

## 小麦属 G 组染色体编码的高分子量谷蛋白亚基多态性

李保云<sup>1\*</sup> 尤明山<sup>1</sup> 梁荣奇<sup>2</sup> 张义荣<sup>1</sup> 刘广田<sup>1</sup>

(1 中国农业大学作物学院, 北京 100094)

(2 北京市农林科学院, 北京 100089)

**摘要** 用 SDS-PAGE 和 PCR 扩增方法对提莫菲维小麦和阿拉拉特小麦 G 组染色体编码的高分子量谷蛋白亚基(HMW-GS)的多态性进行了研究。无论从蛋白质水平还是从 DNA 水平来看, G 组染色体编码的 HMW-GS 都存在遗传多样性, 15 个供试材料表现出 8 种带型, 并与普通小麦和硬粒小麦的 HMW-GS 不同, 为了研究 G 组染色体编码的 HMW-GS 与小麦品质的关系; 利用普通小麦的 Glu-1Y 位点中部重复结构区的保守序列设计的 2 个特异性引物对 G 组染色体进行 PCR 扩增可以鉴别 Glu-1G 位点的等位基因变异, 且与 SDS-PAGE 的结果一致。

**关键词** 提莫菲维小麦; 阿拉拉特小麦; G 组染色体; 高分子量谷蛋白亚基(HMW-GS); Glu-1Y 位点; Glu-1G 位点

中图分类号 S512

## Polymorphism of High Molecular Weight Gluten in Subunits Coded by G-Genome

Li Baoyun<sup>1</sup> You Mingshan<sup>1</sup> Liang Rongqi<sup>2</sup> Zhang Yirong<sup>1</sup> Liu Guangtian<sup>1</sup>

(1 College of Crop Science, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

(2 Beijing Academy of Agriculture and Forest, Beijing 100089, China)

**Abstract** The composition of high molecular weight glutenin subunits (HMW-GS) in 7 *Triticum timopheevii* and 8 *T. araraticum* were analyzed by SDS-PAGE and PCR. 8 allelic variations were detected at Glu-1G locus. PCR primers specific to  $\gamma$ -type HMW-GS were used to investigate the storage protein among 7 *T. timopheevii* and 8 *T. araraticum* too. The PCR analysis indicated that the high level genetic diversity were found at Glu-1G locus which confirmed the results obtained by using SDS-PAGE method. There are specific HMW-GS in *T. timopheevii* and *T. araraticum* as compared with those of 1A, 1B and 1D in common wheat.

**Key words** *Triticum timopheevii*; *T. araraticum*; G-genome in wheat; high molecular weight glutenin subunits(HMW-GS); Glu-1Y locus; Glu-1G locus

小麦的籽粒贮藏蛋白(面筋蛋白)主要包括醇溶蛋白和谷蛋白, 谷蛋白根据其分子量大小又可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)2类。HMW-GS 与小麦品质关系密切, 自从 Payne 建立了小麦 HMW-GS 与烘烤品质的关系以来, 许多谷

收稿日期: 2001-10-16

\* 李保云, 讲师, 研究方向为小麦品质育种。北京圆明园西路 2 号

物化学家和小麦品质育种家对小麦 HMW -GS 进行了深入的研究。但对于 G 组染色体编码的 HMW -GS 的多态性及其与小麦烘烤品质关系的研究未见报道。研究 G 组染色体编码的 HMW -GS 的多态性及其与小麦烘烤品质关系对于利用染色体工程的方法,将 G 组染色体片段导入普通小麦,改良小麦品质具有重要的理论意义和实践意义。

小麦高分子量谷蛋白亚基都是由 3 个区域组成,包括一个大的中间重复区域和保守的 N 末端和 C 末端非重复区域<sup>[1,2]</sup>。D'Ovidio 等<sup>[3]</sup>在研究 1Dx2 2\* 的分子结构时发现, Glu-1 位点的多态性是由于重复区域的长度不同所致。到目前为止已检测到 20 个不同的 HMW -GS 等位基因<sup>[4]</sup>,控制小麦 HMW -GS 1Ax1<sup>[5]</sup>、1Ax2\*<sup>[6]</sup>、1Ay<sup>[7]</sup>、1Bx7<sup>[6]</sup>、1By9<sup>[8]</sup>、1Bx17<sup>[9]</sup>、1Dx5、1Dy10<sup>[10]</sup>、1Dx2、1Dy12<sup>[11]</sup>等的基因序列已被克隆并测序,测序结果表明 HMW -GS 基因的 N 端和 C 端的核苷酸序列非常相似,有些只有一二个核苷酸的差异,这个结果提供了用小麦 HMW -GS 引物研究 G 组编码的 HMW -GS 的可能性。

本研究的目的是从蛋白质水平和 DNA 水平研究 G 组染色体编码的 HMW -GS 多态性,为研究 G 组染色体编码的 HMW -GS 与小麦品质的关系提供理论依据,开辟小麦品质改良新途径。

## 1 材料与方法

### 1.1 植物材料

本试验所用的 *Triticum timopheevii* 小麦和 *T. araraticum* 小麦分别由中国农科院作物所樊路先生、中国科学院遗传所贾旭先生、南京农业大学细胞室陈佩度先生惠赠及通过何仲虎博士从 CMM IIY 引进的材料。一粒小麦,二粒小麦购自中国农科院品资所。普通小麦为本实验室保存。

### 1.2 种子贮藏蛋白中高分子量谷蛋白亚基的提取

选取 1 粒种子,砸碎后置于 1.5 mL 离心管中;加入 1 mL 提取液 A (50% 异丙醇 isopropanol), 60~65 水浴提取 30 min,期间搅动 2 次;室温下 10 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 30 min;弃去上清液,将沉淀物重新悬浮在 1.5 mL 提取液 A 中;重复上述步骤 2 次,弃上清液;在离心管中加入 160 μL 提取液 B [50% 异丙醇, 0.08 mol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl 中含 0.3% 质量浓度 DTT (二硫苏糖醇, dithioerythritol)], 混匀, 60~65 水浴提取 30 min;加入 160 μL 提取液 C [50% 异丙醇, 0.08 mol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl 中含 1.4% 质量浓度 4-乙烯基吡啶 (4-vinylpyridin)];室温下 10 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min;取上清液 150 μL,加入 600 μL 丙酮, 30 水浴 10 min;室温下 10 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min;弃上清液,冷冻干燥约 30 min;加入 100 μL 样品提取液,室温溶解,即可用于上样。

### 1.3 贮藏蛋白的 SDS-PAGE 分析

采用 SDS 不连续缓冲系统,分离胶浓度为 11% (pH 8.5),浓缩胶浓度为 2.5% (pH 6.8),交联度为 2.6,胶厚 0.75 cm,每个样品孔点样 10 μL。

**1.3.1 电泳** 用北京六一仪器厂生产的 DYY-III4 型稳压稳流电泳仪,电极缓冲液中含 0.025 mol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl, 0.192 mol·L<sup>-1</sup> 甘氨酸, 0.001% SDS pH 8.3。在 0~4 冰箱内以每块胶 15 mA 稳流电泳,指示剂出胶后 1 h 停止电泳。

**1.3.2 染色,脱色和保存** 凝胶用含有 12.5% 的三氯乙酸, 0.005% 考马斯亮蓝的染色液染色过夜,用蒸馏水脱色至背景清晰,照相或作成干胶长期保存。

## 1.4 植物总DNA 提取

按CTAB 法进行<sup>[12]</sup>。

## 1.5 Glu-1y 位点特异性引物的PCR 扩增

PCR 反应体系为: 25  $\mu\text{L}$  总体积中含  $1 \times$  buffer ( $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris-HCl pH 8.3,  $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  KCL,  $1.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  MgCl<sub>2</sub>),  $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  dNTP (A、G、T、C) each, 50 ng primers, 模板DNA 50~ 100 ng, Taq DNA 聚合酶 1 U。

PCR 反应条件为: 首先 94 °C 预变性 5 min; 然后 94 °C 变性 1 min, (50~ 63 °C) 退火 1 min, 72 °C 延伸 2 min, 共 45 个循环; 最后 72 °C 延伸 5 min。扩增产物中加入 2  $\mu\text{L}$  加样缓冲液 ( $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris-HCl pH 8.0,  $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  EDTA, 1% SDS, 0.25% Bromophenol blue, 0.25% Xylene Cyanol, 50% Glycerol)。(5% ~ 10%) 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 缓冲体系为  $1 \times$  TBE ( $90 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris-borate pH 8.3,  $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  EDTA), 170 V 电泳 5 h, 银染检测。

## 2 结果分析

### 2.1 G 组染色体编码的高分子量谷蛋白亚基的 SDS-PAGE 多态性分析

从高分子量谷蛋白亚基的 SDS-PAGE 图谱(图 1, 2)上看, 15 个材料中共有 8 种谱带类型, 8 个参试的阿拉拉特小麦只有 3 种带型, 而 7 个参试的提莫菲维小麦有 5 种带型, 提莫菲维小麦的多态性高于阿拉拉特小麦的多态性。虽然 SDS-PAGE 图谱是一个很稳定的生化标记, 但由于用这种方法要破坏种子, 在杂种早代影响种子的发芽, 因而需要进一步用分子标记来检测供试材料的多态性。

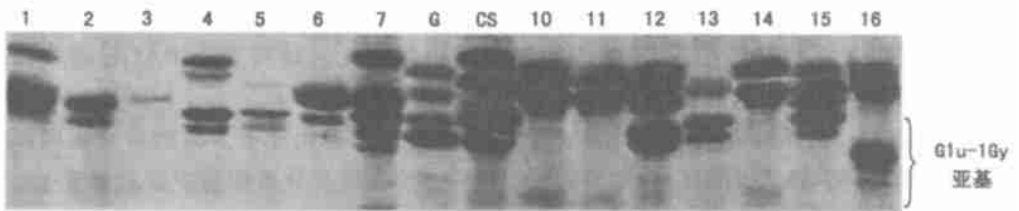


图 1 四倍体小麦种(AABB, AAGG)高分子量谷蛋白亚基 SDS-PAGE 图谱  
1~ 7 染色体组为 AABB, 10~ 16 为提莫菲维小麦(AAGG)型, G 为 Gabo, CS 为中国春

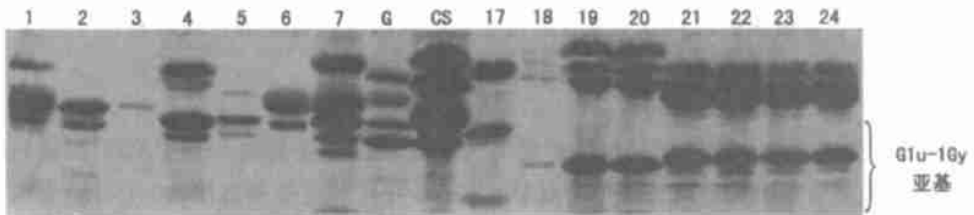


图 2 四倍体小麦种(AABB, AAGG)高分子量谷蛋白亚基 SDS-PAGE 图谱  
1~ 7 染色体组为 AABB 型, 17~ 24 为阿拉拉特小麦(AAGG)型, G 为 Gabo, CS 为中国春

## 2.2 提莫菲维小麦 1G 染色体的 Glu-1Gy 位点的分析

利用 Glu-1y 位点的特异性引物 (1: 5'-GGGAACA TCTTCA CAAAACA GTACAA-3'; 2: 5'-CTGTGTTAACA TGGTA TGGGTTGTC-3') 扩增 Glu-1y 位点的 HMW-GS 的中部重复区域, 能够较好的鉴别与烘烤品质有关的等位基因变异<sup>[14]</sup>。我们用上述引物对 G 组染色体编码的 HMW-GS 进行 PCR 扩增, 15 个材料共扩增出 8 种带型, 且与 SDS-PAGE 图谱一致性很好, 结果证明这些引物可以鉴别 Glu-1G 位点的等位基因变异(图 3)。

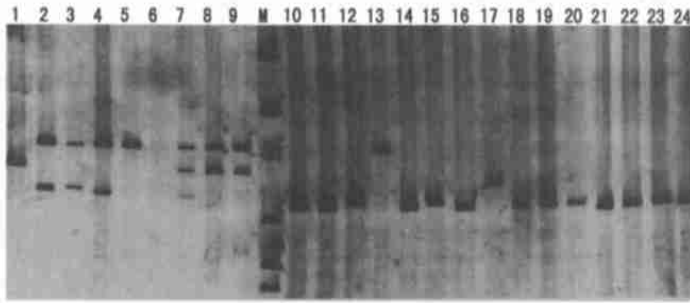


图 3 24 份材料 Glu-1y 基因(包括重复区域)的 PCR 扩增结果

1 为乌拉尔图小麦(AA); 2~6 为四倍体小麦(AABB); 7~9 为六倍体普通小麦(AABBDD);  
10~16 为提莫菲维小麦(AAGG); 17~24 为阿拉拉特小麦(AAGG); M 为 Marker

## 3 讨论

用生化方法研究小麦高分子量谷蛋白亚基基因的遗传变异稳定性高, 但需要破坏种子。而用 PCR 方法可以在植物生长的任何时期进行, 尤其在杂种早代更为实用。

本实验研究的 G 组染色体编码的 HMW-GS 发现, 品种的多态性与提供单位和产地有一定的关系, 尤其是阿拉拉特小麦, 南京农大细胞室提供的 3 份材料 SDS-PAGE 谱带相同, 而 CMMTY 所提供的 4 份材料的 SDS-PAGE 谱带相同。

有关小麦 A、B、D、G 组染色体上高分子量谷蛋白亚基进化分子方面的研究表明: G 组染色体编码的 HMW-GS 与 B 组染色体编码的 HMW-GS 在聚类分析图谱中距离很近<sup>[13]</sup>。所以, 从 HMW-GS 进化方面的研究来看, B 组和 G 组染色体的起源可能很近。本实验用 D'Ovidio et al<sup>[14, 15]</sup> 根据普通小麦 Glu-1 位点中部重复区域的保守序列所设计的引物, 对提莫菲维小麦和阿拉拉特小麦 G 组染色体编码的 HMW-GS 进行 PCR 扩增。从扩增结果来看(图 3), G 组染色体 HMW-GS 的基因比 B 组染色体 HMW-GS 的短, 这可能是由于基因片段的缺失所引起, 有关 G 染色体组编码的高分子量谷蛋白亚基的基因序列有待进一步研究。

## 4 结论

通过对提莫菲维小麦和阿拉拉特小麦高分子量谷蛋白亚基的 SDS-PAGE 图谱(图 1, 2) 分析, 发现提莫菲维小麦和阿拉拉特小麦 HMW-GS 存在一定的多态性。15 个材料表现出 8 种带型, 其中 7 个提莫菲维小麦有 5 种带型, 8 个阿拉拉特小麦有 3 种带型, 并且这些带型与普通小麦和硬粒小麦的 HMW-GS 不同。

利用 Glu-1Y 位点中部重复结构区的保守序列设计的 2 个特异性引物对 G 组染色体进行

PCR 扩增, 15 个材料扩增出 11 种带型, 与 SDS-PAGE 结果一致。利用此引物可以鉴别 Glu-1G 位点的等位基因变异(图 3)。这对研究 G 组染色体编码的 HMW -GS 与小麦品质的关系提供了理论依据; 对远缘杂交早代 Glu-1G 编码的 HMW -GS 的鉴定提供了好方法。

## 参 考 文 献

- 1 Shewry P R, Halford N G, Tatham A S. The high-molecular-weight subunits of wheat, barley and rye: genetics molecular biology, chemistry and role in wheat glutenin structure and functionality. In Oxford Surveys Plant Mol Cell Biol, 1989, 6: 163~ 219
- 2 Kasarda D D, King G, Kumosinski F. Comparison of spiral structures in wheat high-molecular-weight glutenin subunits and elastin by molecular modeling. In: Kumosinske F, Liebm an M N eds. Molecular Modeling: from Virtual Tools to Real Problems. American Chemical Society, 1994. 209~ 220
- 3 D'Ovidio R, Lafiandra D, Porceddu E. Identification and molecular characterization of a large insertion within the repetitive domain of a high-molecular-weight glutenin subunit gene from hexaploid wheat. Theor Appl Genet, 1996, 93: 1048~ 1053
- 4 Shewry P R, Halford N G, Tatham A S. High molecular weight subunits of wheat glutenin. J Cereal Sci, 1992, 15: 105~ 120
- 5 Halford N G, Field J M, Blair H, et al. Analysis of HMW glutenin subunits encoded by chromosome 1A of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) indicates quantitative effects on grain quality. Theor Appl Genet, 1992 83: 373~ 378
- 6 Anderson O D, Greene F C. The characterization and comparative analysis of high-Mr glutenin genes from genomes A and B of a hexaploid bread wheat. Theor Appl Genet, 1989, 77: 689~ 700
- 7 Forde J, Malpica J M, Halford N G, et al. The nucleotide sequence of a HMW glutenin subunit gene located on chromosome 1A of wheat (*Triticum aestivum* L.). Nucleic Acids Res, 1985, 13: 6817~ 6832
- 8 Halford N G, Forde J, Anderson O D, et al. The nucleotide and deduced amino-acid sequences of a HMW glutenin subunit gene from chromosome 1B of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) and comparison with those of genes from chromosomes 1A and 1D. Theor Appl Genet, 1987, 75: 117~ 126
- 9 Reddy P, Appels R. Analysis of a genomic DNA segment carrying the wheat high-molecular-weight (HMW) glutenin Bx17 subunit and its use as an RFLP marker. Theor Appl Genet, 1993, 85: 616~ 624
- 10 Anderson O D, Yip R E, Halford N G, et al. Nucleotide sequences of two high-molecular-weight glutenin subunit genes from the D-genome of a hexaploid bread wheat *Triticum aestivum* L. cv Cheyenne. Nucleic Acids Res, 1989, 17: 461~ 462
- 11 Thompson R D, Bartels D, Harberd N P. Nucleotide sequence of a gene from chromosome 1D of wheat encoding a HMW -glutenin subunit. Nucleic Acids Res, 1985, 13: 6833~ 6846
- 12 Doyle J L, Doyle J J. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus, 1990, 12: 13~ 15
- 13 Allaby R G, Banerjee M, Brown T A. Evolution of the high molecular weight glutenin loci of the A, B, D and G genomes of wheat. Genome, 1999, 42: 296~ 307
- 14 D'Ovidio R, Masci S, Porceddu E. Development of a set of oligonucleotide primers specific for genes at the Glu-1 complex loci of wheat. Theor Appl Genet, 1995, 91: 189~ 194
- 15 D'Ovidio R, Porceddu E, Lafiandra D. PCR analysis of genes encoding allelic variants of high-molecular-weight glutenin subunits at the Glu-D1 locus. Theor Appl Genet, 1994, 88: 175~ 180