带,其余均为三条蜡质蛋白带,也没有发现 W-A1、W-D1 的缺体(图版 I:C)。由于实验所选的材料均为蜡质蛋白正常小麦,在通过花粉管转基因后,出现蜡质蛋白缺失体,说明反义蜡质基因已经特异性的抑制基因的表达。其中泳道(5)的 W-B1 的含量与其它相比似乎要弱,可能也是反义蜡质基因表达的结果,但还有待于进一步的实验验证。

3 讨论

越来越多的研究表明,小麦籽粒的蛋白质构成影响烘烤品质,而占籽粒中 65%~70% 的淀粉的构成影响小麦的食用品质和加工品质(刘广田等,1997)。糯性小麦由于其糯性基因为隐性,籽粒中不含 Wx 蛋白,导致直链淀粉含量降低,其面粉将具有支链淀粉含量高、高峰粘度高和膨胀势高等特点,这

正是优质面粉所要求的。由于糯性基因对淀粉构成及性质的遗传影响及对品质的影响,使得在育种过程中不得不考虑胚乳中第一大组分淀粉的作用。糯性小麦的培育成功,将改善目前小麦品质单一的状况,发展成为面条专用小麦品种。因此,在进一步的研究工作中,可以考虑把优良高分子量麦谷蛋白亚基如 1,5+10,17+18 等与糯性基因整合到一个品种中,从而实现小麦籽粒中蛋白与淀粉的最优组合,使之成为真正的优质小麦品种。

培育糯性小麦品种目前有多种方法,包括常规育种、诱变育种和基因工程育种。但常规育种的最大弊端是育种周期长,选择效率低,选择效果差;诱变育种也存在后代分离世代长,难以纯合稳定,不利于选拔等缺点;通过基因枪法或花粉管通道法导入反义蜡质基因,抑制正常蜡质基因的表达来获得糯性小麦品种,具有周期短、目标明确等特点。本研究采用花粉管通道法将反义蜡质基因导入小麦,并且利用除草剂筛选与 SDS-PAGE 电泳检测相结合,对转基因后代进行逐级筛选,获得了 12 株除草剂抗性苗和两个糯性基因缺体。通过本项研究的结果可知利用除草剂进行筛选是比较可行的一种筛选方法,

只要剂量合适,完全可以排除由于内源抗性造成的假阳性。根据抗性水平的统计,本研究花粉管通道法转基因的转化率为 0.5%,此数据再次证明了花粉管通道导入法的可行性,花粉管通道导入法与别的转基因方法如基因枪介导法在将外源基因转化不同受体方面各有利弊,但就简单方便而言,前者优于后者。

由花粉管导入法获得的种子经 SDS-PAGE 电泳,发现了两粒 Wx-B1 缺体,从蛋白质水平上检测到外源基因已整合到小麦基因组中,并由反义 RNA 专一性地抑制了相应的 mRNA 的翻译。至于结果中只有 Wx-B1 缺体而无其它缺体出现,说明在控制蜡质蛋白的三个基因中,可能 wx-b1 基因与导入外源基因的同源性高于 Wx-a1 和 Wx-d1 与外源基因的同源性,所以被优先抑制;也可能是 wx-b1 基因较其他二者更容易突变,这一点在蜡质蛋白突变体的筛选中也得到了验证;另外可能的原因是检测工作量不够,以致 Wx-A1、Wx-D1 缺体出现机率太小。因此,要获得糯性小麦仍需进行深入的研究。

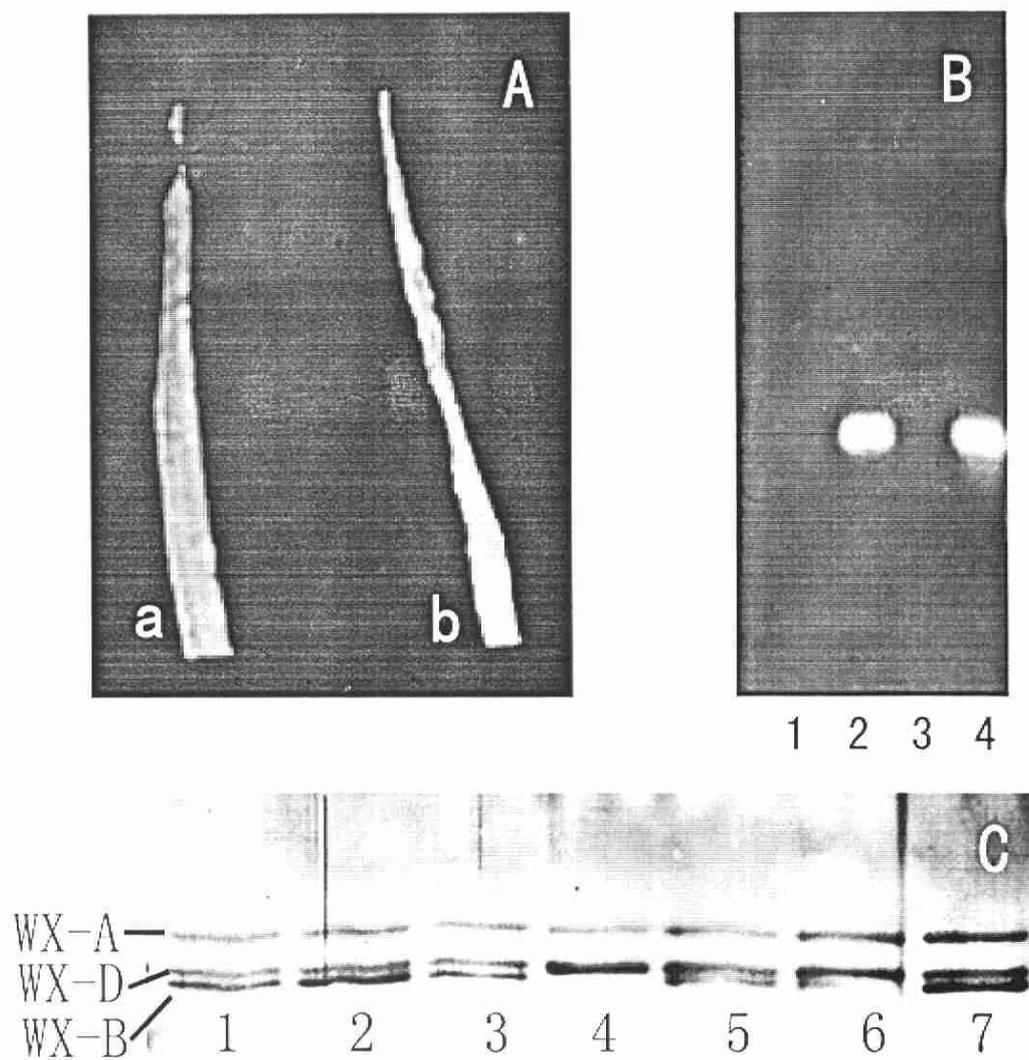
因此,通过反义 RNA 技术来抑制谷类作物蜡质基因的表达以提高作物的加工品质是可行的。此法可减少育种中筛选目的植株的工作量,使田间操作变为室内工作,选择的准确性和可靠性得到一定的保障,育种效率大大提高。至于获得糯性小麦,只是一个时间问题。这也为提高作物品质、培育新的优良品种探索了一条切实可行的新途径。

参考文献:

- 刘广田,李保云. 1997. 小麦的营养品质及品质改良[J]. 小麦研究, *STHZ* 18(1): 1-5.
- 安室喜正. 1991. 小麦种子蛋白质的遗传改良[J]. 国外农学—麦类作物, 1: 1-4.
- Barro F, Smewmy PR, Barcelo P. 1997. Transformation of wheat with high molecular weight subunit genes results in improved functional properties[J]. *Nat Biotechnol*, 15: 1295-1299.
- Miura H, Tani S. 1994. Genetic control of amylose content in wheat endosperm starch and differential effects of three Wx genes[J]. *Theor Appl Genet*, 89(3): 276-280.
- Nakamura T, Yamamori M, Hirano H, et al. 1993. Decrease of waxy (Wx) protein in two wheat cultivars with low amylose content[J]. *Plant Breeding*, 111(3): 99-105.
- Sambrook J, Russell D. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*[M]. New York: Cold Spring Harbor Lab (CSHL) Press.
- Shimada H, Tada Y, Kawasaki T, et al. 1993. Antisense regulation of the rice gene rice waxy gene using a PCR-amplified fragment of the rice genome reduces the amylose content in grain starch[J]. *Theor Appl Genet*, 86(6): 665-672.
- Visser RGF, Somhorst I, Kuipers GJ, et al. 1991. Inhibition of the expression of the gene for granule-bound starch synthase in potato by antisense constructs [J]. *Mol Gen genet*, 225(2): 289-296.
- Wang ZN(王子宁), Guo BH(郭北海), Li HJ(李洪杰), et al. 2000. SDS-PAGE for the detection of Wx protein in polyploid wheats (多倍体小麦 Wx 蛋白的 SDS-PAGE 电泳检测)[J]. *Heredity(遗传)*, 22(3): 169-171.
- Xie QG(谢启光), Huang ZJ(黄占景), Shen YZ(沈银柱). 2001. The progress and prospects of genetic engineering improving the qualities of wheat(基因工程改良小麦品质的研究进展与展望)[J]. *J Hebei Normal Univ(Nat Sci Edition)*(河北师范大学学报(自然科学版)), 2(2): 251-255.
- Zhang XD(张晓东), Li DM(李冬梅), Xu WY(徐文英), et al. 1997. Development of transgenic wheat by biolistic bombardment transferring basta resistance gene and novel HMW glutenin subunit genes(用基因枪将除草剂 Basta 抗性基因与小麦 HMW 谷蛋白亚基基因导入小麦获得转基因植株)[J]. *J North China Agricul*(华北农学报), 12(1): 133-136.
- Xiaochun Zhao, Sharp PJ. 1994. Wheat "waxy" protein; SDS-PAGE separation and variation in Australian cultivars[A]. In: *Wheat Breeding Society of Australia. Proceedings of the Seventh Assembly, Adelaide, South Australia*[C].

陈国庆, 等: 花粉管通道法转基因改良小麦品质的初步研究
 CHEN Guo-qing, *et al.*: Study on the improving of wheat quality by pollen
 tube pathway transgene

图版 I
 Plate I



A: 转化植株除草剂抗性鉴定; a: 转化植株叶片; b: 对照植株叶片。B: 转化植株 *bar* 基因的 PCR 检测; 1, 3: 对照植株的扩增结果; 2: 质粒的扩增产物; 4: 转化阳性植株的扩增产物。C: 蜡质蛋白的 SDS-PAGE 筛选; 泳道 1, 2, 3, 5, 7 为转基因后蜡质蛋白正常小麦; 4, 6 为转基因后蜡质蛋白 WX-B1 缺失体。

A: Leaves of transformed and nontransformed control plants week after inoculation of Basta solution in greenhouse; a: Leaves of transformed plant; b: Leaves of nontransformed plant. B: The identification of *bar* gene from transformed plant by PCR. Control (1, 3), Plasmid pWXAB (2) and transformed plant (4); C: The screening of WAXY protein by SDS-PAGE; Lanes 1, 2, 3, 5, 7 represented the normal waxy protein from transgenic wheats; Lanes 4, 6 represented the absent waxy protein from transgenic wheats.