

网络出版时间: 2025-07-09

网络出版地址: <https://link.cnki.net/urlid/61.1359.S.20250709.1153.010>

太谷核不育 *DsRed*/*RUBY* 双色报告系统的尝试

徐宁瑶^{1,2}, 郑科^{1,2}, 周晓楠^{1,2}, 王海庆^{1,3}

(1. 中国科学院西北高原生物研究所, 中国科学院高原生物适应与进化重点实验室, 青海西宁 810008;

2. 中国科学院大学, 北京 100049; 3. 青海省作物分子育种重点实验室, 青海西宁 810008)

摘要: 太谷核不育小麦作为中国特有的重要种质资源, 在小麦育种中做出了重要贡献。为进一步挖掘其潜能, 利用分子生物学技术, 以编码红色荧光蛋白的 *DsRed* 和色素合成相关的 *RUBY* 基因为报告系统, 对太谷核不育性状 (*Ms2*) 在种子时期进行鉴别, 同时引入单拷贝 *Rht-D1b* 半矮秆基因, 获得半矮化的种子可视化鉴定的雄性不育小麦。结果表明, 通过对获得的转基因小麦植株及其后代的鉴定, 红色荧光蛋白在小麦胚中高效表达且稳定遗传, 虽然未能观察到 *RUBY* 报告基因的表达, 但仍可通过红色荧光蛋白实现对雄性不育性状的有效鉴别, 具有红色荧光的不育种子与无荧光的可育种子符合 1:1 分离比, 红色荧光籽粒所获得的 T_1 植株均为矮秆不育株, 无荧光籽粒的都为非矮秆可育植株, 说明 *DsRed*、*Ms2* 和 *Rht-D1b* 紧密连锁。由此可见, 本实验所构建的报告系统不仅可以在种子阶段通过对籽粒荧光进行育性分选, 同时引入半矮秆基因克服了目前常用的矮败小麦植株过低的问题, 可为杂种小麦生产和轮回选择育种提供新工具。

关键词: 矮败小麦; 种子可视化; *Ms2*; *Rht-D1b*; *RUBY*; *DsRed*

中图分类号: S512.1; S330

文献标识码: A

文章编号: 1009-1041(2026)02-0226-08

Attempt to Construct a *DsRed*/*RUBY* Dual-Color Reporter System for Taigu Genic Male Sterility

XU Ningyao^{1,2}, ZHENG Ke^{1,2}, ZHOU Xiaonan^{1,2}, WANG Haiqing^{1,3}

(1. Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences/Key Laboratory of Adaptation and Evolution of Plateau Biota, Xining, Qinghai 810008, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;

3. Key Laboratory of Crop Molecular Breeding of Qinghai Province, Xining, Qinghai 810008, China)

Abstract: As a unique and important germplasm resource in China, the Taigu male-sterile wheat has made significant contributions to wheat breeding. To further explore its potential application, this study aimed to establish an effective seed-stage identification system for the Taigu genic male sterility trait (*Ms2*) using molecular biology techniques, employing *DsRed* (encoding red fluorescent protein) and *RUBY* (a pigment biosynthesis-related gene) as reporter systems. Additionally, the single-copy semi-dwarf gene *Rht-D1b* was introduced to develop semi-dwarf, visually identifiable male sterile wheat. Through characterization of transgenic wheat plants and their progeny, the red fluorescent protein was efficiently expressed and stably inherited in wheat embryos. Although *RUBY* expression was undetected, effective identification of male sterility could still be achieved through red fluorescence. Sterile seeds with red fluorescence and fertile seeds without fluorescence exhibited a 1:1 segregation ratio. T_1 plants derived from red fluorescent seeds were all semi-dwarf and sterile, while those from non-fluorescent seeds were non-dwarf and fertile, indicating tight linkage among *DsRed*, *Ms2*, and *Rht-D1b*. The constructed reporter system not only enables fertility sorting at the seed stage via

收稿日期: 2025-03-04

修回日期: 2025-04-20

基金项目: 青海省作物分子育种重点实验室项目 (2023-1-1)

第一作者 E-mail: xuningyao@nwipb.cas.cn (徐宁瑶); zhengke@nwipb.cas.cn (郑科)

通讯作者 E-mail: wanghq@nwipb.cas.cn (王海庆)

fluorescence but also addresses the excessive dwarfing issue in current dwarf-sterile wheat lines by incorporating the semi-dwarfing gene. This approach offers a novel tool for hybrid wheat production and recurrent selection breeding.

Keywords: Dwarf-sterile wheat; Seed visual selection; *Ms2*; *Rht-D1b*; *RUBY*; *DsRed*

植物雄性不育(male sterility, MS)是指由遗传或环境引起的不能产生正常花药、花粉或雄配子的现象,但其雌性育性不受影响^[1-2]。通过对雄性不育的遗传研究及雄性不育系的培育,不仅可省去自花授粉作物杂交育种中人工去雄的环节,也促进了作物杂种优势的利用^[3-4]。目前,雄性不育系已广泛运用于水稻、玉米、小麦等作物研究和生产中。太谷雄性核不育小麦(Taigu)是1972年在山西太谷县普通小麦中发现的一个自然突变体^[5],其雄性不育性状由显性基因*Ms*控制,表现稳定,不受环境因素影响;此外,*Ms2*无其他不良表型,其植株异交结实率高,适合于开发杂交种和轮回选择育种^[6-7]。

为克服传统不育系田间鉴别难题,刘秉华等创制了显性矮秆基因*Rht-D1c*和*Ms2*紧密连锁的矮败小麦,可以通过植株高度区分不同小麦植株的育性^[8]。*Rht-D1c* (*Rht10*)是*Rht-D1*位点上的1个等位基因,通过两个拷贝的*Rht-D1b*串联节段重复产生,其降秆效应是单个拷贝的*Rht-D1b*的3倍^[9]。但是由于*Rht-D1c*强烈的降秆效应^[10],田间株高较高的可育植株会对矮败小麦产生遮阴,降低局部光照强度,增加相对湿度,导致矮败小麦开颖和柱头外露时间滞后,使其倾向于接受抽穗扬花较晚可育植株的花粉,致使自然授粉的不育株后代偏于晚熟。此外,在矮败小麦基础上,通过染色体工程手段引入蓝粒性状,培育出了蓝矮败小麦^[11]。蓝矮败小麦是一种集蓝粒、矮秆和雄性不育3个主要性状于一体的小麦种质资源,可通过籽粒颜色,对矮败小麦和正常可育小麦进行有效区分^[12],为小麦遗传改良和杂交种生产提供了新的途径。但其蓝粒基因、*Rht-D1c*和*Ms2*都位于附加染色体上,而附加系染色体传递效率低,蓝矮败小麦杂交后代败育所占比例只有20%左右,并且还有一定比例蓝粒性状与不育性状发生分离^[13]。近年来随着分子生物学的突破,Ni等已成功对太谷核不育基因*Ms2*进行克隆,发现其不育性状由非自主型TRIM转座子插入一个孤儿基因的启动子区域,激活其在花药中特异表达所致^[14-15]。这一研究结果为培育新型太谷核不

育育种工具材料,进一步挖掘太谷核不育小麦潜力提供了重要的基础。

虽然育种家已通过常规育种技术,巧妙地将矮秆和蓝粒性状用于标记太谷核不育小麦,并在育种实践中得到广泛应用,但都仍存在着改良空间。其中,蓝矮败小麦虽相较于矮败小麦,已将育性鉴定提前至种子阶段,但仍存在不育性状传递率低(20%左右)、性状分离等问题。随着*Ms2*基因的克隆及其不育机制的解析,利用分子育种技术改良太谷核不育小麦成为可能,然而目前相关的研究报道仍匮乏。本研究利用分子育种手段,期望构建将太谷核不育基因*Ms2*、半矮秆基因*Rht-D1b*与由胚特异性双向启动子*ZmBDI*^[16-17]驱动红色荧光蛋白基因*DsRed*^[18-20]和色素合成相关基因*RUBY*^[21]相整合的表达载体,通过农杆菌介导的遗传转化获得半矮秆的太谷核不育转基因小麦,希望在种子阶段可以通过籽粒颜色进行育性的分选,为小麦育种效率的提高提供新的工具和技术。

1 材料与方法

1.1 实验材料

玉米B73自交系种子播种于填充了营养土的花盆中,在植物光照培养箱(温度23℃、光周期16h光照/8h黑暗)中培养至三叶期,采集叶片提取基因组DNA,用于*ZmBDI*双向启动子序列的扩增。用于农杆菌遗传转化的双元载体pWMB-110由中国农业科学院作物科学研究所王珂博士提供。野生型小麦Fielder和津强6号于光照培养间(温度23℃、光周期16h光照/8h黑暗)培养,在扬花期取成熟花药对不育转基因植株进行人工授粉。

1.2 表达载体pTM-DBR构建

根据目的基因*DsRed*、*ZmBDI*、*RUBY*、*Rht-D1b*和*Ms2*的序列,设计特异性引物对(表1)。植物表达载体pTM-DBR构建按以下步骤进行:

(1)以本实验室前期构建的pWMB-LRF载体为模板,使用引物BDNosR/BDRfpF从中扩增融合了Nos终止子的红色荧光蛋白基因*DsRed*

序列;以玉米 B73 自交系基因组 DNA 为模板,使用引物 ZmBD1F1/ZmBD1R1 扩增双向启动子 *ZmBD1*;以本实验室前期构建的 pWMB-LRB 载体为模板,使用引物 BDRUBYF/RUBYR2 扩增融合了 Nos 终止子的红色报告基因 *RUBY* 序列。以上序列扩增均利用 *ApeXHF* HS DNA Polymerase CL 高保真酶(艾科瑞生物,长沙)进行。随后,使用无缝克隆试剂盒 In-Fusion Snap Assembly Master Mix 试剂盒(TaKaRa,北京)将上述扩增的 *DsRed*、*ZmBD1* 和 *RUBY* 基因连接至线性化的 pUC-19 载体,测序验证后,获得 pUC-DBR 载体。

(2)将 pUC-DBR 载体进行 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切,切胶回收 *DsRed-ZmBD1-RUBY* 片段后,使用 T4 连接酶连接至用同样上述双酶切制备的 pWMB-110 载体,后转化至 DH5a 大肠杆菌感受态细胞,挑取阳性克隆,提取质粒酶切鉴定,获得 pWMB-DBR 载体。

(3)以本实验室构建的含有 *Rht-D1b* 基因组序列的 pUC-*Rht2* 载体为模板,使用引物 Rht2U/Rht2MR,以及 KOD Plus neo 高保真酶(Toyobo,日本)扩增半矮秆基因 *Rht-D1b*,使用无缝克隆试剂

盒连接至 *Sma* I 酶切的 pWMB-DBR 载体,进行测序验证,获得 pM-DBR 载体。

(4)由于基因 *Ms2* 片段较大,且内部结构复杂,使用高保真酶无法成功扩增全长目标基因,故将 *Ms2* 基因组序列分为 *Ms2*-1688、*Ms2*-5577 和 *Ms2*-3327 三部分,分别设计引物 pMs2SF1/pMs2SR3、pMs2SF31/pMs2SR5 和 pMs2SF2/pMs2SR1,以本实验室前期构建的含有 *Ms2* 基因组序列的 pTM-LRF 载体为模板,其中 *Ms2*-1688 和 *Ms2*-3327 的基因序列利用 KOD Plus Neo 高保真酶(Toyobo,日本)进行扩增,*Ms2*-5577 的基因序列利用 KOD FX Neo 高效酶(Toyobo,日本)进行扩增,将扩增产物利用无缝克隆试剂盒分步连接至 pM-DBR 载体。首先,将 *Ms2*-1688 片段连接至 *Sma* I 处理线性化的 pM-DBR 载体获得 pM-DBR-*Ms2*-1688;然后将 *Ms2*-3327 片段连接至 *Sma* I 处理线性化的 pM-DBR-*Ms2*-1688 载体获得 pM-DBR-*Ms2*-1688-3327 载体;最后,将 *Ms2*-5577 连接至 *Sma* I 处理线性化的 pM-DBR-*Ms2*-1688-3327 载体,最终获得表达载体 pTM-DBR。每一步连接后均对连接到载体上的目的片段进行测序确认。

表 1 本研究所用引物
Table 1 Primers used in this study

引物 Primer	引物序列 Primer sequence(5′-3′)	用途 Application	产物长 Amplicon length/bp
BDNosR	GAGCTCGGTACCCGGGGATCCCCGATCTAGTAACATAGATGACAC	克隆红色荧光蛋白基因 <i>DsRed</i> Cloning of the red fluorescent protein gene <i>DsRed</i>	986
BDRfpF	CGGCCGGAATATGGCCTCCTCCGAGAACG		
ZmBD1F1	AGGAGGCCATATTCCGGCCGGCTCTGCTG	克隆启动子 <i>ZmBD1</i> Cloning of the promoter <i>ZmBD1</i>	655
ZmBD1R1	CATGATCCATCGCCGGCCGGCTGGATC		
BDRUBYF	CCGCCCGCGATGGATCATGCGACCCTCG	克隆红色报告基因 <i>RUBY</i> Cloning of the red reporter gene <i>RUBY</i>	4248
RUBYR2	CGACTCTAGAGGATCAAGCTTCCCGATCTAGTAACATAGATGACA		
Rht2U	GAATTCGAGCTCGGTACCCGGGTTTATAGAGTTCCTTCTTAGTGGGACAAC	克隆矮秆基因 <i>Rht-D1b</i> Cloning of the dwarfing gene <i>Rht-D1b</i>	4787
Rht2MR	TTACTAGATCGGGGATCCCCATGTTTCATCAGAGCAGTGAGCACCA		
pMs2SF1	TCGAGCTCGGTACCCGCGGCCGCGGGTGAGGCTTTGCCAAGG	克隆败育基因 <i>Ms2</i> -1688 Cloning of the abortion gene <i>Ms2</i> -1688	1718
pMs2SR3	AACTCTATAAAACCCGGGCCCTGGTGCGCTAGCAGTGGA		
pMs2SF2	TAGCCACACAGGCCCGGGAGGAAGCAAGCAACCT	克隆败育基因 <i>Ms2</i> -3327 Cloning of the abortion gene <i>Ms2</i> -3327	3357
pMs2SR1	AACTCTATAAAACCCGATCTCCGTGTCCATGTGCTACTA		
pMs2SF31	TAGCCACACAGGCCCGGGTGGAACACAGCCACGGGCTCCTCCT	克隆败育基因 <i>Ms2</i> -5577 Cloning of the abortion gene <i>Ms2</i> -5577	5607
pMs2SR5	GCTTGAGTTCTCTCCCGGAACCATCCCTGAAAGAGGAGAGTAACC		
M7F	GGCGTCCTCGTCTCCCAATA	鉴定败育基因 <i>Ms2</i> Identification of the abortion gene <i>Ms2</i>	1848
M7R	CGATGATGAACCTCACCTGCTGTA		
DsRedF	CTACAG GAACAGGTGGTGGC	鉴定红色荧光蛋白基因 <i>DsRed</i> Identification of fluorescent pro- tein gene <i>DsRed</i>	674
DsRedR	CCTCCTCCGAGA ACGTCAT		

1.3 农杆菌介导的小麦遗传转化和分子鉴定

本研究依照 Ishida 等的转化技术^[22],利用农杆菌介导的遗传转化将 pTM-DBR 表达载体转入 Fielder 小麦幼胚,并获得再生植株。本部分遗传转化委托中国农业科学院作物科学研究所完成。

从再生植株叶片中提取 DNA 作为模板,使用特异性引物 *DsRed*F/*DsRed*R、*ZmBD1*F1/*ZmBD1*R1、*BDRUBY*F/*RUBY*R2 和 *M7F*/*M7R*,以及 Premix Taq 酶(TaKaRa,北京),使用两步法程序对 *DsRed*、*ZmBD1*、*RUBY* 和 *Ms2* 分别进行检测。

1.4 转基因植株的表型鉴定

对经分子鉴定确认的转基因阳性植株,在开花期分离小花,去除颖片后,使用体视显微镜对雌蕊和雄蕊进行观察并拍照记录。对表现为雄性不育的 T₀ 植株,在开花期以野生型 Fielder 和津强 6 号小麦为父本进行授粉。授粉一个月后收获籽粒,分别在可见光和绿光下,观察籽粒颜色和荧光,分单株统计有色或荧光与无色或无荧光种子的比例。

1.5 雄性不育种子可视化鉴别系统的鉴别效率和遗传稳定性鉴定

将从 T₀ 代植株收获荧光分选效果良好的种子,置于 4℃ 冰箱中冷藏 2 d 以解除休眠。随后将种子置于培养皿(含湿润滤纸)中发芽后移栽至土壤中,于光照培养间(温度 23℃、光周期 16 h 光照/8 h 黑暗)中培养。待抽穗后观察雄蕊育性,在开花期,以野生型 Fielder 和津强 6 号小麦为父本对雄性不育植株进行人工授粉,授粉一个月后收获籽粒,在绿光下观察荧光,统计有荧光种子和无荧光种子比例。

1.6 T₁ 代转基因植株的株高测定

对由 T₀ 代植株种子长成的雄性不育株和可育株,在灌浆期测量其主茎高度。

1.7 数据统计与分析

使用 Excel 中的统计函数 CHISQ. TEST 对有荧光籽粒和无荧光籽粒的分离比进行卡方检验;使用软件 GraphPad Prism10 对 T₁ 代植株中可育株和不育株的株高进行 *t* 检验。

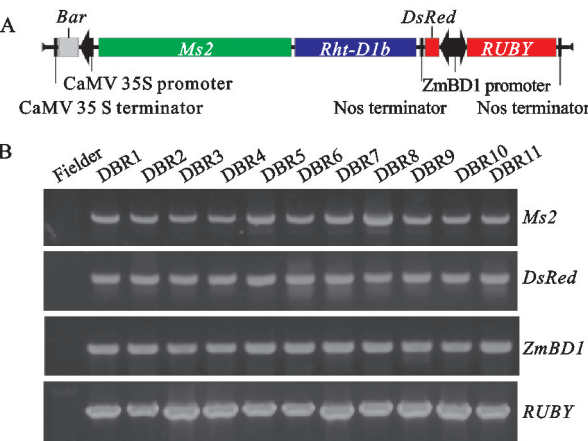
2 结果与分析

2.1 表达载体 pTM-DBR 的构建和转基因植株的检测

通过 PCR 扩增从玉米 B73 的基因组 DNA

中获得了主要在胚中驱动基因表达的 *ZmBD1* 双向启动子序列,将其 5' 和 3' 端分别与 *DsRed* 和 *RUBY* 基因序列融合,在此基础上,将上述融合基因和半矮秆基因 *Rht-D1b*、太谷核不育基因 *Ms2* 基因组序列整合到双元表达载体的 T-DNA 区,构建了多基因表达载体 pTM-DBR(图 1A)。

通过农杆菌介导法将表达载体 pTM-DBR 转化小麦 Fielder,获得了 30 株再生苗,利用 *Ms2*、*DsRed*、*ZmBD1* 和 *RUBY* 序列的特异性引物对再生苗进行 PCR 鉴定,最终获得 25 株转基因阳性苗(图 1B)。



DBR1~DBR11:转基因苗。

DBR1-DBR11: Transgenic seedlings.

图 1 表达载体 pTM-DBR 的结构示意图(A)和部分转基因苗 PCR 鉴定(B)

Fig. 1 Schematic diagram of the expression vector pTM-DBR(A) and PCR identification of some transgenic seedlings(B)

2.2 T₀ 代转基因植株的育性鉴定

在抽穗期至开花期对 T₀ 代阳性转基因植株的雌蕊和雄蕊进行观察,与野生型 Fielder 小麦相比,在获得的 25 株 T₀ 阳性转基因植株中,有 22 株表现为完全雄性不育,具体表现在花药发育停滞,但雌蕊发育正常(图 2)。

2.3 T₀ 代转基因植株的籽粒荧光鉴定

在育性观察基础上,以野生型 Fielder 和津强 6 号小麦为父本,对 22 株雄性不育的 T₀ 转基因植株进行授粉,一个月后收获种子。以野生型 Fielder 植株籽粒作为对照,在明场下,T₀ 代转基因植株的籽粒胚部均未见红色,表明红色报告基因 *RUBY* 未表达。在绿光下,T₀ 代转基因植株中,DBR4、DBR8 和 DBR11 三个植株种子胚部有明显的荧光(图 3A),根据其荧光进行分选,无荧光籽粒与红色荧光籽粒的分离比符合 1:1(表 2)。

其余 19 个植株的籽粒荧光信号弱而无法分选,或红色荧光籽粒比例异常偏高(>50%)。进一步将 DBR8 植株种子对半纵切,在绿光下观察发现具

有红色荧光籽粒的胚内显示很强的红色荧光,且在糊粉层也有一定程度的红色荧光信号,而明场下观察籽粒胚内未见红色(图 3B)。

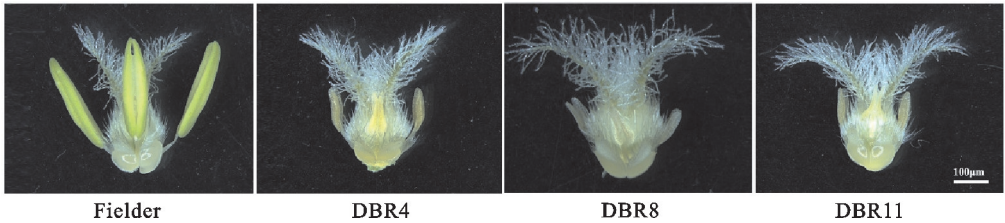
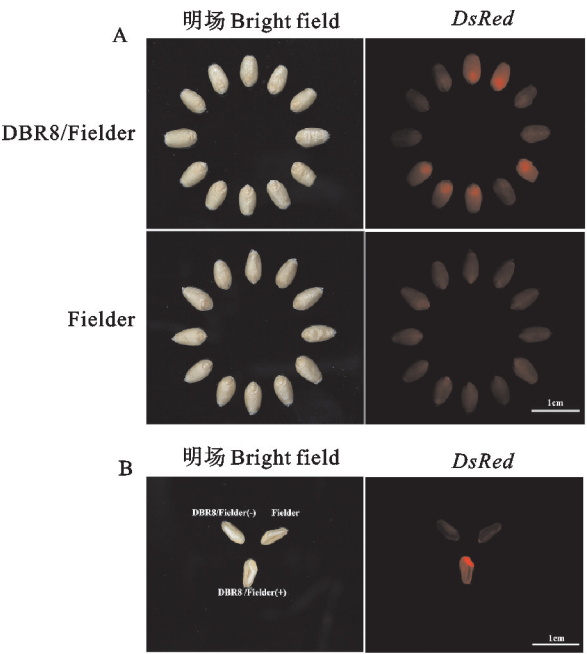


图 2 T₀ 代转基因植株 (DBR4、DBR8 和 DBR11) 的雄性不育表型
Fig. 2 Male sterility of T₀ transgenic plants (DBR4, DBR8 and DBR11)

表 2 T₀ 代转基因植株种子荧光统计
Table 2 Statistics of fluorescence seeds in T₀ transgenic plants

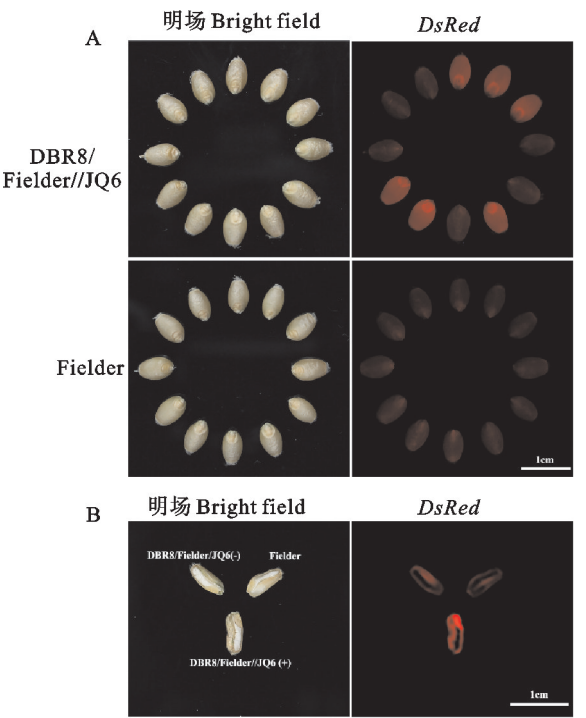
株系 Line	观测值 Observed		期望值 Expected		χ^2	P 值 P value
	无荧光种子 Non-fluorescent seeds	红色荧光种子 Red fluorescent seeds	无荧光种子 Non-fluorescent seeds	红色荧光种子 Red fluorescent seeds		
DBR4/JQ6	42	38	40.0	40.0	0.200 0	0.654 7
DBR8/Fielder	134	129	131.5	131.5	0.095 1	0.757 8
DBR11/JQ6	89	90	89.5	89.5	0.005 6	0.940 4

JQ6: 津强 6 号; /: T₀ 代转基因植株的授粉。
JQ6: Jinqiang 6; /: Pollination of T₀ transgenic plants.



A: T₀ 转基因植株种子红色荧光; B: T₀ 转基因植株种子不同部位的红色荧光; DBR8/Fielder 表示以 Fielder 授粉的 T₀ 代 DBR8 株系种子; DBR8/Fielder(-) 和 DBR8/Fielder(+) 分别表示 T₀ 代 DBR8 株系无荧光和有荧光种子。
A: Red fluorescence in seeds of T₀ transgenic plants; B: Red fluorescence in dissected seeds from T₀ transgenic plants; DBR8/Fielder indicates seeds from T₀ transgenic line DBR8 pollinated with Fielder; DBR8/Fielder(-) and DBR8/Fielder(+) indicate seeds without and with red fluorescence from T₀ transgenic line DBR8, respectively.

图 3 T₀ 代转基因植株种子荧光
Fig. 3 Seed fluorescence of T₀ transgenic plants



A: T₁ 转基因植株种子红色荧光; B: T₁ 转基因植株种子不同部位的红色荧光; DBR8/Fielder//JQ6 表示 T₀ 代转基因的授粉材料为 Fielder, T₁ 代转基因授粉材料为津强 6 号; DBR8/Fielder//JQ6(-) 和 DBR8/Fielder//JQ6(+) 分别表示 T₁ 代 DBR8 株系无荧光和有荧光种子。
A: Red fluorescence in seeds of T₁ transgenic plants; B: Red fluorescence in dissected seeds from T₁ transgenic plants; DBR8/Fielder//JQ6 indicates that the pollination material of the T₀ transgene is Fielder and the pollination material of the T₁ transgene is Jinqiang 6; DBR8/Fielder//JQ6(-) and DBR8/Fielder//JQ6(+) indicate seeds without and with red fluorescence from T₁ transgenic line DBR8, respectively.

图 4 T₁ 代转基因植株种子荧光
Fig. 4 Seed fluorescence of T₁ transgenic plants

表 3 T₁ 代植株的育性
Table 3 Performance of fertility in T₁ transgenic plants

株系 Line	播种的种子 Sown seeds		T ₁ 代植株育性 T ₁ generation fertility	
	种子荧光 Seed fluorescence	数量 Number	可育 Fertile	不育 Sterile
DBR8/Fielder	无 None	10	10	0
	红色 Red	10	0	10
DBR11/JQ6	无 None	14	14	0
	红色 Red	14	0	14

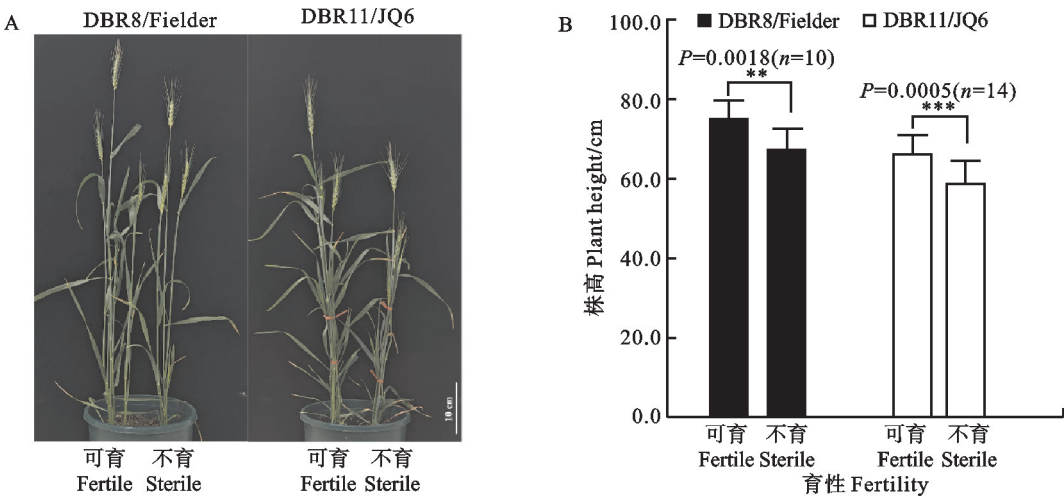
JQ6:津强 6 号。JQ6: Jinqiang 6.

表 4 T₁ 代不育植株种子荧光统计
Table 4 Statistics of fluorescence seeds in T₁ sterile plants

株系 Line	杂交组合 Hybridization combination	观测值 Observed		期望值 Expected		χ^2	P 值 P value
		无荧光种子 Non-fluorescent seeds	红色荧光种子 Red fluorescent seeds	无荧光种子 Non-fluorescent seeds	红色荧光种子 Red fluorescent seeds		
DBR8-1	DBR8/Fielder//JQ6	41	46	43.5	43.5	0.287 4	0.591 9
DBR8-2	DBR8/Fielder//JQ6	34	21	27.5	27.5	3.072 7	0.079 6
DBR8-3	DBR8/Fielder//JQ6	67	85	76.0	76.0	2.131 6	0.144 3
DBR8-4	DBR8/Fielder//JQ6	35	26	30.5	30.5	1.327 9	0.249 2
DBR8-5	DBR8/Fielder//Fielder	74	61	67.5	67.5	1.251 9	0.263 2
DBR11-1	DBR11/JQ6//JQ6	35	43	39.0	39.0	0.820 5	0.365 0
DBR11-2	DBR11/JQ6//JQ6	21	20	20.5	20.5	0.024 4	0.875 8
DBR11-3	DBR11/JQ6//JQ6	31	35	33.0	33.0	0.242 4	0.622 5
DBR11-4	DBR11/JQ6//JQ6	37	26	31.5	31.5	1.920 6	0.165 8
DBR11-5	DBR11/JQ6//JQ6	36	28	32.0	32.0	1.000 0	0.317 3

杂交组合中“/”和“//”分别表示 T₀ 转基因植株的授粉和 T₁ 不育植株的授粉。

In the hybrid combination, “/” and “//” indicate the pollination of T₀ transgenic plants and the pollination of T₁ sterile transgenic plants, respectively.



DBR8/Fielder 表示 T₀ 代 DBR8 植株经 Fielder 授粉获得的 T₁ 代植株;DBR11/JQ6 表示 T₀ 代 DBR11 植株以津强 6 号授粉获得的 T₁ 代植株。

DBR8/Fielder indicates T₁ plants from DBR8 pollinated with Fielder; DBR11/JQ6 indicates T₁ plants from DBR11 pollinated with JQ6.

图 5 T₁ 代转基因植株表型(A)及株高检测(B)

Fig. 5 Phenotype(A) and plant height detection(B) of T₁ transgenic plants

2.4 雄性不育种子可视化系统的鉴别效率和遗传稳定性鉴定

选取以 Fielder 为父本授粉的 DBR8 和以津强 6 号为父本授粉的 DBR11 两个 T₀ 代植株,分别种植其无荧光和有红色荧光的种子,获得 T₁ 代植株。在抽穗期至开花期,对其雌蕊和雄蕊的

育性进行了鉴定,结果表明,两个株系中从无荧光种子长成的 T₁ 植株均表现为雄性可育,而有红色荧光种子长成的 T₁ 植株全部为雄性不育(表 3),符合种子颜色分选育性的预期。在开花期,利用野生型 Fielder 和津强 6 号小麦为父本对 T₁ 代雄性不育植株分别进行授粉,一个月后所得种子

中红色荧光籽粒和无荧光籽粒仍然符合 1:1 的分离比(表 4)。进一步对从 T_1 代不育株获得的红色荧光籽粒解剖观察发现,红色荧光主要分布在胚中,同时在糊粉层有一定程度表达(图 4),与 T_0 代植株种子观察结果相一致。

2.5 转基因植株的株高鉴定

在小麦灌浆期,对 T_1 代转基因植株的株高进行观察,与可育株相比,不育株的株高明显降低(图 5A)。主茎高度测量结果显示,由 Fielder 授粉获得的 DBR8 株系中, T_1 代不育株平均株高为 (67.80 ± 4.89) cm,可育株的株高为 (75.30 ± 4.26) cm;由津强 6 号授粉获得的 DBR11 株系中, T_1 代不育株的株高为 (59.04 ± 5.71) cm,可育株为 (66.75 ± 4.43) cm(图 5B)。总之,两个转基因株系中不育株和可育株的株高存在显著差异($P < 0.01$)。

3 讨论

太谷核不育小麦是中国小麦育种中的重要遗传资源,其显性核基因(*Ms2* 基因)控制的雄性不育特性在育种工作中展现了显著的应用价值,但只能在抽穗期到开花期对育性进行鉴定,使其应用受到限制^[7],因此需要开发一种标记性状,以便于更早或直观地对植株的育性进行分选。目前已成功使用矮秆和蓝粒性状对 *Ms2* 进行标记,如刘秉华等创制了 *Ms2* 与 *Rht-D1c* 紧密连锁的矮败小麦^[7-8],可从拔节期开始通过株高对植株育性进行分选;蒲宗君等创制了蓝矮败小麦^[11],在种子阶段,通过蓝粒性状对种子育性进行分选。而 *Ms2* 基因的克隆^[14-15] 则为进一步利用和实现麦类作物的高效改良提供了基础,并且 Ni 等提出了利用太谷核不育彩色小麦进行杂交制种的构思,即将 *Ms2* 不育基因和籽粒糊粉层颜色基因串联导入目标小麦,收获的有颜色种子为败育,而白粒或正常颜色种子为可育^[15],但目前未见相关实证报道。

本研究构建了一个多基因表达载体,包括太谷核不育基因 *Ms2*、半矮秆基因 *Rht-D1b* 以及由胚特异性双向启动子 *ZmBD1* 调控的 *DsRed* 和 *RUBY* 的报告系统,并将其整合在双元表达载体的 T-DNA 区。通过农杆菌介导法转化小麦 Fielder^[22],再生苗中目的基因的特异性扩增和植株育性鉴定结果均表明,已将目的基因整合到小麦 Fielder 的基因组中。

经 T_0 和 T_1 两代转基因植株育性及种子荧光的鉴定,可通过种子胚部荧光信号对种子育性

进行分选,其红色荧光种子表现为败育,无荧光种子表现为可育,并且红色荧光种子与无荧光种子符合 1:1 的分离比,*DsRed* 与 *Ms2* 紧密连锁。蓝矮败小麦虽也能在种子阶段将蓝色的不育种子和白色的可育种子区分开,但由于附加染色体的传递效率低,蓝色不育种子仅占 20%^[13]。而本研究通过分子手段将 *DsRed* 与 *Ms2* 紧密连锁,使后代中红色荧光不育种子占 50%,显著提高了不育种子的占比,降低不育种子培育所需的成本,有助于小麦杂交种的培育。另外,在 22 株雄性不育的 T_0 阳性转基因植株的种子中,发现种子荧光具有三种表型,部分植株胚部荧光信号微弱,可能由 *DsRed* 表达水平低导致;部分植株荧光种子比例异常偏高($>50\%$),可能由基因多拷贝插入导致;DBR4、DBR8 和 DBR11 三个植株的种子胚处荧光信号强且符合红色荧光与无荧光种子 1:1 比例,结合其他两种情况,推测其目标基因应为单拷贝插入。

矮败小麦是将太谷核不育基因 *Ms2* 与矮秆基因 *Rht-D1c* 紧密连锁而培育得来的,不仅实现了矮秆对不育性状的标记,同时增加了接受较高的可育植株花粉的机会,极大推进了小麦的轮回育种^[7-8]。但是其矮秆基因 *Rht-D1c* 是 *Rht-D1b* 的串联片段重复,具有强降秆作用,导致不育植株过度矮化,使其易被株高较高的可育植株遮蔽,引起田间自然授粉的不育植株偏晚熟,为小麦品种选育带来一定困难。而本研究则将单拷贝的 *Rht-D1b* 引入雄性不育种子的可视化鉴别系统,不育株系的平均株高较可育株系显著降低约 7.5 cm,不仅有助于自然授粉,而且克服了株高过度矮化所带来的不利影响。

本研究通过 *DsRed* 和 *RUBY* 双色报告系统的尝试,实现了对雄性不育种子的荧光分选标记,但是肉眼可见的标记还未实现。根据现有对 *RUBY* 的报道,该基因可以在玉米、水稻、番茄和拟南芥中将酪氨酸转化为甜菜红素^[21,23]。但在本研究的种子胚中未产生肉眼可见的红色,*RUBY* 基因未表达。推测可能有两方面的原因:第一方面,由于胚胎特异性双向启动子 *ZmBD1* 的不对称性^[16],*RUBY* 所在方向的启动子活性不足以驱动其表达;另一方面,*RUBY* 依赖 2A 肽实现多基因共表达,但 2A 肽的自剪切效率可能受小麦核糖体翻译机制的影响,若剪切不完全,融合蛋白功能会出现异常,甜菜红素合成无法完成^[21]。因此,需进一步优化启动子选择和 2A 肽设计。

花青素是一种良好的标记性状,其在小麦中的应用已有较多的报道^[24],如利用*ZmCl*和*ZmR*创制小麦紫胚表型的诱导系,实现了小麦单倍体的高效鉴别^[25-26]。后续工作将创建花青素/*DsRed*、*Rht-D1b*和*Ms2*紧密连锁的多基因表达载体,希望以小麦糊粉层蓝色性状作为可见光标记,以及红色荧光作为荧光标记,以实现籽粒“肉眼+荧光”双模式的育性分选。

4 总结

本研究创制了一种通过种子胚部荧光分选育性的半矮秆雄性不育小麦,可在种子阶段通过荧光信号实现育性分选,其红色荧光的败育籽粒与无荧光的可育籽粒具有1:1分离比,*DsRed*与*Ms2*、*Rht-D1b*紧密连锁。经过连续两代(T_0 和 T_1)的表型鉴定证实,该雄性不育鉴别系统能可靠、稳定且准确地种子阶段,通过籽粒荧光对种子育性进行分选,为杂种小麦生产和轮回选择育种提供新工具。

参考文献:

- [1] KAUL M L H. Male sterility in higher plants[M]. Berlin: Springer, 1988: 5.
- [2] 李泽福,夏加发,唐光勇. 植物雄性不育类型及其遗传机制的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2000, 28(6): 742.
LI Z F, XIA J F, TANG G Y. Types and genetic mechanisms of plant male sterility [J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2000, 28(6): 742.
- [3] KIM Y J, ZHANG D B. Molecular control of male fertility for crop hybrid breeding [J]. *Trends in Plant Science*, 2018, 23(1): 53.
- [4] XU C H, XU Y F, WANG Z J, et al. Spontaneous movement of a retrotransposon generated genic dominant male sterility providing a useful tool for rice breeding [J]. *National Science Review*, 2023, 10(9): 210.
- [5] 邓景扬,高忠丽. 小麦显性雄性不育基因的发现与利用: 太谷不育小麦鉴定总结[J]. 作物学报, 1980, 6(2): 85.
DENG J Y, GAO Z L. The use of a dominant male-sterile gene in wheat breeding [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 1980, 6(2): 85.
- [6] 温辉芹,裴自友,侯美莲,等. 太谷核不育小麦在山西的利用与研究进展[J]. 山西农业科学, 2015, 43(12): 1715.
WEN H Q, PEI Z Y, HOU M L, et al. Research progress and application of Taigu male-sterile wheat in Shanxi Province [J]. *Journal of Shanxi Agricultural Sciences*, 2015, 43(12): 1715.
- [7] 刘秉华,杨丽,王山荭,等. 矮败小麦群体改良的方法与技术[J]. 作物学报, 2002, 28(1): 69.
LIU B H, YANG L, WANG S H, et al. The method and technique of population improvement using dwarf male-sterile wheat [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2002, 28(1): 69.
- [8] 刘宏伟,刘秉华,周阳,等. 矮败小麦育种技术研究进展[J]. 中国农业科技导报, 2013, 15(1): 26.
LIU H W, LIU B H, ZHOU Y, et al. Progress in dwarf male-sterile wheat breeding technology system [J]. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2013, 15(1): 26.
- [9] LI Y Y, XIAO J H, WU J J, et al. A tandem segmental duplication(TSD) in green revolution gene *Rht-D1b* region underlies plant height variation [J]. *New Phytologist*, 2012, 196(1): 282.
- [10] PEARCE S, SAVILLE R, VAUGHAN S P, et al. Molecular characterization of *Rht-1* dwarfing genes in hexaploidy wheat [J]. *Plant Physiology*, 2011, 157(4): 1820.
- [11] 蒲宗君,颜泽洪,郑有良,等. 矮败蓝标型小麦的选育[J]. 西南农业学报, 2004, 17(2): 137.
PU Z J, YAN Z H, ZHENG Y L, et al. Breeding of dwarf male sterile wheat with blue seeds marker [J]. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2004, 17(2): 137.
- [12] 耿爱民,武利峰,刘渤,等. “蓝矮败”: 小麦杂种优势利用的第五途径[J]. 山东农业科学, 2010, 42(2): 31.
GENG A M, WU L F, LIU B, et al. Dwarf male-sterile wheat with blue seeds: The fifth way to utilize wheat heterosis [J]. *Shandong Agricultural Sciences*, 2010, 42(2): 31.
- [13] 蒲宗君,饶世达,杨武云,等. 蓝标型显性核不育小麦的特性及其 F_1 杂种优势分析[J]. 麦类作物学报, 2007, 27(6): 964.
PU Z J, RAO S D, YANG W Y, et al. Characters and F_1 heterosis performance of dominant nuclear male-sterile lines with a blue seed marker [J]. *Journal of Triticeae Crops*, 2007, 27(6): 964.
- [14] XIA C, ZHANG L C, ZOU C, et al. A TRIM insertion in the promoter of *Ms2* causes male sterility in wheat [J]. *Nature Communications*, 2017, 8: 15407.
- [15] NI F, QI J, HAO Q Q, et al. Wheat *Ms2* encodes for an orphan protein that confers male sterility in grass species [J]. *Nature Communications*, 2017, 8: 15121.
- [16] LIU X Q, YANG W Z, LI Y, et al. The intergenic region of the maize defensin-like protein genes *Def1* and *Def2* functions as an embryo-specific asymmetric bidirectional promoter [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2016, 67(14): 4403.
- [17] LIU X Q, LI S Z, YANG W Z, et al. Synthesis of seed-specific bidirectional promoters for metabolic engineering of anthocyanin-rich maize [J]. *Plant and Cell Physiology*, 2018, 59(10): 1942.
- [18] GROSS L A, BAIRD G S, HOFFMAN R C, et al. The structure of the chromophore within *DsRed*, a red fluorescent protein from coral [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97(22): 11990.
- [19] ZHANG Q X, WALAWAGE S L, TRICOLI D M, et al. A red fluorescent protein(*DsRED*) from *Discosoma* sp. as a reporter for gene expression in walnut somatic embryos [J]. *Plant Cell Reports*, 2015, 34(5): 862.
- [20] SUN L, ALARIQI M, ZHU Y, et al. Red fluorescent protein (*DsRed2*), an ideal reporter for cotton genetic transformation and molecular breeding [J]. *The Crop Journal*, 2018, 6(4): 366.
- [21] HE Y B, ZHANG T, SUN H, et al. A reporter for noninvasively monitoring gene expression and plant transformation [J]. *Horticulture Research*, 2020, 7: 152.
- [22] ISHIDA Y, TSUNASHIMA M, HIEI Y, et al. Wheat (*Triticum aestivum* L.) transformation using immature embryos [J]. *Methods in Molecular Biology*, 2015, 1223: 194.
- [23] WANG D, ZHONG Y, FENG B, et al. The *RUBY* reporter enables efficient haploid identification in maize and tomato [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2023, 21(8): 1707.
- [24] RIAZ B, CHEN H Q, WANG J, et al. Overexpression of maize *ZmCl* and *ZmR* transcription factors in wheat regulates anthocyanin biosynthesis in a tissue-specific manner [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(22): 5806.
- [25] TANG H L, WANG K, ZHANG S X, et al. A fast technique for visual screening of wheat haploids generated from TaMTL-edited mutants carrying anthocyanin markers [J]. *Plant Communications*, 2023, 4(3): 100569.
- [26] QI X L, GUO S W, ZHONG Y, et al. Establishment of an efficient haploid identification system by engineering anthocyanin accumulation in the wheat embryo [J]. *Plant Communications*, 2023, 4(3): 100568.