

几个小麦远缘杂种的同工酶分析

贲桂英 韩发

(中国科学院西北高原生物研究所)

近年来随着对同工酶 (isozymes) 基础研究的进展, 同工酶分析技术在动、植物生理生化及遗传育种工作中的应用愈来愈广泛。植物同工酶分析方法已应用于植物分类、杂种亲本的选配、预测杂种优势、基因定位, 各种后代的遗传性分析及个体发育等方面。尤其在亲缘关系较远的远缘杂交中, 子代往往具有母本形态特征, 难以从植物的外部形态和细胞学方面进行鉴别, 而同工酶电泳图谱为杂种后代难以鉴别的遗传变异提供了一个较为理想的生理生化指标(周光宇等, 1979)。

1979年至1981年间我们对小麦的3个远缘杂种 F_1 及豌豆的遗传物质与小麦杂交后代进行了酯酶、过氧化物酶及淀粉酶同工酶分析, 并取得了一定结果, 现报道如下。

一、材料与方 法

供试材料 文中所用杂种材料均由我所农业研究室张思文同志¹⁾提供。

1. [扁凸山羊草 × 波斯小麦] F_1
2. [波斯小麦 × 野生二粒] F_1
3. [硬粒小麦 × 扁穗鹅冠草] F_1
4. 豌豆 1341 与普通春小麦 NP₇₈Ino₂₇C₂₅₃ 进行杂交的杂交后代 72120 及 B₂F₇, B₂F₈, F₁₀, F₁₁ 等近 20 个不同株系及经豌豆 DNA 注射的 79158-5 株系。上述材料均种在本所试验地。

(1) 酶液提取 分析材料取自生长一致的苗期叶片。称取 0.5 克洗净鲜叶剪碎, 置于预冷研钵内加入相当于 1/10 材料鲜重的无离子水于冰浴中研磨成匀浆, 再经 -15℃ 12000 × g 低温离心 15 分钟, 取其上清液置入冰箱中保存备用。

(2) 凝胶电泳 主要采用聚丙烯酰胺凝胶电泳法(莽克强等, 1975; 张树政等, 1973), 兼用淀粉凝胶。酯酶以薄层平板电泳酶带分离效果好, 凝胶浓度 4%, 中性。电极缓冲液 Tris-巴比妥 (pH7.0)。过氧化物酶选用聚丙烯酰胺凝胶盘状电泳, 碱性系统, 分离胶浓度 7.5%, 成层胶浓度 4%, 电极缓冲液为 Tris-甘氨酸 (pH 8.3)。淀粉酶以盘状电泳效果好, 凝胶浓度 5%, 胶内加入 0.14% 可溶性淀粉。

(3) 酶染色 酯酶染色参考 Nokagahar 等人的方法。将电泳毕的凝胶板用蒸馏水轻轻冲洗其表面, 然后用微量喷雾器向胶面均匀喷洒少量染液(含 1% 醋酸- α -萘酯和 2% 醋酸- β -萘酯的丙酮溶液), 再在 38℃ 恒温箱中保温 10—15 分钟, 嗣后用 2% 坚牢蓝水溶液染色约 1 分钟, 待玫瑰紫色(或玫瑰红色)酶带呈现之后用流水冲洗数分钟, 然后放入 7% 醋酸溶液中固定、脱色。过氧化物酶染色用醋酸联苯胺法(张树政等, 1973)。淀粉酶用碘-碘化钾染色液显色²⁾, 酶带为无色透明。

1) 在此向张思文同志致以谢意。

2) 淀粉染色液: 碘 0.1 克, 先用少许 95% 乙醇溶解, 再加入碘化钾 0.158 克, 加水到 10 毫升, 用时再稀释 20 倍。
本文 1985 年 3 月 20 日收到。

二、结果与讨论

(1) 硬粒小麦 (*Triticum turgidum* var. *carthlicum*) × 扁穗鹅冠草 (*Roegneria komarovii*) 杂种 F_1 酯酶同工酶谱。该杂种属于属间杂种, 父、母本双亲具有一定的亲和力。从植株的外部形态特征及其生物学特性来看杂种后代具有明显的父、母双亲的中间性状。而且杂种 F_1 幼苗 3 叶期叶片的酯酶同工酶谱也表现了互补两个亲本的酶谱特征(图 1)。母本硬粒小麦具有酶活很强的呈玫瑰紫色的 3 条酶带 ($Rf = 0.21, 0.30, 0.76$), 其父本扁穗鹅冠草亦具有 3 条酯酶谱带 ($Rf = 0.24, 0.47, 0.76$) 但显色呈玫瑰红色, 酶的活性也较母本谱带弱得多。其中 $Rf = 0.76$ 的 1 条带相当于母本同 1 条带 3 倍宽。由于父、母本酶带显色颜色、酶活强弱及谱带宽度的显著差异, 因而在杂种 F_1 中酯酶谱带呈现出父、母本双方谱带的累加效应非常清楚, 杂种中的第 1 条带来自母本的 $Rf = 0.21$ 带和父本的 $Rf = 0.24$ 的带, 并部分重叠; 杂种第 2 条带显然来自父本 $Rf = 0.47$ 谱带, 而杂种的第 3 条带是父、母本 $Rf = 0.76$ 带的叠加。母本中 $Rf = 0.30$ 的酶带在杂种中未显示。这种属间杂种 F_1 酯酶同工酶谱显示了互补双亲中大部酶带的特征。杂种中未出现新的杂种谱带。

(2) 波斯小麦 (*T. turgidum* var. *carthlicum*) 与野生二粒小麦 (*T. turgidum* var.

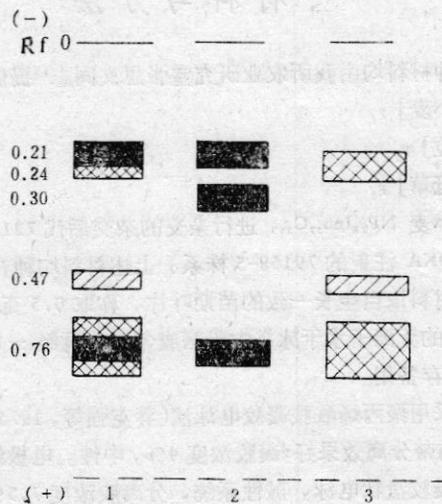


图 1 硬粒小麦 × 扁穗鹅冠草杂种 F_1 酯酶同工酶谱。聚丙烯酰胺凝胶薄层电泳。材料: 幼苗叶片。

Fig. 1 Zymogram patterns of isoesterase of *T. turgidum* var. *durum* × *Roegneria komarovii* hybrid F_1 and its parents.

By polyacrylamide gel thin layer electrophoresis. Material: leaves of seedling

1. 硬粒小麦 × 扁穗鹅冠草杂种 F_1 ;
T. turgidum var. *durum* × *Roegneria komarovii* hybrid F_1
2. 硬粒小麦(♀)
T. turgidum var. *durum* (♀);
3. 扁穗鹅冠草(♂)
Roegneria komarovii (♂)。

dicoccoides) 杂种 F_1 及扁凸山羊草 (*Aegilops ventricosa*) 与波斯小麦杂种 F_1 过氧化物酶同工酶谱。这两个杂种 F_1 其植株的外部形态也属于两亲本的中间类型, 苗期叶片过氧化物酶同工酶谱均呈现出杂种 F_1 为双亲谱带完全或大部分互补型(图 2)。在以扁凸山羊草为母本, 波斯小麦为父本的杂种中共有 9 条酶带, 其中 $R_f = 0.11, 0.27, 0.36, 0.51, 0.86$ 等 5 条带父、母两亲本均具有并在杂种中完全重叠, 而杂种中的 $R_f = 0.45$ 带仅来自父本。 $R_f = 0.61, 0.65$ 两带显然来自母本, 母本中 $R_f = 0.06$ 的泳动速率最低的谱带在杂种中消失了。在以波斯小麦为母本, 以野生二粒小麦为父本的杂种 F_1 中过氧化物酶谱同样表现出父、母本双亲酶谱带的累加效应。从图中看出 $R_f = 0.27, 0.65$ 的两条母本谱带在杂种中未出现。在上述两个杂种中消失的亲本谱带均属酶活较弱的带。两个杂种中均

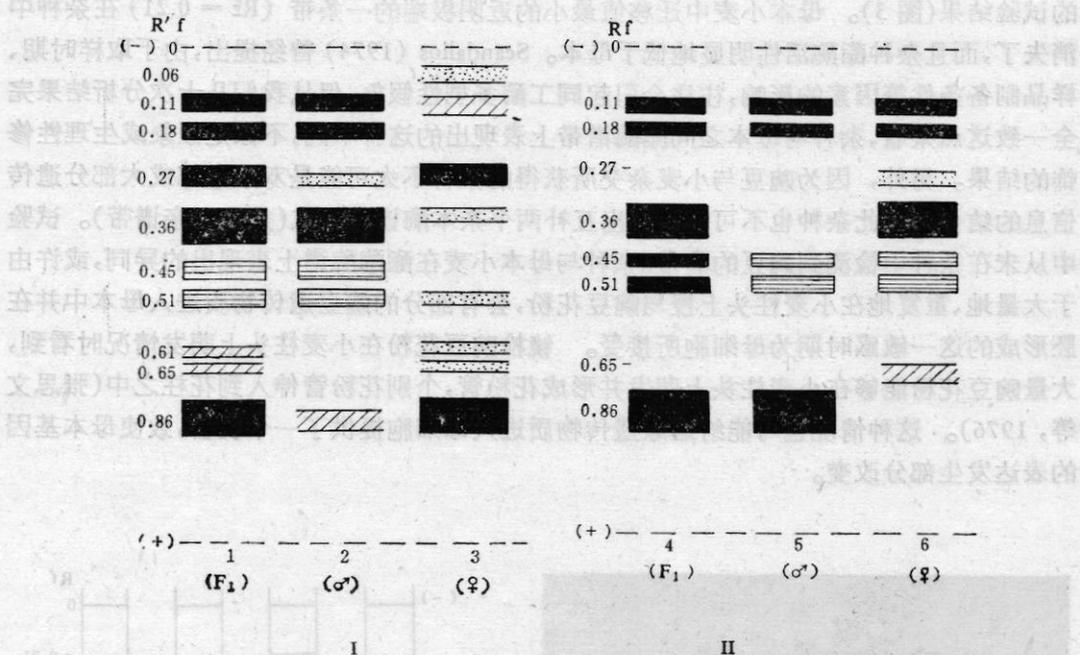


图 2 I 扁凸山羊草×波斯小麦杂种 F_1 及 II 波斯小麦×野生二粒杂种 F_1 及其亲本过氧化物酶同工酶谱。聚丙烯酰胺凝胶盘状电泳, 叶片。

Fig. 2 Zymogram patterns of peroxidase isozymes of *Aegilops ventricosa* × *T. turgidum* var. *carthlicum* hybrids F_1 and II *T. turgidum* var. *carthlicum* × *T. turgidum* var. *dicoccoides* hybrid F_1 and their parents. By polyacrylamide gel round tray electrophoresis. Material: leaves of seedling

1. [扁凸山羊草×波斯小麦] F_1 ;
Aegilops ventricosa × *T. turgidum* var. *carthlicum* hybrid F_1
2. 波斯小麦(σ°)
T. turgidum var. *carthlicum* (σ°);
3. 扁凸山羊草(ρ)
Aegilops ventricosa (ρ);
4. [波斯小麦×野生二粒] F_1 ;
T. turgidum var. *carthlicum* × *T. turgidum*; var. *dicoccoides* hybrid F_1
5. 野生二粒小麦(σ°)
T. turgidum var. *dicoccoides* (σ°);
6. 波斯小麦(ρ)
T. turgidum var. *carthlicum* (ρ).

未见新的杂种酶带产生。

(3) 豌豆遗传物质与小麦杂交杂种后代的酯酶及过氧化物酶同工酶。豌豆与小麦属于两个不同的科，亲缘关系甚远，几乎不可能通过精、卵结合获得杂种。张思文等同志于1971年以引进的普通春小麦 $NP_{78}Ino_{27}C_{253}$ 为母本，早熟豌豆 1341 为父本，经过多次重复授粉获得几粒种子，后又经多次回交、选育成为 72120 小麦品种。作者对 1971 年获得的杂种的不同株系 B_2F_7 , B_2F_8 , F_{10} , F_{11} , 等十几个材料以及用豌豆提取 DNA 注射母本小麦子房所得到的杂种 79158-5 株系进行了多次的、不同生育期叶片的酯酶、过氧化物酶和淀粉酶的同工酶分析。结果发现杂种的过氧化物酶和淀粉酶的同工酶酶谱组成及酶活性基本与母本小麦相似；但酯酶同工酶却表现出杂种与母本小麦酶谱之间的差异。试验重复近 30 次，材料分别取自小麦的胚芽鞘、1—3 叶期叶片及孕穗期剑叶，大体上保持一致的试验结果(图 3)。母本小麦中迁移值最小的近阴极端的一条带 ($Rf = 0.21$) 在杂种中消失了，而且杂种酯酶活性明显地低于母本。Scandalios (1974) 曾经提出，由于取样时期、样品制备条件等因素的影响，往往会引起同工酶多型性假象。但从我们几十次分析结果完全一致这点来看，杂种与母本之间酯酶谱带上表现出的这种不同，不像是假象或生理性修饰的结果。另外，因为豌豆与小麦杂交所获得的杂种不太可能是双亲全部或大部分遗传信息的结合，因此杂种也不可能表现出互补两个亲本酶谱的模式(兼有双亲谱带)。试验中从未在杂种中检测到豌豆的酶带。杂种与母本小麦在酯酶酶谱上表现出的异同，或许由于大量地、重复地在小麦柱头上授与豌豆花粉，会有部分的豌豆遗传物质进入母本中并在胚形成的这一敏感时期为母细胞所接受。镜检豌豆花粉在小麦柱头上萌发情况时看到，大量豌豆花粉能够在小麦柱头上萌发并形成花粉管，个别花粉管伸入到花柱之中(张思文等, 1976)。这种情况也可能给远缘遗传物质进入母细胞提供了一个机会，致使母本基因的表达发生部分改变。

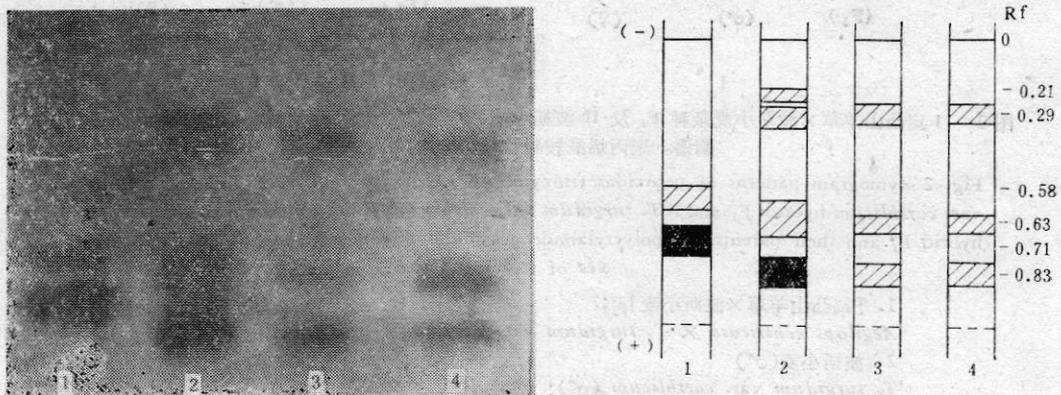


图 3 普通小麦 $NP_{78}Ino_{27}C_{253}$ × 豌豆 1341 杂种和亲本聚丙烯酰胺薄层电泳酯酶同工酶酶谱

Fig. 3 Zymogram patterns of isoesterase of *T. aestivum* $NP_{78}Ino_{27}C_{253}$ × *Pisum sativum* 1341 hybrids and its parents. By polyacrylamide gel thin layer electrophoresis. Material: leaves of seedling

1. 豌豆 1341 *Pisum sativum* 1341(♂)
2. 小麦 $NP_{78}Ino_{27}C_{253}$ (♀) *T. aestivum* $NP_{78}Ino_{27}C_{253}$ (♀)
3. 豌豆麦 72120 *T. aestivum* $NP_{78}Ino_{27}C_{253}$ × *Pisum sativum* hybrid 72120
4. B_2F_8 株系 *T. aestivum* $NP_{78}Ino_{27}C_{253}$ × *Pisum sativum* hybrid B_2F_8

为了进一步了解豌豆的遗传物质对小麦的影响,张思文等同志将从豌豆中提取的DNA(北京遗传所提供)注入到小麦 $NP_{78}InO_{27}C_{253}$ 子房中去,比较子代的变异情况。我们对其中6个株系进行了酯酶同工酶分析。发现其中的79158-5株系的幼苗叶片酯酶酶谱与[小麦 $NP_{78}InO_{27}C_{253} \times$ 豌豆1341] F_1 的酶谱相似,但酶活性及酶谱组成却完全不同于母本。用该株系多次重复试验结果都一致。因不同株系之间重复性不甚一致,因此仅一个株系还不足以证明豌豆DNA对小麦的影响,有待进一步试验,但也不能完全排除其影响的可能性。

从分子遗传学的观点看,远缘杂交有以远缘精、卵携带的全部遗传信息的结合,如小偃麦;有远缘物种间部分遗传信息的结合,如高粱稻。本文叙述的种、属之间的杂种从外部形态和同工酶分析结果来看似乎属于前者;而小麦与豌豆之间仅是部分遗传物质的杂交。至于小麦与豌豆杂交后如何得到种子?豌豆的远缘遗传物质又究竟怎样进入母细胞?诸如此类的一系列问题均有待于进一步进行严格、仔细地观察试验。

参 考 文 献

- 周光宇、龚秦秦、王自芬,1979,远缘杂交的分子基础,遗传学报 6(4): 405—413。
莽克强、徐乃正、方荣祥,1975,聚丙烯酰胺凝胶电泳,科学出版社。
张树政、王扬声,1973,聚丙烯酰胺凝胶盘状电泳化学通报(1) 30。
张思文、孙立南、李志翔,1976,春小麦与豌豆远缘杂交初报,遗传学报 3(4): 299—302。
Nokagahar, M., T. Akihama and Ken-icgi Hayashi, 1975, Genetic variation and geographic ciine of esterase isozymes in nature rice varieties, *Japan. J. genetics* 50: 373—382。
Scandlios, J. G., 1974, Isozymes in development and differentiation. *Ann. Rev. Pl. Physiol.* 25: 225—258.

AN ANALYSIS OF SEVERAL DISTANT HYBRIDS OF WHEAT ISOZYMES

Ben Guiying Han Fa

(Northwest Plateau Institute of Biology, Academia Sinica)

Using polyacrylamide gel electrophoresis we analysed the zymogram patterns of peroxidase esterase and amylase of four distant hybrids of wheat. The results showed that (1) isoesterase zymogram patterns of *T. turgidum* var. *durm* × *Roegneria komarovii* hybrid F_1 displayed complementary zymogram patterns of their two parents, but the band $Rf=0.30$ of the female parent disappeared in the hybrid F_1 . *Aegiops ventricose* × *T. turgidum* var. *carthlicum* and *T. turgidum* var. *carthlicum* × *T. turgidum* var. *dicoccoides* hybrids F_1 showed the same characteristics as mentioned above (the bands of hybrids come from two parents). (2) Isoesterase zymogram patterns of the hybrids B_2F_7 , B_2F_8 , F_{10} , F_{11} , 72120, etc. of *T. aestivum* $NP_{78}Ino_{27}C_{253}$ × *Pisum sativum* 1341 (partial genetic material) were approximately similar to the zymogram patterns ($Rf=0.29, 0.63, 0.83$) of the female parent wheat, but the esterase activity was lower than that of female parent, and the band $Rf=0.20$ had been lost in the hybrids. The enzyme bands of *Pisum sativum* had never been observed in the zymogram of the hybrids.