

转基因小麦“中间试验”与农艺性状评价

林刚, 何光源*

(华中科技大学生命科学与技术学院中英联合实验室, 武汉 430074)

摘要: 在湖北武汉对 3 个转基因小麦品系连续 2 次进行了“中间试验”。结果表明: 在田间栽培条件下, 转基因小麦植株个体生长发育正常, 但转基因小麦主要农艺性状与对照间存在差异; 特别是小区产量与本地小麦品种之间存在极显著差异; 转基因小麦品系与其受体品系之间千粒重和小区产量上存在显著差异或极显著差异。组织化学和 SDS-PAGE 检测结果表明, 外源基因能够稳定遗传, 功能得到正确表达。

关键词: 转基因小麦; 中间试验; 农艺性状评价

中图分类号: S512.1; Q78

文献标识码: A

文章编号: 1000-470X(2004)04-0284-05

Field Trial and Agronomic Performance of Transgenic Wheat in Hubei

LIN Gang, HE Guang-Yuan*

(China-UK HUST-RRes Crop Genetic Engineering and Genomics Joint Laboratory, School of Life Science and Technology, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China)

Abstract: Three transgenic wheat lines have been evaluated under field conditions during 2 years continuously, together with 4 non-transgenic lines of wheat. Two of the non-transgenic lines are donor plants of the transgenic lines and the other two are local region cultivars used as control materials. The plant growth and development of all transgenic lines were normal under the conditions tested. But their morphological and major agronomic traits were different from the donor plants, especially when comparing with 2 local cultivars. In the yield and 1 000 grains weight, there was difference of major agronomic traits between transgenic lines and its donor lines. Results of the histochemical and SDS-PAGE analysis showed that the target genes were stably inherited.

Key words: Transgenic wheat; Field trial; Agronomic performance

利用基因工程技术改良作物农艺性状已经成为农作物新品种选育的重要手段之一。如小麦遗传转化已经在提高抗性、改良品质(面包烘烤品质)和淀粉含量等方面取得成功^[1,2]。应用基因工程技术改良作物的主要目的是在不改变受体材料遗传背景的基础上改良个别农艺特性, 如品质、抗性等。而且这些特性在其后代能够稳定遗传和正确表达。因此, 对转基因作物进行田间栽培试验, 以考察目的基因遗传表达的稳定性以及转基因小麦农艺性状表现和

适应性, 为转基因小麦商品化生产提供科学依据。

笔者报道了转高分子量麦谷蛋白亚基基因小麦在湖北武汉连续 2 次的“中间试验”, 包括转基因小麦个体生长发育和各农艺性状表现等方面的试验结果。

1 试验材料与方法

转基因小麦在湖北省武汉市的“中间试验”连续进行了 2 次, 播种期分别在 2001 年 3 月 15 日和

收稿日期: 2003-12-02, 修回日期: 2004-03-15。

基金项目: 国家转基因植物研究与产业化专项资助课题(J99-B-009)。

作者简介: 林刚(1960—), 男, 高工, 从事植物遗传栽培工作。

* 通讯作者(E-mail: hegy@mail.hust.edu.cn)。

2001 年 10 月 28 日。进行“中间试验”的试验材料共有 7 个,包括 3 个转基因小麦材料及其 2 个原受体材料,2 个湖北省本地小麦品种(鄂恩 1 号和鄂麦 18, 本文简称为 EN1 和 EM18)。转基因小麦品系 B102-1-2 和 B72-8-11b 的受体为 L88-31,导入的基因包括标记基因 *gus* 和 *bar*,而目的基因分别为 *1Ax1* 和 *1Dx5*;B73-6-1 的受体为 L88-6,导入的基因包括标记基因 *gus* 和 *bar*,目的基因为 *1Dx5*。3 个转基因品系均为第 5 代材料。对照(受体)材料 L88-6 和 L88-31 是从澳大利亚春小麦品种 Olympic 和 Gabo 杂交后代突变体中得到的姊妹系,供试材料详细背景见表 1。转化质粒中的启动子有 2 种,标记基因的启动子为玉米广谱启动子,目的基因的启动子为胚乳特异性启动子。湖北省当地品种亦作为本次试验的对照材料。

表 1 “中间试验”材料名单及背景
Table 1 The background of the varieties in the field test

材料 Material	所含 HMW 亚基 HMW subunit	导入基因 Target gene
L88-31	1Bx17+1By18	—
B72-8-11b	1Bx17+1By18	1Dx5
B102-1-2	1Bx17+1By18	1Ax1
L88-6	1Ax1,1Bx17+1By18,1Dx5+1Dy10	—
B73-6-1	1Ax1,1Bx17+1By18,1Dx5+1Dy10	1Dx5
EN1	1Bx7+1By8,1Dx2+1Dy12	—
EM18	1Ax1,1Bx14+1By15,1Dx2+1Dy12	—

田间试验采取随机区组设计,2 区组,每处理重复 6 次;每小区面积 1 m²,长宽各 1 m,沟宽 0.5 m;每小区种植 6 行,行间距 20 cm;根据湖北省的土壤、气候条件,按每公顷 225~300 万苗的播种量进

行播种;条播,播种深度为 2~3 cm;试验地四周设有保护行,宽 2 m;田间栽培管理措施参照小麦区域试验的要求进行。

转基因小麦田间试验主要对供试材料的生长发育、形态特征等各种农艺性状进行了观察记载,包括播种期、出苗期、分蘖期、分蘖数、拔节期、抽穗期、开花期、成熟期、株高、穗粒数、千粒重和小区产量等。

试验数据统计:各生长时期和主要农艺性状的统计标准,按田间试验的要求进行记录;株高和分蘖数是从每小区随机统计 3 行各单株的数据。

从各供试转基因小麦品系的混合群体中随机选取 12 粒麦粒,重复 3 次。将种子胚乳横向切成 3 份,带胚部分留着繁殖,中间部分作 SDS-PAGE 检测,剩余部分作 Gus 检测。转基因小麦种子胚乳组织化学检测(Gus 检测)参照 Jefferson 的方法^[1]进行,将切好的检测材料放入 96 孔细胞培养板,加 25 μL X-Gluc 试剂,在室温下静置 2 h,根据显色情况确定阳性或阴性,并统计阳性与阴性的分离比。

2 试验结果

2.1 供试材料生长发育各阶段物候期观察比较

从表 2 中可以看出,在秋播情况下,从播种到成熟,3 个转基因小麦品系中 L88-6 和 L88-31 的全生育天数在 200 d 左右,与本地品种之间相差 10~16 d;转基因小麦品系 B102-1-2 和 B72-8-11b 与其受体材料 L88-31 之间生育期基本相同;而转基因小麦品系 B73-6-1 与其受体材料 L88-6 之间生育期相差 3 d,但统计学上也不存在显著差异。从各个生长发育阶段来看,3 个转基因小麦品系分蘖期较本地品种迟 10~12 d,而与其受体材料 L88-6 和 L88-31

表 2 供试材料物候期观察统计结果
Table 2 Phenophase results of the varieties (day)

供试材料 Material	播种至 出苗天数 Days from sowing to seedling		出苗至 分蘖天数 Days from seedling to tillering		分蘖至 拔节天数 Days from tillering to elongating		拔节至 抽穗天数 Days from elongating to spiking		抽穗至 开花天数 Days from spiking to flowering		开花至 成熟天数 Days from flowering to maturing		生育期 Days from sowing to maturing	
	春播 Spring sowing		秋播 Autumn sowing		春播 Spring sowing		秋播 Autumn sowing		春播 Spring sowing		秋播 Autumn sowing		春播 Spring sowing	
	春播 Spring sowing	秋播 Autumn sowing	春播 Spring sowing	秋播 Autumn sowing	春播 Spring sowing	秋播 Autumn sowing	春播 Spring sowing	秋播 Autumn sowing	春播 Spring sowing	秋播 Autumn sowing	春播 Spring sowing	秋播 Autumn sowing	春播 Spring sowing	秋播 Autumn sowing
L88-31	10	7	13	47	21	59	22	38	5	9	30	45	101	205
B72-8-11b	10	7	14	47	18	58	21	41	5	7	31	45	99	205
B102-1-2	10	7	13	47	21	59	22	40	5	8	31	45	100	206
L88-6	10	7	14	45	20	60	18	37	7	8	31	48	100	205
B73-6-1	10	7	14	47	19	61	21	40	5	7	30	46	99	208
EN1	9	7	13	35	20	60	13	36	5	9	32	45	92	192
EM18	10	7	14	35	19	62	18	36	5	8	35	46	102	195

基本一致；抽穗期较本地品种迟 1~5 d。总的来看，3 个转基因小麦品系在生长发育各阶段所需的天数与其受体材料 L88-6 和 L88-31 基本一致，生长特性没有发生变化。

从 2 次试验结果来看，在春季播种的情况下，3 个转基因品系及其受体品系和 2 个本地品种的生育期只有 100 d 左右，比秋季播种的减少了 50%；从播种到抽穗，秋季播种的约需 148 d，春季约 62 d，生育天数减少了 58%；从开花至成熟，秋播历时 45~48 d，春播约需 30~35 d，灌浆时间春播比秋播少 13~15 d。从以上的统计结果可以看出，无论是转基因小麦或普通小麦，由于环境条件的改变，其生长发育也发生了明显的变化，主要表现在生长发育进程加快，生育期缩短。环境条件的这种影响对于转基因小麦或普通小麦来说是相同的。

2.2 农艺性状

从生长发育、农艺性状表现来看，3 个转基因小麦品系及其受体品系幼苗习性为半匍匐，均属弱冬性小麦，在湖北武汉地区春播和秋播的情况下能完

成生活周期；从长相长势来看，拔节抽穗后，3 个转基因小麦品系群体整齐度稍差，与其受体品系相比在幼苗习性、株型、叶形以及穗形上没有明显的变化，基本保持了其受体材料的农艺特征。

从表 3 可以看出，在春季播种的情况下，转基因小麦品系 B72-8-11b 与 L88-31 在株高上高于受体材料，存在极显著差异。B102-1-2 与 L88-31、B73-6-1 与 L88-6 之间在小区产量上比对照低，存在显著差异或极显著差异。在秋季播种的情况下，B72-8-11b 与 L88-31 在株高、和小区产量上均比对照高，存在显著差异或极显著差异；而千粒重比对照低，存在显著差异。B102-1-2 的千粒重比对照低，存在显著差异；小区产量比对照的高，存在极显著差异。B73-6-1 与 L88-6 之间，除穗粒数外，株高、千粒重和小区产量比对照明显降低，存在极显著差异；而分蘖数比对照高，存在显著差异。对转基因品系及其受体品系小区产量(秋播)作进一步的方差分析表明(表 4)，各供试材料重复间在小区产量上不存在显著差异，但各品系之间存在显著差异。

表 3 供试材料的农艺性状比较
Table 3 Agrinomic performances of the varieties

供试材料 Material	株高(cm) Plant height		分蘖数 Tillers per plant		穗粒数 Grains per spike		千粒重 1000-grain weight		产量(g) Yield	
	春播 Spring sowing	秋播 Autumn sowing	春播 Spring sowing	秋播 Autumn sowing	春播 Spring sowing	秋播 Autumn sowing	春播 Spring sowing	秋播 Autumn sowing	春播 Spring sowing	秋播 Autumn sowing
L88-31	80.7	104.1	4.7	4.8	16.8	25.9	22.5	31.9	145.2	316.7
B72-8-11b	95.0**	108.8*	5.5	4.7	21.6	25.8	23.4	30.3*	155.3	346.5**
B102-1-2	84.8	104.1	4.5	4.4	16.7	23.4	23.2	29.1**	132.7*	338.6**
LSD _{0.05}	4.6	4.4	1.1	0.9	5.1	3.8	1.8	1.4	10.6	12.9
LSD _{0.01}	6.3	5.7						2.0	14.8	17.9
L88-6	86.2	99.1	4.3	3.9	19.4	27.5	25.8	35.4	242.4	412.2
B73-6-1	85.8	92.9**	4.8	4.8*	21.0	28.4	24.8	28.5**	185.3**	352.0**
LSD _{0.05}	4.1	4.2	1.0	0.9	4.4	6.3	1.5	1.0	21.8	23.0
LSD _{0.01}		5.6						1.4	31.8	32.8

* 0.05 显著水平；** 0.01 显著水平。
* Significance at 0.05 level. ** Significance at 0.01 level.

表 4 供试材料(秋播)小区产量方差分析
Table 4 The variance analysis of wheat varieties
yield under autumn sowing

变异来源 Source of variation	DF	SS	MS	F	F _{0.01}	F _{0.05}
品种 Varieties	5	44.39	8.878	554.87	3.86	2.6
重复 Repetition	5	0.14	0.028	1.75	3.86	2.6
误差 Error	25	0.41	0.016			
总误差 Total error	35	44.94				

小麦的株高、分蘖能力、穗粒数、千粒重和产量等主要农艺性状，除受品种本身的遗传特性影响外，还和土壤肥力、种植密度、种植地区环境条件等因素有关。

对秋播材料小区产量的分析表明(表 5、表 6)，转基因小麦品系及其受体品系在小区产量上比本地品种低，存在极显著差异。这可能与受体材料本身的遗传特性以及适应性有关。而转基因材料与其受体之间，在小区产量方面也发生了一些变化，统计分析结果均达到极显著水平。从表 6 可以看出，B72-8-

表 5 新复极差测验
Table 5 The Duncan's analysis

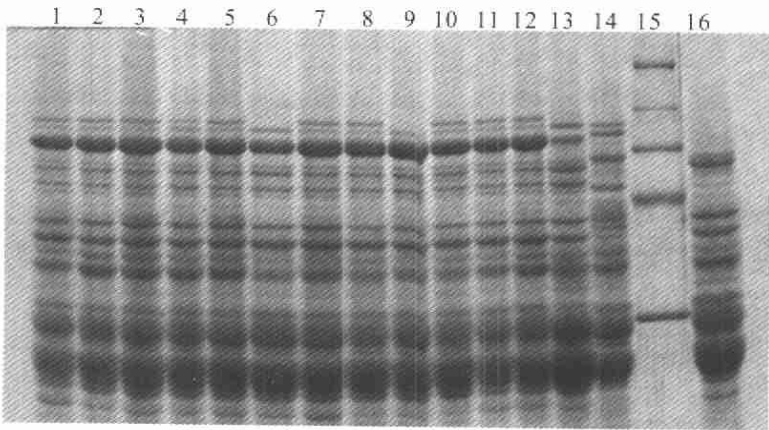
P	2	3	4	5	6
SSR0.05	2.91	3.06	3.14	3.21	3.27
SSR0.01	3.93	4.11	4.21	4.30	4.36
LSR0.05	16.0	16.8	17.3	17.7	18.0
LSR0.01	21.6	22.6	23.2	23.7	24.0

表 6 供试材料(秋播)新复极差测验结果
Table 6 The examination result of autumn sowing varieties

品名 Varieties	小区产量(g) Yield	显著水平 Significant level	
		5%	1%
EM18	640.8	a	A
L88-6	412.2	b	B
B73-6-1	352.0	c	C
B72-8-11b	346.5	c	C
B102-1-2	338.6	c	C
L88-31	316.7	d	D

11b 和 B102-1-2 与 L88-31 以及 B73-6-1 与 L88-6 之间在小区产量上均存在极显著差异;而转基因品系之间,B72-8-11b、B102-1-2 和 B73-6-1 之间不存在显著差异。B72-8-11b 和 B102-1-2 的小区产量比对照(L88-31)高,B73-6-1 的比对照(L88-6)低。转优质蛋白质基因的转基因小麦千粒重和小区产量降低可能与其蛋白质含量提高有关。从凝胶电泳图(图 1)上也可以地看出,B73-6-1 的 *IDx5* 亚基条带比 L88-6 的明显加粗。

从 2 次“中间试验”的结果来看,除穗粒数外,7 个供试材料第一次与第二次试验结果,在株高、分蘖数、千粒重和小区产量等方面都存在显著差异或极显著差异。引起转基因小麦农艺性状发生变化的主要原因不仅与栽培地区的气候条件以及栽培措施有关,包括温度、光照和栽培管理方法等,也可能与遗传操作引起基因型改变有关。在武汉地区春季播种小麦,由于开春以后气温逐渐升高,日照时间逐渐



1—12. B73-6-1; 13. L88-6; 14. EM18; 15. Standard; 16. L88-31

图 1 供试材料 SDS-PAGE 图谱
Fig. 1 SDS-PAGE results of the varieties

变长,小麦生长速度和发育进程比秋播的明显加快。因而营养生长期减少,生育期缩短,影响有效成分的积累,从而使穗粒数和千粒重降低,产量明显下降。

2.3 组织化学检测

对供试材料的种子进行组织化学和 SDS-PAGE 检测结果表明(表 7),在转基因小麦品系 B73-6-1 和 B72-8-11b 后代中导入的标记基因(*gus*)和目的基因(*IDx5*)均能表达;而 B102-1-2 的籽粒经 *gus* 检测无显色反应,经 SDS-PAGE 检测,*IAx1* 基因能正确表达。SDS-PAGE 检测还发现 B73-6-1 的 *IDx5* 条带明显比对照的粗,可能 *IDx5* 亚基在 B73-6-1 品系中发生超表达现象。

表 7 转基因小麦外源基因表达检测结果
Table 7 Analysis of the expression of target genes in transgenic wheat

材料名称 Material	导入基因 Foreign gene		外源基因表达 Expression of foreign gene	
	<i>gus</i>	<i>bar</i>	目的基因 Target gene	目的基因 Target gene
L88-31	—	—	—	—
B72-8-11b	+	+	<i>IDx5</i>	+
B102-1-2	+	+	<i>IAx1</i>	+
L88-6	—	—	—	—
B73-6-1	+	+	<i>IDx5</i>	+
EN1	—	—	—	—

注:“+”表示阳性反应;“—”表示阴性反应。
Notes: “+” means colour reaction; “—” means non colour reaction.

3 讨论

连续2次“中间试验”的结果表明,转基因小麦在春季和秋季播种情况下,植株个体生长发育正常,形态特征未发生较大改变,能正常完成生活周期。但由于基因型和栽培条件的影响,转基因小麦品系在株高、千粒重和产量方面均发生了一些变化,这种变化可能与基因型的改变有关。一般来讲,小麦籽粒蛋白质含量与产量成反比,引起千粒重和产量降低的原因是否与外源基因超表达,引起种子储藏蛋白含量提高有关,需要进一步进行检测分析。

在试验中观察到少数转基因株系的个别单株生长发育与群体不一致,如抽穗、开花、成熟和整穗不结实等。从国内外研究报道来看,许多学者认为在遗传转化过程中,组织培养、外源基因导入、选择剂筛选等过程都会引起染色体变异,如突变、断裂、易位等,产生一系列的体细胞克隆变异^[2-4],从而造成转基因植物后代在农艺性状上产生一系列变化;另外一个原因是由于外源基因插入位点造成的位置效应引起的^[5-7]。许多学者的研究^[8-12]都发现了类似的现象。Barro等^[13]认为转基因小麦株系从抽穗到抽穗完毕所需的天数较长可能与体细胞克隆变异、组织培养诱导和转化过程等因素引起染色体变异有关。Lynch等^[14]报道转基因水稻的植株变小、花期推迟和育性降低;崔海瑞等^[15]报道转基因抗虫水稻的株高、穗长、育性、单株产量和千粒重等明显降低,而单株分蘖数增多,落粒性增强,开花期推迟,后期叶片转色速度慢。

对供试材料组织化学和 SDS-PAGE 检测结果表明,3个转基因小麦外源基因均能遗传给下一代,功能得到正确表达。B102-1-2品系 *gus* 基因发生丢失或沉默,目的基因能稳定遗传并正确表达。

通过植物基因工程技术将外源优质高分子量麦谷蛋白亚基基因导入到小麦品种中,其后代目的基因能够稳定遗传,功能得到正确表达。转基因小麦的生长发育表现和主要农艺性状基本保持了原受体品系的特性。虽然转基因小麦株系的产量比本地小麦品种低,但这种带有标记基因同时含有优质品质基因的材料可作为一种杂交亲本加以利用,为杂交后代早期单株选择提供帮助。

参考文献:

- [1] Jefferson R A. Assaying chimeric genes in plants: The *GUS* gene fusion system[J]. *Plant Mol Biol Rep*, 1987, 5: 387-405.
- [2] Altman D W, Stelly D M, Mitten D M. Quantitative trait variation in phenotypically normal regenerants of cotton [J]. *In vitro cell dev biol*, 1991, 27: 132-138.
- [3] Stelly D M, Altman D W, Kohel R J, Rangan T S, Comiskey E. Cytogenetic abnormalities of cotton somaclones from callus cultures [J]. *Genome*, 1989, 32: 762-770.
- [4] Zhang S, Warkentin D, Sun B, Zhong H, Sticklen M B. Variation in the inheritance of expression among subclones for unselected (*uidA*) and selected (*bar*) transgenes in maize (*Zea mays* L.) [J]. *Theor Appl Genet*, 1996, 92: 752-761.
- [5] Benedict J H, Sachs E S, Altman D W, Deaton W R, Kohel R J, Ring D R, Berberich S A. Field performance of cottons expressing transgenic CryIA insecticidal proteins for resistance to *Heliothis virescens* and *Heliocoverpa zea* [J]. *Eco Ent*, 1996, 89: 230-238.
- [6] Leuhrs K R. Insertion of *Mul* elements in the first intron of the *Adh1-S* gene of maize results in novel RNA processing events [J]. *Plant Cell*, 1990 (2): 1225-1238.
- [7] Van L M, Vanderhaeghen R, Van M M. Insertional mutagenesis in *Arabidopsis thaliana*: isolation of a T-DNA Linked mutation that alters leaf morphology [J]. *Theor Appl Genet*, 1991, 81: 277-284.
- [8] Bao P H, Granata S, Castiglione S, Wang G, Giordani C, Cuzzoni E, Damiani G, Bandi C, Datta S, Datta K, Potrykus I, Callegarin A, Sala F. Evidence for genomic changes in transgenic rice (*Oryza sativa* L.) recovered from protoplasts [J]. *Transgenic Res*, 1996, 5: 97-103.
- [9] Breitzger P, Halbert S E, Lemaux P G. Somaclonal variation in the progeny of transgenic barley [J]. *Theor Appl Genet*, 1998, 96: 421-425.
- [10] Hayashimoto A, Li Z, Murai N. A polyethylene glycol-mediated protoplast transformation system for the production of fertile transgenic rice plants [J]. *Plant Physiol*, 1990, 93: 857-863.
- [11] Peng J, Kononowicz H, Hodges T K. Transgenic indica rice plants [J]. *Theor Appl Genet*, 1992, 83: 855-863.
- [12] Cai W Q, Fang R X, Shang H S, Wang X, Zhang F L, Li Y R, Zhang J C, Cheng X Y, Wang G L, Mang K Q. Development of CMT- and TMV-resistant transgenic chili pepper: field performance and biosafety assessment [J]. *Molecular Breeding*, 2003, 11: 25-35.
- [13] Barro F, Barceló P, Lazzeri P A, Shewry P R, Martín A, Ballesteros J. Field evaluation and agronomic performance of transgenic wheat [J]. *Theor Appl Genet*, 2002, 105: 980-984.
- [14] Lynch P T, Jones J, Eyles P S, Blackhall N W, Cocking E C, Power J B, Davey M R. The phenotypic characterisation of R2 generation transgenic rice plants under field and glasshouse conditions [J]. *Euphytica*, 1995, 85: 395-401.
- [15] 崔海瑞,舒庆尧,叶恭银. 转CryIAb基因水稻农艺性状的大田表现: 生物科学研究进展[M]. 杭州: 杭州大学出版社, 1998. 810-816.