

密穗小麦高分子量谷蛋白亚基组成分析

倪中福 孙其信 张义荣 刘广田

(中国农业大学作物学院)

摘要 采用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PA GE)方法,分析了32份密穗小麦的高分子量谷蛋白亚基(HMW -GS)组成。在3个位点上一共检测到12种不同的亚基类型。在Glu-B1位点上,密穗小麦的高分子量谷蛋白亚基组成具有其明显的组成特点,表现为21和13+ 16亚基出现频率较高,分别为34.83%和18.75%,而这2种亚基在普通小麦和斯卑尔脱小麦中为极稀有亚基;密穗小麦在Glu-A1和Glu-D1位点上的主要亚基变异形式与普通小麦相似,即以null(Glu-A1)、2+ 12和5+ 10(Glu-D1)为其主要变异形式。另外,本研究还筛选出了7份具有5+ 10优质亚基的材料,这将为提高密穗小麦与普通小麦种间杂交种的品质杂种优势提供了材料基础。最后讨论了密穗小麦的起源。

关键词 密穗小麦; 高分子量谷蛋白亚基; SDS-PA GE

中图分类号 S512

Composition Analysis of HMW Gluten in Subunits in *Triticum compactum*

Ni Zhongfu Sun Qixun Zhang Yirong Liu Guangtian

(College of Crop Science, CAU)

Abstract The composition of high molecular weight glutenin subunits (HMW -GS) in *Triticum compactum* was electrophoretically analyzed by SDS-PA GE. Twelve alleles were identified: three at Glu-A1, six at Glu-B1, and three at Glu-D1. At the Glu-B1 locus, frequencies of subunit 21 (34.83%) and subunits 13+ 16 (18.75%) were relatively high, whereas in common wheat and spelt wheat, the above two subunits were very rare, indicating that HMW -GS compositions of *T. compactum* differed obviously from common wheat and spelt wheat. The variation form of Glu-A1 and Glu-D1 of *T. compactum* is similar to common wheat, i.e. the most common alleles at Glu-A1 and Glu-D1 were null (Glu-A1), 2+ 12 and 5+ 10 (Glu-D1) respectively. In this study, seven *T. compactum* that have 5+ 10 subunits were selected providing a basis for selecting breeding parents with good quality. In addition, the origin of *T. compactum* was also discussed.

Key words *Triticum compactum*; HMW -GS; SDS-PA GE

小麦的高分子量谷蛋白亚基(HMW -GS)是由染色体1A, 1B, 1D长臂上的位点控制,总称为Glu-1位点,分别用Glu-A1, Glu-B1, Glu-D1表示,每一位点都有2个相距很近紧密连锁的

收稿日期: 2000-12-21

北京市自然科学基金重点资助项目(5991001)和国家自然科学基金重点资助项目(39930110)

倪中福,北京圆明园西路2号中国农业大学(西校区),100094



基因, 分别控制分子量较高的 x-型亚基和分子量较低的 y-型亚基。各位点均有不同数量的等位基因变异, 编码不同类型的亚基^[1]。虽然小麦高分子量谷蛋白仅占胚乳储藏蛋白的 10%, 但其数目和组成与小麦的烘烤品质关系密切^[2]。目前, 在优质面包小麦育种工作中, 包括国际玉米小麦改良中心(CMMYT)在内的一些著名育种机构都将高分子量谷蛋白亚基组成作为最重要的选择和评价指标之一^[3]。

密穗小麦是小麦属内与普通小麦具有相同基因组(AABBDD)的一个物种, 与普通小麦种间杂交结实正常, 杂交一代育性正常。最近, 我们研究发现, 密穗小麦与普通小麦种间杂交种具有明显的杂种优势, 部分组合在品质上也表现出了较强的杂种优势。尽管国内外学者对普通小麦及其近缘种属(如二粒小麦和粗山羊草)的高分子量谷蛋白亚基组成已有深入细致的研究^[2-4, 6, 7], 但在密穗小麦上尚未见报道。另外, 我们前文^[8]分析发现, 选择具有优质亚基的斯卑尔脱亲本与普通小麦组配的种间杂交种具有更高的品质杂种优势。因此, 分析密穗小麦的高分子量谷蛋白亚基组成对于密穗小麦和普通小麦种间杂种优势利用具有重要意义。

除在育种工作中的重要价值以外, 许多学者还利用高分子量谷蛋白亚基组成进行了小麦的遗传演化及群体分化研究。例如, 以色列野生二粒小麦的高分子量谷蛋白多态性与环境因素有关^[6]; 通过分析节节麦高分子量谷蛋白亚基遗传变异类型发现节节麦 Glu-D1 位点的遗传变异远比普通小麦丰富, 并认为在由四倍体小麦与节节麦天然杂交、自然加倍进化成六倍体普通小麦的过程中参与普通小麦起源的节节麦基因型相当有限^[7]。

本研究采用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)方法, 鉴定分析了 32 份密穗小麦的高分子量谷蛋白亚基组成, 并与普通小麦及斯卑尔脱小麦的研究结果相比较, 进而对密穗小麦的起源问题进行了分析和讨论。另外, 我们还期望筛选出具有优质亚基的密穗小麦品种, 在利用普通小麦和密穗小麦种间产量杂种优势的同时, 为提高种间杂交种的品质杂种优势提供材料基础。

1 材料和方法

1.1 供试材料

供试密穗小麦的品种及来源见表 1, 其中的 30 份为本实验室近期从美国引进的。

1.2 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)方法

样品的提取: 选取 1 粒种子, 砸碎后置于 1.5 mL 离心管中, 加入 50% 异丙醇 1 mL, 60~65 °C 水浴 30 min (其间搅动 2 次), 10^4 r·min⁻¹ 离心 3 min, 弃上清液。重复 2 次上述流程后加入提取液 B₁ 160 μL (50% 异丙醇+ 0.3% DTT), 混匀, 60~65 °C 水浴 30 min, 加入 160 μL 提取液 B₂ (50% 异丙醇+ 1.4% (10^4 r·min⁻¹) 4-乙炔基吡啶) 混匀, 60~65 °C 水浴烷化处理 60 min, 10^4 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上清液 150 μL, 加入 600 μL 丙酮, 45 °C 水浴 30 min, 10^4 r·min⁻¹ 离心 10 min, 弃上清液, 加入 100 μL 样品提取液[0.0625 mol·L⁻¹ Tris-HCl, pH 6.8, 5% β-巯基乙醇, 20% SDS, 10% 丙三醇, 0.002% 溴酚蓝], 40 °C 水浴溶解 1 h 即可。

凝胶配制: 参考哈密斯等(1994)的方法配制缓冲液, 采用 SDS 不连续缓冲系统, 分离胶浓度为 10% (pH 8.5), 浓缩胶的浓度为 2.5% (pH 6.8), 交联度为 2.6%, 胶厚 0.75 cm。

电泳条件: 电极缓冲液为 0.025 mol·L⁻¹ Tris-HCl, 0.192 mol·L⁻¹ 甘氨酸, 0.001% (体积分数) SDS, pH 8.3, 每板 15 mA 稳流电泳过夜。

染色、脱色和保存: 凝胶用含有 12.5% 三氯乙酸, 0.05% 考马斯亮蓝的染色液染色过夜, 用蒸馏水脱色至背景清晰, 照相或做干胶长期保存。

2 结果与分析

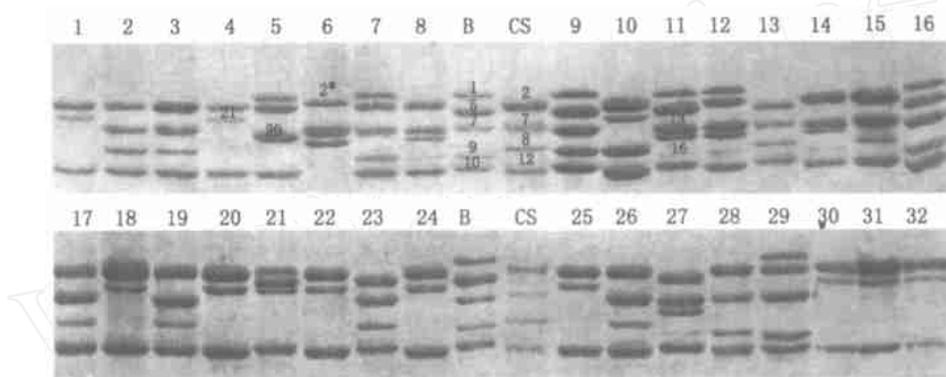
以中国春 (null, 7+ 8, 2+ 12) 和荔垦 2 号 (1, 7+ 9, 5+ 10) 为对照材料, 对 32 份密穗小麦的高分子量谷蛋白亚基进行鉴定分析 (图 1), 结果分别列于表 1, 2, 3。

表 1 32 份密穗小麦的编号、名称、来源及高分子量谷蛋白亚基组成

编号	品种	来源	Glu-A 1	Glu-B 1	Glu-D 1
1	Barbee	美国	Null	21	2+ 12
2	Faro	美国	Null	7+ 8	2+ 12
3	Tyee	美国	Null	7+ 8	2+ 12
4	Tres	美国	Null	21	2+ 12
5	Americian 94	美国	1	20	2+ 12
6	Americian 98	美国	2*	13+ 16	Null
7	Americian 173	美国	1	7+ 9	2+ 12
8	American Club	美国	Null	13+ 16	2+ 12
9	Ech 1096	美国	1	7+ 8	5+ 10
10	Rouge De La Gruyer	美国	Null	6+ 8	2+ 12
11	Tiroler Fruhe Bink	美国	1	13+ 16	5+ 10
12	Konia	美国	1	13+ 16	2+ 12
13	Falco	美国	Null	7+ 8	5+ 10
14	Compacto ide	美国	Null	13+ 16	2+ 12
15	W 2691	美国	Null	7+ 8	2+ 12
16	DN -2263	美国	1	7+ 9	5+ 10
17	Vardenik9	美国	Null	7+ 8	2+ 12
18	Gluclvb	美国	Null	21	2+ 12
19	Knoppies Caledon	美国	Null	7+ 8	2+ 12
20	M algas	美国	Null	21	2+ 12
21	T incvrrin	美国	2*	21	5+ 10
22	L ine F	美国	Null	21	2+ 12
23	Big Head	美国	Null	7+ 8	5+ 10
24	WA 7621	美国	Null	21	2+ 12
25	Temple	美国	Null	21	2+ 12
26	Rely	美国	Null	7+ 8	2+ 12
27	90455ARS	美国	Null	13+ 16	5+ 10
28	C02	中国	Null	7+ 9	2+ 12
29	C028	中国	1	7+ 9	2+ 12
30	E lmer	美国	Null	21	2+ 12
31	Omar	美国	Null	21	2+ 12
32	Paha	美国	Null	21	2+ 12

表 2 密穗小麦 HMW -GS 在不同位点上的变异类型及其频率

染色体 1A			染色体 1B			染色体 1D		
亚基	材料数目	比例/%	亚基	材料数目	比例/%	亚基	材料数目	比例/%
Null	23	71.88	21	11	34.38	2+ 12	24	75.00
1	7	21.87	13+ 16	6	18.75	5+ 10	7	21.87
2*	2	6.25	7+ 8	9	28.12	Null	1	3.13
			7+ 9	4	12.50			
			6+ 8	1	3.125			
			20	1	3.125			



1~32 为材料编号(同表 1); 对照品种:CS(中国春)和 B(莠星 2 号)

图 1 密穗小麦的高分子量谷蛋白亚基组成

由表 1 和表 2 可以看出, 32 份密穗小麦在 3 个位点上一共鉴定出 12 种不同的高分子量谷蛋白亚基类型, 其中 Glu-A 1, Glu-B 1 和 Glu-D 1 位点上的变异形式分别为 3, 6 和 3 种。

由表 2 可知, 在 Glu-A 1 位点上的 3 种变异类型(null, 1 和 2*) 中, 亚基缺失类型(null) 的出现频率高, 达 71.88%, 1 亚基次之(21.88%), 2* 亚基最低, 仅占 6.25%。这与许多学者对普通小麦进行的研究结果相似, 即在 Glu-A 1 位点上, null 为优势亚基变异类型^[2-5]。例如, Nakamura 等^[4]最近的研究显示, 在中国和日本普通小麦亚基缺失类型(null) 的出现频率分别高达 80.4% 和 74.1%。值得提出的是, 上述结果与我们前文^[8]对斯卑尔脱小麦进行的研究结果明显不同, 斯卑尔脱小麦在 Glu-A 1 位点上以 1 亚基为优势类型。

在 Glu-B 1 位点上, 密穗小麦高分子量谷蛋白亚基的变异类型较为丰富, 检测到 21, 13+ 16, 7+ 8, 7+ 9, 20 和 6+ 8 等 6 种类型, 其中以 21 亚基出现频率最高(34.38%), 7+ 8 亚基次之(28.12%)。另外, 13+ 16 和 7+ 9 亚基出现频率也较高, 分别为 18.75% 和 12.5%。其他的为稀有亚基类型。与对普通小麦^[2-5]以及我们前文^[8]对斯卑尔脱小麦的研究结果相比,

密穗小麦在 Glu-B1 位点上的高分子量谷蛋白亚基具有其明显的组成特点,主要表现在 21 亚基和 13+ 16 亚基出现频率较高,而这 2 种亚基类型在普通小麦和斯卑尔脱小麦中均为稀有亚基,出现频率相当低(1% 以下)。另外,在斯卑尔脱小麦的 Glu-B1 位点上,6+ 8 亚基出现频率高达 78.75%,而密穗小麦中仅为 3.125%。

在密穗小麦 Glu-D1 位点上的 3 种亚基变异形式(2+ 12, 5+ 10 和 null)中,2+ 12 亚基类型最多(75%),其次是 5+ 10 亚基(21.87%),表明 2+ 12 亚基和 5+ 10 亚基为密穗小麦 Glu-D1 位点上的主要变异形式,这与普通小麦和斯卑尔脱小麦的研究结果相同。我们首次发现在 Glu-D1 位点存在 x 和 y 亚基同时缺失的六倍体小麦类型(American 98),目前正对其缺失原因进行分子水平上的分析,结果将另文报道。

由表 4 可知,32 份密穗小麦的高分子量谷蛋白亚基组成类型也相当丰富,共有 15 种,其中以 null, 21, 2+ 12 类型最多,占全部供试材料的 31.25%,属优势亚基组成类型。其次为 null, 7+ 8, 2+ 12 类型,占 18.75%。与普通小麦和斯卑尔脱小麦相比,密穗小麦中的优势亚基组成类型(null, 21, 2+ 12)出现频率相对较低。例如,我们前文^[8]研究发现,1, 6+ 8, 2+ 12 亚基组成类型在斯卑尔脱小麦中的出现频率高达 68.75%。在中国和日本等国的普通小麦中,Null, 7+ 8, 2+ 12 亚基组成类型出现频率均为 50% 以上^[2, 4]。

3 讨论

本研究显示,在 Glu-A1 位点上,密穗小麦高分子量谷蛋白亚基变异类型以 null 为主,这与普通小麦研究结果相似,不同于斯卑尔脱小麦(以 1 亚基为优势类型)。在 Glu-B1 位点上,密穗小麦以 21 和 13+ 16 亚基出现频率较高,而在斯卑尔脱小麦和普通小麦中,分别以 6+ 8 亚基和 7+ 8 或 7+ 9 亚基出现频率较高。上述结果说明,密穗小麦、斯卑尔脱小麦和普通小麦的高分子量谷蛋白亚基都具有其明显的组成特点,尤其是在 Glu-B1 位点上。

密穗小麦在 Glu-D1 位点上的主要亚基变异形式为 2+ 12 亚基和 5+ 10 亚基,这与普通小麦和斯卑尔脱小麦的研究结果相似,但变异类型远远低于二倍体粗山羊草(DD 染色体组)。目前,在二倍体粗山羊草 Glu-D1 位点上发现至少有 14 种等位基因变异形式,且许多亚基类型为粗山羊草所特有,如 1, 5+ 10, 2+ T1+ T2 等^[7]。因此,根据本实验结果,作者认为密穗小麦 D 染色体组的起源可能与斯卑尔脱和普通小麦相同,即起源于有限的山羊草基因型,这也暗示着普通小麦、斯卑尔脱小麦和密穗小麦在 D 染色体组上可能具有较高的遗传相似性,目前我们正在用微卫星分子标记对该推论进行分子水平上的分析验证。

表 3 密穗小麦 HMW -GS 的组成类型及材料数目

HMW -GS 组成类型	材料数目	比例/%
Null, 21, 2+ 12	10	31.25
Null, 7+ 8, 2+ 12	6	18.75
Null, 7+ 9, 2+ 12	1	3.125
Null, 6+ 8, 2+ 12	1	3.125
Null, 13+ 16, 2+ 12	2	6.25
Null, 7+ 8, 5+ 10	2	6.25
Null, 13+ 16, 5+ 10	1	3.125
1, 20, 2+ 12	1	3.125
1, 7+ 9, 2+ 12	2	6.25
1, 13+ 16, 2+ 12	1	3.125
1, 7+ 9, 5+ 10	1	3.125
1, 7+ 8, 5+ 10	1	3.125
1, 13+ 16, 5+ 10	1	3.125
2*, 13+ 16, Null	1	3.125
2*, 21, 5+ 10	1	3.125

由于高分子量谷蛋白亚基是影响小麦烘烤品质的重要因素。因此, 筛选出具有优质亚基的材料是进行优质小麦育种及提高杂交种的品质杂种优势的前提。本研究筛选出了 7 份具有 5 + 10 优质亚基的材料, 这将为提高密穗小麦与普通小麦种间杂交种的品质杂种优势提供了材料基础。

参 考 文 献

- 1 Payne P I, Law C N, Mudd E E, et al Control by homologous group I chromosome of the high molecular weight subunits of glutenin: a major protein of wheat endosperm. *Theor Appl Genet*, 1980, 58: 113 ~ 120
- 2 孙辉 小麦谷蛋白亚基与烘烤品质的关系及 Glu-D1 位点基因多态性分析: [学位论文] 北京: 中国农业大学, 1998
- 3 He Zhonghu, Pena R I, Rajaram S High molecular weight glutenin subunit composition of Chinese bread wheats *Euphytica*, 1992, 64: 11~ 20
- 4 Nakamura H. Allelic variation at high-molecular-weight glutenin subunit loci, Glu-A1, Glu-B1 and Glu-D1 in Japanese and Chinese hexaploid wheats *Euphytica*, 2000, 112: 187~ 193
- 5 朱金宝 普通小麦品质性状遗传、环境互作及其与高、低分子量谷蛋白亚基(HMW-GS, LMW-GS)的关系: [学位论文] 北京: 中国农业大学, 1994
- 6 Nevo E, Payne P I Wheat storage proteins: Diversity of HMW glutenin subunits in wild emmer from Israel: I. Geographical patterns and ecological predictability. *Theor Appl Genet*, 1987, 74: 827~ 836
- 7 Lagudah E S, Halbram G M. Phylogenetic relationship of *Triticum tauschii*, the D genome donor to hexaploid wheat: I. Variation in HMW subunits of glutenin and gliadins *Theor Appl Genet*, 1988, 75: 592~ 598
- 8 倪中福, 孙其信, 张义荣, 等 斯卑尔脱小麦高分子量谷蛋白亚基组成分析 农业生物技术学报, 2001, (待发表)
- 9 Lelley T, Stachel M, Grausgruber H, et al. Analysis of relationship between *Aegilops tauschii* and the D genome of wheat utilizing microsatellites *Genome*, 2000, 43: 661~ 668