

花粉管通道法导入高粱 DNA 创造优良小麦 新品系的分子聚合育种

欧巧明, 崔文娟, 王 炜, 倪建福, 王红梅, 杨芳萍, 罗俊杰

(甘肃省农业科学院生物技术研究所, 甘肃 兰州 730070)

摘 要: 采用优化的花粉管通道法将高粱 (*Sorghum bicolor* L.) 基因组 DNA 导入高感条锈病、籽粒粉质的稳定小麦品系, 并借助幼胚培养挽救加代、早代变异筛选等技术, 经多代连续选择优良变异系, 获得 2 个稳定的优良变异新品系, 其中 2001502-23-26 两年度位居省区试第一位, 已申请生产试验和品种审定。变异新品系与感病受体小麦比较, 某些生物学性状发生明显变异, 对条锈病免疫, 品质指标得到提升, HMW-GS 发生明显变异, Gul D1 位点基因发生等位变异, 过氧化物酶发生明显变化, 说明外源高粱基因导入引起了相应基因表达的变化, 地区适应性也相应的较受体不同。这说明异源高粱基因组 DNA 导入小麦可实现高粱抗条锈性和 HMW-GS 等优良性状的遗传转育和聚合, 达到生物学性状、产量、抗条锈性和品质指标等目标性状得到遗传改良的目的。性状改良的原因, 推测可能是高粱抗条锈基因转化和 HMW-GS 基因生物诱变和多基因聚合的结果, 而导入后代 HMW-GS 的 Gul D1 位点基因的等位变异机理可归结为生物诱变所致, 条锈病抗性的变异可能属于高粱抗锈基因的定向转移所致。

关键词: 小麦; 高粱 DNA; 花粉管通道法; 高分子量谷蛋白亚基; 抗条锈; 分子聚合育种

中图分类号: S512.332 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-7601(2013)02-0006-07

Molecule – pyramiding breeding of new improved wheat varieties by introducing sorghum DNA via pollen-tube pathway

OU Qiao-ming, CUI Wen-juan, WANG Wei, NI Jian-fu, WANG Hong-mei, YANG Fang-ping, LUO Jun-jie

(Bio-technology Institute, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou, Gansu 730070, China)

Abstract: The genomics DNA of sorghum was introduced via the pollen tube pathway into the strains of soft-grain wheat that were highly infectable to stripe rust. Two stable variants was obtained with the aid of the key technologies including culturing of young embryo and screening of early generation variation, and the apparent variation of biological characteristics, such as stripe-rust resistance, quality indicators, HMW-GS, alleles in Gul D₁ loci and peroxidase, was displayed in the new variants compared with their receptors. This showed that the introduction of sorghum genomics DNA caused the changes of gene expression in wheat strains, and their regional adaptabilities were also different from their receptors accordingly. Therefore, the genetic transformation of the traits of stripe-rust resistance and HMW-GS from sorghum into wheat was realized, and the objective of improving target characters, such as biological indicators, stripe-rust resistance, yield and quality, was achieved. It was speculated that the above results might be led by the genetic transformation of stripe-rust resistant gene from sorghum and biological mutation of HMW-GS gene as well as polygenic pyramiding. The variation of alleles in Gul D1 loci of HMW-GS could be attributed to the biological mutagenesis, and the variation of stripe-rust resistance could be ascribed to the target-oriented transformation of genomic DNA from sorghum.

Keywords: wheat; sorghum DNA; pollen-tube pathway; HMW-GS; stripe-rust resistance; molecule-pyramiding breeding.

收稿日期: 2012-09-16

基金项目: 国家转基因生物新品种培育重大专项(2009ZX08005-013B); 甘肃省农业生物技术研究与开发项目(GNSW-2011-07); 甘肃省农科院农业科技创新专项(2009GAAS16); 甘肃省青年科学基金项目(1208RJYA091)

作者简介: 欧巧明(1976—), 男, 甘肃靖远人, 副研, 硕士, 从事小麦生物技术育种及其应用开发研究。E-mail: ouqiaoming@163.com。

通讯作者: 罗俊杰(1962—), E-mail: hnsjjie@163.com。

小麦条锈病抗性培育和品质遗传改良一直是西北地区小麦育种研究的重点。如何实现小麦抗条锈基因和优质亚基基因等优良性状基因的聚合就成为目前小麦育种的关键所在。

对于小麦条锈病,国内外研究证明,选育和种植抗病品种是防治该病最经济、安全、有效和对环境安全的核心措施^[1],表现为免疫及高度抗病的小种专业化抗病材料是育种中首选的抗病资源。然而条锈菌毒性变异频繁,条锈菌新毒性小种不断出现,抗锈性丧失成为抗病育种中最棘手的问题^[2-4]。对于小麦品质的遗传改良,研究认为国内小麦品种麦谷蛋白亚基是改善烘烤品质的限制因子,其中, Glu - D1 位点的品质效应来源于 5 + 10 亚基与 2 + 12 亚基之间的差异, 5 + 10 亚基取代 2 + 12 亚基将可能改善小麦的烘烤品质^[5-7]。

然而,有计划的常规/远缘杂交和系统选育等主要手段在小麦抗条锈新品种培育和品质改良方面虽然发挥了重要作用,但这也使得小麦优良基因资源愈加狭窄。因此,采用分子育种等多种集成育种技术,有效利用异源基因资源,特别是从有关栽培或野生的异种属中寻找抗病和品质相关基因,通过外源基因的导入创造优质抗病新种质,间接或直接提高栽培小麦抗病和品质水平就显得格外重要。

基于花粉管通道法遗传转化的外源 DNA 导入分子育种技术不受物种生殖障碍和基因型限制,可引进或诱导产生新的有利性状,较有性杂交,避免了供受体基因组的全面重组,最大限度保持了受体优良性状,性状稳定速度快,为拓宽小麦抗性基因资源和品质改良提供了新的途径。然而,花粉管通道遗传转化分子机理目前尚不十分清楚,在诸多理论上仍存在争议;此外该技术对目的性状转化与否带有很大随机性,转化效率较低,加之其易受环境影响,重复性较差,存在较难实现标准化操作等问题,致使其在较长时期内难以获得国际同行的广泛认可。然而,花粉管通道遗传转化方法现逐渐被国内外广泛采用。已有的研究结果表明,其后代能产生变异,已相继在 40 多种作物上取得了显著成效^[8-9];在国外 SCL/EI 期刊也相继出现报道^[10-13],并已获得大量优良小麦新品种^[14-17]。笔者也曾利用花粉管通道法将多种异源高粱基因组 DNA 导入小麦,成功实现了小麦的抗条锈性^[18]、高分子量麦谷蛋白亚基(HMW - GS)^[19]以及品质性状的遗传改良^[20-22]。其中将高粱基因组 DNA 导入受体甘麦 8 号,获得抗条锈变异系 89144 系列品系,部分品系已连续 21 年对混合菌和分生理小种条锈菌均表现免

疫^[18],抗锈机理分析显示 89144 在条锈菌感染后表现出系统获得性抗性^[23], HMW - GS 发生了突变,由受体的 2 + 12 亚基变为 5 + 10 亚基^[19],是优质且持久抗条锈病的优良种质资源^[18]。

为了持续获得优质、抗锈小麦种质材料,拓宽小麦优质、抗条锈基因资源,本研究拟采用花粉管通道法,将抗逆性强、对条锈病免疫的 C₄ 作物高粱 (*Sorghum bicolor* L.) 基因组 DNA 导入高感条锈病的稳定品系 89122,以期引入高粱抗条锈基因,进行品质和产量性状改良,突出抗条锈、优质等目标性状的遗传改良,丰富优质、抗锈小麦基因和种质资源,为花粉管通道法外源 DNA 导入的分子育种研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 供体材料 高粱 [*Sorghum bicolor* (L.) Moench], 禾本科高粱属,体细胞染色体数目 $2n = 20$,分蘖旺盛,根系发达、抗旱、耐盐碱、适应性广,对条锈病免疫^[24]。

1.1.2 受体材料 稳定的春小麦品系 89122, $2n = 42$,叶宽,旗叶下披,红粒,籽粒粉质,分蘖成穗率中等,耐盐碱、高感条锈病,品质较差(由甘肃省农科院生物技术研究所采用花粉管通道法育成的粉质春小麦品种^[25])。

1.2 试验方法

1.2.1 供体总 DNA 的提取 采用 CTAB 法,按照刘学春^[26]等报道的方法,提取供体米高粱基因组 DNA,紫外分光光度计检测, $A_{260}/A_{230} = 2.13 > 2.00$, $A_{260}/A_{280} = 1.87 > 1.80$;琼脂糖电泳呈单一区带,无拖尾现象,表明所提纯的 DNA 分子量在 50 kb 以上,蛋白质等杂质已去除干净,达到作物 DNA 导入所要求的纯度。基因组 DNA 溶于 $1 \times$ SSC 溶液, 4°C 冰箱储存,导入前用蒸馏水稀释至 $300 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

1.2.2 供体高粱基因组 DNA 的导入及后代的处理与选择 供体高粱基因组 DNA 的花粉管通道法导入参考倪建福等(1994, 2005)的方法^[19, 25]。

待导入穗形成幼胚后,记作 D₀ 代种子。取其 15 ~ 20 d 胚龄的幼胚进行幼胚培养,于 MS 培养基上直接诱导幼胚成苗(D₁),并于温室加代选择,所获 D₁ 及 D₂ 代种子点播于单株选择圃,选择各种变异株,按单株收取种子;自 D₃ 代起播种于株系选择圃,选择优良稳定变异株系。D₄ - D₆ 代依次参加高代产量比较、鉴定试验等各级试验,逐代筛选优良品系。自 D₁ 代起进行生物学特性的观察、记载和统计

分析,并同步进行产量、抗病性、品质鉴定、生理生化及分子鉴定。

1.2.3 产量及抗条锈性鉴定 $D_4 - D_6$ 代参加各级观察和产量鉴定试验;2007—2008 年参加甘肃省春小麦区域试验;同时进行多年多点生产示范及适应性分析。

自 D_1 代起,连续对供体、受体及后代变异株采用新叶涂抹法进行混合菌条锈菌孢子粉田间人工接种成株期条锈病鉴定。自 D_6 代委托省级作物抗病性鉴定机构进行混合菌和新强毒菌株分生理小种的苗期和成株期条锈病鉴定。条锈病记载及分级标准采用国家质量技术监督局 1995 年颁布的《小麦条锈病测报调查规范》国家标准。

1.2.4 品质分析、高分子量麦谷蛋白亚基鉴定、过氧化物酶分析 自 D_6 代委托省级作物品质化验分析机构进行各项品质指标的化验分析。高分子量麦谷蛋白亚基检测参考倪建福等(2005)报道的方法^[15],略有改动。供试样品过氧化物酶活性测定参考《现代植物生理学实验指南》·1999 年版报道的方法。

1.2.5 统计与分析 生物学性状等所获可定量数据的观察和统计均重复 3 次以上,取其平均值。

2 结果与分析

2.1 外源 DNA 导入小麦 D_1 代幼胚离体培养及温室加代

外源基因组 DNA 导入后的 D_1 代种子由于灌浆不充分,其萌发率较低,大量可能的变异后代因不能正常萌发成苗而遗失,是提高其变异率的制约因素。

本研究经对外源高粱 DNA 导入受体小麦 89122 的 D_1 代幼胚的离体培养研究,获得了适宜取材时间、最适培养基及培养条件、幼苗移栽炼苗、温室栽培条件等关键技术信息(见图 1),结果显示幼胚取材适宜胚龄期为 10~15 d,幼胚大小约 1.5 mm, D_1 代幼胚培养存在幼胚直接成苗和愈伤组织途径两种成苗途径,虽然幼胚直接成苗率较低 24.1%,但幼胚愈伤诱导率高达 74.6%,最终愈伤分化成苗率达 90.4%,移栽成活率 99.2%,温室可结实率 100%, D_2 代植株成本较原有技术仅增加 3.4%,不但挽救了少数因不能直接形成可育种子而导致的无效导入后代,而且缩短了变异稳定时间,达到了幼胚挽救和温室加代稳定的目标(叶春雷、欧巧明等,2007)。

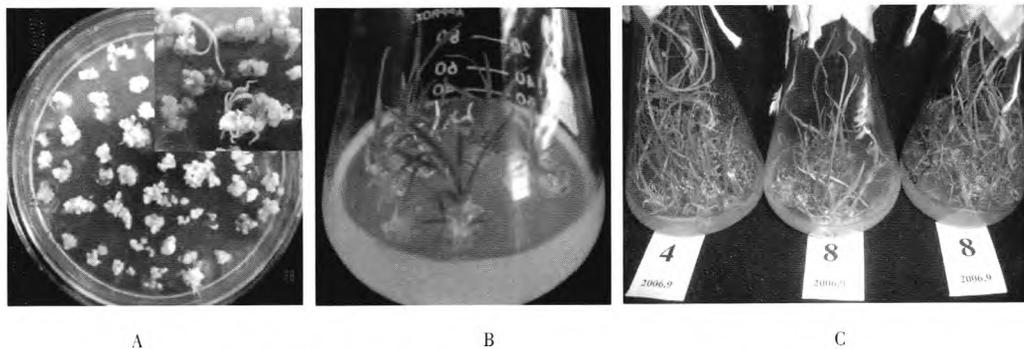


图 1 外源高粱 DNA 导入小麦后的 D_1 代幼胚离体培养及再生幼苗

Fig.1 The young embryo culture and regeneration seedlings of D_1 generation after the introduction of exogenous sorghum DNA into wheat

注:图 A 表示幼胚脱分化形成愈伤组织;图 B 表示愈伤组织分化成苗;图 C 表示完整幼苗。

Note: A. The dedifferentiation of young embryo to form callus; B. The differentiation of callus into seedlings; C. The seedlings.

2.2 生物学性状分析

外源 DNA 供体高粱、导入受体 89122 及变异系 2001502-23 的生物学性状分析显示,新品系 2001502-23 的生物学性状较受体 89122 出现不同程度的变异(见表 1,图 2、3)。

(1) 外源新品系 2001502-23 的生育期、芒性、单株粒重等农艺性状多偏向于受体小麦 89122 或与受体接近;但部分性状,如株高、穗长、千粒重、旗叶面积等与受体表现出明显差异。(2) 导入新品系 2001502-23 的分蘖数、单株粒重均较受体 89122 有所增加,尤其是单株穗数和分蘖力明显增加,这与在

后期产量鉴定中表现出的产量群体优势相一致。而株高、穗长、千粒重、旗叶面积等较受体 89122 有所减小。(3) 受体 89122 旗叶下披、叶面积大,但功能期较短;而导入新品系 2001502-23 的旗叶叶型上举、单个叶面积缩小,叶功能期长,增加空间间隙,提高了整体光合效率,这也与其分蘖数高、后期产量优势相一致。(4) 受体 89122 籽粒红色、粉质,落黄较差;而导入新品系 2001502-23 的株高适中、籽粒白色、硬质,落黄性好,虽表现晚熟,但籽粒灌浆快,表现出明显的生产适应性优势(见图 3)。

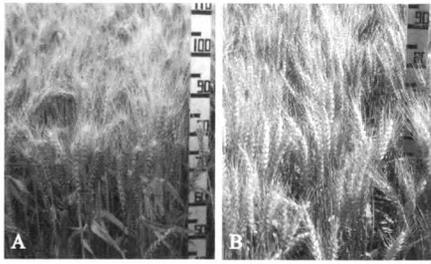


图 2 外源高粱 DNA 导入受体 89122 及变异系 2001502-23 的生物学性状的比较

Fig.2 Comparison of biological characteristics of the receptor 89122 introduced by exogenous sorghum DNA and the variant 2001502-23

注:A.受体 89122;B.变异系 2001502-23.

Note: A. The receptor No. 89122; B. The variant No. 2001502-23.

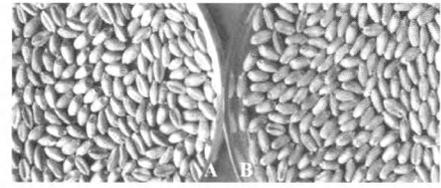


图 3 外源高粱 DNA 导入受体 89122 及变异系 2001502-23 的籽粒性状比较

Fig.3 Comparison of grain traits of the receptor 89122 introduced by exogenous sorghum DNA and the variant 2001502-23

注:A.受体 89122;B.变异系 2001502-23.

Note: A. The receptor No. 89122; B. The variant No. 2001502-23.

表 1 外源 DNA 供体、导入受体与后代新品系的生物学特性及主要农艺性状的统计与分析

Table 1 The biological characteristics and agronomic traits of the exogenous DNA donor, receptor and new lines

材料 Materials	生育期 Growth period /d	株高 Plant height /cm	分蘖数 Tiller number	芒 Awn	穗长 Ear length /cm	单株粒重 Grain weight per plant/g	千粒重 1000-grain weight/g	旗叶叶型 Type of flag leaf	旗叶面积 Area of flag leaf/cm ²
高粱 Sorghum	138	171.0	1.5	—	23.5	13.2	24.8	上举 Erect	> 6000
89122	106	98.0	8.0	长芒 Long	12.0	7.2	42.0	下披 Weeping	36.2
2001502-23-25	107	87.0	12.0	长芒 Long	10.6	8.1	39.0	上举 Erect	28.7
2001502-23-26	107	90.0	12.0	长芒 Long	10.6	8.1	39.0	上举 Erect	28.7

上述结果说明,后代变异系 2001502-23 的部分生物学性状较受体 89122 变异程度大;穗长、千粒重等产量性状比较稳定,变异相对较小;生育期等性状易受环境影响,变异也不明显。这些结果可能是外源高粱 DNA 导入受体 89122 引起了相应基因表达的变化所致。

2.3 产量鉴定

历年各级产量试验结果显示,后代新品系 2001502-23-25 在鉴定、品比试验及生产示范试验

中较受体 89122 分别增产 17.24%、5.18%、52.42% (省区试中产量较受体 89122 低,原因可能是区域试验选点不完全发挥该品种增产潜力所致)(见表 2); 2001502-23-26 在鉴定、品比试验、省区试中较受体 89122 分别增产 20.01%、8.34%、10.71%,并在 2011 年度和 2012 年度甘肃省水地春麦区试中均位居第一位,已申请生产试验和品种审定。说明外源 DNA 导入受体后使其产量性状得到明显改善。

表 2 外源 DNA 供体、导入受体与后代新品系的各级试验产量比较

Table 2 Comparison of the yields of the exogenous DNA donor, receptor and new lines in various tests

材料 Materials	2005 年鉴定试验 Identification test in 2005 /(kg·hm ⁻²)	2006 年品系比较试验 Variety contrast test in 2006 /(kg·hm ⁻²)	甘肃省品种区域试验 Variety regional test in Gansu /(kg·hm ⁻²)	多年多点生产示范试验 Demonstration test in different places and years /(kg·hm ⁻²)
89122	7877.9	5792.4	5268.0	3624.0
2001502-23-25	9236.1	6093.0	4230.0	7616.7
2001502-23-26	9454.0	6275.3	5832.0	/

注:“/”表示该项未测定。

Note: “/” indicates untested item.

2.4 抗条锈性鉴定

连续田间成株期人工接种条锈菌混和菌鉴定结果显示,后代新品系 2001502-23 连续 8 年对条锈病表现免疫;而供体高粱对条锈病免疫,受体 89122

则自 1998 年起逐渐对条锈病丧失抗性(见表 3),其反应型从 1998 年的 2 型增加至 4 型。

D₀ 代混合菌和新强毒菌株分生理小种的苗期和成株期条锈病鉴定结果显示(见表 3):新品系

2001502-23 苗期对混和菌,成株期对水 4、水 7、水 14、HY8、条中 32 和混和菌均表现免疫;而供体高粱经鉴定对条锈病免疫,导入受体 89122 经苗期混合菌和成株期分生理小种鉴定显示均表现高感条锈病

(反应型 4 型)。上述结果证明,采用花粉管通道法将外源高粱 DNA 导入高感条锈病的受体小麦 89122 后,实现了小麦抗条锈性状的恢复和高粱抗条锈基因向小麦的转移。

表 3 2002—2008 年外源 DNA 供体、导入受体与后代新品系的条锈病抗性鉴定与比较

Table 3 The identification of resistance to stripe rust of the exogenous DNA donor, receptor and new lines in 2002—2008

材料 Materials	田间人工接种成株期条锈病抗性鉴定 Identification in adult plant stage under artificial inoculation in field		混合菌和分生理小种的苗期和成株期条锈病抗性鉴定 Identification in seedling and adult plant stage with mixed bacteria and individual physiological species					
	2002 - 2005	2006 - 2009	苗期混合 菌鉴定 Seedling stage with mixed bacteria	成株期分生理小种鉴定 Adult plant stage with individual physiological species				
				水 4 Water No. 4	水 14 Water No. 14	水 7 Water No. 7	条中 32 号 HY8 Tiaozhong No. 32	
高粱 Sorghum	0	0	0	0	0	0	0	0
89122	3/60/80	4/60/80	4	4	4	4	4	4
2001502 - 23 - 25	0	0	1	0	0	0	0	0
2001502 - 23 - 26	0	0	1	0	0	0	0	0

注:记载标准采用 0-4 级分类法,记载项目:反应型/严重度/普遍率。

Note: The 0 - 4 level taxonomy is used in recording. Recording items: reaction type/severity/prevalence rate.

2.5 籽粒和面粉品质分析

外源 DNA 供体、导入受体与后代新品系的籽粒营养及加工品质分析结果显示(见表 4),2 份外源 DNA 导入新品系的容重、蛋白质含量、籽粒粗蛋白含量、赖氨酸含量等均较导入受体 89122 有所改善。排除高粱作为杂粮作物本身的品质指标较低外,导入新品系 2001502-23-26 粗蛋白、湿面筋含量、沉

淀值、容重分别较导入受体 89122 提高 25.61%、32.94%、32.87%、6.55%,赖氨酸含量降低 9.11%,品质类型接近中筋至强筋小麦,籽粒品质得到明显改善,进一步证明高粱外源基因导入小麦引起了相应基因表达和蛋白质等籽粒和面粉品质性状的变化。

表 4 外源 DNA 供体、导入受体与后代新品系的籽粒营养及加工品质的比较与分析

Table 4 The grain nutrition and processing quality of the exogenous DNA donor, receptor and new lines

材料 Materials	容重 Bulk density /(g·L ⁻¹)	粗蛋白含量 Crude protein content /(g·kg ⁻¹)	赖氨酸含量 Lysine content /(g·kg ⁻¹)	湿面筋含量 Wet gluten content /(g·kg ⁻¹)	Zeleny 沉淀值 Zeleny sedimentation value/mL	淀粉含量 Starch content /%	品质类型 Quality type
高粱 Sorghum	708.0	126.9	2.90	/	/	69.23	/
89122	763.0	123.0	4.50	229.2	36.2	59.30	中筋 Mid gluten
2001502 - 23 - 25	792.0	144.6	4.91	207.8	32.5	612.7	中筋 Mid gluten
2001502 - 23 - 26	813.0	154.5	3.52	304.7	48.1	644.5	中~强筋 Mid to high gluten

注:“/”表示该项未测定。粗蛋白含量、赖氨酸含量和淀粉含量的折算以籽粒干物质重为基础,湿面筋含量和 Zeleny 沉淀值的折算以籽粒含水 14% 为基础。

Note: “/” indicates untested item. The contents of crude protein, lysine and starch are based on dry matter of grains, while the wet gluten content and Zeleny sedimentation value are based on grains with 14% water.

2.6 高分子量麦谷蛋白亚基鉴定

HMW-GS 检测结果显示:2 份后代新品系均含有 7+8、5+10 优质亚基,与导入受体 89122(含有 7+8、2+12 亚基)相比, HMW-GS 发生明显变异, Gul D1 位基因发生等位变异,其表达产物由原来(89122)的 2+12 亚基变为 5+10 亚基(图 4),但高

粱种子贮藏蛋白中并没有亚基 5+10,从而实现了麦谷蛋白亚基的改良。这与倪建福^[19]等(2005)报道的高粱基因组 DNA 导入春小麦甘麦 8 号的后代 89144 的 HMW-GS 基因变异情况相同。这种相同的异源供体基因组 DNA 导入不同小麦材料产生了相同的变异情况,其可能的原因是异源高粱基因组

DNA 的导入对受体基因组中 HMW - GS 基因的生物诱变机理和效果相同所致。



图 4 外源 DNA 导入受体与后代新品系的 HMW - GS 组成的比较

Fig.4 The HMW - GS composition of the exogenous DNA donor, receptor and new lines

注:a. 89122; CS. 中国春; b. 2001502 - 23; c. 2001502 - 25; m. 小偃 54。

Note: a. 89122; CS. Chinese Spring; b. 2001502 - 23; c. 2001502 - 25; m. Xiaoyan 54.

2.7 过氧化物酶电泳分析

高粱 DNA 导入后代新品系及其供、受体的过氧化物酶电泳分析显示,新品系 2001502 - 23 - 25 在条带 a、b、c、d、e、f、g 等处与导入受体 89122 存在差异,在条带 a 等几处明显与外源 DNA 供体高粱相同(图 5),说明其过氧化物酶较导入受体 89122 发生明显变化。而过氧化物酶等蛋白质的类型是相关基因表达的产物,这也进一步证明外源高粱 DNA 导入受体小麦 89122 后引起了相应的过氧化物酶基因表达的变化。

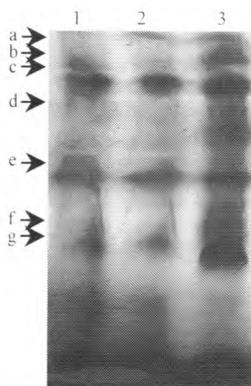


图 5 外源 DNA 供体、导入受体与后代新品系的过氧化物酶电泳分析

Fig.5 The analysis of EST - PAGE of the exogenous DNA donor, receptor and new lines

注:1. 89122; 2. 2001502 - 23; 3. 米高粱。

Note: 1. 89122; 2. 2001502 - 23; 3. Sorghum bicolor.

2.8 适应性分析

高粱 DNA 导入后代新品系 2001502 - 23 - 25、2001502 - 23 - 26 均适合在甘肃省兰州、武威、白银、定西以及宁夏、青海等年降雨 500 mm 左右的水地及

不饱灌区示范推广,特别是 2001502 - 23 - 26 在 2011 年度和 2012 年度的省区试中均位居第一位,在甘肃临夏、渭源等阴湿地区表现优异,有望成为甘肃省首个借助外源 DNA 导入小麦分析育种技术获得的通过品种审定春小麦新品种;而受体 89122 适宜在甘肃省高寒阴湿地区进行地膜栽培以及中度盐碱地种植^[25]。这说明外源 DNA 导入引起了受体小麦生物学性状及生理机制的变化导致其地区适应性的相应变化。

3 讨论

本研究将高粱基因组 DNA 导入高感条锈病、籽粒粉质的稳定小麦品系,获得 2 个稳定的优良变异新品系,较供体高粱和受体小麦,其农艺和生物学性状发生明显变异和改良,大多数性状与受体接近,部分性状与受体表现出明显差异,这与以往的研究结果类似^[21],对条锈病免疫, HMW - GS 发生明显变异, *Gul D₁* 位点基因发生等位变异,其表达产物由原来(89122)的 2 + 12 亚基变为 5 + 10 亚基,但高粱种子贮藏蛋白中并没有亚基 5 + 10,多项品质指标得到改良,过氧化物酶表达发生明显变化,地区适应性也相应的较受体不同。上述结果说明异源高粱基因组 DNA 导入小麦引起了相应基因表达的变化,实现了高粱抗条锈性和 HMW - GS 等优良性状的遗传转育和聚合,达到了生物学性状、产量、抗条锈性和品质指标等目标性状遗传改良的目的。推测该新品系的优良性状的产生是供体 DNA 导入并发生了某种重组的结果,但这是否是高粱抗条锈基因和 HMW - GS 基因的直接转化和多基因聚合的结果尚待进一步深入研究。这与裴新梧等^[22](1999)、王广金^[27]等(2002)、王立新^[14]等(2003)、倪建福^[18,19,21,25]等(1994,2005)、刘香利^[28]等(2008)报道的结果类似。笔者也曾利用花粉管通道法将异源高粱基因组 DNA 导入小麦,成功实现了小麦抗条锈性、HMW - GS 和品质指标的遗传改良^[14,17-19],已在引言中作了论述。

结合以往研究结果,这种相同供体基因组 DNA 导入不同小麦产生了相同的变异情况,其原因可能是高粱基因组 DNA 的导入因受体基因组中抗条锈基因、HMW - GS 基因等的转化和生物诱变机理以及变异效果相同所致。而笔者在不同时间阶段采用相同供体 DNA 对不同受体材料处理后的研究结果出现如此相似的结果,这可能是虽然高粱和小麦分属禾本科的不同属植物,其基因组 DNA 和小麦基因组 DNA 必然有较多的同源序列,而高粱基因组 DNA

导入小麦后受体基因组发生了相同作用和类似变异,这说明通过花粉管通道法导入高粱基因组 DNA,导致异源高粱抗条锈基因和 HMW - GS 基因的转化和遗传变异机理具有相当的共性,其遗传变异也可能是普遍现象。

外源 DNA 导入后代性状变异是供体与受体基于 DNA 分子局部亲和性而产生片段杂交的必然结果。关于其引起变异的机理,前人提出了各种推测^[19,29-31]。但对于变异体中经常出现供受体均没有的新带以及某些受体带消失的现象,周建林等(2001)认为供体 DNA 整合时有可能恰巧分隔或破坏某个引物的结合位点,或形成新的位点,从而造成该引物在这个区段得不到扩增或扩增的分子量发生变化^[32]。另外,万文举^[33]等(1992)报道外源 DNA 导入具有双重作用,直接遗传转化和生物诱变均是外源 DNA 导入可能的遗传转化机理之一,是一种综合作用的结果。

对于高粱基因组 DNA 导入小麦后 HMW - GS 变异,张鲁军等(2009)认为 HMW - GS 基因可能发生了基因沉默、相关元件的激活等^[34]。李三和^[35]等(2007)认为这是外源基因在不同于受体环境的细胞质中表达发生了变化,且由于外源基因的插入引起了内源高分子量麦谷蛋白亚基组成的变异。本研究中 HMW - GS 的 Glu D₁ 位点基因发生的等位变异的机理也可能与此情况类似,其更多应该归结为生物诱变所致。对于高粱基因组 DNA 导入后抗条锈性的变异(以往研究中也曾多次出现类似抗条锈性变异的情况^[18]),因为供体高粱对条锈病免疫,属于目标基因的定向转移,更多应该归结为高粱基因组 DNA 的直接转化所致。

综上所述,笔者认为花粉管介导的异源高粱 DNA 导入完全可以实现包括抗条锈基因、HMW - GS 基因在内的遗传转化、多基因聚合和目标性状遗传改良,这对促进属间基因交流,扩展小麦基因资源具有重要的科学意义。关于高粱 DNA 导入引起小麦抗条锈性和 HMW - GS 变异的分子鉴定和变异机理目前正在进行中,将另文报道。

参考文献:

- [1] Chen X M. Epidemiology and control of stripe rust (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*) on wheat[J]. *Can J Plant Pathol*, 2005, 27: 314-337.
- [2] 马成,徐世昌,徐琴,等.抗条锈病小麦品系 Taichuang29 * 6/Yr5 接种条锈菌 CY32 后的蛋白质组学分析[J]. *中国农业科学*, 2009, 42(5): 1616-1623.
- [3] Barcellos A L, Roelfs A P, de Moraes Fernandes M I B. Inheritance of adult plant leaf rust resistance in the Brazilian wheat cultivar Toropi[J]. *Plant Disease*, 2000, 84(1): 90-93.
- [4] 张岗,董艳玲,夏宁,等.利用 cDNA - AFLP 技术分析小麦成株抗条锈性差异基因表达特征[J]. *作物学报*, 2010, 36(3): 401-409.
- [5] 朱金宝.小麦籽粒高、低分子量麦谷蛋白亚基及其与品质关系的研究[J]. *中国农业科学*, 1996, 29(1): 34-39.
- [6] 马传喜,吴兆.小麦胚乳蛋白组成及高分子量麦谷蛋白亚基与烘烤品质的关系[J]. *作物学报*, 1993, 19(6): 562-566.
- [7] 李兴林,王光瑞,徐凤,等.面包质地品质性状的研究: I 面包质地同品质性状的相关性分析[J]. *中国粮油学报*, 1999, 14(4): 4-6.
- [8] 孔青,丰震,刘林,等.外源 DNA 导入花粉管通道技术的发展和应[J]. *分子植物育种*, 2005, 3(1): 113-116.
- [9] Song M, Gu Y H, Qin G Y. Application of a transformation method via the pollen - tube pathway in agriculture molecular breeding[J]. *Life Science Journal*, 2007, 4(1): 77-79.
- [10] Luo Z X, Wu R. A simple method for transformation of rice via the pollen tube pathway[J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1989, 7(1): 69-77.
- [11] Li Z, Nelson R L, Widholm J M, et al. Soybean transformation via the pollen tube pathway[J]. *Soybean Genet Newsllett*, 2002, 29: 1-11.
- [12] Shou H X, Palmer R G, Wang K. Irreproducibility of the Soybean Pollen - Tube Pathway Transformation Procedure[J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2002, 20(4): 325-334.
- [13] Chen W S, Chiu C C, Liu H Y, et al. Gene transfer via pollen - tube pathway for anti - fusarium wilt in watermelon[J]. *IUBMB Life*, 2008, 46(1): 1201-1209.
- [14] 王立新,常利芳,段绍光,等.通过花粉管通道导入外源 DNA 创造抗白粉病小麦新种质[J]. *中国农业科学*, 2003, 36(12): 1576-1581.
- [15] 令利军,倪建福,张正英.花粉管通道转基因技术及在小麦分子育种中的应用[J]. *分子植物育种*, 2004, 2(3): 407-412.
- [16] 周春江,葛荣朝,赵宝存,等.利用花粉管通道法将免疫素 NP21 基因导入小麦的研究[J]. *华北农学报*, 2007, 22(2): 26-28.
- [17] 王永芳,张军,崔润丽,等.利用花粉管通道转化谷子 DNA 基因获得转基因小麦[J]. *华北农学报*, 2009, 24(2): 17-21.
- [18] 倪建福,欧巧明,令利军,等.小麦抗条锈新品系 89144 抗锈机理研究[J]. *植物保护*, 2006, 32(1): 30-34.
- [19] 倪建福,欧巧明,庞斌双,等.高粱总 DNA 导入春小麦新品系高分子量麦谷蛋白亚基的变化[J]. *兰州大学学报(自然科学版)*, 2005, 41(6): 47-49.
- [20] 欧巧明,倪建福,张正英,等.长穗偃麦草 DNA 导入引起的冬小麦后代性状变异及其遗传研究[J]. *麦类作物学报*, 2005, 25(5): 18-22.
- [21] 倪建福,令利军,欧巧明,等.外源 DNA 导入小麦的分子育种实践[J]. *麦类作物学报*, 2005, 25(5): 27-31.
- [22] 裴新梧,崔凯荣,孔英珍,等.导入高粱 DNA 选育丰产、抗逆小麦新品系及其 RAPD 分子验证[J]. *兰州大学学报(自然科学版)*, 1999, 35(2): 130-135.

(下转第 22 页)

+12、null/7+9/2+12 二种组合为主,共占 65%。在 Glu-A1 位点有 3 个等位基因(1、2*、null),其中主要是 null,频率高达 70%,2* 和 1 的出现频率极低;Glu-B1 位点等位基因极度单一,仅有 7+8 和 7+9 二个等位基因,7+8 的频率达到了 60%、7+9 频率达 40%,Glu-D1 位点仅出现了 5+10 和 2+12,2+12 的出现频率达 90%,并出现了新变异 2+10。

3 结论与讨论

1) 陇东冬小麦育成品种中, HMW-GS 的组成以 Null、7+8、2+12(40%)和 Null、7+9、2+12(30%)为主,这与我国大部分省份和全国的研究结果是一致的,大部分缺乏 5+10,1,2+3,17+18,14+15 等优质亚基。本次测试中 7+9,2+12 亚基占多数也充分说明了这个问题;

2) 陇东冬小麦育成品种中,20 份材料有 8 种亚基出现,说明亚基遗传多样性欠缺, Glu-A1 位点亚基无缺失;

3) 陇东旱塬地区早年育成的冬小麦品种庆丰 1 号中其亚基组合为 1、7+8、5+10,为公认的优质亚基组合类型,这和它的祖辈当地地方品种白齐麦(1、7+8、5+10)亚基组合类型完全相同;

4) 陇东旱塬地区近年育成的新品种陇育 219 其亚基组合为(Null、7+9、2+10),在 Glu-D1 位点出现了 2+10 新亚基类型。

优质亚基(1、7+8、5+10)在白齐麦和庆丰 1 号这两个品种出现充分说明了亚基具有较强的遗传特

性,李硕碧研究也证实了这点^[7]。然而在近年育成的品种中却没有出现,说明育种过程中没有很好地利用这一优质亚基。

陇育 219 在 Glu-D1 位点出现的 2+10 新亚基类型可能是 Glu-D1a(亚基 2+12)和 Glu-Dd(亚基 5+10)两个连锁基因的重组子,能否证实还有待进一步研究。

特别是 Glu-D1 位点上的 5+10 亚基,呈正向效应^[3]。另外 2*、14+15、17+18 等亚基也与烘烤品质呈正相关,含这些亚基的亲本利用是将后陇东地区小麦育种工作中改善小麦品质的突破点。

参考文献:

- [1] 朱金宝,刘广田.小麦子粒高、低分子量麦谷蛋白亚基及其与品质关系的研究[J].中国农业科学,1996,29(1):34-39.
- [2] 赵和,卢少源,李宗智,等.普通小麦高分子量麦谷蛋白亚基遗传变异及其与其他性状的关系[J].河北农业大学学报,1993,16(1):8-12.
- [3] 刘广田,许明辉.普通小麦胚乳高分子量谷蛋白亚基的变异和遗传[J].中国农业科学,1998,21(1):56-58.
- [4] Payne P I, Holt L M, Law C N. Structural and genetical studies on the high molecular weight gluten in [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1981, 60: 229-236.
- [5] Payne P I, Lawrence G J. Catalogue of alleles for the complex gene loci, Glu-A1, Glu-B1, and Glu-D1 which code for high-molecular-weight subunits of gluten in hexaploid wheat [J]. Cereal Research Communication, 1983, 11(1): 26-35.
- [6] 毛沛.小麦高分子量(HMW)麦谷蛋白亚基组成及其与面包烘烤品质关系的研究[D].石家庄:河北农业大学,1993.
- [7] 李硕碧,高翔,单明珠,等.小麦高分子量谷蛋白亚基与加工品质[M].北京:中国农业出版社,2001:26,45.

(上接第 12 页)

- [23] 邢更妹,王蒂,崔凯荣,等.抗锈小麦品系 89144 对锈菌侵染和伤害反应的比较[J].中国农业科学,2003,36(1):44-48.
- [24] 山仓,徐炳成.论高粱的抗旱性及在旱区农业中的地位[J].中国农业科学,2009,42(7):2342-2348.
- [25] 倪建福,周文麟,王亚馥.高粱 DNA 导入小麦选育抗条锈白粒新品系[J].兰州大学学报(自然科学版),1994,30(增刊):144-147.
- [26] 刘学春,潘春欣,宋云枝,等.一种单子叶植物总 DNA 提取方法的改进与应用[J].山东农业大学学报,1995,26(4):491-492.
- [27] 王广金,李忠杰,张晓东,等.利用花粉管通道法将编码优质 HMW-GS 基因导入小麦进行品质改良的研究[J].黑龙江农业科学,2002,(6):1-3.
- [28] 刘香利,刘缙,郭嵩光,等.小麦高分子量麦谷蛋白 14 亚基基因的花粉管通道法转化[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2008,36(1):121-124.
- [29] 刘芳,袁鹰,高树仁,等.外源 DNA 花粉管通道途径导入机理研究进展[J].玉米科学,2007,15(4):59-62.
- [30] 赵炳然.外源 DNA 直接导入植物后的整合与分子验证[J].作物研究,1998,(4):1-3.
- [31] 王玉元.染色体遗传中的一个不解之谜——B 染色体[J].武汉植物学研究,1997,15(1):73-79.
- [32] 周建林,李阳生,李达模.稗草 DNA 导入水稻产生的变异体的耐铁毒特性和 RAPD 分析[J].作物学报,2001,27(4):529-532.
- [33] 万文举,邹冬生,彭克勤.论生物诱变——外源 DNA 导入的双重作用[J].湖南农学院学报,1992,18(4):886-891.
- [34] 张鲁军,焦滨,史艳芹,等.小麦高分子量麦谷蛋白基因沉默研究进展[J].麦类作物学报,2009,29(6):1129-1133.
- [35] 李三和,李举,王娜丽,等.外源 1Dx5 基因导致小麦高分子量麦谷蛋白亚基表达变异[J].生物技术通讯,2007,18(2):217-219.