

转反义 *trxs* 基因小麦分子鉴定及抗穗发芽株系的筛选

陈 新, 孟晓丹, 王亚英, 肖瑞霞, 张 斌, 任江萍*, 尹 钧
(河南农业大学 国家小麦工程技术研究中心, 河南 郑州 450002)

摘要: 为给小麦抗穗发芽育种提供基础材料和参考依据, 分别以豫麦 18、豫麦 70 和豫麦 34 为受体, 对转反义 *trxs* 基因小麦 01TY18、01TY70 和 01TY34 高代株系进行 PCR 分子检测, 并对阳性株系进行离体整穗发芽和 α -淀粉酶活性测定。结果表明, 经 PCR 检测 T_7 代 40 个转基因株系中, 阳性株系占 55%。与非转基因对照相比, 转基因株系的穗粒发芽率和 α -淀粉酶活性都有所下降, 其中有 19 个株系穗粒发芽率显著低于对照, 占阳性转基因株系的 86.4%; 有 16 个株系 α -淀粉酶活性较对照显著降低, 占阳性转基因株系的 72.7%。综合 PCR 检测、穗粒发芽率和 α -淀粉酶活性测定结果, 共筛选出转反义 *trxs* 基因的抗穗发芽小麦株系 15 个, 其中 01TY18 8 个、01TY70 5 个、01TY34 2 个, 占有转基因株系的 37.5%、阳性转基因株系的 68.2%。

关键词: 小麦; 反义 *trxs* 基因; 转基因株系; 离体整穗发芽; α -淀粉酶活性

中图分类号: S512.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2013)04-0019-05

Molecular Identification and Screening of Pre-harvest Sprouting Resistance Lines in Transgenic Wheat with Anti-sense *trxs* Gene

CHEN Xin, MENG Xiao-dan, WANG Ya-ying, XIAO Rui-xia,
ZHANG Bin, REN Jiang-ping*, YIN Jun

(National Engineering Research Center for Wheat, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: To provide the basic materials and reference for pre-harvest sprouting resistance in wheat breeding, the high generation transgenic lines 01TY18, 01TY70 and 01TY34 with anti-*trxs* gene and their non-transgenic parents Yumai 18, Yumai 70 and Yumai 34 were used as testing materials to carry out the PCR detection, and the determination of intact spike sprouting and α -amylase activity in positive lines. The results of PCR detection showed that the positive lines with the target gene were 55% of the 40 T_7 transgenic lines. Compared with the non-transgenic control, the spike-seed sprouting rate and the α -amylase activity in positive transgenic lines decreased. Among them, 19 lines were significantly lower than the control in spike-seed sprouting rates, accounting for 86.4% of the positive transgenic lines, while 16 lines were significantly lower than the control in α -amylase activity, accounting for 72.7% of the positive transgenic lines. Based on the results of PCR detection, spike spouting and α -amylase activity screening, 15 positive transgenic lines with pre-harvest sprouting resistance were selected, among which, 8 lines were from 01TY18, 5 from 01TY70, and 2 from 01TY34, accounting for 68.2% of the positive transgenic lines and 37.5% of all transgenic lines, respectively.

Key words: wheat; anti-sense *trxs* gene; transgenic lines; intact spike sprouting; α -amylase activity

收稿日期: 2012-08-02

基金项目: 国家转基因生物新品种培育重大专项(2011ZX08002-002)

作者简介: 陈 新(1987-), 男, 湖北咸宁人, 在读硕士研究生, 研究方向: 小麦生物技术。E-mail: gary680xin@163.com

* 通讯作者: 任江萍(1966-), 女, 山西定襄人, 副研究员, 主要从事小麦生理生态与生物技术研究。E-mail: xmxrjp@126.com

穗发芽(pre-harvest sprouting, PHS)是小麦减产、品质下降的世界性难题。在我国长江流域冬麦区、东北春麦区和黄淮冬麦区小麦穗发芽现象时有发生^[1]。穗发芽不仅影响小麦产量,而且影响品质(尤其是加工品质)、储藏及播种质量。即使有的籽粒外观不发芽,但其储藏的营养物质已发生转化,给小麦生产带来严重的经济损失^[2-3]。关于穗发芽的成因,国内外学者进行了大量的研究,认为 α -淀粉酶活性提高是造成穗发芽的主要原因^[4-7]。硫氧还蛋白(thioredoxin, trx)是一类广泛存在于生物体内的多功能酸性蛋白,能够通过氧化还原靶蛋白中的二硫键来参与生物体内许多重要的生命活动^[8]。小麦籽粒中 trxh 还原态可占 80%^[9],还原型 trxh 可以还原小麦 α -淀粉酶抑制蛋白的双硫键,从而降低该抑制蛋白对 α -淀粉酶的抑制作用^[10],起着启动种子萌发的作用。序列分析发现,源于蓝色鹼草(*Phalaris coerulescens*)的 *trxs* 基因与源自小麦的 *trxh* 基因的 cDNA 序列同源性达 94%,同属于硫氧还蛋白基因家族。研究表明,它们的蛋白质表达产物也有相同的活性中心和相似的生物活性^[11-12]。本实验室已于 2003 年通过基因枪介导法将来源于蓝色鹼草的 *trxs* 反义基因成功导入普通小麦中,通过转录后基因沉默(PTGS)途径抑制小麦 *trxh* 类同源基因表达,进而影响 α -淀粉酶活性,显著提高了小麦穗发芽抗性^[13-15]。

大量研究结果表明,由于存在多种影响因子和限制因素,使得外源基因在受体植物中不能稳定表达,甚至完全不表达^[16]。为了在转 *trxs* 基因小麦后代中筛选出能够稳定遗传且具有抗穗发芽特性的株系,本研究在得到转反义 *trxs* 基因小麦的基础上,进一步对转基因株系的后代株系进行 PCR 检测、离体整穗发芽试验和 α -淀粉酶活性测定,筛选出抗穗发芽特性显著的株系,旨在为小麦抗穗发芽育种提供重要的种质资源。

1 材料和方法

1.1 供试材料

以小麦品种豫麦 18、豫麦 70 和豫麦 34 为受体,通过基因枪转化法将反义 *trxs* 基因导入,目前已分别得到转基因小麦 01TY18、01TY70、01TY34 第 7 代(T_7)40 个株系。

1.2 试验设置

转基因株系与其相应的受体品种(未转基因对

照)于 2009—2010 年在河南农业大学科技示范园区种植。土壤为砂壤土,肥力均匀。各个株系与其受体品种分小区种植,小区面积 3 m×5 m,每小区种植 11 个株系,每个株系种植 1 行,单粒播种,穴距 5 cm,随机排列,重复 3 次,生育期间统一管理。

小麦长至两叶一心时,每株系随机选取 5 株,取幼嫩的中部叶片 0.5 g,装入无菌 Eppendorf 管中,液氮速冻后置于-80℃超低温冰箱贮藏,用于转基因株系的分子鉴定。对经分子鉴定结果为阳性的转基因株系及其相应的受体品种,在开花期选取株形整齐、同一天开花、穗形大小一致的植株进行挂牌标记,分别于成熟期进行取样,每株系取 15 穗,置于冰盒中,用于离体整穗发芽试验以及 α -淀粉酶活性测定。

1.3 转基因株系的分子鉴定

小麦叶片基因组 DNA 的小量提取采用 CTAB 法^[17]。根据反义 *trxs* 基因序列设计 2 条特异引物,上游引物 P1(5'-CCAAGTTCTGTGCCAGCCATGC-3')和下游引物 P2(5'-GAACCTGTGCTGATCCAGAGCTG-3')由上海英骏生物技术有限公司合成。PCR 扩增体系 20 μ L,含有 13.1 μ L ddH₂O, 2.0 μ L 10×PCR buffer, 1.2 μ L 2.5 mmol/L dNTP Mix, 10 μ mol/L 引物 P1、P2 各 1.0 μ L, 1.5 μ L 模板 DNA, 0.2 μ L Taq DNA 聚合酶。PCR 反应在 Biametra T3000 型 PCR 扩增仪(德国)上进行。扩增程序为:95℃预变性 5 min;然后 94℃变性 30 s, 58℃退火 30 s, 72℃延伸 30 s, 30 个循环;最后 72℃延伸 10 min。PCR 产物用 1%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.4 离体整穗发芽试验

在小麦完熟期,随机选取 PCR 检测为阳性的转基因株系及其对照各 15 个主茎穗,依次插在泡沫板上,在人工气候室进行离体整穗发芽试验,温度控制在(25±1)℃,湿度≥90%(模拟降雨),16 h 光照、8 h 黑暗交替进行。处理 3 d 后取其中 5 穗,剥取籽粒,液氮处理后于-80℃冰箱保存,作为 α -淀粉酶活性测定材料。5 d 后对剩余 10 穗剥粒,统计穗粒发芽率。以胚根突破种皮作为发芽标准。

穗粒发芽率=第 5 天穗发芽粒数/穗粒总数×100%

1.5 α -淀粉酶活性测定

α -淀粉酶活性测定采用 3,5-二硝基水杨酸法^[18],即每份材料称取 0.5 g 籽粒,加 0.5 g 石英砂,再加 2 mL 提取液冰浴研磨成匀浆状,分 2 次将

残渣洗入 10 mL 离心管,室温放置 15~20 min,期间上下颠倒数次。离心 10 min,取上清液,定容至 50 mL。取 2 mL 于 70 ℃ 水浴 15 min,加 1 mL 1% 淀粉溶液,40 ℃ 水浴 5 min,迅速加入 2 mL 3,5-二硝基水杨酸,沸水煮 5 min,后取出冷却后定容至 50 mL。于 540 nm 处比色,记录 OD 值。根据吸光值的大小计算 α -淀粉酶活性。 α -淀粉酶活性单位按 1 g 植物材料 1 min 水解淀粉产生的麦芽糖量(mg)计算。

1.6 数据的统计分析

试验数据采用生物学统计软件 SPSS 11.0 进行方差分析和多重比较。

2 结果与分析

2.1 小麦转基因后代的分子鉴定

在小麦长至两叶一心时,每个株系及未转基因小麦分别随机选取 5 株,提取叶片 DNA 并等量混合后,取适量为模板,用引物 P1+P2 对 T₇ 代共计 40 个转基因株系进行 PCR 检测,未转基因小麦为阴性对照,含有反义 *trxs* 基因的质粒为阳性对照。结果表明(检测的部分结果见图 1),在被检测的 40 个转基因株系中均扩增出了与阳性对照片段大小相同的目的片段,而未转化株未扩增出目标片段。说明反义 *trxs* 基因已稳定遗传至后代。

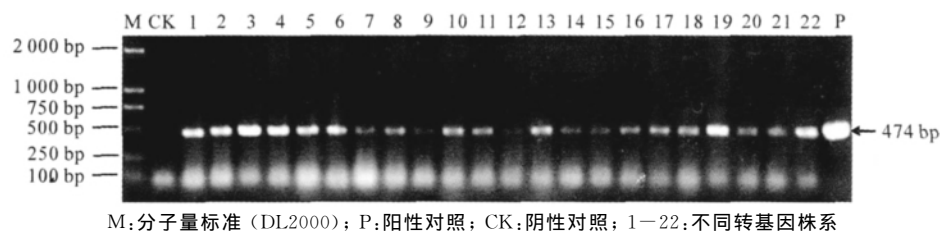


图 1 部分转基因株系 PCR 检测结果

为了进一步检测转基因株系中每个单株外源基因的遗传稳定情况,以每个株系中随机选取的 5 个单株 DNA 为模版,用引物 P1+P2 进行了 PCR 扩增。结果表明(图 2),在被检的 200 个单株中,大部分植株

均出现了与阳性对照相一致的目标条带。为了后续的研究,挑选 5 株全部为阳性的株系为阳性株系。经过对检测结果的统计,共检测出 22 个阳性株系(表 1),这些阳性株系占 T₇ 代转基因株系的 55%。

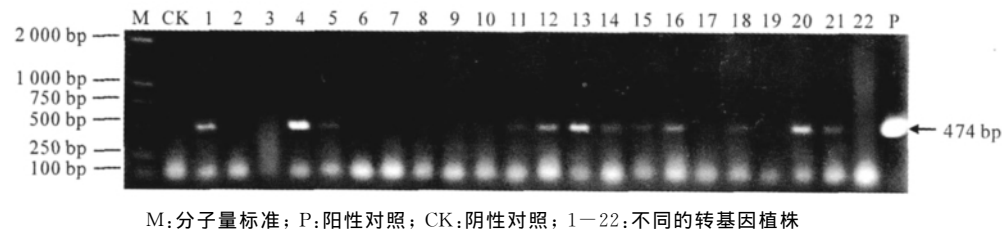


图 2 不同转基因株系随机单株 PCR 检测结果

表 1 转基因材料株系代码

受体	转基因小麦	株系代码					
豫麦 18	01TY18	99-8-1	99-8-3	107-1	106-3	14-5-2	14-5-3
		14-5-4	14-8-3	14-8-5	6-10-5		
豫麦 70	01TY70	73-5-4	70-6-2	72-4-2	68-1-1	68-3-2	68-3-3
豫麦 34	01TY34	73-9-10	73-9-14	73-9-15	71-6	71-10	71-3

2.2 不同转基因株系抗穗发芽特性分析

为了进一步明确转基因株系的抗穗发芽特性,对检测为阳性的株系进行了离体整穗发芽试验,结果见表 2—4。从表中可以看出,反义 *trxs* 基因导入对转基因株系的穗粒发芽率均有不同程度的影响。

与未转基因对照相比,22 个转基因株系的穗粒发芽率均有所下降,其中有 19 个株系的穗粒发芽率较对照显著下降 ($P < 0.05$), 占有转基因株系的 86.4%。说明反义 *trxs* 基因使转基因小麦具备了一定的抗穗发芽能力,但各品种间穗粒发芽率降低

程度有所差异。由表 2—4 可知,以受体品种豫麦 18、豫麦 70 和豫麦 34 获得的转基因小麦 01TY18、01TY70、01TY34 的平均穗粒发芽率为 12%、30.3%、33.3%,分别较其对照下降 63.8%、45.7%、38.2%。其中,01TY18 阳性转基因株系平均穗率发芽率最低,较对照下降比例最大。

表 2 转基因小麦 01TY18 穗发芽及淀粉酶活性检测结果

株系	穗粒发芽率/%	α -淀粉酶活性/ [mg/(g·min)]
99-8-1	21.2±2.62bc	1.74±0.19de
99-8-3	24.57±3.08b	2.62±0.27ab
107-1	10.26±2.14d	2.36±0.04b
106-3	3.63±1.95e	1.89±0.04cd
14-5-2	19.07±4.86c	2.24±0.21bc
14-5-3	10.27±1.95d	2.54±0.23ab
14-5-4	3.45±1.25e	1.55±0.33de
14-8-3	0	1.40±0.17e
14-8-5	13.86±1.14e	1.53±0.25de
6-10-5	14.01±2.42d	1.61±0.22de
对照	33.14±2.13a	2.75±0.16a

注:同列不同的小写字母表示差异达到 5%显著水平,下同。

表 3 转基因小麦 01TY70 穗发芽及淀粉酶活性检测结果

株系	穗粒发芽率/%	α -淀粉酶活性/ [mg/(g·min)]
73-5-4	19.39±0.74c	3.13±1.17bc
70-6-2	36.38±2.23b	3.50±0.26bc
72-4-2	24.18±2.28c	2.60±0.31cd
68-1-1	21.22±2.50c	1.90±0.43d
68-3-2	32.66±3.08b	1.85±0.13d
68-3-3	47.8±3.74a	3.77±0.64ab
对照	55.85±3.73a	4.59±0.19a

表 4 转基因小麦 01TY34 穗发芽及淀粉酶活性检测结果

株系	穗粒发芽率/%	α -淀粉酶活性/ [mg/(g·min)]
73-9-10	10.63±1.94d	3.20±0.34bc
73-9-14	19.69±3.10c	4.32±0.71ab
73-9-15	21.38±1.00c	3.84±0.46abc
71-6	49.82±5.56ab	4.07±1.71abc
71-10	46.93±2.06b	2.81±0.13c
71-3	51.27±1.16ab	3.32±0.35bc
对照	53.85±3.34a	4.80±0.34a

2.3 不同转基因株系 α -淀粉酶活性分析

反义 *trxs* 基因导入对转基因株系的 α -淀粉酶

活性均有一定的抑制作用。与相应未转基因对照相比,阳性转基因株系的 α -淀粉酶活性均有所下降。对照 α -淀粉酶活性平均值为 4.1 mg/(g·min),各株系 α -淀粉酶活性平均值为 2.6 mg/(g·min),较对照下降 35.1%。其中有 16 个株系的 α -淀粉酶活性显著低于对照,占 72.7%。

各品种间 α -淀粉酶活性降低程度有所差异。由表 2—4 可知,转基因小麦 01TY18、01TY70、01TY34 的 α -淀粉酶活性分别为 1.9、2.8、3.6 mg/(g·min),比其对照分别下降 30.9%、39.2%、25.1%。3 个受体品种阳性转基因株系中,01TY18 阳性转基因株系 α -淀粉酶活性最低。

3 结论与讨论

对 40 个转基因株系的 PCR 检测结果显示,反义 *trxs* 基因能够特异性表达的阳性株系占 55%。说明反义 *trxs* 基因已整合到小麦基因组中并在 22 个阳性株系中稳定遗传。在证实外源基因存在的基础上,外源基因能否正常表达以及性状表现如何,是决定转基因材料能否利用的重要条件。因此 PCR 检测只能作为基础的检测方法,该方法应该与转基因后代性状表现的筛选结合起来。穗发芽除了受成熟时环境条件的影响外,还受穗部形态如颖壳形态、穗的大小、疏密程度、芒的长短等因素影响。用脱粒种子进行试验,只能测出种子休眠程度对穗发芽的影响,有关外源抑制物质及穗的形态结构对穗发芽的作用则难以了解^[19]。而用完整麦穗进行试验,则能从种子休眠、外源抑制物质和穗部形态、结构等方面较直观、全面地反映品种穗发芽特性。因此,本研究采用整穗发芽和模拟降雨的方法对不同转基因株系穗粒发芽率进行调查。另外,在影响小麦穗发芽的多种因素中, α -淀粉酶活性的高低也可作为鉴定穗发芽抗性的重要指标^[5,20]。对转基因株系进行穗发芽试验和 α -淀粉酶活性测定的结果显示,转基因株系在穗发芽抗性上存在着较大差异,有 19 个株系穗粒发芽率较对照显著降低,占阳性转基因株系的 86.4%;株系间在 α -淀粉酶活性上也存在较大差异,有 16 个株系较对照显著降低,占 72.7%。

单一指标判定,可能由于人为因素或外源基因异时性表达等原因造成试验误差,影响株系筛选结果,本研究在对外源基因进行 PCR 检测的基础上,结合穗粒发芽率和 α -淀粉酶活性测定结果,筛选出转反义 *trxs* 基因小麦抗穗发芽株系 15 个,其中 01TY18 8 个,分别为 99-8-1、107-1、106-3、14-5-2、

14-5-4、14-8-3、14-8-5、6-10-5;01TY70 5 个,分别为 73-5-4、70-6-2、72-4-2、68-1-1、68-3-2;01TY34 2 个,分别为 73-9-10、71-10。本研究筛选出的转反义 *trxs* 基因小麦抗穗发芽株系可为抗穗发芽育种提供重要材料和参考依据,并对外源基因在种植多代后在转基因小麦中的遗传特性分析和检测提供参考和借鉴。

参考文献:

- [1] 肖世和,闫长生,张海萍,等. 小麦穗发芽研究[M]. 北京:中国农业科学技术出版社,2004:4-10.
- [2] 尹钧,李志岗,任江萍,等. 反义 *trxs* 基因对转基因小麦籽粒硫氧还蛋白还原活性的影响[J]. 作物学报,2006,32(9):1344-1348.
- [3] 原亚萍,陈孝,肖世和. 小麦穗发芽的研究进展[J]. 麦类作物学报,2003,23(3):136-139.
- [4] Mares D J. Preservation of dormancy in freshly harvested wheat grain[J]. Australian Journal of Agricultural Research,1983,34(1):33-38.
- [5] 张海峰,Zemetra R S,Liu T C. 冬小麦穗发芽抗性及其鉴定方法的研究[J]. 作物学报,1989,15(2):116-122.
- [6] 沈正兴,俞世蓉,吴兆苏. 小麦品种抗穗发芽性的研究[J]. 中国农业科学,1991,24(5):44-50.
- [7] 周苏玫,尹钧,任江萍,等. 转反义 *trxs* 基因小麦籽粒蛋白组分的巯基含量与 α -淀粉酶活性的关系[J]. 作物学报,2006,32(6):821-826.
- [8] Gelhaye E,Rouhier N,Jacquot J P. The thioredoxin h system of higher plants[J]. Plant Physiology and Biochemistry,2004,42: 265-271.
- [9] Joudrier P,Gautier M F,de Lamotte F,*et al.* The thioredoxin h system: potential applications[J]. Biotechnology Advance,2005,23:81-85.
- [10] Besse I,Wong J H,Kobrehel K,*et al.* Thiocalsin: A thioredoxin linked, substrate-specific protease dependent on calcaium[J]. Proc Natl Acad Sci USA,1996,93: 3169-3175.
- [11] Li X M,Nield J,Hayman D,*et al.* Thioredoxin activity in the C terminus of *Phalaris* S protein[J]. Plant Journal,1995,8(1):133-138.
- [12] Li X M,Nield J,Hayman D,*et al.* A self-fertile mutant of *Phalaris* produces an S protein with reduced thioredoxin activity[J]. Plant Journal,1996,10(3): 505-513.
- [13] 郭红祥,尹钧. 反义 *trxs* 基因对小麦种子萌发中 α -淀粉酶的影响[J]. 江西农业学报 2009,21(6):1-3.
- [14] 刘雷,尹钧,任江萍,等. 反义 *trxs* 基因的导入对小麦种子发芽的影响[J]. 作物学报,2004,30(8): 801-805.
- [15] 任江萍,郭建军,王新国,等. 转反义 *trxs* 基因小麦株系 01TY18 遗传分析及抗穗发芽特性[J]. 西北植物学报,2008,28(8):1549-1553.
- [16] Meyer P,Saedler H. Homology-dependent gene silencing in plants[J]. Plant Molecular Biology,1996,47: 23-48.
- [17] 王关林,方宏筠. 植物基因工程原理与技术[M]. 北京:科学出版社,1998.
- [18] 姜晓东,张京,郭刚刚. 大麦 Amy32b 的遗传多样性及其对 α -淀粉酶活性的影响[J]. 中国农业科学,2012,45(5):823-831.
- [19] 陈爱大,朱传统. 小麦穗发芽敏感性测定方法初探[J]. 江苏农业科学,1997(3):14-16.
- [20] Gale M D. Endogenous hormones and the production of α -amylase in the developing wheat grain[M]// Abstracts of 4th intern symp on pre-harvest sprouting in cereals,Port Macquire,1986:13-14.