

导入大赖草 DNA 小麦后代的变异性状分析

朱新产, 廖祥儒, 付增光

(西北农业大学分子生物学研究室, 陕西杨凌 712100)

S512.103.3

Q343.15

[摘要] 外源大赖草 DNA 直接导入普通小麦, 诱导小麦籽粒蛋白质组成及过氧化物酶、酯酶、超氧化物歧化酶同工酶谱带发生了显著变化, 蛋白质分别增加 44, 67, 85 ku 新组分, 蛋白质和氨基酸含量分别提高 16.82%, 15.62%, 赖氨酸增长 42.94%, 同工酶不同程度出现了差异谱带, 酶带缺失, 酶活性增减的明显变化。导入 DNA 的变异小麦的籽粒色泽、硬度、胚乳粉质等生物学性状都有一些改变, 其变异现象在连续后代中依然表达。

[关键词] 小麦; 大赖草 DNA; 外源 DNA 导入; 蛋白质; 同工酶

[中图分类号] Q343.1⁺5 **[文献标识码]** A

小麦的麦谷蛋白赋予面团弹性, 醇溶蛋白赋予面团延伸性, 弹性和延伸性是决定优良加工品质的重要基础^[1,2]。小麦加工品质的优劣与限制小麦品种品质遗传潜力的麦谷蛋白种类密切相关, 特别是位于 1A, 1B, 1D 染色体上 3 个基因位点控制的高分子质量麦谷蛋白亚基, 它们对加工品质有不同的贡献^[3,4]。小麦籽粒蛋白中所含人体必需氨基酸, 尤其是赖氨酸含量相对较低, 其营养价值并不理想。70 年代以来已有小麦×豌豆^[5]、小麦×玉米^[6]、小麦×高粱^[7]等小麦和异属植物远缘杂交研究^[8~11]。利用生物技术与传统育种方法相结合, 探究改良、培育、创造优质小麦新品种, 不仅能促进分子育种研究, 而且能丰富远缘杂交遗传理论。本研究应用转基因技术将大赖草 DNA 直接导入小麦, 以期改良小麦的某些生物学性状。

1 材料和方法

1.1 材料

大赖草 (*Leymus racemosus*), 由西北植物研究所遗传工程实验室提供, 普通小麦 (*Triticum aestivum*) 超大穗类型, 由西北农业大学农学系育种室提供。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取 取大赖草生长锥部组织, 加液氮研磨成细粉, 用热酚-氯仿-异戊醇法提取分离 DNA, 经岛津 UV-120 紫外仪检测, $A_{260}/A_{280} = 1.893$, $A_{260}/A_{230} = 2.173$, 琼脂糖电泳呈单一区带, 表明提纯的 DNA 达到导入作物所需的要求^[12,13]。

1.2.2 导入 DNA 试验 玻璃温室中盆栽小麦, 每盆栽培 5 株, 在小麦返青期, 向其分蘖

[收稿日期] 1999-03-09

[基金项目] 陕西省自然科学基金资助项目(99SM05)

[作者简介] 朱新产(1959—), 男, 博士

节注射大赖草 DNA 10 μL (4~5 g/L), 套袋, 单穗收获, 分别进行检测分析, 变异株连续种植, 并进行相关的测试鉴定。

1.2.3 小麦籽粒蛋白质 SDS-PAGE 采用赵文明等^[4]的方法。

1.2.4 全氮量测定 用日本 Vs-KTP 自动定氮仪, 分析小麦籽粒全氮量。

1.2.5 氨基酸含量测定 用贝克曼 121-MB 型氨基酸自动分析仪分析氨基酸含量。

1.2.6 同工酶 PAGE 分析 参照薛应龙^[15]的方法, 取小麦幼苗分蘖节部位 0.5 g, 冰浴中加 3 mL Tris-HCl (pH 8.0) 缓冲液, 研磨提取酶, 0~4℃ 离心, 上清液即酶制备液, 定量点样每槽 20 μL 。电泳胶片用日本岛津 Cs-930 型双波长自动扫描仪扫描, 过氧化物同工酶和酯酶同工酶分别用波长 370 和 525 nm, 超氧化物歧化酶采用反向扫描, 波长 600 nm。

2 结果与分析

2.1 变异小麦籽粒蛋白质构成

图 1 表明, 直接导入 DNA 的变异小麦籽粒的蛋白质构成发生了显著变化, 与对照小麦相比较, 变异小麦 M_1 新增加 85 ku 蛋白组分; M_2 新增加了 44, 67 ku 蛋白组分, 36~67 ku 蛋白质组分谱带型出现较大变化 (迁移率), 数目增多, 含量也相对增高, 这表明向小麦直接导入外源基因能够诱导种子蛋白质发生重大变异, 改变小麦籽粒蛋白质的构成。

2.2 变异小麦籽粒蛋白质和氨基酸含量

由表 1 看出, 直接导入 DNA 的变异小麦籽粒蛋白质和氨基酸含量出现明显不同, 变异小麦 M_2 变化最大, 其蛋白质、赖氨酸、总氨基酸含量分别增长 16.82%, 42.94% 和 15.62%, 这与蛋白质组分数增加相一致。

表 1 变异小麦籽粒蛋白质、氨基酸含量的变化 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$

处理	蛋白质	赖氨酸	总氨基酸
CK	141.5	3.40	118.75
M_1	150.1	3.69	125.11
Δ	8.6	0.29	6.36
M_2	165.3	4.86	137.30
Δ	23.8	1.46	18.55

注: CK 为对照; M_1 , M_2 为变异小麦; Δ 为增长值。

2.3 变异小麦同工酶

图 2 表明, 直接导入 DNA 的变异小麦的同工酶谱及活性与对照相比表现出较大差异, 其中过氧化物同工酶 (POD) 的谱带数及活性增加甚大, 特别是 M_2 变异小麦, 酶谱带数增加 4 条, 相对活性提高 2.147 倍, 与其蛋白质变化相一致; 酯酶同工酶 (EST), M_1 变异小麦增加 3 条, 活性相对提高 1.66 倍, 而 M_2 变异小麦的酶谱带数和活性有所减少; 超氧化物歧化酶 (SOD), M_1 变异小麦酶谱变化甚小, 而 M_2 变异小麦新增 2 条酶带, 但又有

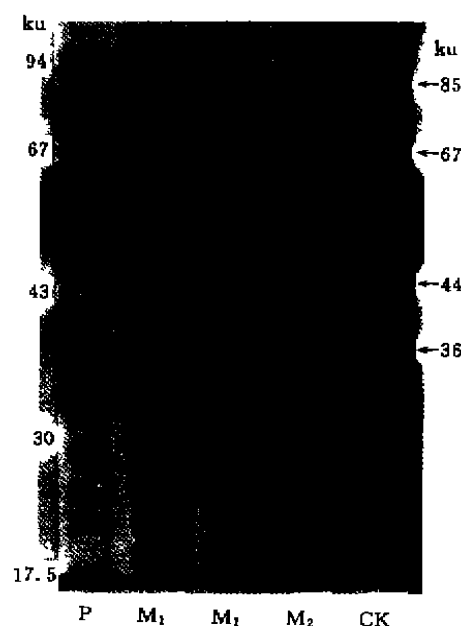


图 1 变异小麦种子蛋白 SDS-PAGE
P. 豌豆 (示分子质量); CK. 对照;
 M_1 , M_2 . 变异小麦, 下同。

3 条谱带消失,类似于其 EST 的变化。

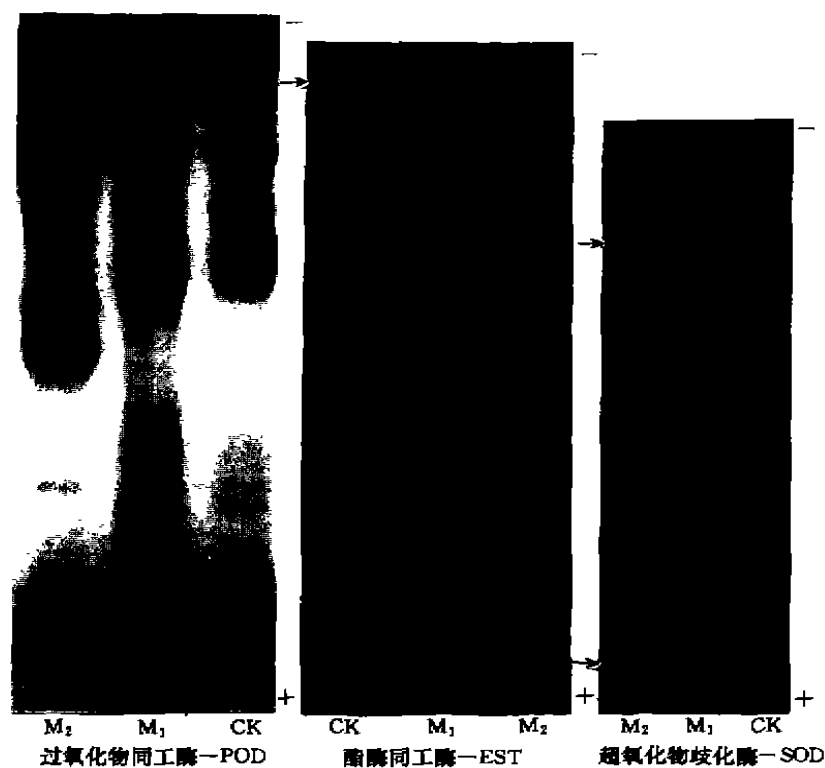


图 2 变异小麦同工酶电泳图谱(PAGE)

2.4 变异小麦籽粒形态

直接导入 DNA 的变异小麦籽粒与对照小麦相比有所不同,其 M_1 变异小麦籽粒型态差别甚少,而 M_2 变异小麦籽粒颜色发红加深,硬度和胚乳粉质透明度增强,但其植株形态在外观上都无多大变化。

3 讨 论

整体染色体结构的亲缘关系愈远,同源性愈小,从进化角度来看,部分基因间的结构有可能保持一定的亲和性而发生杂交重组^[16,17]。小麦返青期正值幼穗分化、细胞分裂,体内代谢旺盛,DNA 大量合成,外源 DNA 的导入容易参与体内 DNA 的复制或重组过程,或修饰调控基因,激活或抑制本身结构基因的表达,诱发其蛋白质构成发生变异,本研究直接导入 DNA 的变异小麦的蛋白质和同工酶谱变化,正是其验证。

选育作物优质新品种的前提是遗传变异,遗传变异来源于双亲间的 DNA 交流,远缘亲本间的性状交流可获得良好的品质育种效果,然而这种交流方式在远缘杂交中存在着很大的限制性,尤其是受多基因家族控制,由多基因编码的种子贮藏蛋白质^[18],寻找和获得特定目的基因也是比较困难的,但通过外源 DNA 直接导入,可较方便的诱导种子蛋白

发生变异,克服远缘杂交不亲和性的障碍,打破基因连锁关系,改良小麦营养品质及生物学性状。本研究结果表明,导入 DNA 的变异小麦籽粒的蛋白质、氨基酸含量都得到提高,其营养价值有所改良(赖氨酸含量的增高)。

酶是基因和性状的联接物,因此,同工酶是从分子水平鉴别遗传变异或基因转移的一种有效手段,可作为基因表达的一种良好标志。直接导入 DNA 的变异小麦不同程度地出现了 POD,EST 和 SOD 同工酶的差异酶带,酶带缺失、酶活性增强及酶活性减弱等现象,证明直接导入的 DNA 有可能引起调控代谢系统的改变或调控某些基因的表达。

外源 DNA 转移的途径多种多样,其效果各不相同,并且程序大都较复杂。本研究结果表明,简单、直接向小麦注射外源 DNA 能有效地引起基因表达的变化,改良其生物学特性,并且在连续种植的后代中,这些变异性状依然表达,稳定保持,但引起此变异现象的分子作用机制还不清楚,其分子验证仍待深入研究。

[参考文献]

- [1] Hoseney R C. Principles of cereal science and technology[R]. USA: American Association of Cereal Chemistry, Inc, 1986. 76~81.
- [2] Blackman J A, Payne P L. Wheat breeding—its scientific basis[M]. Eupaton F G H London: Chapman and Hall, 1987. 455~485.
- [3] Shewry P R, Tatham A S, Barro F, et al. Biotechnology of breadmaking: Unraveling and manipulating the multi-protein gluten complex[J]. Bio/Technology, 1995, 13: 1185~1191.
- [4] Anderson O D, Kuhl J C, Tam A. Construction and expression of a synthetic wheat storage protein gene[J]. Gene, 1996, 174: 51~58.
- [5] 张思文, 孙立南, 李忠炯. 春小麦×豌豆远缘杂交初报[J]. 遗传学报, 1976, 3(4): 299~302.
- [6] 刘 辉, 陈纯贤, 孙敬三. 小麦、玉米杂交后代的蛋白及酯酶同工酶分析[J]. 植物学报, 1996, 38(5): 357~361.
- [7] 孙敬三, 路铁刚, 刘 辉. 小麦×高粱的受精率和小麦单体的诱导[J]. 实验生物学报, 1996, 29(2): 191~195.
- [8] 朱新产, 赵文明. 豌豆花 DNA 向小麦体中转移的研究[J]. 作物学报, 1996, 22(3): 371~374.
- [9] 朱新产, 朱庆麟, 廖祥儒. 导入外源 DNA 小麦蛋白质遗传变异性的研究[J]. 华北农学报, 1998, 13(1): 36~39.
- [10] Troy W J, Anderson O D, Blechl A E. Rapid production of multiple independent lines of fertile transgenic wheat (*Triticum aestivum*) [J]. Plant Physiol, 1993, 102: 1077~1084.
- [11] Blechl A E, Anderson O D. Expression of a novel highmolecular-weight glutenin subunit gene in transgenic wheat[J]. Nature Biotechnology, 1996, 14(7): 875~879.
- [12] Murray M G, Thompson W F. Apid isolation of high molecular weight plant DNA[J]. Nucleic Acid Res, 1980, 8: 4321~4325.
- [13] Sambrook J, Fritsch E F, Mannatis T. In Molecular Cloning, A Laboratory manula[M]. New York: Cold Spring Harbor Press, 1986. 603~619.
- [14] 赵文明, 朱新产, 文树基. 小麦种子发育期麦谷蛋白的累积[J]. 西北农业大学学报, 1991, 19(3): 8~12.
- [15] 薛应龙. 植物生理学实验手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1985.
- [16] 周光宇. 从生物化学角度探讨远缘杂交的理论[J]. 中国农业科学, 1978, (2): 16~20.
- [17] 王亚馥, 陈克明, 焦成瑾, 等. 外源 DNA 导入小麦后的变异系生物学特性及胚乳蛋白的研究[J]. 作物学报, 1995, 21(4): 404~411.
- [18] Shewry P R, Halford N G, Tatham A S. High molecular weight subunits of wheat glutenin[J]. Journal of Cereal Science, 1992, 15: 105~120.

An analysis of variation characteristics of the progenies derived from introducing leymus racemosus gene into common wheat

ZHU Xin-chan, LIAO Xiang-ru, FU Zheng-guang

(Laboratory of Plant Molecularly Biology, Northwestern Agricultural University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Exogenous DNA directly introduced into wheat plant induced striking change in seed protein components of wheat and isozymogram of peroxidase isozyme (POD), esterase isozyme (EST) and superoxide dismutase (SOD). The proteins increased by 44 ku, 67 ku, 85 ku new components, and the protein and amino acid contents enhanced by 16.85% and 15.62% separately, Lys increased by 42.94%. Isozyme also showed difference isozyme bands, losing isozyme bands and increase and decrease of enzyme activity in varying degrees. Some bio-characteristics of variant grains derived from introducing exogenous DNA into common wheat, such as colour, hardness, endosperm transparency etc, also showed remarkable changes. These variations can be stably expressed in successive progenies.

Key words: wheat; leymus racemosus gene; exogenous DNA introduction; protein; isozyme