

小麦耐盐突变体的分子生物学鉴定^①

秘彩莉, 沈银柱, 黄占景, 何聪芬,

柏峰, 马闻师, 赵宝存, 葛荣朝

(河北师范大学生物系, 河北 石家庄 050016)

摘 要: 利用 F₁ 花药培养、EMS 诱变和耐盐性反复筛选后已稳定 9 代的小麦耐盐突变体 RH8706-49、H8706-34、H8706-44、H8706-48、H8706-57 及其亲本濮农 3665、百农 3039 为材料, 用生化标记 (醇溶蛋白) 及分子标记 (RAPD) 分析了各材料间的差异, 发现突变体与亲本相比, 不仅发生了蛋白质水平的变异, 而且也在 DNA 水平上证明了突变的发生, 从而为耐盐突变体的真实性提供了有力的证据, 排除了盐适应的可能性; 经用 218 个引物对 5 个突变体之间的多态性进行 RAPD 分析, 结果表明, 它们之间的差异很小, 其遗传背景相似, 因而它们是一系列耐盐性不同的近似等位基因系。

关键词: 小麦; 耐盐突变体; 醇溶蛋白; RAPD

中图分类号: Q78, Q342 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-9772(1999)06-0032-36

Molecular Biological Identification of Wheat Salt Tolerant Lines

BI Cai-li, SHEN Yin-zhu, HUANG Zhan-jing, HE Cong-fen,

BAI Feng, MA Wen-shi, ZHAO Bao-cun, GE Rong-chao

(Biology Department of Hebei Normal University, Shijiazhuang 050016, China)

Abstract: In this paper, 5 wheat salt tolerant mutants (H8706-34, H8706-44, H8706-48, RH8706-49, H8706-57) derived from anther culture, EMS induction and salt tolerance selection and their parents (Punong3665, Bainong3039) were used as materials, all the mutants have inherited stably for 9 generations. Differences were revealed between the mutants and their parents using chemical marker (gliadin) and molecular marker (RAPD), the results showed that compared with the parents, the mutants varied not only on the protein level, but also on the DNA level, which supplied hard evidence of the truth of the mutants and ruled out the possibility of salt adaptation. RAPD analysis were conducted among the 5 mutants by 218 primers, which proved they were a series of near isogenic lines of different salt tolerance because of their little difference and similar genetic background.

Key words: Wheat; Salt tolerant mutants; Gliadin; RAPD

我国有大面积的盐碱荒地^{〔1〕}, 随着人口增长和可利用耕地面积的日益减少, 开发利用盐碱荒地、使之发挥出生产上的巨大潜力是摆在全国人民面前的一个重要课题。小麦是一种非常重要的粮食作物, 因此研究小麦的耐盐机理及其遗传是进行小麦耐盐碱育种的前提和基础。长期以来, 与小麦耐盐性有关的理论研究至今尚未有突破性的进展, 其重要原因之一是缺乏遗传背景相似而耐盐性有差异的实验材料。最近, 沈银柱等^{〔2〕}利用小麦花药

①收稿日期: 1998-07-14; 修订日期: 1999-02-02

基金项目: 河北省教委基金(资助号: 953304)资助项目

作者简介: 秘彩莉(1974-), 女, 硕士学位, 助教, 专业方向: 分子生物学。

培养, EMS 诱变和耐盐性反复筛选得到了一系列耐盐性不同的突变体。这些突变体外部形态和耐盐性均与亲本明显不同, 但仍缺乏分子生物学的直接证据。RAPD 是揭示基因组 DNA 差异的有效方法, 目前已用于遗传作图、遗传多样性分析及品系鉴定等方面的研究, 且取得了另人瞩目的成果^[3-5]。

用醇溶蛋白电泳和 RAPD 方法对突变体和亲本进行分析, 从而在蛋白质水平和 DNA 水平上为小麦耐盐突变体的真实性提供了有力的证据; 用 RAPD 方法对突变体之间的差异进行分析表明, 突变体是一系列遗传背景相似而耐盐性有差异的近似等位基因系, 为小麦耐盐性研究提供了一套好材料。

1 材 料 和 方 法

1.1 材 料

1.1.1 植物材料 供试材料 RH8706-49、H8706-34、H8706-44、H8706-48、H8706-57 为澳农 3665 / 百农 3039F₁ 经花药培养、EMS 诱变、耐盐性反复筛选得到的同一单株的后代, 它们耐盐性不同且均经过连续 9 代自交选择, 详见文献 [2]。

1.1.2 试剂 10-mer 随机引物购自美国 Operon 公司; *Taq* 酶购自华美生物工程公司; dNTPs 购自 Bio-Lab。

1.1.3 PCR 仪 为 MJ 公司的 PTC-100™ Programmable Thermal Controller。

1.2 方 法

1.2.1 醇溶蛋白电泳 参照傅宾孝的方法^[6], 点样量为 8 μ l。

1.2.2 小麦核 DNA 的提取 取液氮冷冻叶片 3~5g, 在液氮冷冻下迅速研磨成粉末。放入 50ml 离心管中, 然后加 20ml 缓冲液 (100mmol/L Tris-HCl, pH8.5; 50mmol/L EDTA, pH8.0; 2%SDS; 100mmol/L NaCl) 及 100 μ l 蛋白酶 K (终浓度为 0.05mg/ml), 充分摇匀。将离心管置于 65℃ 水浴 1~2h, 此过程中均匀地混合几次。取出离心管, 每管加入等体积的酚/氯仿 (1:1), 混匀后, 3 000 r/min 离心 20min。将上清液移入另一离心管中, 加入等体积的氯仿, 混匀后, 3 000 r/min 离心 20min。取上清液于另一离心管中, 加入 0.6V 异丙醇, 轻轻混匀, 静置一段时间, 然后用玻璃钩挑出 DNA, 并用 70% 乙醇冲洗 2~3 次, 气干。将 DNA 溶于 5ml TE 中, 加入 100 μ g RNase (不含 DNase) 37℃ 酶解 1~3h。加入等体积酚/氯仿, 轻轻混匀, 3 000 r/min 离心 15min。取上清, 加入等体积的氯仿, 混匀, 3 000 r/min 离心 15min, 取上清。加入 1/10V 3mol/L NaAc (pH5.2) 混匀后加入 2V 100% 冷乙醇, 玻璃钩挑出 DNA, 70% 乙醇洗 2~3 次, 气干。加入适量 TE 溶解 DNA。以 OD₂₆₀ 测定 DNA 浓度, 以 OD₂₆₀ / OD₂₈₀ 检测核酸纯度。

1.2.3 RAPD 反应 参考 Williams 方法^[7] 略有改动。反应体系为 20 μ l, 其中含模板 DNA 50ng, *Taq* 酶 0.9U, dCTP, dATP, dGTP, dTTP 终浓度各为 0.1mmol/L, 1 μ l 随机引物。

扩增反应条件: 90s / 94℃ 预变性, 45s / 94℃、45s / 36℃、120s / 72℃, 循环 40 次, 然后 72℃ 延伸 4min, 扩增产物在 1.1% 琼脂糖凝胶中电泳后, 于 0.5 μ g/ml EB 的水溶液中染色 30min, 以蒸馏水脱色 20min 后, 观察并拍照。各扩增反应至少重复 3 次。

2 结 果 与 分 析

2.1 小麦耐盐突变体生化水平变异 (醇溶蛋白) 的分析

按前述方法进行供试品种醇溶蛋白的提取和电泳, 以加拿大硬红春小麦 Marquis 和 Nepawa 为对照品种, 结果如图 1。如箭头所示, 5 个突变体均比其亲本多一 Rf 为 0.19 的区带, 控制醇溶蛋白的各组分已有明确的染色体定位, 有关基因分别位于第一和第六同源染色体组的短臂上, 而控制大分子量 γ 、 ω 蛋白亚基的基因则位于第一同源染色体组的短臂上^[8]; 突变体的这一特异区带位于 γ 区, 可见耐盐突变体的突变部位可能在第一同源染色体组的短臂上。

2.2 耐盐突变体 DNA 水平变异 (RAPD) 的分析

用 38 个随机引物对突变体及其亲本进行了 RAPD 分析, 随后用 218 个引物对 5 个突变体之间的差异进行统计分析, 结果如下:

2.2.1 亲本与突变体之间的多态性 用 38 个引物对亲本及 5 个突变体进行 RAPD 分析, 35 个引物有扩增产物, 共扩增出 140 条带, 其中两个引物 (OPE12, OPT16) 在突变体与亲本之间出现多态性 (如图 2), 5 个突变体共扩增出两条特异带, 占总扩增产物的 1.4%。因为 RAPD 所揭示的是 DNA 水平的差异, 因而在 DNA 水平上证明了突变的发生。

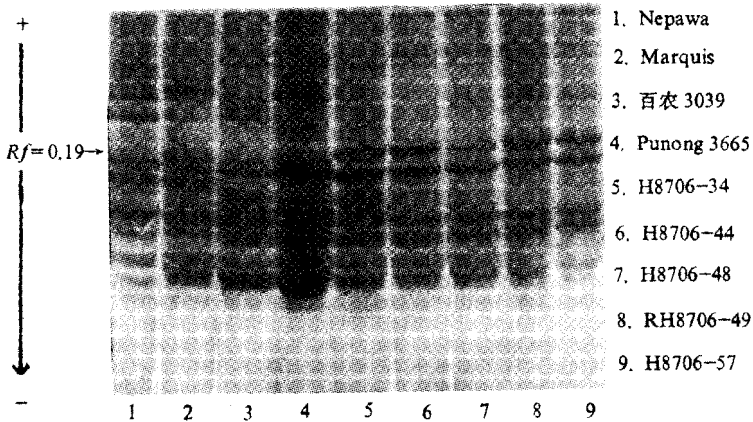


图 1 供试品种的醇溶蛋白电泳图谱

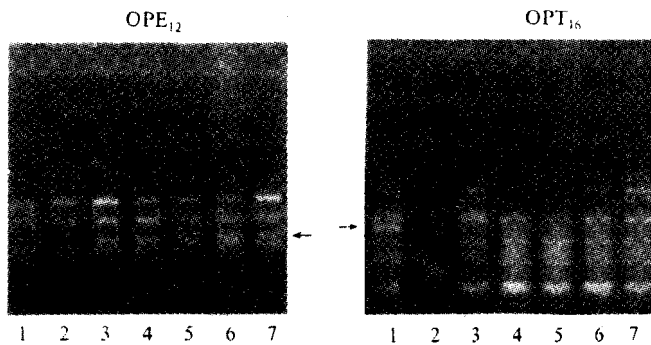


图 2 OPE12 及 OPT16 在突变体与亲本之间的扩增产物

1. 百农 3039; 2. 濮农 3665; 3. H8706-34; 4. RH8706-49; 5. H8706-44; 6. H8706-48; 7. H8706-57。

2.2.2 突变体之间的多态性 用 218 个引物对 5 个突变体进行了 RAPD 分析。经统计共有 210 个引物有扩增产物, 占总引物数的 95.9%, 共扩增出 1 244 条带, 平均每个引物可扩增出 6 条带; 有 6 个引物 (OPK₁₁、OPS₀₂、OPS₀₆、OPS₁₀、OPS₁₅、OPZ₀₈) 在突变体之间扩增出多态性 (如图 3), 仅占引物数的 2.8%, 说明它们之间的差异十分微小。

为了进一步说明突变体之间的变异程度, 我们对多态性进行了统计分析, 并按刘春宇的方法计算遗传距离⁽⁹⁾, 结果如表 1 和表 2, 可知 5 个突变体之间的遗传距离变动在 0.0004~0.002 之间。由此可见, 各突变体之间差异很小, 有的甚至于在所用引物中没有扩增出特异区带; 突变体之间遗传距离的测定说明突变体的遗传背景十分相似。

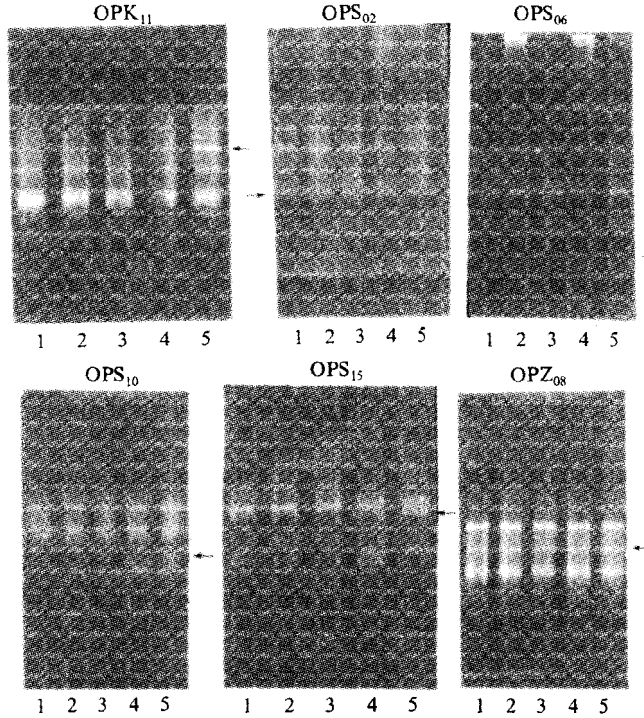


图 3 突变体之间的 RAPD 扩增结果

1. H8706-34; 2. RH8706-49; 3. H8706-44; 4. H8706-48; 5. H8706-57.

表 1 突变体之间多态性统计

引物	RH8706-49	H8706-34	H8706-44	H8706-48	H8706-57
OPK11		-			+
OPS02		+			
OPS06			+		
OPS10					+
OPS15				+	+
OPZ08					+

注: 表中的“+”代表特异扩增产物的存在;“-”代表缺失某一扩增产物。

表 2 突变体之间遗传距离分析

材料 A 与材料 B	N_A	N_B	N_{AB}	遗传距离(D)
RH8706-49 与 H8706-34	1238	1238	1237	0.00081
RH8706-49 与 H8706-44	1238	1239	1238	0.0004
RH8706-49 与 H8706-48	1238	1239	1238	0.0004
RH8706-49 与 H8706-57	1238	1242	1238	0.0016
H8706-34 与 H8706-44	1239	1239	1238	0.00081
H8706-34 与 H8706-48	1239	1239	1238	0.00081
H8706-34 与 H8706-57	1239	1242	1238	0.002
H8706-44 与 H8706-48	1239	1239	1238	0.00081
H8706-44 与 H8706-57	1239	1239	1238	0.002
H8706-48 与 H8706-57	1239	1242	1239	0.0012

注: N_A 、 N_B 分别为 A、B 材料的 RAPD 图谱中各自显现的总带数; N_{AB} 为样品 A 与样品 B 图谱中相同的带数。
遗传距离 $D = 1 - 2N_{AB} / (N_A + N_B)$ 。

3 讨 论

经过 EMS 诱变和耐盐性反复筛选得到的耐盐突变体, 其真实性往往受到人们的怀疑, 即其可能是盐适应的产物。本研究所用突变体的耐盐性及农艺性状已基本排除了这种可能性, 但尚缺乏分子生物学的直接证据。由于醇溶蛋白的研究已较为透彻, 其各组分已有较明确的染色体定位, 对于某一小麦品种, 其醇溶蛋白电泳图谱的条带数目、各谱带的相对位置及染色强度构成了该品种的“指纹”; RAPD 方法可以比较有效地对基因组进行差异分析⁽⁸⁾。本文对 5 个突变体及其亲本进行了醇溶蛋白及 RAPD 分析, 结果表明, 突变体与亲本相比, 发生了从蛋白质水平到 DNA 水平的变异, 从而为突变体的真实性提供了充分的分子生物学证据; 用 218 个引物对 5 个突变体进行了 RAPD 分析, 结果表明突变体之间差异十分微小, 遗传距离的计算更证明了这一点。根据以前的研究结果, 突变体耐盐性不同且为同一单株的后代, 因而其遗传背景十分相似, 所以我们认为, 我们所得到的突变体是一系列遗传背景相似而耐盐性又有差异的近似等位基因系, 从而为小麦耐盐性研究的进一步深入提供了一套良好的材料。

通过诱变来改良作物的性状已成为育种的主要途径之一, 但诱变涉及基因组的多大范围, 很少有人了解, 只有陈受宜⁽¹⁰⁾对水稻耐盐突变体、管泽强⁽¹¹⁾对一个 CMS 水稻育性回复突变体进行了分子水平的鉴定, 对于小麦, 有关突变体的详细分子生物学研究还未见报道。本研究表明, 诱变可引起某些性状的变异, 并且通过突变可以得到具有特殊性状的近似等位基因系, 它们在小麦耐盐机理及遗传研究中将具有重要的理论和实践意义。

参 考 文 献:

- (1) 张福锁, 等. 环境胁迫与植物育种[M]. 北京: 农业出版社, 1993, 330~335.
- (2) 沈银柱, 等. 诱发小麦花药愈伤组织及其再生植株抗盐性变异的研究[J]. 遗传, 1997, 19 (6), 7~12.
- (3) 王文, 兰宏, 等. 云南4个少数民族的随机扩增多态DNA分析[J]. 科学通报, 1994, 39: 1900~1904.
- (4) Tigest D, Robert P A. The use of PCR-RAPD analysis in plant taxonomy and evolution. In: Griffin H G, Griffin A M. PCR technology current innovations[M]. CRC Press Inc, 1994, 179~191.
- (5) Welsh J, Petersen C, et al. Polymorphism generated by arbitrary primed PCR in the mouse: application to strain identification and genetic mapping[J]. Nucl Acids Res, 1990, 19: 303~306.
- (6) 傅宾孝, 等. 小麦醇溶蛋白电泳分析的新方法[J]. 作物学报, 1993, 19 (2): 185~187.
- (7) Williams J G, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers[J]. Nucl Acids Res, 1990, 18: 6531~6535.
- (8) Paynt P I. Genetics of wheat storage proteins and the effect of allelic variation on bread-making quality[J]. Ann Rev Plant Physiol, 1987, 38: 141~153.
- (9) 刘春宇, 等. 家蚕与蓖麻蚕杂交后代变异机理探讨——基因组RAPD检测[J]. 遗传, 1998, 20 (2): 5~8.
- (10) 陈受宜, 等. 水稻耐盐突变体的分子生物学鉴定[J]. 植物学报, 1991, 33 (8): 569~573.
- (11) 管泽强, 等. 一个CMS水稻育性回复突变体的RAPD分析[J]. 遗传学报, 1997, 24 (6): 501~506.
- (12) Delourme R, et al. Identification of RAPD markers linked to a fertility restorer gene for the Qgura radish cytoplasm male sterility of rapeseed (*Brassica haps L.*) [J]. Theor Appl Genet, 1994, 88 (6-7): 741~748.

声 明

上海基康生物技术有限公司引进美国先进技术, 在 DNA 测序及化学合成方面取得重大突破, 为此真诚作出降价行动。特将 1999 年《遗传》封四的广告报价改动如下:

1. DNA 测序服务 仅收 **300 元**/反应; 2. DNA 化学合成 每个碱基仅 **8 元**

高效、高质、高速, 中立、守密是我们的宗旨。欢迎拨打咨询热线: (021)64956278 转 39 分机或 41 分机

北京办事处电话: (010)64981182 手机: 1380-1367477

上海基康生物技术有限公司

1999-08-12