

种子贮藏蛋白凝胶电泳在小麦外源染色体鉴定中的应用^{*}

王小利, 张改生, 陈新宏, 赵继新, 刘宏伟, 王军卫

(西北农林科技大学 农学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 利用小麦种子贮藏蛋白凝胶电泳技术, 对簇毛麦(*H. aynaldia villosa*)、滨麦(*L. ymus mollis*)、华山新麦草(*P. satyrostachys huashanica*)、大麦(*H. ordeum distichum*)以及黑麦(*Secale cereale*)的高分子量谷蛋白亚基和醇溶蛋白进行了分析。结果表明, 簇毛麦、滨麦、华山新麦草、大麦的高分子量谷蛋白亚基和醇溶蛋白与普通小麦相比均有各自的特征带; 利用簇毛麦和大麦的高分子量谷蛋白亚基特征带鉴定出了普通小麦中与小麦第一同源群染色体有部分同源的V1和H5附加系; 利用黑麦1RS醇溶蛋白标记位点Gld1B3鉴定了1BL/1RS易位系, 同时利用染色体C-分带对1BL/1RS易位系77(2)进行了验证。并对小麦种子贮藏蛋白凝胶电泳技术在小麦品质育种和细胞质雄性不育选育中的应用进行了讨论。

[关键词] 小麦; 高分子量谷蛋白亚基; 醇溶蛋白; 外源染色体; C-分带

[中图分类号] S512.101

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2004)01-0019-04

小麦贮藏蛋白质分为谷蛋白和醇溶蛋白, 是小麦面粉的主要成分。谷蛋白是含双硫键的蛋白质, 用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)在还原条件下, 可将谷蛋白分为高分子量谷蛋白亚基(HMW-GS)和低分子量谷蛋白亚基(LMW-GS)^[1~3]。醇溶蛋白是不含双硫键的蛋白质, 分子质量75 ku, 根据其酸性聚丙烯酰胺凝胶电泳(A-PAGE)将小麦醇溶蛋白图谱分为 α 、 β 、 γ 、 ω 4个区^[1~3]。

目前, 种子贮藏蛋白凝胶电泳主要用于小麦品质育种中的辅助选择和品种鉴定, 而很少用于鉴定普通小麦中的外源染色体。小麦的谷蛋白和 γ 、 ω 醇溶蛋白基因已被定位在小麦的第一同源群染色体长臂着丝点部位和短臂末端上, α 和 β 醇溶蛋白定位在小麦第六同源群染色体的短臂末端, 因而利用高分子量谷蛋白亚基和醇溶蛋白凝胶电泳鉴定小麦中近缘种属染色体就成为一种有效的方法。本研究利用小麦种子贮藏蛋白凝胶电泳技术, 对簇毛麦(*H. aynaldia villosa*)、滨麦(*L. ymus mollis*)、华山新麦草(*P. satyrostachys huashanica*)、大麦(*H. ordeum*

distichum)以及黑麦(*Secale cereale*)的高分子量谷蛋白亚基和醇溶蛋白进行分析, 比较其高分子量谷蛋白亚基和醇溶蛋白与普通小麦各自的特征带, 并用其特征带鉴定普通小麦中的外源染色体, 旨在为进一步利用小麦近缘种属的稀有HMW-GS改良小麦的加工品质提供依据, 也为小麦细胞质雄性不育系的选育提供一种有效的方法。

1 材料与方法

1.1 材料

本试验所用的簇毛麦、滨麦、华山新麦草由中国农业科学院作物品种资源研究所提供, V1附加系由陕西省农科院小麦中心提供, H5附加系由西北植物研究所提供, 大麦、黑麦和1BL/1RS易位系77(2)由本课题组保存。

1.2 方法

1.2.1 SDS-PAGE 分析 采用SDS不连续缓冲系统^[2], 分离胶质量分数为10% (pH8.8), 浓缩胶质量分数为2.5% (pH6.8), 胶厚1.5 mm。

1.2.2 A-PAGE 分析 采用国际种子检验协会

^{*} [收稿日期] 2002-12-18

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30170567); 杨凌农业生物技术育种中心基金项目

[作者简介] 王小利(1967-), 女, 陕西华县人, 副教授, 在读博士, 主要从事小麦雄性不育及分子细胞遗传学研究。

(ISTA)于 1986 年颁布的 A-PAGE (pH 3.2) 标准程序^[4]。电泳仪采用北京六一仪器厂生产的 DYY-10 型三恒型电泳仪, DYY-III28B 型夹心式电泳槽。

1.2.3 染色体制片 将种子消毒后用水浸泡 12 h, 置于铺有吸水纸的培养皿中 (25 °C), 当根长至 1~2 cm 时, 取根尖于冰水中预处理 22~24 h, 然后用乙醇:冰乙酸(体积分数 3:1)的卡诺固定液固定 2~3 d, 用质量分数 1.5% 的醋酸洋红染色 2 d, 体积分数 45% 冰乙酸压片观察。

1.2.4 染色体 C-分带 染色体 C-分带参照文献

[5]的方法,即将干燥的染色体制片依次在 45~50 °C 的体积分数 45% 冰乙酸、50 g/L Ba(OH)₂ 和 2×SSC 溶液中分别处理 3~5 min, 2~2.5 min 和 5~15 min, 用 Giesma 染色液 (pH 6.8) 染色显带。

2 结果与分析

2.1 SDS-PAGE 分析

高分子量谷蛋白亚基的 SDS-PAGE 图谱见图

1。

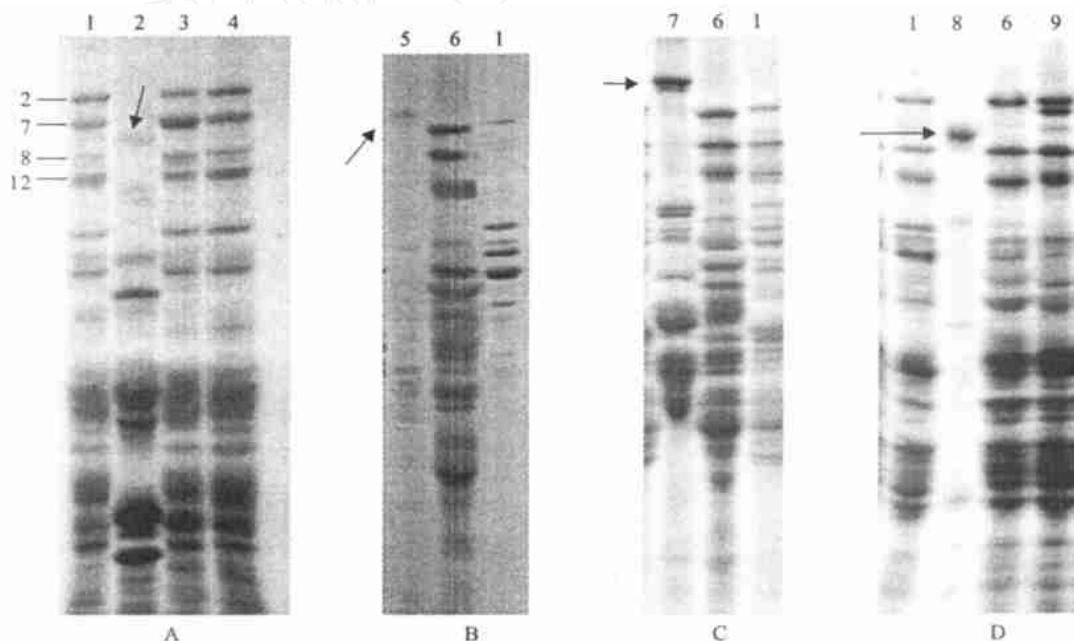


图 1 SDS-PAGE 图谱

1 中国春; 2 簇毛麦; 3, 4 V1 附加系; 5 滨麦; 6 7182; 7 华山新麦草; 8 大麦; 9 H5 附加系; A. 簇毛麦; B. 滨麦; C. 华山新麦草; D. 大麦

Fig 1 SDS-PAGE patterns

1. Zhong Guo chun; 2. *H. aynaldia villosa*; 3, 4 V1 additional line; 5. *L. ym us m ollis*; 6. 7182; 7. *P. sathy rostachys huashanica*;

8. *H. ordeum distichan*; 9. H5 additional line; A. *H. aynaldia villosa*; B. *L. ym us m ollis*; C. *P. sathy rostachys huashanica*; D. *H. ordeum distichan*

由图 1 可以看出, 簇毛麦在小麦高分子量谷蛋白亚基区含有 1 条特征带, 介于中国春 7 和 8 两条带之间。滨麦在小麦高分子量谷蛋白亚基区上有 4 条紧密相连的细带, 位于中国春 2 之上。华山新麦草在小麦高分子量谷蛋白亚基区上有 2 条带, 其中上面的 1 条带较粗, 下面的 1 条带较细, 且两带迁移率较近。大麦在小麦高分子量谷蛋白亚基区仅有 1 条带, 且较粗。由于小麦与其近缘种属有部分同源关系, 因此, 可以利用簇毛麦、滨麦、华山新麦草、大麦的高分子量谷蛋白亚基特征带鉴定小麦中的与第一同源群有关的外源染色体, 其中簇毛麦 V1 附加系 (图 1A) 和大麦 H5 附加系 (图 1D) 在小麦高分子量

谷蛋白亚基区就含有簇毛麦和大麦的特征带。

2.2 A-PAGE 分析

从醇溶蛋白的 A-PAGE 图谱 (图 2) 看, 簇毛麦在 α , β 和 γ 区均有特征带 (图 2A), 滨麦在 β 和 γ 区有特征带 (图 2B), 华山新麦草在 α , β 和 ω 区有特征带 (图 2C), 黑麦在 α , β 和 γ 区均有特征带 (图 2D)。由于 α , β 醇溶蛋白基因串联排列在小麦第六同源群染色体的短臂末端, γ , ω 醇溶蛋白基因位点位于小麦第一同源群染色体的短臂末端^[3], 因而可以利用簇毛麦、滨麦、华山新麦草、黑麦的醇溶蛋白特征带鉴定与小麦第一和第六同源群染色体有部分

同源关系的外源染色体。

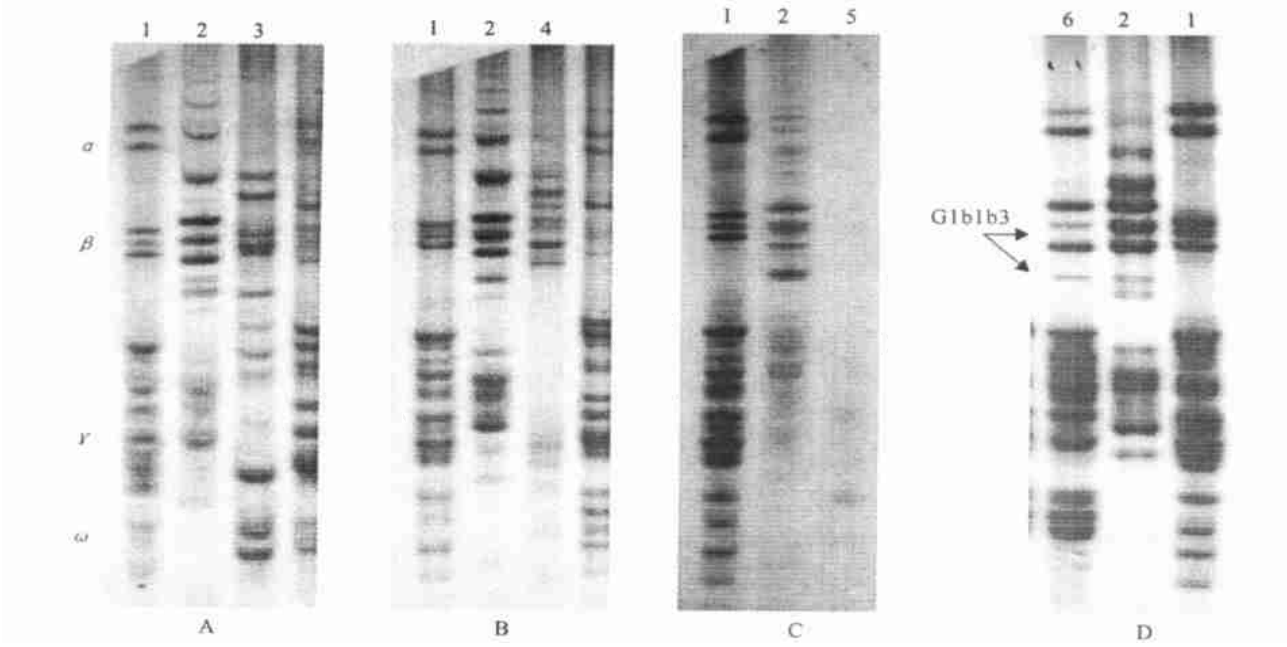


图 2 A-PAGE 图谱

1. 中国春; 2. 黑麦; 3. 簇毛麦; 4. 滨麦; 5. 华山新麦草; 6. 77(2); A. 簇毛麦; B. 滨麦; C. 华山新麦草; D. 黑麦

Fig 2 A-PAGE patterns

1. Zhong Guo chun; 2. *Secale cereale*; 3. *H. aynaldia villosa*; 4. *L. ym us m ollis*; 5. *Psathyrostachys huashanica*; 6. 77(2);
A. *H. aynaldia villosa*; B. *L. ym us m ollis*; C. *Psathyrostachys huashanica*; D. *Secale cereale*

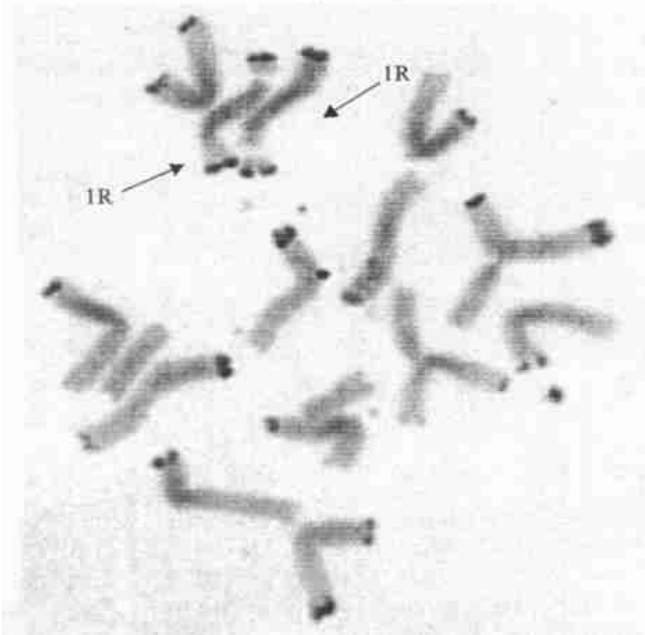


图 3 黑麦染色体 C-分带

Fig 3 C-Binding of *Secale cereale*

2.3 1BL/1RS 易位系的染色体 C-分带鉴定

已有研究^[6,7]表明, 将黑麦 γ 区 G1d1B3 组醇溶蛋白位点定为小麦背景中黑麦 1RS 的标记位点, 为鉴定 1BL/1RS 易位染色体提供了一种有效的鉴定

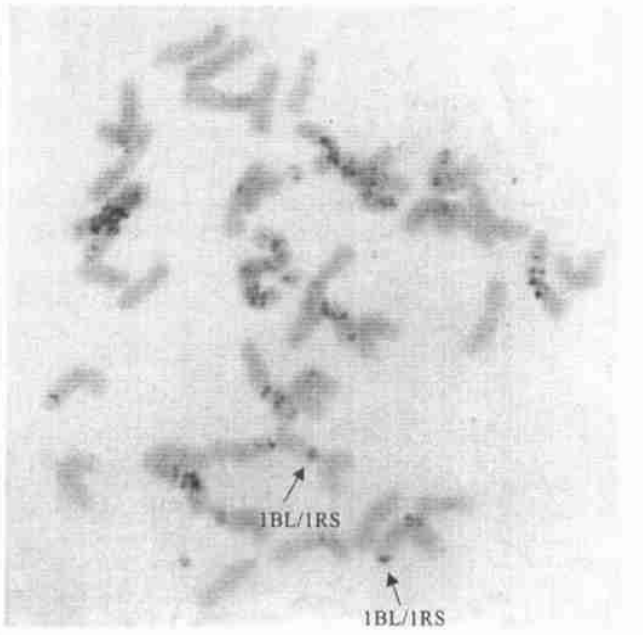


图 4 77(2) 染色体 C-分带

Fig 4 C-Binding of 77(2)

标记。1BL/1RS 易位系 77(2) 的 A-PAGE 图谱就具有 G1d1B3 组醇溶蛋白位点(图 2D)。利用染色体 C-分带鉴定 77(2), 可以看出, 有 2 条染色体含有 1B 染色体的长臂和 1R 染色体的短臂(图 3, 4)。图 3 箭

头示 1R 染色体, 图 4 箭头示 1BL/1RS 易位染色体。

3 讨 论

3.1 利用小麦种子贮藏蛋白凝胶电泳鉴定外源染色体

由于簇毛麦 V1, 大麦 H5 附加系 HMW-GS 和 1BL/1RS 易位系 77(2) 醇溶蛋白的特征带在小麦遗传背景中均能够表现出来, 因而完全可以利用种子贮藏蛋白凝胶电泳技术对小麦中的外源染色体进行鉴定, 即利用 HMW-GS 和 γ , ω 醇溶蛋白的特征带鉴定小麦近缘植物的第一部分同源群染色体, 利用 α , β 醇溶蛋白鉴定小麦近缘植物的第六部分同源群染色体, 特别是鉴定小麦二倍体近缘植物染色体。

3.2 小麦近缘植物 HMW-GS 对小麦加工品质的影响

HMW-GS 与小麦品质关系密切, 利用染色体工程与种子贮藏蛋白凝胶电泳技术相结合, 有目的

地将小麦近缘植物中稀有的 HMW-GS 染色体或染色体片段导入小麦, 对改良小麦的加工品质具有重要的理论和实践意义, 同时也可利用此方法研究小麦外源 LMW-GS 和醇溶蛋白对小麦加工品质的影响。

3.3 Gld1B3 位点在小麦雄性不育系选育中的应用

由于 1BL/1RS 易位型小麦雄性不育系恢复基因 Rfv1 位于 1BS 染色体的末端^[5], 因而黑麦 γ 区 Gld1B3 醇溶蛋白位点为 1BL/1RS 易位型小麦雄性不育系的鉴定提供了可靠的依据。利用 A-PA GE 技术可以对大量的小麦优良品种(系)进行筛选, 选育粘、易、偏、二角型不育系的保持系, 结合 C-分带技术可有目的地进行 1BL/1RS 易位型不育系的选育和改良, 以克服 1BL/1RS 易位型雄性不育系在产生雄性不育的同时带来的一些负面影响, 如不育系及其 F_1 会产生一定频率的单倍体, 育性恢复性变异较大等。

[参考文献]

- [1] 赵文明 种子蛋白质工程[M]. 西安: 陕西科学技术出版社, 1995 32- 50
- [2] 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, 2000
- [3] 雷东锋, 马建岗, 赵文明 小麦种子贮藏蛋白质研究进展[J]. 西北植物学报, 2001, 21(3): 584- 593
- [4] 郎明林, 卢少源, 赵家发, 等 适合我国小麦醇溶蛋白“指纹图谱”绘制的改良 A PAGE 分子标记技术[J]. 河北农业大学学报, 1998, 21(4): 1- 4
- [5] Mukai Y, Endo T R. Physical mapping of a fertility-restoring gene against *Aegilops kotschy* cytoplasm in wheat[J]. Japanese Journal of Genetics, 1992, 67(3): 199- 207.
- [6] Wei Y M, Zheng Y L. Detection of the rye chromatin in multispiket wheat gemplasm 10-A background using fluorescence in situ hybridization (FISH) and RFLP markers[J]. Acta Botanica Sinica, 1999, 41(7): 722- 725.
- [7] Sozinov A A, Novosolskaya A Y, Lushnikova A A, et al Cytological and biochemical analysis of bread wheat variants with 1B/1R substitutions and translocations in Karyotype[J]. Tsitologiya i Genetika, 1987, 21: 256- 261.

Application of proteins gel electrophoresis in the identification of allo some chromosome in wheat

WANG Xiao-li, ZHANG Gai-sheng, CHEN Xin-hong,
ZHAO Ji-xin, LIU Hong-wei, WANG Jun-wei

(College of Agronomy, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Wheat proteins gel electrophoresis was used to identify allo some chromosome of *Haynaldia villosa*, *Leymus mollis*, *Pseudotschys huashanica*, *Hordeum distichon* and *Secale cereale* in wheat. All of these plants had their own HMW-GS and gliadin marker, compared to wheat V1 and H5 additional lines were detected by HMW-GS marker of SDS-PAGE, which have partial homologous relations with the first homologous series chromosome in wheat. 1BL/1RS translocation lines was detected with the gliadin marker Gld1B3 of 1RS translocation chromosome and C-banding Meantime, the technology application of wheat proteins gel electrophoresis was discussed in quality control and male sterile breeding of wheat.

Key words: wheat; HMW-GS; gliadin; allo some chromosome; C-banding