

小麦高分子量麦谷蛋白 14 亚基基因的 花粉管通道法转化

刘香利,刘 缙,郭蔼光,赵惠贤,金伟波

(西北农林科技大学 生命科学学院,陕西省农业分子生物学重点实验室,陕西 杨凌 712100)

【摘 要】 【目的】利用优质高分子量麦谷蛋白亚基对小麦进行遗传转化和品质改良。【方法】采用花粉管通道法,将小麦高分子量麦谷蛋白 14 亚基基因导入洛阳 8716、陕 354、陕 893、小偃 107 和陕 150 5 种不含该亚基的小麦品种中,转化后代在大田播种出苗后,利用小麦高分子量麦谷蛋白 14 亚基基因特异性引物进行 PCR 检测,分析其转化率。【结果】不同品种、不同处理间转化率存在很大差异,其中以陕 354 授粉后切去柱头,滴加 50 ng/ μ L DNA 液处理的转化率最高,为 1.01%,所有转化材料的平均转化率为 0.56%。【结论】利用花粉管通道法对小麦进行遗传转化是可行的。

【关键词】 小麦;花粉管通道法;转基因小麦;PCR 法检测

【中图分类号】 S512.135.3;Q78 【文献标识码】 A 【文章编号】 1671-9387(2008)01-0121-04

Transformation of wheat high molecular weight gluten subunit 14 gene by pollen tube pathway

LIU Xiang-li,LIU Jin,GUO Ai-guang,ZHAO Hui-xian,JIN Wei-bo

(College of Life Sciences,Northwest A & F University,Key Laboratory of Plant Molecular Biology
of Shaanxi Province,Yangling,Shaanxi 712100,China)

Abstract: 【Objective】 The study was to improve the bread-making quality of wheat. 【Method】 High molecular weight glutenin subunit 14 gene was transformed into five wheat varieties by pollen tube pathway. The progenies were grown in field and the leaf genomic DNA of each progenies were extracted. Transformants were identified by PCR using the specific primer of high molecular weight glutenin subunit 14 gene. 【Result】 The result showed that the differences between varieties and treatments were significant,among which the transformation frequency of Shaan 354 with 50 ng/ μ L DNA was the highest. The average transformation frequency of all varieties was 0.56%. 【Conclusion】 Therefore it is a potential way to transform wheat by pollen tube pathway.

Key words: wheat;pollen tube pathway;transformation wheat;PCR

小麦是世界上栽培面积最大的粮食作物。随着食品加工业的发展和人民生活水平的提高,对优质面包小麦的需求量日益增加。研究表明,小麦高

分子量麦谷蛋白亚基(HMW-GS)的组成与其加工品质密切相关^[1-2]。对我国小麦品种 HMW-GS 组成的分析表明,我国的一些优质小麦品种,如小偃 6

* 【收稿日期】 2006-12-30

【基金项目】 国家转基因研究与产业化开发专项(JY03-A-13-01);西北农林科技大学博士点创新基金;西北农林科技大学校青年专项基金

【作者简介】 刘香利(1972—),女,陕西杨凌人,讲师,在读博士,主要从事生物化学与分子生物学研究。

【通讯作者】 郭蔼光(1942—),女,陕西西安人,教授,博士生导师,主要从事生物化学与分子生物学研究。

号、陕 225 等并不含有优质亚基 1Dx5+1Dy10,但却含有另一类优质亚基 1Bx14+1By15^[3-4]。本研究室纯化获得了 14+15 亚基并测定了其 N 端序列^[5],克隆了 14 亚基基因并获得国家专利^[6]。因此,利用基因工程方法向普通小麦栽培品种导入有自主知识产权的 1Bx14 亚基基因,改善小麦加工品质,将对小麦优质育种具有重大的理论价值和实践意义。

小麦遗传转化中广泛使用的基因枪法和农杆菌转化法,均需经过组织培养过程,而小麦胚性愈伤组织的分化能力在很大程度上受到基因型的影响,这使小麦转化材料的选用受到了很大限制。由我国学者周光宇等^[7]提出来的花粉管通道法,避免了复杂的组织培养、植株再生过程,可以直接收获转化种子,已成为小麦遗传转化的有效途径^[8-10]。本研究利用花粉管通道法,将含有麦谷蛋白 14 亚基基因的

质粒导入普通小麦中,以期获得优质亚基转化后代,为利用优质基因改良小麦品质探索新途径。

1 材料与方法

1.1 材 料

洛阳 8716、陕 354、陕 893、小偃 107、陕 150 5 个不含高分子质量麦谷蛋白 14 亚基的小麦栽培品种和对照小偃 6 号,均由西北农林科技大学生命学院赵惠贤教授提供,播种于西北农林科技大学实验田。含高分子量麦谷蛋白 14 亚基基因质粒 pin438-HMW-GS14 由本研究室构建,其含有来自 CaMV 的增强型 35S 启动子(ED35S 启动子)启动的小麦高分子量麦谷蛋白 14 亚基基因及其 3'-utr 片段和 Nos 启动子启动的筛选标记基因 *Npt II* 基因(图 1)。含有质粒 pin438-HMW-GS14 的大肠杆菌 JM109 和农杆菌 LBA4404 由本研究室保存。

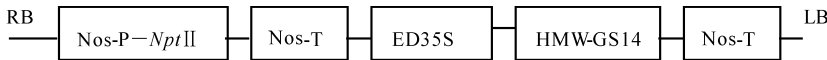


图 1 质粒 pin438-HMW-GS14 的 T-DNA 区
Fig. 1 T-DNA region of plasmid pin438-HMW-GS14

1.2 方 法

1.2.1 质粒 DNA 的制备 大量培养含有质粒 pin438-HMW-GS14 的大肠杆菌 DH5 α ,采用常规碱裂解法提取质粒,并用 PEG 法对其进行纯化^[11],根据不同处理用双蒸水分别稀释成 300 和 500 ng/ μ L。将含质粒 pin438-HMW-GS14 的农杆菌 LBA4404,用含卡那霉素和利福平各 50 mg/L 的液体 YEB 培养基(牛肉浸膏 5 g/L,酵母浸膏 1 g/L,蛋白胨 5 g/L, MgSO₄ · 2H₂O 0.493 g/L, pH 7.0),28 ℃培养至 OD₆₀₀ 值为 0.5,5 000 r/min 离心 10 min 收集菌体,使用 MS 液体培养基洗涤后,用含 0.2 mmol/L 乙酰丁香酮的 MS 液体培养基分别重悬至 OD₆₀₀ 值为 0.3 和 0.5。

1.2.2 对小麦的转化及转化后代的获得 各待转化小麦品种于开花前 1~2 d 去雄套袋,在各品种盛花期用自身花粉授粉并套袋,授粉 30 min 后用刀片切去柱头,分别滴加质量浓度为 300 ng/ μ L 的 DNA 溶液 10 μ L(记为处理 1),滴加质量浓度为 500 ng/ μ L 的 DNA 溶液 10 μ L(记为处理 2);滴加用 MS 液体培养基稀释的 OD₆₀₀ 值为 0.3 的农杆菌液 100 μ L(记为处理 3);滴加用 MS 液体培养基稀释的 OD₆₀₀ 值为 0.5 的农杆菌液 100 μ L(记为处理 4)。

每个穗子处理完后套袋并挂牌标记候其自然结实,收获当代种子。由于处理 3 和处理 4 是初次尝试,因此只做了陕 354 和陕 893 两个品种。所有的后代种子直接大田播种,待出苗后采用 CTAB 法^[11]提取小麦基因组 DNA 进行 PCR 检测。

1.2.3 转基因材料的 PCR 检测 于各品种不同处理的后代转化种子播种出苗后,按每 10 株为 1 组分别挂牌标记,混合采样后提取基因组 DNA,利用 14 亚基基因特异性引物进行 PCR 检测。PCR 引物 P1 的序列为:5'-ATG TGA GCG CGA GCT CCG GAA GCG CG-3',P2 的序列为:5'-GCG AAG GCG TAG TCT CGC TGG GG-3'。以含有 14 亚基基因的小偃 6 号基因组为阳性对照,以相应未转化小麦品种的基因组为阴性对照。PCR 反应采用 25 μ L 反应体系:10 $\times$ PCR buffer 2.5 μ L,25 mmol/L MgCl₂ 2.5 μ L,10 mmol/L dNTP 0.4 μ L,5 U/ μ L *Taq* DNA 聚合酶 0.15 μ L,5 mmol/L 引物 P1 和 P2 各 0.5 μ L,基因组模板 0.5 μ L),ddH₂O 17.95 μ L。PCR 反应条件为:95 ℃预变性 5 min;95 ℃变性 45 s,68 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 45 s,循环 32 次;72 ℃延伸 10 min。PCR 结果用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳,EB 染色并用凝胶成像仪照相分析。对其中的

阳性混合样再按单株挂牌标记采样,提取基因组进行 PCR 检测。

1.2.4 数据处理方法 转化种子的出苗率和转化率按以下公式计算:

出苗率/%=(成苗数/收获的种子数)×100%;
转化率/%=(阳性植株数/收获的种子数)×100%。

2 结果与分析

2.1 不同处理不同品种转化后代的出苗率

利用花粉管通道法,采用不同处理对不同小麦

表 1 不同小麦品种不同处理的花粉管通道法转化结果

Table 1 Transformation result of different varieties and treatments

品种 Varieties	处理 Treatment	收获种子数 Number of seeds	成苗数 Number of seedlings	出苗率/% Frequency of germination	阳性植株数 Transformed seedlings	转化率/% Frequency of transformation
洛阳 8716 Luoyang 8716	1	583	476	81.6	3	0.51
	2	296	253	85.5	2	0.68
	1	1 293	915	70.8	3	0.23
陕 354 Shaan 354	2	398	342	85.9	4	1.01
	3	55	21	38.2	0	0
	4	108	39	36.1	1	0.93
陕 893 Shaan 893	1	500	427	85.4	4	0.80
	2	617	536	86.9	4	0.65
	3	360	149	41.4	3	0.83
小偃 107 Xiaoyan 107	4	404	138	34.2	2	0.50
	1	115	93	80.9	1	0.87
	2	51	47	92.2	0	0
陕 150Shaan 150	1	60	41	68.3	0	0
总计或平均 Total or average		4 840	3 477	71.8	27	0.56

不同处理间出苗率及转化率的统计结果见表 2。由表 2 可以看出,5 个小麦品种滴加 DNA 的处理 1 和处理 2 的平均成苗率均较高,分别为 76.5%和 86.5%。滴加农杆菌的处理 3 和处理 4 均较低,

表 2 不同处理花粉管通道法的转化结果

Table 2 Transformation result of different treatments

处理 Treatment	收获种子数 Number of seeds	成苗数 Number of seedlings	成苗率/% Average frequency of germination	阳性植株数 Transformed seedlings	转化率/% Average frequency of transformation
1	2 551	1 952	76.5	11	0.43
2	1 362	1 178	86.5	10	0.73
3	415	170	41.0	3	0.72
4	512	177	34.6	3	0.59

2.2 不同处理不同品种的转化率

根据序列分析预测,转化阳性后代应可扩增出大小约为 184 bp 的特异性扩增片段。对不同小麦品种花粉管通道法转化的后代植株采样进行 PCR 检测,其结果与预期相符。在对混合样的分析中发现,混合样中大多数样品为阴性,少数样品为阳性,且扩增的目的条带强弱各异,可能是混合样中阳性单株数的差异所致。对所有阳性混合样再按单株采

品种进行高分子量麦谷蛋白 14 亚基基因的转化,待成熟后收获种子。由于转化时切割柱头造成损伤,花粉管转化后部分小花不能结实,结实的种子也比较瘦小。考虑到卡那筛选对种子萌发的影响,试验先不作种子筛选,待后代播种大田成苗后作 PCR 检测。播种后各小麦品种出苗率的统计结果见表 1。由表 1 可知,部分转化后种子不能正常萌发,出苗率较低,同一处理不同品种间出苗率差异不大,但同一品种不同处理间差异很大。

分别为 41.0%和 34.6%。这是因为滴加农杆菌处理后很多穗子严重发霉,结实率很差,所结种子均非常瘦小,多数不能正常萌发,因此出苗率较低。

样进行 PCR 检测,图 2 为陕 893 处理 1 的部分单株分析结果。由图 2 可以看到,在检测的 14 个样品中,8,10,12 号样品可扩增出与阳性对照小偃 6 号大小相同的特异性条带,为转化阳性植株,其余 11 个样品无相应扩增条带,为阴性植株。所有品种及不同处理转化检测统计结果分别见表 1 和表 2。

从表 1 可以看出,不同小麦品种各处理间转化率存在很大差异,其中以陕 354 处理 2 的转化率最

高,为 1.01%;其次为陕 354 的处理 4,为 0.93%。陕 893 的处理 1、处理 3 和小偃 107 的处理 1 的转化率也较高,均在 0.8%以上,其他处理转化率均较低。陕 354 的处理 3、小偃 107 的处理 2 以及陕 150 的处理 1 均未获得转化植株。陕 150 未获得转化植株,可能是由于其开花较早,授粉时其盛花期已过,从而影响了花粉管的正常形成,导致外源 DNA 不能进入所致。由此可见,转化时植株是否处于盛花

期对转化效率影响很大。另外,所有处理的平均转化率为 0.56%,较文献[8]报道的转化率低,可见转化条件还有待于进一步优化。

由表 2 的统计结果可以看出,各处理的平均转化率有很大差异,转化率大小分别为处理 2>处理 3>处理 4>处理 1,说明增加 DNA 浓度、使用农杆菌处理均可提高转化率。因此,使用花粉管通道法对小麦进行遗传转化是可行的。

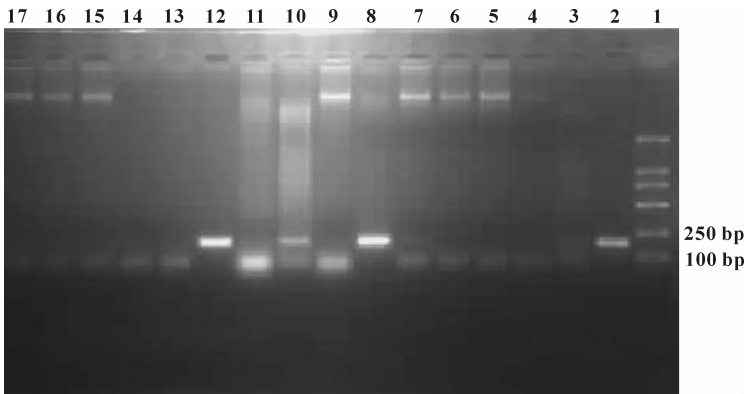


图 2 转化后代的 PCR 电泳检测
1. Marker DL2000;2. 阳性对照小偃 6 号;3. 阴性对照陕 893;4~17. 转化后代单株
Fig. 2 Agarose electrophoresis of PCR product

1. Marker DL2000;2. Positive control Xiaoyan No. 6;3. Negative control Shaan 893; 4—17. Transformed individuals

3 讨 论

(1)在小麦遗传转化中,基因枪法和农杆菌转化法都要经过组织培养过程,花粉管通道法避免了复杂的组织培养、植株再生过程,可以直接收获转化种子,对于组培再生能力较差的品种无疑是最佳选择。但对于庞大的后代植株,选择一个高效的筛选标记基因尤为重要。卡那霉素抗性基因作为双子叶植物遗传转化中使用较多的筛选标记基因,在小麦愈伤筛选中效果较差。但有研究认为,利用卡那霉素筛选转化种子非常有用^[12]。本研究对几个小麦品种卡那霉素种子的筛选试验发现,卡那霉素对小麦种子发芽有一定的抑制作用,用其处理后的种子发芽慢且苗子生长弱,鉴于此才对转化种子改用 PCR 筛选。

(2)何道一等^[13]报道,将含有 *Npt II* 基因表达载体的农杆菌滴入小麦小花中进行小麦活体转化,通过对幼胚和成熟种子进行卡那霉素抗性初步筛选,并通过 PCR 和 Southern 杂交进行分子水平鉴定,在参试的 5 个品种(系)中均获得了转化植株。因此,本研究也进行了这方面的尝试,但滴加农杆菌处理的很多穗子霉菌生长严重,结实率很差,且多数

种子不能萌发。这可能与后期雨水较多,套袋后湿度较大,农杆菌收集时培养基洗涤不彻底有关。因此在转化时应在转化结束后几天去掉袋子降低湿度,或象愈伤转化一样,在转化结束进行适当抑菌处理。花粉管通道法转化在大田完成,影响因素很多,转化条件还有待于进一步优化。

(3) PCR 检测时,在泳道最前端都有引物二聚体存在。因为高分子量麦谷蛋白亚基基因之间同源性很高,特异性引物选择范围很小,且特异性引物的溶解温度较高,提高退火温度虽依然未能消除引物二聚体,但是其存在并不影响检测结果。

[参考文献]

[1] Payne P I. Genetics of wheat storage protein and the effect of allelic variation on bread-making quality[J]. Annual Review of Plant Physiology,1987,38:141-153 .

[2] 宋健民,刘建军,刘爱峰,等. 高分子量麦谷蛋白亚基组成与小麦烘烤品质关系研究[J]. 作物学报,2004,30(11):1124-1128. Song J M, Liu J J, Liu A F, et al. Relationship between composition of high-molecular-weight glutenin subunits and bread-making quality[J]. Acta Agronomica Sinica, 2004, 30 (11): 1124-1128. (in Chinese)