

转基因小麦外源优质亚基基因的杂交转育研究

王娜丽, 汪越胜, 李 举, 李三和, 何光源*

(华中科技大学中英 HUST-RRes 基因工程和基因组学联合实验室, 武汉 430074)

摘 要: 在获得外源品质基因 *1Dx5* 和 *1Ax1* 超量表达的转基因小麦的基础上, 利用小麦转基因品系 'B72-8-11b' 和 'B102-1-2' 为父本, 主要以湖北省栽培品种 '鄂麦 12' 为母本, 配置杂交组合。杂交后代中采用系谱选择法, 结合 HMW-GS 鉴定, 研究了转基因小麦外源品质基因在 F_1 、 F_2 、 F_3 、 F_4 代的传递, 并筛选出外源 *1Dx5* 或 *1Ax1* 基因保持超表达的 2 个新型转基因株系; 同时证明了将外源品质基因向栽培品种转育, 是提高小麦优质亚基含量和提高 HMW-GS 总量的有效方法之一。

关键词: 转基因小麦; 超量表达; 新种质

中图分类号: S512.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-470X(2007)04-0331-04

Studies on Transgenes *1Dx5* and *1Ax1* Transferred into Elite Wheat Cultivars by Cross Breeding

WANG Na-Li, WANG Yue-Sheng, LI Ju, LI San-He, HE Guang-Yuan*

(China-UK HUST-RRes Genetic Engineering and Genomics Joint Lab, Huazhong University of Science & Technology, Wuhan 430074, China)

Abstract: For introducing the transgenes from transgenic wheat 'B72-8-11b' and 'B102-1-2' into elite wheat lines, two wheat crosses had been made in 2002. In the crosses, elite subunits *1Dx5* and *1Ax1* were over-expressed in the male parents 'B72-8-11b' and 'B102-1-2' respectively, while the female parent 'Emai 12' were selected with better agronomic traits. The expression of exogenous *1Dx5* and *1Ax1* gene in F_1 , F_2 , F_3 and F_4 generations was tested by SDS-PAGE, then the inheritance patten of the transgenes was analysed. Two lines had been selected from the progenies of the crosses in which the subunit *1Dx5* or *1Ax1* is over-expressed and the endogenous HMW-GS compositions are different from each other. The results demonstrated that the introduction of transgenes from transgenic wheat lines into elite varieties by crossing is an effective way to transfer extra HMW-GS gene.

Key words: Transgenic wheat; Over-expression; New germplasm

小麦是我国第二大粮食作物, 改良其品质、提高产量与抗性是我国小麦育种的重要目标。小麦品质包括营养品质和加工品质, 其中的加工品质与小麦胚乳中储藏蛋白的组成紧密相关。小麦储藏蛋白包括麦谷蛋白和醇溶蛋白, 醇溶蛋白赋予面团展性, 麦谷蛋白赋予面团弹性。根据分子量的不同, 又可以把麦谷蛋白分为高分子量麦谷蛋白 (high molecular weight glutenin subunit, HMW-GS) 和低分子量麦谷蛋白 (low molecular weight glutenin subunit, LMW-GS), 其中 HMW-GS 与小麦品种的烘烤品质密切相关^[1-7], 小麦品质变异的 30% ~ 70% 可归因于高分子量麦谷蛋白等位亚基的变异。不同的小麦栽培品种间亚基的数量、等位基因变异类型及基因表达水

平的差异可导致品种间在加工品质上的多样性。目前在小麦中发现的 HMW-GS 亚基有 20 多种, 由于某些编码基因的沉默, 每个小麦品种中通常只表达其中的 3 ~ 5 种。近年来的遗传转化实验表明, 通过向普通栽培小麦品种中导入编码优质亚基的基因 (如 *1Ax1*、*1Dx5*), 可以改善面包烘烤品质^[8,9]。而且转基因技术进一步明确了 *1Ax1*、*1Dx5* + *1Dy10* 等亚基有利于增加面团弹性, Glu-D1 位点上的 *1Dx5* + *1Dy10* 基因的连锁表达对面团品质的提高尤为明显^[10,11]。

本研究以外源品质基因 *1Dx5* 和 *1Ax1* 超量表达的转基因小麦为品质基因供体, 与湖北省农艺性状优良的栽培小麦品种杂交, 试图将外源品质基因转

收稿日期: 2007-01-29, 修回日期: 2007-03-05。

基金项目: 国家 973 科技基金项目 (2002CB111302)。

作者简介: 王娜丽 (1982 -), 女, 硕士, 研究方向为基因组学。

* 通讯作者 (E-mail: hegy@hust.edu.cn)。

移到国内小麦品种中,获得 *IDx5* 和 *IAx1* 超量表达的株系,提高 HMW-GS 的总含量,特别是优质亚基含量,为进一步品质育种提供新的优良种质。

1 材料与方法

1.1 杂交亲本

杂交亲本及其 HMW-GS 组成见表 1,其中转基因小麦由中英联合实验室英方合作单位英国洛桑研究所提供。转基因小麦‘B72-8-11b’和‘B102-1-2’都是由 Barro 等^[12]采用基因枪法通过两个质粒共转化获得。转化中共同使用的一个质粒是 pAHC25,携带标记基因 *bar* 和 *uidA*,上游连接广谱 *ubiquitin* 启动子;另两个质粒是 pIDx5 和 pIAx1,分别携带高分子量麦谷蛋白基因 *IDx5* 和 *IAx1*。转化受体‘L88-31’是组织培养、遗传转化的模式品种,只有 17+18 两个高分子质量麦谷蛋白亚基。转基因植株连续自交,采用系谱选择法传代,获得 *IDx5* 和 *IAx1* 基因超表达的 T_7 代纯系。2001 年到 2006 年期间,经国家农业部批准,本实验室对上述转基因材料进行了中间试验、环境释放试验及生产性试验。同时用此作为杂交组合的父本,提供优质外源基因 *IDx5* 和 *IAx1*。母本‘鄂麦 12’具有优良农艺性状但面包烘烤品质较差。希望能通过配制杂交组合的方法从后代中选育出既有母本优良背景,又具有超量表达的外源优质亚基的株系。

表 1 杂交组合亲本及其 HMW-GS 组成
Table 1 The HMW-GS composition of the parents in the crosses

杂交亲本 Parents in crosses	亲本材料亚基组成 The HMW-GS composition of the parents			
	1A	1B	1D	外源亚基
‘B72-8-11b’	null	17+18	null	5
‘B102-1-2’	null	17+18	null	1
‘鄂麦 12’	null	7+8	2+12	null
‘Emai 12’				

1.2 杂交后代检测

2002 年配置杂交组合,2003 年获得 F_1 代(种子),采用系谱选择法繁殖后代,2004 年获得 F_2 代(种子),2005 年获得 F_3 代(种子)。采用 SDS-PAGE 技术,检测各世代种子高分子量麦谷蛋白亚基组成,包括外源 *IDx5* 和 *IAx1* 基因的表达。 F_2 代是广泛分离的群体,检测后将具有不同亚基组成的种子分别播种,收获 F_3 代种子。每一类 F_3 代种子检测 12 粒。同时我们还用组织化学法检测了 F_3 代种子中 *udiA* 基因的表达。将检测过的 F_3 代半粒种子单独播种,收获 F_4 代种子,每株取 8 粒检测其 HMW-GS 的组成。

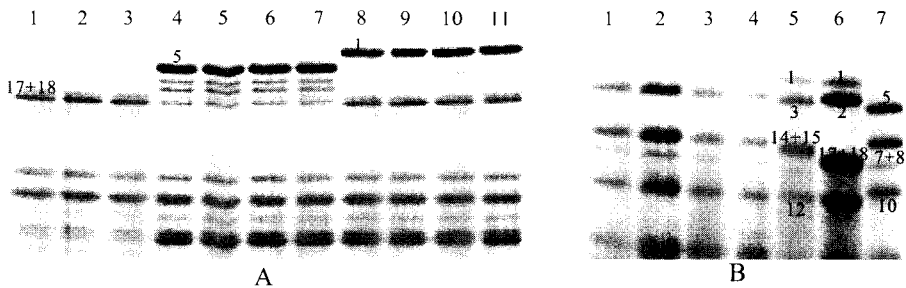
2 结果

2.1 亲本 HMW-GS 的鉴定

转基因小麦‘B72-8-11b’的多代种子胚乳通过 SDS-PAGE 方法检测 HMW-GS 组成,结果表明:转基因纯系与受体对照‘L88-31’相比,增加了 3 条带,不同世代间都表现出稳定的传递。转基因小麦‘B102-1-2’与受体对照‘L88-31’相比,增加了 2 条带并稳定遗传。正如 Barro 等^[12]报道,这些新带都是外源基因或其变异体的表达产物。杂交组合中的母本‘鄂麦 12’的 HMW-GS 组成为 7+8、2+12(见图 1)。

2.2 杂交后代检测

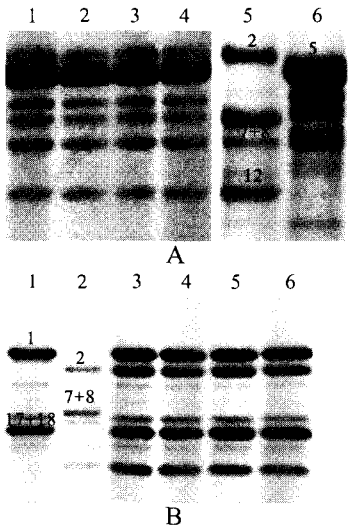
2.2.1 亚基组成的检测 对 F_1 、 F_2 代种子的 SDS-PAGE 检测显示,外源品质基因在后代中都呈现显性表达。 F_2 代是广泛分离的群体,其中出现了不同的亚基组成。将含有不同亚基的种子分别播种之后收获 F_3 代种子。2005 年 10 月底对检测过的半粒小麦及其他材料进行播种,2006 年 6 月收获 F_4 代种子。根据连续三代种子 SDS-PAGE 检测结果,我们从杂交后代中筛选出多个遗传稳定的新型转基因



A. 泳道 1~3: ‘L88-31’; 4~7: ‘B72-8-11b’; 8~11: ‘B102-1-2’。B. 泳道 1~4: ‘鄂麦 12’; 5~7: 高分子量麦谷蛋白亚基组成的标准品种
A. Lane 1~3: ‘L88-31’; 4~7: ‘B72-8-11b’; 8~11: ‘B102-1-2’。B. Lane 1~4: ‘Emai 12’; 5~7: Standard lines for HMW-GS composition

图 1 杂交组合中亲本的 HMW-GS 组成

Fig. 1 The HMW-GS compositions of parents in crosses



A. 泳道 1~4: '鄂麦 12' × 'B72-8-11b' 后代中纯系; 5: '鄂麦 12'; 6: 'B72-8-11b'。B. 泳道 1: 'B102-1-2'; 2: '鄂麦 12'; 3~6: '鄂麦 12' × 'B102-1-2' 后代中纯系
A. Lane 1~4: The progeny of 'Emai 12' × 'B72-8-11b'; 5: 'Emai 12'; 6: 'B72-8-11b'. B. Lane 1: 'B102-1-2'; 2: 'Emai 12'; 3~6: The progeny of 'Emai 12' × 'B102-1-2'

图 2 杂交后代中新型纯系的 HMW-GS 组成

Fig.2 The HMW-GS compositions of new lines, selected from the progenies of crosses

纯系,其中 2 个株系经过了大样本鉴定证实。其 HMW-GS 组成列于图 2。

2.2.2 *udiA* 基因表达 采用组织化学法检测对 F₃ 代籽粒中进行 GUS 检测。共检测种子 552 粒,其中 GUS 检测呈阴性的 95 粒,约占总检测数的 17.21%;外源基因超量表达同时 GUS 检测阴性的籽粒有 51 粒,占总检测数的 9.24%。这些籽粒出现在'川 89' × 'B102-1-2', '鄂麦 18' × 'B102-1-2', '鄂麦 12' × 'B102-1-2' 三个杂交组合中。

3 讨论

小麦是我国第二大粮食作物,其种植面积和总产量仅次于水稻,是我国重要的商品粮食和战略性的主要粮食储藏品种。长期以来我国的小麦育种只重视产量,而忽视籽粒的品质改良,致使我国小麦品质改良工作落后于欧洲。随着市场经济的发展,人民生活水平的提高,国内对各种专用粉,如面包粉、糕点粉的需求日益增加,而国内专用小麦品质仍不能满足相应要求。有些国家甚至针对我国小麦、市场的现状和人们的膳食习惯,发展适合我国市场需要的小麦品种,以期进一步扩大对我国的出口。加入世贸组织后,我国优质小麦市场面临更大的挑战,若不能尽快提高我国小麦遗传改良技术的研究开发水平,加快优质小麦产业化进程,欧美等国必将在小

麦品质改良方面对我国整个小麦生产带来极大冲击。我们通过将优质外源品质基因导入国内栽培品种,发展适合面包加工的小麦品种,并希望相关品种能获得广泛种植,满足我国对面包小麦的需求。

HMW-GS 是面团延展特性的主要决定因素,面粉烘烤品质与小麦品种的 HMW-GS 组成、含量的差异密切相关,近年来的许多遗传转化实验表明了优质亚基(如 1Ax1、1Dx5)对改善小麦面包烘烤品质的作用。我们的研究成功实现了将外源优质基因导入国内栽培品种,丰富了国内小麦品种中高分子量麦谷蛋白的种类,突破了小麦种子中只含 3~5 种麦谷蛋白亚基的界限,其中出现的一些亚基在现有小麦品种中从未发现过;而且,外源优质基因的表达量是内源相应基因的 5~8 倍,为进一步研究麦谷蛋白的功能及其相互作用提供了极佳的材料。

小麦籽粒中 HMW-GS 从质量和数量两个方面影响着其加工品质。含有不同数量的 HMW-GS 的小麦品种,它们的籽粒蛋白质含量存在差异,即使在亚基数量相同的情况下,由于不同亚基对加工品质的贡献不同,也会导致具有相同数量 HMW-GS 的品种在小麦加工品质上较大的差异。我们在研究中创制的小麦品种不仅改变了本地小麦 HMW-GS 组成,在提高了小麦中 HMW-GS 含量的同时,也提高了优质外源亚基 1Dx5 和 1Ax1 在 HMW-GS 含量中的比例。利用新创制的种质,可以在更丰富的背景上研究小麦中不同 HMW-GS 组成对加工品质的影响,同时对研究 1Dx5 和 1Ax1 亚基的功能作用机理具有重要意义。

研究中筛选到了不含 *udiA* 基因的材料类型。*udiA* 基因的缺失使基因安全得到进一步的保障,也使转基因小麦的商品化生产成为可能。

参考文献:

[1] Rogers W J, Payne P I, Harinder K. The HMW glutenin subunit and gliadin compositions of german-grown wheat and their relationship with bread-making quality [J]. *Plant Breeding*, 1989, 103: 89 - 100.
[2] Lukow O M, Payne P I, Tkachuk R. The HMW glutenin subunit compositions of canadian wheat cultivars and their association with bread-making quality [J]. *J Sci Fd Agric*, 1989, 46 (4): 451 - 460.
[3] 赵友梅,王淑俭. 高分子量麦谷蛋白亚基的 SDS-PAGE 图谱在小麦品质研究中的应用[J]. *作物学报*, 1990, 16(3): 208 - 218.
[4] 马传喜,吴兆苏. 小麦胚乳蛋白质组成及高分子量谷蛋白亚基与烘烤品质的关系[J]. *作物学报*, 1993, 19(16): 562 -

- 566.
- [5] Shewry P R, Halford N G, Tatham A S. The high molecular weight subunits of wheat barley and rye: genetics, molecular biology, chemistry and role in wheat gluten structure and functionality [J]. *Oxford Survey of Plant Molecular Cell Biology*, 1989, 6: 163 - 219.
- [6] Payne P I, Corfield K G, Holt L M, Blackman J A. Correlations between the inheritance of certain high-molecular-weight subunits of glutenin and bread-making quality in progenies of six crosses of bread wheat [J]. *J Sci Fd Agric*, 1981, 32: 51 - 60.
- [7] Payne P I, Holt L M, Law C N. Structural and genetical studies on the high-molecular-weight subunits of wheat glutenin. Part 3: Telocentric mapping of the subunit genes on the long arm of the homoeologous group 1 chromosome [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1982, 63: 129 - 138.
- [8] He G Y, Rooke L, Steele S, Békés F, Gras P, Tatham A S, Fido R, Barcelo P, Shewry P R, Lazzeri P A. Transformation of pasta wheat (*Triticum turgidum* L. var. *durum*) with high-molecular-weight glutenin subunit genes and modification of dough functionality [J]. *Molecular Breeding*, 1999, 5: 377 - 386.
- [9] 张晓东, 梁荣奇, 陈绪清, 杨凤萍, 张立全. 优质 HMW 谷蛋白亚基转基因小麦的获得及其遗传稳定性和品质性状分析 [J]. *科学通报*, 2003, 48(5): 474 - 479.
- [10] Shewry P R, Halford N G, Tatham A S. High molecular weight subunits of wheat glutenin [J]. *J Cereal Sci*, 1992, 15: 105 - 120.
- [11] Pastori M G, Wilkinson D M, Steele H S, Sparks A C, Jones D H, Parry A J M. Age-dependent transformation frequency in elite wheat varieties [J]. *J Exp Bot*, 2001, 52(357): 857 - 863.
- [12] Barro F, Rooke L, Bekes F, Gras P, Tatham A S, Fido R, Lazzeri P A, Shewry P R, Barcelo P. Transformation of wheat with high molecular weight subunit genes results in improved functional properties [J]. *Nature Biotechnology*, 1997, 15: 1295 - 1299.

《植物遗传资源学报》2008 年征订启事

《植物遗传资源学报》是中国农业科学院作物科学研究所和中国农学会主办的专业性学术期刊, 全国优秀农业期刊, 由中国农科院副院长刘旭先生担任主编。该刊为中国科技核心期刊(中国科技论文统计源期刊)、中国科学引文数据库来源期刊(核心期刊)、中国核心期刊(遴选)数据库收录期刊、中国学术期刊综合评价数据库统计源期刊, 又被《中国生物学文摘》和中国生物学文献数据库、中文科技期刊数据库收录。据中国期刊引证研究报告统计, 2006 年度《植物遗传资源学报》影响因子达 0.872。

报道内容为大田、园艺作物, 观赏、药用植物, 林用植物、草类植物及其一切经济植物的有关植物遗传资源基础理论研究、应用研究方面的研究成果、创新性学术论文和高水平综述或评论。诸如, 种质资源的考察、收集、保存、评价、利用、创新、信息学、管理学等; 起源、演化、分类等系统学; 基因发掘、鉴定、克隆、基因文库建立、遗传多样性研究。

季刊, 大 16 开本, 128 页。定价 20 元, 全年 80 元。各地邮局发行, 邮发代号: 82-643。国内刊号 CN11-4996/S, 国际统一刊号 ISSN1672-1810。本刊编辑部常年办理订阅手续, 如需邮挂每期另加 3 元。

地 址: 北京市中关村南大街 12 号 中国农业科学院《植物遗传资源学报》编辑部

邮 编: 100081 电 话: 010-62180257 62180279(兼传真)

E-mail: zwyczyxb2003@163.com zwyczyxb2003@sina.com

欢迎投稿, 欢迎订阅