

转 *TaCOMT-3D* 基因小麦的农艺性状评价周森平¹, 张增艳², 姚金保¹, 王化敦¹, 杨学明¹, 张鹏¹, 余桂红¹, 马鸿翔¹

(1. 江苏省农业科学院粮食作物研究所, 江苏南京 210014; 2. 中国农业科学院作物科学研究所, 北京 100081)

摘要 *TaCOMT-3D* 基因是小麦木质素合成的关键基因,也是小麦抵御纹枯病菌侵染的重要基因。为了评估转基因小麦中 *TaCOMT-3D* 基因组成型表达对农艺性状的影响,4 个遗传稳定的转基因株系及其受体对照扬麦 16 用于 *TaCOMT-3D* 基因检测、不同器官表达分析验证、纹枯病抗性鉴定、小区产量试验以及主要农艺性状的考察。结果显示,转基因株系均能检测到导入的 *TaCOMT-3D* 基因并且该基因能组成型表达;转基因株系与受体对照扬麦 16 相比,纹枯病抗性显著提高;除了部分转基因株系的主穗穗长、主穗粒数、籽粒蛋白含量与受体对照差异显著外,转基因小麦的生育期、株高、产量性状、主穗性状和籽粒性状与受体对照均没有显著差异。试验结果表明, *TaCOMT-3D* 基因的组成型表达对转基因小麦的主要农艺性状影响不明显。

关键词 小麦; *TaCOMT-3D*; 转基因; 纹枯病; 农艺性状

中图分类号 S503.2 **文献标识码** A

文章编号 0517-6611(2020)01-0102-04

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2020.01.032



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Evaluation of Agronomic Traits of Transgenic Wheat with *TaCOMT-3D*

ZHOU Miao-ping¹, ZHANG Zeng-yan², YAO Jin-bao¹ et al (1. Institute of Grain Crops, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing, Jiangsu 210014; 2. Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081)

Abstract *TaCOMT-3D* gene is a key gene in wheat lignin synthesis and is also an important gene resistant to wheat sharp eyespot. To assess the effect on agronomic traits of the transgenic wheat by *TaCOMT-3D*, four varieties with stable heredity and their receptor Yangmai 16 were used to detect the *TaCOMT-3D*, analyze the expression of the gene in different organs, evaluate the resistance to wheat sharp eyespot, test plot yield and survey the major agronomic traits. The results showed that the *TaCOMT-3D* gene could be detected in all transgenic lines and expressed constitutively in different organs. Compared with Yangmai 16, the resistance to wheat sharp eyespot improved significantly in all transgenic lines. There were no significant differences in wheat growth period, plant height, yield traits, main spike traits and grain traits except for significant differences in grain protein content, ear length and number of grains of main spike between some transgenic lines and receptor control. The results indicated that the constitutive expression of *TaCOMT-3D* had no significant effect on the main agronomic traits of transgenic wheat.

Key words Wheat; *TaCOMT-3D*; Transgene; Wheat sharp eyespot; Agronomic trait

小麦纹枯病是我国长江中下游麦区和黄淮麦区的重要病害,每年造成经济损失巨大^[1],该病害主要由禾谷丝核菌等侵染小麦茎秆基部引起,抗病小麦的培育和推广是防治该病害、保证小麦可持续发展的重要措施。由于小麦对纹枯病的抗性是数量性状,抗性涉及多个 QTL 位点和多条染色体^[2],抗性 QTL 的累积耗时费力,因而小麦抗纹枯病育种进展缓慢。

转基因技术可以引进外源的抗病基因或者对小麦本身的基因进行修饰,从而提高小麦的纹枯病抗性,已经成为小麦纹枯病抗病新种质创制的重要途径^[3-5]。中国农业科学院作物科学研究所张增艳实验室对纹枯病抗感小麦品种 CI12633(抗)和温麦 6 号(感)采用基因芯片分析技术发现并克隆了位于 3DL 染色体的差异表达基因 *TaCOMT-3D*,过表达和抑制表达试验表明该基因是小麦抗纹枯病的重要基因,进一步的研究发现该基因的过表达增加了小麦茎秆中的木质素积累,提高了茎秆强度,增强了对小麦纹枯病菌的抵御能力^[6]。将由 ubiquitin 组成型启动子驱动的 *TaCOMT-3D* 基因导入小麦品种扬麦 16 中,发现其纹枯病抗性较受体对照明显提高。但该基因的组成型表达对小麦其他农艺性状有何影响尚不明了。该研究拟对筛选获得的 4 个遗传稳定

的转基因株系在大田环境下与受体对照扬麦 16 的农艺性状进行比较,评价 *TaCOMT-3D* 基因的组成型表达对转基因株系重要农艺性状的影响。

1 材料与方法

1.1 材料 转 *TaCOMT-3D* 基因株系 CT248、CT274、CT323 和 CT345 由中国农业科学院作物科学研究所张增艳研究员提供;受体对照扬麦 16 由江苏省农业科学院粮食作物研究所麦类作物研究室提供。

1.2 方法

1.2.1 转基因株系 *TaCOMT-3D* 基因的检测。 分别取转基因株系和对照扬麦 16 的幼苗叶片,冷冻干燥,全自动样品快速研磨仪(上海净信)磨碎后参照 Karroten 植物基因组 DNA 提取试剂盒操作手册提取 DNA。导入的 *TaCOMT-3D* 基因采用嵌合引物进行扩增,正向引物序列为 *TaOMT-3D-964JCF*: 5'-GAGAGGTACGAGAGGGAGTT-3',反向引物序列为 *TaOMT-3D-1281JCR*: 5'-TAAATGTATAATTGCGG-GAC-3';PCR 反应体系总体积为 20 μ L,含 2 \times premix *Taq* (TaKaRa) 10 μ L, 5 μ mol/L 引物各 1 μ L, 50 ng 模板 DNA。PCR 扩增条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 57 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。扩增产物 300 bp 左右,PCR 产物采用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳分离。

1.2.2 转基因株系 *TaCOMT-3D* 基因的表达分析。 灌浆期,取转基因株系和对照的根、茎、叶和籽粒,液氮冷冻磨碎,采用植物 RNA 快速提取试剂盒(南京钟鼎)提取 RNA, Prime

基金项目 转基因生物新品种培育重大专项(2016ZX08002001);江苏省农业科学院基金项目(6111687)。

作者简介 周森平(1968—),男,江苏兴化人,研究员,硕士,从事小麦遗传和育种研究。

收稿日期 2019-07-29

Script II 1st Strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa) 进行反转录, 按照 SYBR Premix Ex *Taq* (Tli RNaseH Plus) 试剂盒 (TaKaRa) 推荐方法进行荧光定量 PCR。Actin 基因为内参基因, 其特异引物对为 TaActin - F: 5'—CACTGGAATGGTCAAG-GCTG—3' 和 TaActin - R: 5'—CTCCATGTCATCCCACTTG—3'; *TaCOMT-3D* 基因特异引物对为 TaCOMT-Q-F: 5'—AT-GTTCAGAAAGGTGCC—3' 和 TaCOMT-Q-R: 5'—TGCTCG TCGCTCCAGTC—3'。荧光定量 PCR 在 LineGene K 荧光定量 PCR 仪 (杭州博日) 上进行, 扩增曲线: 95 °C 30 s, 循环 1 次; 95 °C 5 s, 60 °C 20 s, 循环 40 次, 72 °C 单点检测信号。溶解曲线: 95 °C 0 s, 65 °C 15 s, 95 °C 0 s, 连续检测信号^[7]。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法对数据进行相对定量分析。

1.2.3 转基因株系的农艺性状观察和分析。转基因株系和受体对照于 2018 年 12 月 17 日在江苏省农业科学院六合转基因基地按随机小区播种, 每个小区 5 行, 行长 2 m, 行距 0.25 m, 3 次重复。播种后覆盖地膜至 2019 年 1 月 15 日, 其余按正常小麦种植管理。

田间试验主要对转基因株系的生长发育和形态特征等主要农艺性状进行观察, 记载播种、出苗、抽穗、开花和成熟等各生育时期; 调查和测量基本苗、高峰苗、有效穗、产量、株

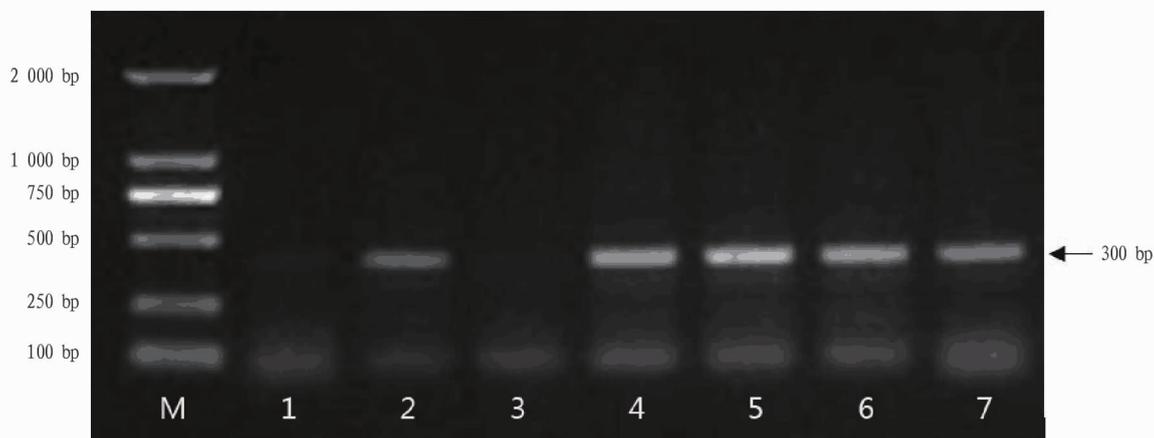
高等重要农艺性状; 成熟时, 考察主穗穗长、小穗数、不孕小穗数以及每穗粒数; 收获后, 测量籽粒大小、千粒重和籽粒蛋白含量等籽粒性状; 同时调查转基因株系对白粉病、纹枯病和赤霉病等病害的抗性。

籽粒大小测量方法: 每小区随机取 100 粒籽粒, 照相后采用 SmartGrain 软件^[8] 根据像素计算籽粒长度与宽度; 籽粒蛋白含量采用 Perten DA7200 近红外仪测定。

所有数据的方差分析和 *t* 测验分析均采用 Excel 2016 软件进行, 先进行方差分析, 差异显著的性状再分别在各转基因株系和受体对照间进行 *t* 测验。

2 结果与分析

2.1 转基因株系 *TaCOMT-3D* 基因的检测结果 种植的 4 个转基因株系经 T_3 检测已经纯合, 该试验已达 T_4 代, 拔节期分别取转基因株系和受体对照扬麦 16 的叶片, 提取 DNA。考虑到小麦本身含有 *TaCOMT-3D* 基因, 因而采用嵌合引物检测导入的 *TaCOMT-3D* 基因, 嵌合引物的正向引物在 *TaCOMT-3D* 中, 反向引物在 nos 终止子中, 结果表明转基因株系均能扩增出 300 bp 的目的条带 (图 1), 而受体对照未有扩增条带出现, 表明导入的 *TaCOMT-3D* 基因已经整合进小麦基因组并能稳定遗传。



注: M. DNA Marker; 1. H_2O ; 2. pWMB-*TaCOMT-3D*; 3. Yangmai 16; 4. CT248; 5. CT274; 6. CT323; 7. CT345

图 1 转基因小麦 *TaCOMT-3D* 基因的 PCR 检测

Fig. 1 PCR detection of *TaCOMT-3D* in transgenic wheat

2.2 转基因株系 *TaCOMT-3D* 基因的表达分析结果 灌浆期分别取转基因株系和受体对照的根、茎、叶片和籽粒样品, 提取 RNA 并反转录成 cDNA, 采用荧光定量 PCR 检测 *TaCOMT-3D* 基因的表达, 以受体对照扬麦 16 各器官的表达为基准, 计算转基因株系不同器官的相对表达量, 发现 4 个转基因株系的根、茎、叶片和籽粒等器官中 *TaCOMT-3D* 基因的表达均超过受体对照扬麦 16, 符合组成型表达的预期。

2.3 转基因株系的农艺性状表现

2.3.1 生育期的比较。由于播种已经迟于扬麦 16 最适播种期, 采用加大播种量和覆盖地膜等措施, 保证小麦齐苗和足苗。小麦返青后, 加强肥水管理, 小麦生长基本正常, 转基因株系生育期与受体亲本扬麦 16 相仿 (表 1), 表明目的基因的导入和持续表达对其生育期影响不明显。

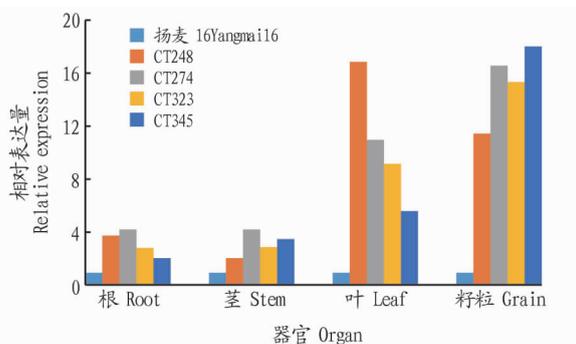


图 2 转基因小麦不同器官中 *TaCOMT-3D* 基因表达分析

Fig. 2 Expression analysis of *TaCOMT-3D* in different organs of the transgenic wheat

2.3.2 苗情和产量的比较。4 个转基因株系与扬麦 16 相

似,均属春性小麦,幼苗半直立,后期株型较松散。由于播种气温偏低,尽管采取加大播种量和地膜覆盖措施,但是基本苗仍偏低,转基因株系与对照没有明显差别,表明目的基因的导入和表达对种子萌发没有显著影响。

在基本苗基本一致的情况下,转基因株系的高峰苗和有效穗与对照差异不显著,说明目的基因的表达没有对小麦的繁茂性和成穗率产生明显影响。除了转基因株系 CT323 较扬麦 16 增产外,其余 3 个转基因株系的产量低于扬麦 16,但

都未达到显著差异水平。由于播种期的推迟,生育期缩短,转基因株系和对照的株高均有所降低,但转基因株系与对照株高相差不明显(表 2)。

2.3.3 主穗性状的比较。灌浆后期,对转基因株系和对照的主穗农艺性状进行考察,结果见表 3,除了 CT274 的主穗粒数、CT345 的主穗长度和主穗粒数与对照相比有显著差异外,其余转基因株系主穗性状与对照扬麦 16 相比无显著差异。

表 1 转基因株系生长发育各阶段物候期的比较

Table 1 Comparison of phenological stages at different stages of growth and development of transgenic lines

品系名称 Lines name	从播种至出苗天数 Days from sowing to germination	从出苗至抽穗天数 Days from germination to heading	从抽穗至开花天数 Days from heading to flowering	从开花至成熟天数 Days from flowering to matures	全生育期天数 Days of whole growth period
CT248	16	108.3	11.0	30.0	165.3
CT274	16	108.3	11.3	29.7	165.3
CT323	16	108.0	11.0	30.0	165.0
CT345	16	108.7	11.0	30.0	166.7
扬麦 16 Yangmai 16	16	108.0	11.0	30.0	165.0

表 2 转基因株系部分农艺性状的比较

Table 2 Comparison of the partial agronomic traits of transgenic lines

品系名称 Lines name	基本苗 Basic seedling $\times 10^4/\text{hm}^2$	高峰苗 Peak seedling $\times 10^4/\text{hm}^2$	有效穗 Effective spikes $\times 10^4/\text{hm}^2$	产量 Yield kg/hm^2	株高 Plant height cm
CT248	159.0	693.0	315.0	6 057.0	81.4
CT274	162.0	723.0	366.0	6 055.5	81.1
CT323	147.0	670.5	369.0	6 937.5	80.0
CT345	151.5	709.5	421.5	5 896.5	80.9
扬麦 16 Yangmai 16	159.0	735.0	343.5	6 297.0	79.6

表 3 转基因株系主穗性状的比较

Table 3 Comparison of the main spike traits of transgenic lines

品系名称 Lines name	穗长 Spike length cm	小穗数 Number of spikelets	不孕小穗数 Number of infertile spikelets	粒数 Number of grains
CT248	8.5	21.9	1.8	54.9
CT274	8.6	21.8	2.1	50.8*
CT323	8.6	21.9	1.8	57.7
CT345	8.7*	22.4	2.1	52.2*
扬麦 16 Yangmai 16	8.5	22.0	2.3	55.7

注: * 表示在 0.05 水平有显著差异
Note: *. Significant difference at 0.05

2.3.4 籽粒性状的比较。籽粒收获晒干后,每小区随机取 100 粒测定籽粒长度和宽度,计算平均值,方差分析显示尽管转基因株系和对照的籽粒长宽有所变化,但差异均不显著。采用近红外测定籽粒蛋白含量发现转基因株系籽粒蛋白含量均较对照有所提高,CT274 和 CT345 与对照的差异达到显著水平。转基因株系的千粒重与对照差异不显著(表 4)。

2.4 病害抗性的比较 由于 2018—2019 年度小麦生长期雨水偏少,田间湿度低,并且试验地已经多年未种植小麦,与常规小麦的物理距离也超过 500 m,小麦病害的病原菌较少,因而转基因株系和对照扬麦 16 的白粉病、锈病、纹枯病、赤霉

病、小麦黄花叶病等主要病害均未发生或轻微发生,转基因株系与受体对照差异不明显。但在人工病麦粒接种条件下,转基因株系与对照纹枯病病害差异仍然明显(表 5),转基因株系较受体对照平均病情指数降低 18.6%~34.6%。

表 4 转基因株系籽粒性状的比较

Table 4 Comparison of the grain traits of transgenic lines

品系名称 Lines name	长度 Length mm	宽度 Width mm	蛋白含量 Protein content %	千粒重 Thousand kernel weight//g
CT248	6.13	3.18	14.19	44.8
CT274	6.13	3.27	15.27*	46.6
CT323	6.13	3.19	14.30	44.7
CT345	6.18	3.20	15.69*	46.2
扬麦 16 Yangmai 16	6.22	3.24	12.94	46.5

注: * 表示在 0.05 水平有显著差异
Note: *. Significant difference at 0.05

3 讨论与结论

木质素是细胞次生壁的主要成分,在植物体内的含量仅次于纤维素,对维管植物的生长发育是必需的,它参与了细胞壁木质化,加大了细胞壁的抗压强度,促进了机械组织的形成,对植物的抗倒伏和抗病有重要影响。研究发现木质素由木质素单体聚合而成,根据单体来源的不同可将木质素分

为 H 型木质素、G 型木质素和 S 型木质素 3 种类型,单子叶植物均含有这 3 种木质素。

表 5 转基因株系纹枯病抗性的比较

Table 5 Comparison of the resistance to wheat sharp eyespot of transgenic lines

品系名称 Lines name	平均病级 Average disease grade	平均病情指数 Average disease index
CT248	1.8	36.0
CT274	1.6	32.7
CT323	2.0	40.0
CT345	2.0	40.7
扬麦 16Yangmai 16	2.5	50.0

咖啡酸 3-O-甲基转移酶基因 (*COMT*) 是植物木质素合成的重要基因, *COMT* 可以催化咖啡酸、5-羟基松柏醛、5-羟基松柏醇甲基, 分别形成阿魏酸、芥子醛和芥子醇, 从而调控 S 型木质素的合成^[9]。研究发现, S 型木质素含量与拟南芥对核盘菌和维管束真菌甘蓝轮枝菌的感病性有关^[10]。玉米中研究也发现, *ZmCCoAOMT2* 可以调节木质素含量以及改变次生代谢途径调节细胞的死亡程序从而提高对玉米小斑病和灰色叶斑病的抗性^[11]。但将这些基因导入植物中组成型表达对植物其他性状影响的研究几乎没有报道。

中国农业科学院作物科学研究所张增艳课题组将组成型表达的 *TaCOMT-3D* 基因导入小麦可以提高茎秆木质素含量, 增强小麦茎秆强度, 提高对纹枯病菌侵染的抵御能力。笔者引进纯合的转基因株系与受体对照在大田生长状况下评估组成型表达的 *TaCOMT-3D* 基因对小麦其他农艺性状的影响, 结果表明只有个别转基因株系在主穗穗长、主穗粒

数和籽粒蛋白含量方面与受体对照的差异达 0.05 显著水平, 但该基因对冬春性、生育期、产量和株高等重要农艺性状没有产生显著影响。

参考文献

- [1] HAMADA M S, YIN Y N, CHEN H G, et al. The escalating threat of *Rhizoctonia cerealis*, the causal agent of sharp eyespot in wheat [J]. Pest management science, 2011, 67(11): 1411-1419.
- [2] CHEN J, LI G H, DU Z Y, et al. Mapping of QTL conferring resistance to sharp eyespot (*Rhizoctonia cerealis*) in bread wheat at the adult plant growth stage [J]. Theor Appl Genet, 2013, 126: 2865-2878.
- [3] CHEN L, ZHANG Z Y, LIANG H X, et al. Overexpression of TiERF1 enhances resistance to sharp eyespot in transgenic wheat [J]. Journal of experimental botany, 2008, 59(15): 4195-4204.
- [4] LI Z, ZHOU M P, ZHANG Z Y, et al. Expression of a radish defensin in transgenic wheat confers increased resistance to *Fusarium graminearum* and *Rhizoctonia cerealis* [J]. Funct Integr Genomics, 2011, 11(1): 63-70.
- [5] ZHU X L, YANG K, WEI X N, et al. The wheat AGC kinase TaAGC1 is a positive contributor to host resistance to the necrotrophic pathogen *Rhizoctonia cerealis* [J]. Journal of experimental botany, 2015, 66(21): 6591-6603.
- [6] WANG M X, ZHU X L, WANG K, et al. A wheat caffeic acid 3-O-methyltransferase TaCOMT-3D positively contributes to both resistance to sharp eyespot disease and stem mechanical strength [J]. Scientific reports, 2018, 8: 1-14.
- [7] 曾爱松, 李家仪, 李英, 等. 结球甘蓝游离小孢子热激处理下差异表达基因分析 [J]. 南京农业大学学报, 2019, 42(2): 236-245.
- [8] TANABATA T, SHIBAYA T, HORI K, et al. SmartGrain: High-throughput phenotyping software for measuring seed shape through image analysis [J]. Plant physiology, 2012, 160(4): 1871-1880.
- [9] 吕梦燕, 王崇, 奈婕菲, 等. 东北白桦 *COMT1* 基因克隆及其植物表达载体构建 [J]. 湖北农业科学, 2013, 52(15): 3690-3692, 3696.
- [10] VANHOLME R, STORME V, VANHOLME B, et al. A systems biology view of responses to lignin biosynthesis perturbations in *Arabidopsis* [J]. Plant cell, 2012, 24: 3506-3529.
- [11] YANG Q, HE Y J, KABAHUMA M, et al. A gene encoding maize caffeoyl-CoA O-methyltransferase confers quantitative resistance to multiple pathogens [J]. Nature genetic, 2017, 49(9): 1364-1372.

(上接第 61 页)

- [2] SCHINDLER D W. The dilemma of controlling cultural eutrophication of lakes [J]. Proceedings of the royal society B, 2012, 279(1746): 4322-4333.
- [3] KARUNANITHI R, SZOGI A A, BOLAN N, et al. Chapter three. Phosphorus recovery and reuse from waste streams [J]. Advances in agronomy, 2015, 131: 173-250.
- [4] LEI Y, SAAKES M, VAN DER WEIJDEN R D, et al. Effects of current density, bicarbonate and humic acid on electrochemical induced calcium phosphate precipitation [J]. Chemical engineering journal, 2018, 342: 350-356.
- [5] LOGANATHAN P, VIGNESWARAN S, KANDASAMY J, et al. Removal and recovery of phosphate from water using sorption [J]. Critical reviews in environmental science and technology, 2014, 44(8): 847-907.
- [6] WENDLING L A, BLOMBERG P, SARLIN T, et al. Phosphorus sorption and recovery using mineral-based materials: Sorption mechanisms and potential phytoavailability [J]. Applied geochemistry, 2013, 37: 157-169.
- [7] WANG Z H, GUO H Y, SHEN F, et al. Biochar produced from oak sawdust by Lanthanum (La)-involved pyrolysis for adsorption of ammonium (NH_4^+), nitrate (NO_3^-), and phosphate (PO_4^{3-}) [J]. Chemosphere, 2015, 119: 646-653.
- [8] 柳富杰, 唐想, 郭海蓉. 用于制备饲料的蔗渣处理方法的研究进展 [J].

- 轻工科技, 2016(12): 28-30.
- [9] 唐想. 改性蔗渣生物炭的制备及其吸附水中氨氮的研究 [D]. 南宁: 广西大学, 2018.
- [10] 宋振扬. 天然及改性吸附剂对废水中磷的吸附研究 [D]. 石家庄: 河北科技大学, 2018.
- [11] 左昊, 徐康宁, 孟萍萍, 等. 硫酸改性小麦秸秆生物炭对氨氮吸附特性研究 [J]. 应用化工, 2017, 46(7): 1237-1242.
- [12] 李海芳. 改性沸石吸附废水中氮磷的试验研究 [D]. 邯郸: 河北工程大学, 2018.
- [13] 彭小明, 罗文栋, 胡峰平, 等. Cu-Al-LDHs/生物炭的制备及对水中磷的去除 [J]. 应用化工, 2019, 48(2): 304-308.
- [14] KIZITO S, WU S B, KIPKEMOI KIRUI W, et al. Evaluation of slow pyrolyzed wood and rice husks biochar for adsorption of ammonium nitrogen from piggery manure anaerobic digestate slurry [J]. Science of the total environment, 2015, 505: 102-112.
- [15] 朱司航, 赵晶晶, 尹英杰, 等. 针铁矿改性生物炭对砷吸附性能 [J]. 环境科学, 2019, 40(6): 2773-2782.
- [16] 史月月, 单锐, 袁浩然. 改性稻壳生物炭对水溶液中甲基橙的吸附效果与机制 [J]. 环境科学, 2019, 40(6): 2783-2792.
- [17] 杨世栋. 丝光沸石疏水化改性及吸附性能研究 [D]. 大连: 大连理工大学, 2004.