

技术与方法 Techniques and Methods

小麦组织培养后代的醇溶蛋白和 SSR 位点的遗传变异

张志清* 郑有良** 魏育明 颜泽洪 刘虹 王际睿 彭学莲

四川农业大学小麦研究所, 四川都江堰 611830

Genetic Variations on Gliadin Alleles and SSR Loci among Regenerated Plants and Seeds of Wheat (*Triticum aestivum* L.) from Tissue Culture

ZHANG Zhi-Qing*, ZHENG You-Liang**, WEI Yu-Ming, YAN Ze-Hong, LIU Hong, WANG Ji-Rui, PENG Xue-Lian

Triticaceae Research Institute, Sichuan Agricultural University, Dujiangyan, Sichuan 611830, China

摘要 以酸性聚丙烯酰胺凝胶电泳(APAGE)和简单重复序列(SSR)标记分别检测 40 个通过组织培养获得单株收获的种子 and 23 个再生植株的 DNA, 结果表明, 5 株 '98-1266' 和 2 株 '80-8' 在 APAGE 分析中出现位点缺失, 迁移率增大, 并出现新带。在 34 个小麦 SSR 位点中, WMS18、WMS264、WMS328、Xgdm67、Xgdm98 等 5 个位点有变化。单株发生变化的是 '80-8'-8、'川麦 32'-1、'川麦 32'-7、'川育 12'-1、'Y1496'-3 和 'Y1496'-6。说明在组织培养过程中体细胞无性系变异广泛存在。APAGE 技术和 SSR 标记均可用来检测这种变异。

关键词 小麦; 组织培养; 酸性聚丙烯酰胺凝胶电泳(APAGE); 醇溶蛋白; SSR 标记; 遗传变异

小麦(*Triticum aestivum* L.)组织培养过程中由于生长调节物质和培养条件等理化因素的影响, 在分化过程中常常会发生染色体结构和数量的变异, 其中一些变异是可遗传的, 即体细胞无性系变异(somatic variation, SV)。无性系变异既有单一性状变异, 又有 2 个或多个性状同时变异。前者变异频率高, 后代在个别性状上发生变异, 基本上保持原品种特性, 稳定速度快, 育种周期短, 是改良优良品种单一缺点的有效手段之一; 后者可产生丰富的变异群体, 从而作为育种工作中的一种变异体来源, 从中筛选出综合性状优良的品种(Cooper 和 Sears 1986; Larkin 和 Rvan 1984)。近年来, 许多研究者对小麦体细胞无性系在形态特征、穗部性状、产量构成因子等性状以及在容重、粒重、蛋白质含量、面团形成时间、SDS 沉淀值等品质性状方面的变异进行了深入的研究(高明尉等 1994; 梁竹青 1995; 张怀刚等 1997, 1998; 叶兴国等 1998; 胡尚连等 1998; 孙岩等 1999)。在鉴定小麦无性系变异中常用的手段是田间农艺性状考察、分子标记差异分析、染色体核型带型分析等, 其中, 鉴定醇溶蛋白是一种快速、简单的手段。目前, 国内外比较通用的鉴定分析小麦醇溶蛋白的方法是酸性聚丙烯酰胺

凝胶电泳(acid polyacrylamide gel eletrophoresis, APAGE)技术, 虽然该项技术已应用于小麦种子纯度鉴定、种质资源遗传多样性、1B/1R 易位系鉴定、品种差异分析等研究领域(Zillam 和 Bushuk 1979; 张学勇等 1995), 而用于检测体细胞无性系变异的报道还相对较少。另外, 分子标记技术可直接用于检测样品中 DNA 水平的差异, 简单重复序列(simple sequence repeat, SSR)标记或称微卫星(microsatellite)由于在小麦基因组中多态性极高, 且有染色体组特异性, 相对于 RFLP (restriction fragment length polymorphism)、RAPD (random amplified polymorphic DNA)等标记而言, 有操作简单、稳定性高和花费小等优点(Lee 等 1995; Röder 等 1995), 因此, 已成为目前研究小麦最有效的分子标记技术之一(Plaschke 等 1995; Peng 等 1999; 景蕊莲和昌小平 1999; Prasad 等 2000; 崔国惠等 1999)。

本文用 APAGE 技术和 SSR 标记研究获得的 40

收稿 2006-01-16 修定 2006-05-07

资助 四川省科技厅应用基础项目(2002A008)和四川省教育厅重点项目(03JY029-028-2863)。

* 现工作单位: 四川农业大学分析测试中心(E-mail: zqzhang721@163.com, Tel: 0835-2882281)。

** 通讯作者(E-mail: grmb@sicau.edu.cn, Tel: 0835-2882336)。

个组织培养株系的醇溶蛋白位点和 SSR 位点是否发生遗传变异, 以及变异特点, 同时结合田间农艺性状考察, 筛选变异材料, 以期为小麦育种的研究提供参考。

材料与方法

使用 International Seed Testing Association (ISTA) 于 1986 年颁布的标准程序, 对 40 株组织培养小麦 (*Triticum aestivum* L.) 单株收获的种子进行醇溶蛋白位点分析, 每个单株分别随机选取 1 粒种子用于检测。小麦品种 (系) 来源有 ‘川育 12’、‘异源 2 号’、‘川农 16’、‘80-8’、‘川育 16’、‘Y1496’、‘98-1266’、‘川麦 32’。以未经组织培养的相应品种在正季收获的种子为对照。所有材料均由小麦研究所转基因研究室提供。

SSR 检测用 CTAB 法提取 23 个组织培养单株总 DNA。共 34 个 SSR 引物: EMP-I、 γ -gli、WMS120、WMS512、WMS108、WMS149、WMS154、WMS157、WMS164、WMS18、WMS186、WMS190、WMS194、WMS24、WMS264、WMS282、WMS325、WMS328、WMS374、WMS43、WMS46、WMS480、WMS484、WMS5、WMS52、WMS544、WMS570、WMS60、WMS601、WMS82、Xgdm126、Xgdm129、Xgdm67、Xgdm98 由北京赛百胜公司合成, 引物序列及在小麦染色体上的定位见文献 (Röder 等 1995, 1998; Plaschke 等 1995; Pestsova 等 2000)。扩增反应应用 PTC220 型热循环仪 (MJ 公司生产)。

PCR 反应参照 Röder 等 (1995) 的方法, 并稍加改动。反应总体积 25 μ L, 其中含 1 U Taq DNA 聚合酶 (TaKaRa 公司)、1 $\times$ 缓冲液、1.5 mmol·L⁻¹ MgCl₂、200 μ mol·L⁻¹ dNTPs、65 ng 引物和 50~100 ng 模板 DNA。扩增前 94℃ 预变性 4 min; 然后在 94℃ 中变性 1 min, 55 或 60℃ (视引物而定) 退火 1 min, 72℃ 延伸 2 min, 扩增 40 个循环; 最后, 在 72℃ 延伸 10 min。扩增产物中加适量上样缓冲液后点样, 在含 0.5% EB 和 3.0% 的琼脂糖凝胶中以 1 $\times$ TAE 缓冲液为介质, 100 V 稳压电泳 2 h。BIO-RAD 凝胶成像系统拍照、记录。

实验结果

1 组织培养再生植株醇溶蛋白位点变异

为了避免由于种子不纯造成的实验误差, 每个材料选取正季收获的种子 3 粒作为对照材料进行纯度鉴定, 取 3 粒种子的 APAGE 电泳图谱一致的材料作为对照材料并与组织培养材料的种子醇溶蛋白进行对比分析的结果表明, 在 8 个四川小麦品种 (系) 的 40 粒再生单株收获的种子中, 有 2 个品种部分单株种子的醇溶蛋白位点发生了变异。这 2 个基因型分别是 ‘98-1266’ 和 ‘异源 2 号’。‘98-1266’ 在 12 个单株中有 5 株的醇溶蛋白与未经组织培养的相应品种比较有差异 (图 1), 表现为 5 粒种子在 ω 区迁移率最小的 2 条带缺失, 特别是 ‘98-1266’-7 (图 1 中 3 号样品) 在 α 区有 1 条迁移率较大的新带出现。‘异源 2 号’ 的 8 个组织培养单株中有 2 个单株的醇溶蛋白位点有差异, 发生变异的区域是 α 区和 β 区, 主要表现在这两个区出现了一些新的迁移率较大的条带, 其中 α 区 2 条, β 区 2 条 (图 2)。在测试的 40 个再生单株的收获种子中, 有 7 粒种子的醇溶蛋白位点与未经组织培养

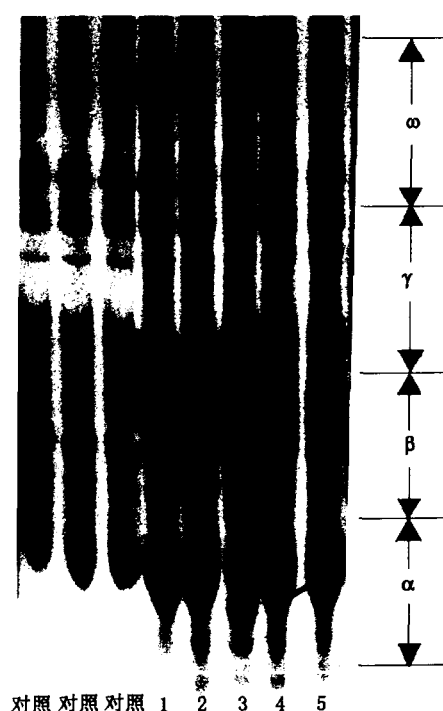


图 1 小麦 ‘98-1266’ 组织培养再生单株醇溶蛋白位点变异



图2 小麦‘异源2号’组织培养再生单株醇溶蛋白位点变异

的相应品种相比有差异, 可能是组织培养的过程中由于激素、培养条件等一些理化因子的影响所致。

2 组织培养再生植株 SSR 位点变异

在用于检测的 34 个 SSR 引物中, 有 5 个引物扩增的产物在部分品种的一些组织培养再生单株中表现出差异性, 这些引物分别是 WMS18、WMS264、WMS328、Xgdm67、Xgdm98, 它们在小麦染色体上的定位分别是 4BS、3BS、2AL、7DL、6DL。其具体变异表现为: 在 WMS18 位点上, 组织培养再生单株‘80-8’-8 明显地缺少了主带(图 3-a); 这个单株的 WMS264 位点上, 其扩增片段比对照少了 1 条片段较大的条带(图 3-b)。在 WMS328 位点上, ‘川麦 32’-1 也少了 1 条迁移率最小的带, 同时出现了 1 条迁移率较大的弱带(图 3-c); 用 Xgdm67 引物对这些材料扩增时, 在‘川麦 32’-7 中出现了 1 个新的扩增片段, 其长度较大(图 3-d)。在不同的品种上发生了位点变异的 SSR 标记是 Xgdm98, 其变异表现



图3 小麦组织培养再生植株 SSR 位点的变异

a: ‘80-8’ 在 WMS18 位点的变异, 由左至右为对照、‘80-8’-1、‘80-8’-3、‘80-8’-8、‘80-8’-9; b: ‘80-8’ 在 WMS264 位点的变异, 由左至右为对照、‘80-8’-1、‘80-8’-3、‘80-8’-8、‘80-8’-9; c: ‘川麦 32’ 在 WMS328 位点的变异, 由左至右为对照、‘川麦 32’-1、‘川麦 32’-7、‘川麦 32’-8; d: ‘川麦 32’ 在 Xgdm67 位点的变异, 由左至右为对照、‘川麦 32’-1、‘川麦 32’-7、‘川麦 32’-8; e: ‘川麦 12’ 在 Xgdm98 位点的变异, 由左至右为对照、‘川麦 12’-1、‘川麦 12’-3; f: ‘Y1496’ 在 Xgdm98 位点的变异, 由左至右为对照、‘Y1496’-1、‘Y1496’-3、‘Y1496’-6。

为: (1)‘川育12’-1比‘川育12’-3少了1条迁移率较小的带(图3-e); (2)在‘Y1496’-3和‘Y1496’-6中都出现的1条迁移率略大于未经组织培养的相应品种和‘Y1496’-1的扩增条带(图3-f)。

讨 论

小麦组织培养过程中的体细胞无性系变异是一种常见的现象。孙岩等(1999)检测小麦组织培养种子和经辐射处理的组织培养种子醇溶蛋白的结果表明, 两者均有醇溶蛋白的变异, 于是认为, 鉴定醇溶蛋白是一种快速鉴定体细胞无性系变异的有效手段。我们对转基因受体系统中获得的40余个组织培养再生单株, 以APAGE检测醇溶蛋白位点, 以SSR检测23个单株的总DNA, 分别在生化水平和DNA水平上检测到了这种变异的存在, 据此我们认为, SSR标记在小麦中良好的稳定性和重复性, 可以作为鉴定变异的手段, 其检测的效率可随标记数的增加而提高。

近年来, 许多研究者采用小麦体细胞无性系变异与育种相结合的方法, 获得了一些在形态变异、农艺性状改良、品质指标发生变化的育种新材料(张怀刚等1997, 1998; 叶兴国等1998; 胡尚连等1998; 孙岩等1999)。本文中由于检测群体较小, 获得的变异材料不多, 在40个种子中仅有7粒存在变化, 采用SSR标记虽然也检测到了7株变异材料, 但这些变异在小麦育种中的应用价值还十分有限。尽管如此, 我们仍然认为, 植物转基因再生植株经过分子检测后被确定为非转化植株中也可能存在丰富的变异类型, 如果用多种遗传标记和田间性状考察方法鉴定这些材料中的遗传变异, 或许这些非转化植株可以得到有效利用, 也应予以重视。

参考文献

- 崔国惠, 倪中福, 刘志勇, 王晓玲, 吴利民, 孙其信(1999). 小麦杂种优势群研究: II 普通小麦和斯卑尔脱小麦微卫星分子标记遗传差异的研究. 农业生物技术学报, 7 (4): 333~338
- 高明尉, 成雄鹰, 梁竹青, 胡天赐(1994). 小麦体细胞组织离体诱变效应研究. 作物学报, 20 (1): 18~25
- 胡尚连, 李文雄, 曾寒冰(1998). 小麦未成熟胚离体培养的研究——再生植株后代籽粒醇溶蛋白和谷蛋白亚基及蛋白质

- 含量变化. 作物学报, 24 (2): 204~212
- 景蕊莲, 吕小平(1999). SSR标记在小麦种质资源研究中的应用. 作物品种资源, (2): 17~20
- 梁竹青, 高明尉, 成雄鹰, 刘国振(1995). 普通小麦体细胞无性系R2代变异发生特点. 作物学报, 21 (1): 49~56
- 孙岩, 唐凤兰, 李忠杰, 张月学, 闫文义, 王广金, 孙德全(1999). 麦醇溶蛋白在鉴定小麦体细胞无性系变异上的应用研究. 黑龙江农业科学, 2: 5~7
- 叶兴国, 徐惠君, 赵乐莲, 杜丽璞(1998). 组织培养途径改良定型小麦品种的研究. 作物学报, 24 (3): 310~314
- 张怀刚, 陈集贤, 胡含(1997). 小麦体细胞无性系 *Glu-1* 基因突变体的遗传分析. 遗传, 19 (1): 23~25
- 张怀刚, 陈集贤, 胡含(1998). 小麦体细胞无性系 SDS 沉淀值的变异与遗传. 西北农业学报, 7 (2): 1~5
- 张学勇, 杨欣明, 董玉琛(1995). 醇溶蛋白电泳在小麦种质资源遗传分析中的应用. 中国农业科学, 28 (4): 25~32
- Cooper DB, Sears RG (1986). Heritable somaclonal variation of gliadin proteins of wheat plant derives from immature embryo callus culture. Theor Appl Genet, 71: 784~790
- Larkin PJ, Ryan SA (1984). Heritable somaclonal variation in wheat. Theor Appl Genet, 67: 443~455
- Lee SJ, Penner GA, Devos KM (1995). Characterization of loci containing microsatellite sequence among Canadian wheat cultivars. Genome, 38: 1037~1040
- Peng JH, Fahima T, Röder MS, Li YC, Dahan A, Grama A, Ronin YI, Korol AB, Nevo E (1999). Microsatellite tagging of the stripe-rust resistance gene *YrH52* derived from wild emmer wheat, *Triticum dicoccoides*, and suggestive negative cross-over interference on chromosome 1B. Theor Appl Genet, 98: 862~872
- Pestsova E, Ganal MW, Röder MS (2000). Isolation and mapping of microsatellite markers specific for the D genome of bread wheat. Genome, 43: 689~697
- Plaschke J, Ganal MW, Röder MS (1995). Detection of genetic diversity in closely related bread wheats using microsatellite markers. Theor Appl Genet, 91: 1001~1007
- Prasad M, Varshney RK, Kumar A, Balyan HS, Sharma PC, Edwards KJ, Singh H, Dhaliwal HS, Kroy J, Gupta PK (2000). A microsatellite marker associated with a QTL for grain protein content on chromosome arm 2DL of bread wheat. Theor Appl Genet, 100: 341~345
- Röder MS, Korzun V, Wendehake K, Plaschke J, Tixier MH, Leroy P, Ganal MW (1998). A microsatellite map of wheat. Genetics, 149: 2007~2023
- Röder MS, Plaschke J, König SU, Börner A, Sorrells ME, Tanksley SD, Ganal MW (1995). Abundance, variability and chromosomal location of microsatellites in wheat. Mol Gen Genet, 246: 327~333
- Zillam RR, Bushuk W (1979). Wheat cultivar identification by gliadin electrophoregrams II. Effect of environmental and experiment factors on the gliadin electrophoregram. Can Plant Sci, 59: 281~285