

抗大麦黄矮病(BYDV)种质 ——无芒中4的同工酶电泳图谱研究*

陈孝¹ P.J.Larkin² R.I.S.Brettell² P.M.Banks²
周广和³ 辛志勇¹ 成卓敏³

1. (中国农业科学院作物育种栽培研究所, 北京 100081)
2. (澳大利亚联邦科工组织植物工业部)
3. (中国农业科学院植物保护研究所, 北京 100094)

提要 抗大麦黄矮病的小麦——中间偃麦草部分双二倍体无芒中4 ($2n=56$, 染色体组A、B、D、E) 胚乳的乙醇脱氢酶(ADH)、 β -淀粉酶(β -amy), 酯酶(EST)和叶片过氧化物酶(Per)电泳图谱表明: 无芒中4的ADH酶谱中除具有双亲的酶带外, 还有一条由普通小麦4B、4D和中间偃麦草4E染色体上结构基因共同编码产生的杂种带ADH-4。在酯酶电泳图谱的EST1活性区, 无芒中4缺少普通小麦部分同源染色体组3上的结构基因控制产生的酶带EST1-5、6; 具有中间偃麦草3E染色体上结构基因编码产生的酶带EST1-7。在EST2活性区, 它还有由中间偃麦草6E染色体上结构基因控制产生的3条酶带。无芒中4有2条色深且宽的 β -amy酶带, 有3条等电点 $pH=4.32, 5.35$ 和 6.12 的Per酶带, 它们都源于中间偃麦草。无芒中4的这些特异带在无芒中4/普通小麦 F_1 代, 除EST1-5、6、7外, 都呈显性效应, 可作为鉴别真假杂种的生化标志。

关键词 无芒中4; 中间偃麦草; 乙醇脱氢酶; β -淀粉酶; 酯酶; 过氧化物酶; 等电点聚焦电泳

无芒中4是经中国、澳大利亚、墨西哥、美国和加拿大等国科学家测试确认的抗大麦黄矮病毒(BYDV)的抗病亲本。它是由中国黑龙江省农业科学院用普通小麦与中间偃麦草(*Thinopyrum intermedium*或*Agropyron intermedium*)杂交选育后, 经甘肃农业科学院植物保护研究所系选而得。其系谱是(克强 \times 南大2419) F_5 /中间偃麦草, 染色体数 $2n=56$ 。据钟冠昌^[2]研究, 其染色体组为ABDE。

大麦黄矮病BYDV是一种由蚜虫传播, 危害大麦、小麦、小黑麦、黑麦和燕麦的严重病害。迄今在普通小麦中还未找到免疫源, 仅发现了抗病品种CI13232, Anza及中国农家种北京白、红芒黑和白秃麦等。在大麦中已发现了抗性基因, 如CI3208含有Yd2基因^[14], CI3906含有Yd3基因。小麦近缘属中的偃麦草属(*Thinopyrum*或*Agropyron*)和赖草属(*Elymus*)的某些种都带有抗性基因。中国和法国的学者已把中间偃麦草具抗病(BYDV)基因的染色体导入普通小麦, 分别育成了部分双二倍体($2n=56$)无芒中4、TAF46和异源二体附加系L1($2n=44$)。墨西哥玉米、小麦改良中心也选育了抗病的双

本文于1990年2月6日收到。

* 此项目属中国和澳大利亚合作研究(ACIAR 8813)——抗BYDV小麦种质的生物技术。由澳方资助。

二倍体 ($2n=70$) *T. turgidum*/*A. pylcherrimum*和 *T. turgidum*/*A. acutum*.

无芒中4对中国流行的BYDV的GPV株系具有极好的抗性,是中国选育抗BYDV小麦品种的主要抗源。我们已通过有性杂交、回交、幼胚和幼穗培养的方法,获得了 $2n=42$ 、抗BYDV的株系。

在小麦品种改良中,随着从小麦近缘植物中转移有益性状研究的增加,必须采用细胞学、形态学、生物化学或分子生物学等方法来检测外源染色体或染色体片断的存在,以证实杂种的真伪。其中采用生化标记如同工酶和贮藏蛋白的电泳图谱的分析是鉴别特殊染色体或片断存在的一种较简便、快速、廉价的方法。至今,在普通小麦中,已知至少有57个同工酶结构基因,它们分别定位在小麦21对染色体中的18对上。部分同源的外源染色体可通过相应的同工酶带而得到鉴别。如果一个来自外源染色体的期望性状与外源同工酶结构基因相连锁,那么,通过小麦与该外源植物杂种同工酶电泳图谱的检测,可准确地筛选出具期望性状的杂种后代。Hart^[9, 10]利用同工酶标记进行小麦遗传研究和外源遗传材料的测定。Figueiras^[6]和Hsam^[11]报道了普通小麦与中间偃麦草部分同源染色体组间的生化标记。

本文将对无芒中4及其与普通小麦杂种 F_1 的乙醇脱氢酶(ADH)、酯酶(EST)、过氧化物酶(Per)和 β -淀粉酶(β -amy)电泳图谱进行分析研究,以便在利用无芒中4配制杂交组合时,快速、简便地检测杂种后代。

材 料 和 方 法

供试材料包括无芒中4及其亲本克强、南大2419、中间偃麦草,还有普通小麦品种Millewa、Sunstar、中7606、中7902、丰抗13、宛7107等及它们与无芒中4的杂种一代、二代和回交一代,以中国春小麦为对照。

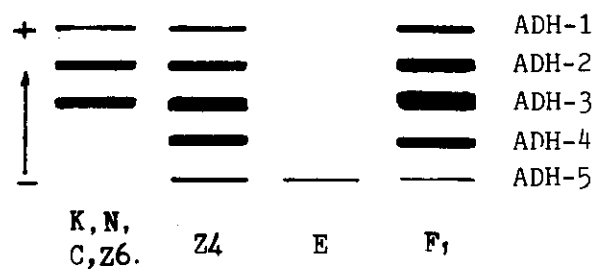
种子的一半(胚乳部分)用来测定乙醇脱氢酶、酯酶、 β -淀粉酶。过氧化物酶取材于分蘖期的新生叶片。

乙醇脱氢酶在醋酸纤维素纸上测定,其它酶类的检测采用薄层聚丙烯酰胺凝胶等电点聚焦电泳(PAGEF)的方法。乙醇脱氢酶、酯酶、过氧化物酶的测定程序如陈孝等^[1]所述。 β -淀粉酶的提取液是100mM $CaCl_2$ +1M巯基乙醇+100mM叠氮化钠,染色剂为碘-碘化钾溶液。

结 果

一、乙醇脱氢酶(Alcohol dehydrogenase, ADH)

无芒中4的ADH同工酶谱表型(图一)为5条带:ADH-1, ADH-2, ADH-3, ADH-4和ADH-5。它们的电泳迁移率由负极向正极依次减小,相对染色强度为1:4:6:4:1。ADH-1、ADH-2、ADH-3的迁移率与其普通小麦亲本克强、南大2419完全相同,ADH-5的迁移率与中间偃麦草相同,ADH-4为无芒中4所特有,其位于ADH-3和ADH-5之间。此特异带在无芒中4与普通小麦品种Millewa、Sunstar、中7606、宛7107和丰抗13的杂种 F_1 中均能显现,可作为鉴别真伪杂种的生化标记。



图一 籽粒乙醇脱氢酶谱带图式

克强(K), 南大2419(N), 中国春(C), 中7606 (Z6), 无芒中4 (Z4), 中间偃麦草(E), 无芒中4 / 中7606 杂种F₁

Fig. 1 Diagrammatic representation of grain ADH zymograms

Keqiang(K), Nanda2419(N), Chinese spring(C), Zhong 7606 (Z6), Awnless Zhong4 (Z4), *Thinopyrum intermedium* (E), Z4/Z6 F₁

二、酯酶(Esterase)

参试材料的酯酶同工酶等电点聚焦电泳图谱(图版)有两个活性区:近负极的EST1区, 等电点(PI)在pH6.2-7.2之间; 近正极的EST2区, 等电点在pH5.8-4.7之间。

无芒中4胚乳的酯酶同工酶带的数目和活性强度因灌浆时间的长短而异。在EST1区, 无芒中4至少有9个酯酶同工酶带(图版, a)。授粉后10天, EST1区不显带; 授粉后15天, 显现等电点较低的同工酶带7、8、9、10; 授粉后20天, 可见等电点较高的同工酶带1、2、3和4; 授粉后35-40天, 9个同工酶带全部显现。酶带的颜色也随着灌浆期的延长而加深, 有剂量效应。样品中胚的有无, 对同工酶带数的多少和颜色的深浅无明显影响。为此, 可根据EST1区酶带的多少和颜色的深浅来鉴别无芒中4种子的成熟度。在EST2区授粉后15天显现的同工酶带数与成熟种子一样多, 仅在着色强度上较弱。

在EST1区, 无芒中4比其普通小麦亲本克强、南大2419及普通小麦品种中国春、中7902等少第5、6同工酶带, 多第7同工酶带(图版, c), 它与普通小麦杂种F₁的表现型为普通小麦亲本型(图版, d, e), 无芒中4的表现型为隐性。F₂代的表现型分离比例符合理论值3:1。用普通小麦回交后的BC₁不表达中4的表现型(表1)。由此, 可

表1 无芒中4酯酶同工酶特异带在普通小麦/无芒中4 F₁, F₂和BC₁世代中的表现频率
Table 1 Esterase isozyme bands of common wheat/awnless Zhong 4 F₁, F₂ and BC₁ progeny showing segregation of special bands from awnless Zhong 4

活性区 Active zone	组合 Crosses	F ₁ (%)	F ₂ (%)	BC ₁ (%)
EST1区	无芒中4/Sunstar	0	13/53=24.5	0
	中7902/无芒中4	0		0
EST2区	无芒中4/Sunstar	100	24/56=42.9	3/27=11.1
	中7902/无芒中4	100		11/45=24.5

认为第5、6条带的缺失和第7条带的显现是由同一个酯酶结构基因控制的, 它位于中间偃麦草的染色体上。

在EST2区, 无芒中4比其普通小麦亲本明显多3条同工酶带, 它们在杂种F₁都能

同工酶带, 是由 4 个亚单位 α 、 β 、 δ 和 γ 随机的所有可能的二聚体组成(表 2)。无芒中 4 特有的杂种带 ADH-4 是由 $\beta\gamma$ 和 $\delta\gamma$ 二聚体形成的。 $\alpha\gamma$ 二聚体同 ADH-3 有相同的迁移率, 所以, 无芒中 4 的 5 条 ADH 同工酶带的亚单位组成分别为: ADH-1 ($\alpha\alpha$), ADH-2 ($\alpha\beta$, $\alpha\delta$), ADH-3 ($\beta\beta$, $\delta\delta$, $\beta\delta$, $\alpha\gamma$), ADH-4 ($\beta\gamma$, $\delta\gamma$) 和 ADH-5 ($\gamma\gamma$)。假若这 4 个亚单位是等量形成二聚体分子, α 、 β 、 δ 和 γ 的频率都等于 1/4。由此推导出同工酶带间相对染色强度的比值是: 普通小麦的 ADH-1 : ADH-2 : ADH-3 = 1 : 4 : 4, 无芒中 4 的 ADH-1 : ADH-2 : ADH-3 : ADH-4 : ADH-5 = 1 : 4 : 6 : 4 : 1。无芒中 4 / 普通小麦 F₁ 的 5 条 ADH 同工酶带的迁移率虽与无芒中 4 相同, 但染色强度的相对比值为 4 : 16 : 20 : 8 : 1, 这是由于 F₁ 中仅含有一条 4 E 染色体。由于 ADH-5 染色强度很弱, 在 F₁ 电泳图谱中, 肉眼常见到的是 4 条酶带。

表 2 无芒中 4 及其双亲、无芒中 4 / 普通小麦 F₁ 的 ADH 同工酶亚单位组成模式

Table 2 Schematic models for the subunit composition of the isozymes produced by octoploid awnless Zhong 4 his parents and F₁ hybrid crosses with common wheat

同工酶 Isozymes	克强、南大2419 中国春、中7606 Keqiang, Nanda2419, Chinese spring, Zhong7606 (2n=42)	中间偃麦草 <i>Th. intermedium</i> (2n=42)	无芒中 4 Awnless Zhong4 (2n=56)	无芒中 4 / 中7606 Awnless Zhong4 / Zhong7606 (2n=49)
ADH-1	1/9 $\alpha\alpha$		1/16 $\alpha\alpha$	4/49 $\alpha\alpha$
ADH-2	4/9 $\alpha\beta$, $\alpha\delta$		4/16 $\alpha\beta$, $\alpha\delta$	16/49 $\alpha\beta$, $\alpha\delta$
ADH-3	4/9 $\beta\beta$, $\beta\delta$, $\delta\delta$		6/16 $\beta\beta$, $\beta\delta$, $\delta\delta$, $\alpha\gamma$	20/49 $\beta\beta$, $\beta\delta$, $\delta\delta$, $\alpha\gamma$
ADH-4			4/16 $\beta\gamma$, $\delta\gamma$	8/49 $\beta\gamma$, $\delta\gamma$
ADH-5		$\gamma\gamma$	1/16 $\gamma\gamma$	1/49 $\gamma\gamma$

(二) 小麦籽粒和叶片中酯酶在 EST1 和 EST2 活性区的酶带分别是由小麦染色体组 3 A、3 B、3 D 长臂和 6 A、6 B、6 D 长臂上的酯酶结构基因控制产生的 (Ainsworth^[3], May^[13])。根据小麦和它的近缘植物染色体组间部分同源的概念, 可以认为控制无芒中 4 酯酶特异带形成的结构基因位于 3 E 和 6 E 上。根据无芒中 4 / 普通小麦 F₂、BC₁ 代中酯酶同工酶谱带中, 无芒中 4 特异带的缺失或显现, 选择出含有或丢失了 3 E 或 6 E 染色体的植株。

(三) Jourdrier 等^[12] 报道, 控制小麦 β -淀粉酶同工酶形成的结构基因位于染色体 4 A β 和 4DL 上。1978 年 Cauderon 与其合作^[5], 以从普通小麦品种 Vilmorin 27 / *Th. intermedium* 杂交衍生的八倍体 TAF46 (2n=56, 染色体组 ABDX) 中分离获得 6 个二体附加系。在普通小麦 Vilmorin 27 的遗传背景下进行 β -淀粉酶的电泳分析结果说明, 二体附加系 L 4 中含有中间偃麦草染色体 4 X 与普通小麦第 4 染色体组是部分同源关系。那么, 无芒中 4 具有的来自中间偃麦草的两条 β -淀粉酶带, 也可认为是由 4 E 染色体组上的 β -淀粉酶结构基因控制形成的。TAF46 含有的 4 X 染色体组和无芒中 4 含有的 4 E 染色体组间的相关性, 尚需通过它们间杂交种 F₁ 花粉母细胞减数分裂时的染色体行为来进一步确定。

(四) May^[13] 以普通小麦品种中国春和它的四体-缺体, 双端体的叶片为材料, 在聚丙烯酰胺凝胶薄层等电聚焦电泳中, 测定了控制过氧化物酶形成的结构基因位于小麦

1 B和1 D染色体短臂上。它测试用的组织和程序与本研究相同。由此,无芒中4所具有的来自中间偃麦草的3条过氧化物酶带(等电点pH=4.32、5.35和6.12)是由1 E染色体上的过氧化物酶结构基因控制形成的。

把TAF46、无芒中4和由TAF46衍生的二体附加系L1(抗大麦黄矮病)的分蘖期叶片的过氧化物酶提取液在同一聚丙烯酰胺凝胶上进行等电点聚焦电泳,观察到TAF46和无芒中4都有一条来自于中间偃麦草的等电点pH=4.32的酶带,但是L1没有,说明此带不能作为L1所附加的中间偃麦草染色体的标记酶带。在田间用饲GPV毒素的蚜虫接种后一个月,TAF46和L1的叶片均表现轻微大麦黄矮病症状,而无芒中4仅在叶缘有波浪状缺刻。从EI ISA读数看,TAF46、L1均高于无芒中4。用饲PAV毒素的蚜虫接种后21天,进行ELISA测定,TAF46与L1读数相近,且稍高于中4。由此,可以推测TAF46和无芒中4可能携带有不同的抗BYDV基因。

(五) Figueiras等^[6]以Cauderon^[14]选育的V-*Th. intermedium*二体附加系L1、L2、L3、L4、L5、L7作同工酶分析,以测定普通小麦和中间偃麦草染色体组间的部分同源的生化标记,并把这些同工酶的结构基因定位在中间偃麦草X染色体组上(表3)。研究说明L1、L2、L3、L4、L5、L7所含有的中间偃麦草X染色体分别与普通小麦的染色体7、3、1、4、2和6是部分同源的,并提议把这些中间偃麦草染色体分别命名为7X(L1)、3X(L2)、1X(L3)、4X(L4)、2X(L5)和6X(L7)。上述结果,对研究无芒中4所含有的中间偃麦草染色体组E的同工酶生化标记有参考价值。

表3 六倍体小麦品种中国春和中间偃麦草同工酶结构基因的染色体位点

Table 3 Chromosomal location of the isozyme structural genes in hexaploid wheat cultivar Chinese spring (C.S) and *Thinopyrum intermedium*

同工酶 Isozyme	基因 Gene	中国春小麦(A,B,D) <i>T. aestivum</i>				供试组织* Tissue	参考文献 References	基因 Gene	中间偃麦草附加系(x) <i>Th. intermedium</i>		供试组织* Tissue	参考文献 References
		C.V.	CS						<i>Th. intermedium</i>			
葡萄糖异构酶 Glucose phosphate isomerase	GPI-1	1Ap	1Bp	1Dp	a	(10)	GPI-X1	L ₃ (1X)	e	(7)		
过氧化物酶 Peroxidase	Per1	2Ap	2Bp	2Dp	b	(5)	Per-X1 Per	L ₅ (2X) L ₁ (7X)	e d	(7) (6)		
谷氨酸草酰乙酸转氨酶 Glutamic oxalocetic transaminase	GOT-3	3Aq	3Bq	3Dq	c	(10)	GOT-X3	L ₂ (3X)	f	(7)		
β-淀粉酶 β-amylase	β-amy	4Aq	4Dq		d	(13)	β-amy	L ₄ (4X)	d	(6)		
乙醇脱氢酶 Alcohol dehydrogenase	Adh-1	4Ap	4Bp	4Dp	d	(8)	Adh-X1	L ₄ (4X)	g	(7)		
酯酶 Esterase	EST1-1 EST2-4	3Ap 6Aq	3Bp 6Bq	3Dp 6Dq	b,d	(10,4)	EST-X2	L ₇ (6X)	e	(7)		
酸性磷酸酶 Acid phosphatase	ACPH	4Aq	4Bq	4Dq	b	(10)	ACPH-X1	L ₁ (7X)	e	(7)		
肽链内切酶 Endopeptidase	EP-1	7Aq	7Bq	7Dq	c	(9)						

* 供试组织说明:

- 发芽48小时盾片
- 叶片
- 发芽7天黄化苗叶片
- 成熟种子
- 发芽12天叶片
- 发芽10天叶片
- 胚乳

* Tissues examined:

- Scutella of grains germinated 48 hours.
- Leaves of green plants.
- Leaves of etiolated 7-day-old seedlings.
- Mature grains.
- Leaves of 12-day-old plants.
- Leaves of 10-day-old plants.
- Endosperm.

参 考 文 献

- [1] 陈孝等: 硬粒小麦—簇毛麦双二倍体同工酶的研究, 作物学报, 1991, 17(2): 123-127
 [2] 钟冠昌: 作物学报, 1983, 9(1): 39-44
 [3] Ainsworth C.C., et al.: *Theor. Appl. Genet.*, 1984, 68: 219-226
 [4] Benito C., et al.: *Z. pflanzenzucht*, 1985, 94: 307-320
 [5] Cauderon Y., et al.: *Ann Amelior plant*, 1978, 28: 257-267
 [6] Figueiras A. M.: *Theor. Appl. Genet.*, 1986, 72: 826-832
 [7] Hart G. E.: *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, 1970, 66: 1136-1141
 [8] Hart G. E.: *Heredity*, 1977, 39: 263-277
 [9] Hart G. E.: *Amsterdam*, 1983a, 35-56
 [10] Hart G.E., et al.: *Genet. Res.* 1983b, 41: 181-202
 [11] Haam S. L. K., et al.: *Theor. Appl. Genet.*, 1982, 63: 213-217
 [12] Jourdrier P., et al.: *Comptes Rendus Ac. Sc. Paris* 1976, D282: 115-118
 [13] May C. E., et al.: *Proc. 4th Int. wheat genet symp. columbia*, 1973, 843-849
 [14] Rasmusson D. C., et al.: *Agron. J.*, 1959, 51: 661-664
 [15] Sharma H. C., et al.: *Phytopathologische Zeitschrift*, 1984, 110: 143-147

ISOZYMES ZYMOGRAM PHENOTYPES OF *TRITICUM AESTIVUM-THINOPYRUM INTERMEDIUM* OCTOPLOID-AWNLESS ZHONG 4 RESISTANT TO BARLEY YELLOW DWARF VIRUS (BYDV)

X. Chen¹ P.J.Larkin² R.I.S.Brettell² P.M.Banks² G.H.Zhou³
 Z.Y.Xin¹ Z.M.Zheng³

1. (CAAS, Institute of Crop Breeding and Cultivation, China Beijing 100081)

2.(CSIRO, Division of Plant Industry, Australia)

3. (CAAS, Institute of Plant Protection, China Beijing 100094)

ABSTRACT

The endosperm alcohol dehydrogenase (ADH), β -amylase, esterase (EST) and leaf peroxidase (Per) zymogram phenotypes of *Triticum aestivum-Thinopyrum intermedium* partial amphiploid-Awnless Zhong 4 ($2n=56$ genome ABDE) resistant to barley yellow dwarf virus were determined. It was found that Awnless Zhong 4 expressed ADH-4 isozyme, not expressed by its parents, which was jointly controlled by the structural genes located in common wheat chromosomes 4B, 4D and Th. intermedium chromosome 4E.

Esterase zymogram of Awnless Zhong 4 showed EST1-7 band which was controlled by a gene on the chromosome 3E of Th. intermedium but missed EST1-5 and 6 bands controlled by the genes on the homologous chromosomes group 3 from common wheat in the EST1 active zone. It showed three bands in the EST2 active block which was controlled by a gene on the Th. intermedium chromosome 3E.

Awnless Zhong 4 expressed two stronger staining bands in the β -amylase zymogram and three bands with isoelectric points (PI) pH=4.32, 5.35 and 6.12, respectively. These bands were controlled by genes on the Th. intermedium chromosomes.

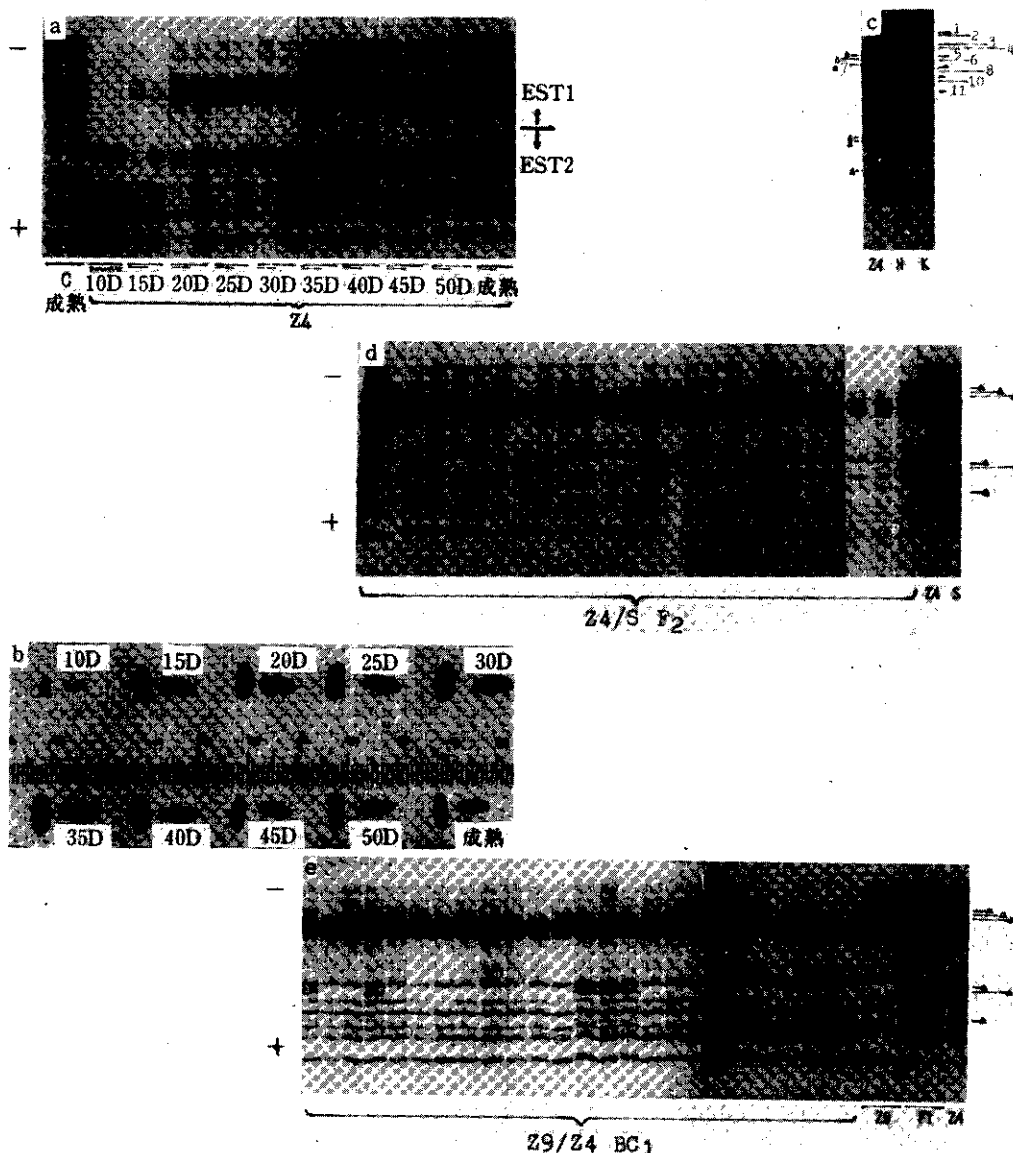
The bands were dominant in Awnless Zhong 4 / common wheat F₁ progeny, except those located in EST1 active zone. They can be used as biochemical markers for distinguishing true hybrids from the false ones.

Key words: Awnless Zhong 4; *Thinopyrum intermedium*; Alcohol dehydrogenase; β -amylase; Esterase; Peroxidase; Isoelectric focusing

陈 孝等: 抗大麦黄矮病(BYDV)种质—无芒中4 的同工酶电泳图谱研究
 Chen Xiao et al.: Isozymes Zymogram Phenotypes of *Triticum Aestivum-thinopyrum Intermedium* Octoploid-Awnless Zhong 4 Resistant to Barley Yellow Dwarf Virus (BYDV)

图版

Plate



无芒中4 (Z4), 克强(K), 南大2419(N), 中国春(C), 中7902(Z9), Sunstar及无芒中4/Sunstar, F₂和中7902/无芒中4 F₁, BC₁籽粒酯酶同工酶等电聚焦电泳图谱。“▲”示无芒中4特有的带,“△”示无芒中4缺失的带。a.无芒中4授粉后10、15、20、25、30、35、40、45、50天和成熟种子的酯酶同工酶电泳图谱。“≈”为整粒种子,“=”为带胚的半粒种子,“-”为不具胚的半粒种子。b.授粉后不同天数无芒中4籽粒的大小。c.无芒中4与其普通小麦亲本克强、南大2419,酯酶同工酶电泳图谱。d.无芒中4/Sunstar F₂及其双亲酯酶同工酶电泳图谱。e.中7902/无芒中4、F₁, BC₁及其双亲酯酶同工酶电泳图谱。
 Grain esterase zymogram of awnless Zhong 4 (Z4), Keqiang (K), Nanda 2419(N), Chinese spring (C), Zhong 7902 (Z9), Sunstar (S) and Z4/ S, F₂, Z9/Z4 F₁, BC₁ (PAGEF). Isozymes present in Z4 marked by ▲ and not present in Z4 marked by △. a. Esterase zymogram of Z4 kernels obtained from different days after pollination: 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 and maturity. “≈” showing individual kernel, “=” showing half kernel with embryo, “-” showing half kernel without embryo. b. Kernel size of Z4 from different days after pollination. c. Esterase zymogram of Z4, K and N. d. Esterase zymogram of a sample of Z4/S F₂ progeny and their parents. e. Esterase zymogram of a sample of Z9 /Z4 F₁, BC₁ progeny and their parents.