

# 具簇毛麦6VS的小麦抗白粉病近等基因系的培育与蛋白质组检测

段爽 王炼 甘富 刘晓颖 王振英 彭永康\*

(天津师范大学生命科学学院, 天津 300387)

**摘要** 利用具*Pm21*的小麦-簇毛麦染色体易位系6AL/6VS为抗病供体, 与对白粉病敏感的优良小麦栽培品种京411为轮回亲本杂交、 $F_1$ 个体回交7次, 培育了近等基因系(near-isogenic line, NIL)。利用蛋白质组技术, 检测了NIL的选择效率, 叶子蛋白质组分析发现, NIL中有43.8%的蛋白质组斑点变化倾向于抗病供体亲本6AL/6VS, 56.2%的蛋白质组斑点变化倾向于轮回亲本京411。胚根中有41.7%的蛋白质组斑点变化倾向于抗病亲本6AL/6VS, 58.3%的蛋白质组斑点变化倾向于轮回亲本京411。通过MS/MS分析, 在NIL中有23个蛋白质斑点产生表达变化, 它们是: ATP synthase beta subunit、glycosyltransferase family 2 protein、Rab7/RabG-family small GTPase、COP1-interacting protein 7、cryptochrome 1a、ribosomal protein L16、transcription initiation factor TFIID subunit、23.5 kDa heat-shock protein、POR、RIC1、NBS-LRR resistance protein、transcription factor、serine/threonine-protein kinase haspin、F-actin capping protein beta subunit、mitochondrial protein translocase family、maturase K、NADH dehydrogenase subunit F、chloroplast Tha 4-2、mitochondrial translational initiation factor、ATP binding protein、SNF-1 related kinase、heat shock protein 70 和lipase family protein。这些蛋白质斑点的功能涉及能量代谢、糖代谢、信号传导、光合反应、DNA和蛋白质合成以及环境胁迫。蛋白质组检测所得结果能反映出NIL的培育与选择效果。

**关键词** 近等基因系; 6AL/6VS; 蛋白质组; MALDI-TOF-MS; 小麦白粉病

由于白粉病在我国南北麦区的日益加重和小麦本身存在的抗原单一所导致的遗传脆弱性, 因此, 异原物质的导入, 特别是带有抗白粉病目的基因染色体或染色体片段的导入, 对提高小麦的抗白粉病有十分重要的作用。6AL/6VS是我国学者刘大钧、陈佩度将簇毛麦6V染色体导入栽培小麦, 育成6V代换系, 从6V代换系与农艺亲本的杂交和辐射后代中选育出的小麦-簇毛麦染色体易位系<sup>[1]</sup>。研究证明, 在6VS上存在着一个抗性最强、抗谱最广的*Pm21*基因<sup>[2-6]</sup>。因此, 对携带*Pm21*基因资源的6VS的利用, 对我国小麦抗白粉病育种意义重大。

近等基因系(near-isogenic line, NIL)是指遗传背景相近, 目标基因不同的一对品系。由于它可以用于基因多效性分析、目标基因分离、基因精细定位、克隆等研究, 因此, 是遗传学和育种研究的珍贵材料。在小麦中, 已有多种具有目标基因的NILs被选择成功, 并应用于相关的领域中<sup>[7-15]</sup>。

本研究中, 我们利用具有*Pm21*的6AL/6VS为抗

病供体, 以对白粉病敏感的小麦优良品种京411为轮回亲本, 通过杂交、回交和白粉菌胁迫下的个体选择, 配制了抗白粉病NIL 6AL/6VS×京411<sup>7</sup>, 并对6AL/6VS中*Pm21*的抗、感遗传特性进行了分析, 同时利用蛋白质组技术, 对NIL的选择效率进行了检测, 以期使NIL在小麦抗病育种方面发挥积极作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

小麦(*T. aestivum*)-簇毛麦(*H. villosa*)染色体易位系(6AL/6VS)、栽培小麦(*T. aestivum*)京411, 白粉菌15号优势小种(powdery mildew No.15 isolate)。上述材料分别由中国农业大学、南京农业大学和中国

收稿日期: 2011-08-23 接受日期: 2012-04-05

国家自然科学基金(No.31071671)和天津市重点项目(No.11ZCK FNC00700)资助项目

\*通讯作者。Tel: 022-2376569, E-mail: pykcell@yahoo.com.cn

农业科学院植物保护研究所惠赠。

## 1.2 *Pm21*抗、感白粉病遗传特性鉴定与NIL的培育

1.2.1 *Pm21*抗白粉病遗传特性鉴定 分别以6AL/6VS为♀、♂亲本, 与京411配制杂交组合2对, 对F<sub>1</sub>群体和F<sub>2</sub>分离个体用华北地区流行的白粉菌15号生理小种进行苗期人工接种, 以鉴别*Pm21*的抗性遗传特性。

1.2.2 NIL的配制和白粉病抗性鉴定 以京411为母本与6AL/6VS杂交, 获F<sub>1</sub>, 再以京411为父本, 连续回交7代, 自交1代后, 配制成NIL 6AL/6VS×京411<sup>7</sup>。每一杂交、回交世代用白粉菌人工感染, 鉴别NIL对白粉菌的抗性, 具体做法如下: 在温室和田间条件下, 当小麦第1片叶完全展开后进行人工接种, 15 d后进行抗性鉴定。幼苗对白粉病的反应根据Liu<sup>[16]</sup>和Wolfe<sup>[17]</sup>的方法制定, 反应等级为O、O<sub>1</sub>、1/2和3/4共4个等级, 其中O表示免疫, O<sub>1</sub>表示过敏性坏死反应, 1/2表示抗病, 3/4为感病。

## 1.3 NIL选择效率的蛋白质组检测

1.3.1 蛋白质制备 按照Yan等<sup>[18]</sup>的方法制备蛋白质, 以液氮研磨叶片、胚根组织, 将匀浆悬浮于含0.07%(W/V)二硫苏糖醇(DTT)的10%冷丙酮中, -20℃下温育1 h, 然后在3 500×g下离心5 min, 碎片重悬在含有0.07%(W/V) DTT的丙酮中, 在-20℃下温育1 h后, 1 500×g下离心30 min, 这一步骤重复3次。将样品冻干, 然后溶解于样品缓冲液[8 mol/L尿素, 35 mmol/L Tris, 4%(W/V) 3-[(3-胆酰胺丙基)-二乙胺]-丙磺酸(CHAPS), 1% pH5~7两性离子, 0.4% pH3~10两性离子, 1%(W/V) DTT], 参考Bradford<sup>[19]</sup>的方法测定蛋白质含量, 并以BSA作为标准。

1.3.2 双向凝胶电泳分析 参阅Castro等<sup>[20]</sup>的方法进行蛋白质的双向凝胶电泳(2-dimensional gel electrophoresis, 2-DE)分析。利用pH3~10的固相化pH梯度(immobilized pH gradient, IPG)胶条, 长度为13 cm, 根据Bio-Rad产品说明书操作。取每个待分析样品各60 μg, 用样品缓冲液稀释至300 μL, 将干胶条在含待测样品的缓冲液中水化10 h(300 V), 使待测蛋白质样品吸入胶条中。

第一向等电聚焦程序如下, 分别在300 V和1 000 V下1 h, 然后将电压调至8 000 V下2 h。电泳结束后, 胶条在平衡液[60 mmol/L Tris-HCl, pH6.8, 1% DTT, 1%甘氨酸, 2%十二烷基硫酸钠(SDS)]中平衡20 min。电泳的第二向参考Laemmli<sup>[21]</sup>介绍的浓度为12.5%

的SDS-PAGE。将经聚焦后的凝胶条放在垂直板状胶的上面, 用1%的内含0.15 mol/L Bis-Tris/0.1 mol/L HCl和0.2%(W/V) SDS的琼脂糖封胶, 并使其聚合。80 V下电泳5 h。为保证实验结果的准确性, 每次实验重复3次, 并保证取材、实验条件、染色等的一致性, 最后取蛋白质斑点清晰、分散性好的胶作为实验结果, 记录分析。采用银染法<sup>[22]</sup>显色。对MS分析胶用GS-800考马斯亮蓝染色。用色谱扫描记录图像, 用PDQuest 2-DE分析软件(Bio-Rad)进行凝胶斑点检测、匹配和差异斑点鉴别, 并根据Sweetlove等<sup>[23]</sup>采用的差异蛋白斑点丰度高于或低于对照0.3倍作为差异显著标准, 确定对照和处理组之间有差异的蛋白质斑点, 进行质谱分析。

1.3.3 凝胶消化和MALDI-TOF MS分析 从制备胶上切下经鉴别有差异的蛋白质斑点, 用超纯水洗3次, 50 mmol/L NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>脱色2次, 100%乙腈干燥, 用0.1%三氟乙酸(TFA), 在50%乙腈溶液中, 37℃消化过夜, 将制备物混匀、冻干, 溶解在含有1%TFA和50%的5 mg/mL α-氰基-4-羟基肉桂酸(CHCA)中。利用ABI4700型(USA)正离子生物质谱仪进行MALDI-TOF MS分析。以胰蛋白酶自动降解片段为内部标准校正。通过MASCOT软件(<http://www.matrixscience.com/>), 在NCBIInr绿色植物数据库(Viridiplantae)进行查询。为了表明新鉴别的蛋白质的可靠性, 除个别功能未确定的推测蛋白质斑点外, 每个被鉴别的蛋白质序列覆盖率至少达15%, 得分在35以上, 肽质量数误差范围为±0.1 Da, 未水解酶切位点数为1。

## 2 结果

### 2.1 位于6VS中*Pm21*的抗病遗传特性和NIL对白粉菌的抗性反应

6VS中由于含有*Pm21*, 对15号生理小种呈免疫, 小麦优良品种京411对白粉菌高度敏感, 6AL/6VS与京411杂交F<sub>1</sub>表现为抗病, 而F<sub>1</sub>自交所得到的143个单株中, 106株为抗病, 37株为感病, 抗、感比例符合孟德尔3:1分离规律( $\chi^2 3:1=0.0294$ ,  $\chi^2 0.05=3.84$ ), 表明位于6VS中的*Pm21*为显性基因, 呈单基因遗传。NIL是连续7个世代与京411回交, 在白粉菌胁迫下选择得到的, 其外形与京411已十分接近, 但对白粉菌表现出很强的抗病性(图1), 证明NIL从形态和抗病性上兼具了双亲的特性。



a: 6AL/6VS; b: 近等基因系; c: 京411。

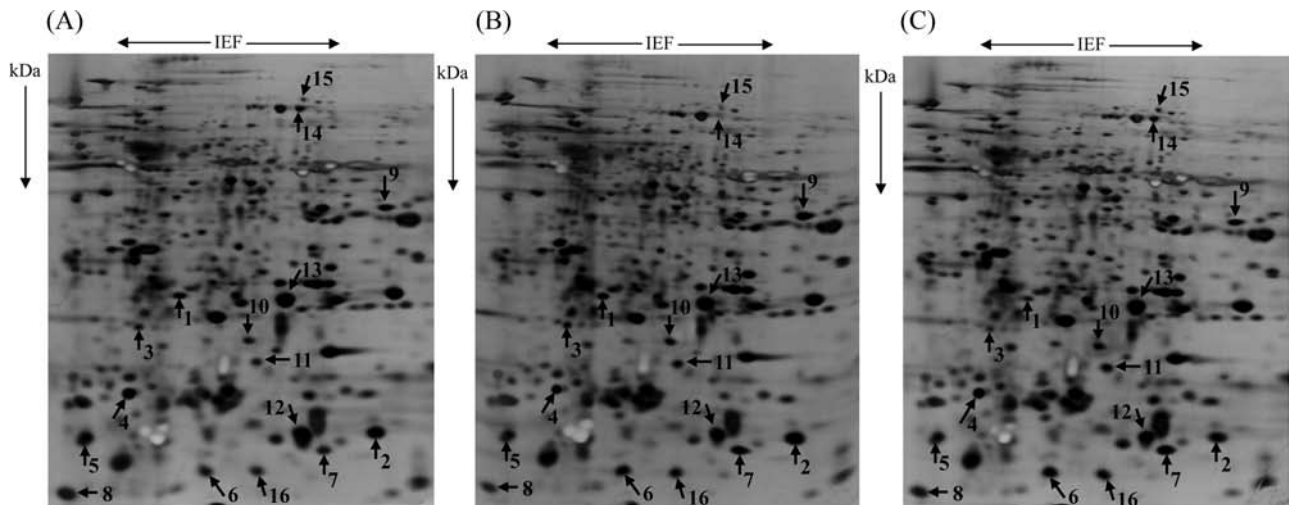
a: 6AL/6VS; b: near-isogenic lines(NIL); c: Jing 411.

图1 6AL/6VS、NIL和京411对白粉病的抗性反应

Fig.1 The response of 6AL/6VS, NIL and Jing 411 to powdery mildew

## 2.2 6AL/6VS、京411和NIL叶片、胚根蛋白质组比较

利用2-DE技术,对6AL/6VS、京411和NIL叶片和胚根的蛋白质组进行了分析。图2为6AL/6VS、京411和NIL 3天叶片蛋白质组谱型,其中,第一向水平轴表示的是等电聚焦,pH范围是4.5~8.6,第二向为表示分子量的SDS-PAGE垂直胶,多数斑点的分子量范围位于14 kDa~97 kDa,部分蛋白质斑点的分子量大于97 kDa。双亲(6AL/6VS、京411)叶片中有多于1 000个蛋白质斑点被检测到,胚根中约有800个左右的蛋白质斑点,为便于NIL与双亲的蛋白质组相似性进行比较,以便从蛋白质组角度分析NIL的选择效果,我们根据以往研究者们采用的蛋白质斑点含量超过或低于0.3倍为差异显著性标准。比较结果发现,叶片中和胚根中,双亲间(6AL/6VS、京411)相比较,高于90%的蛋白质斑点含量无明显差异,但分别约有60个左右(叶片)和55个左右(胚根)的蛋白质斑点上存在差异(图3)。而在NIL中,与双亲6AL/6VS、京411比较,则有多于50个以上的蛋白



A: 京411; B: 6AL/6VS; C: 近等基因系。

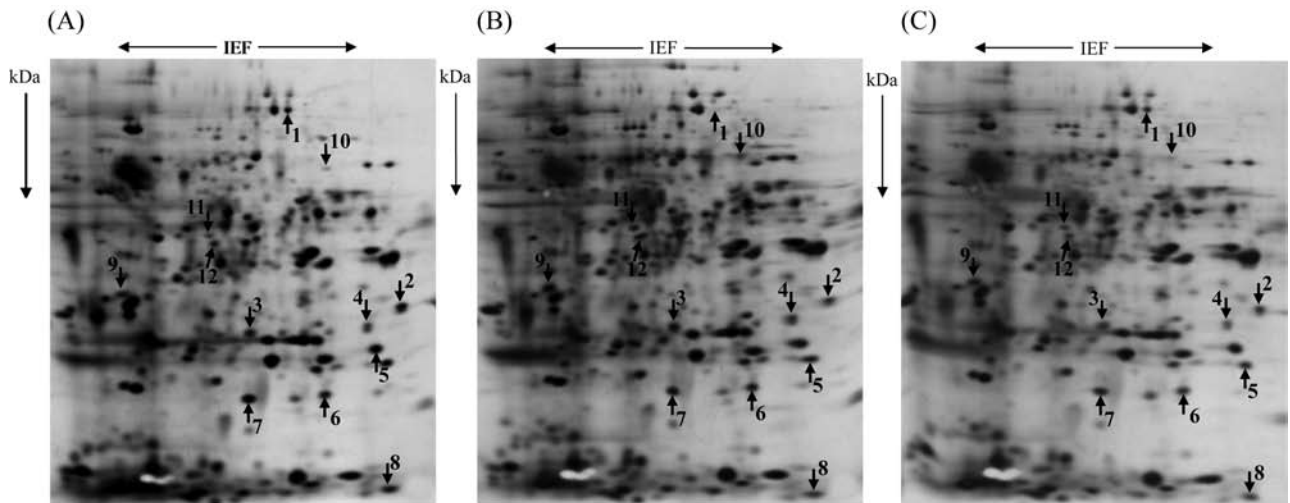
A: Jing 411; B: 6AL/6VS; C: near-isogenic lines(NIL).

图2 小麦6AL/6VS、轮回亲本京411和NIL叶片2-DE银染胶

Fig.2 Silver-stained two-dimensional electrophoresis profiles of leaves proteins from 6AL/6VS, recurrent parent type Jing 411 and NIL in *T. aestivum*

质斑点产生明显的上调或下调现象。其中叶片中23个,胚根中27个。在叶片的23个斑点中,11个斑点偏6AL/6VS,12个斑点偏京411。在胚根的27个斑点中,偏6AL/6VS的有12个,偏京411的15个。为便于

质谱分析,我们在NIL的叶片和胚根中与双亲蛋白质表达差异大于0.3倍的28个斑点(叶片16个、胚根12个)作了比较分析,发现在叶片的16个蛋白质斑点中,斑点1、2、3、9在6AL/6VS中含量丰富,而在京



A: 京411; B: 6AL/6VS; C: 近等基因系。

A: Jing 411; B: 6AL/6VS; C: near-isogenic line(NIL).

图3 小麦6AL/6VS、轮回亲本京411和NIL胚根2-DE银染胶

Fig.3 Silver-stained two-dimensional electrophoresis profiles of roots proteins from 6AL/6VS, recurrent parent type Jing 411 and NIL in *T. aestivum*

411中相对较少, NIL中则偏京411; 斑点4、8、13、14在6AL/6VS中含量少, 而在京411中含量丰富, NIL偏京411; 斑点5、12, 在6AL/6VS中含量少, 京411中含量多, NIL偏6AL/6VS; 斑点6、7、10、11、16偏6AL/6VS, 斑点15偏京411(图2)。

在胚根中, 斑点1在6AL/6VS中不存在, 但在京411和NIL中均存在, NIL偏京411; 斑点2、3、4、9、

11偏6AL/6VS; 斑点5、6、7、8、10、12偏京411(图3)。

在上述叶和胚根28个有含量变化的蛋白斑点中, 通过比较, 发现多数蛋白质斑点变化偏向于轮回亲本京411, 如在叶子中有56.2%的蛋白质斑点变化倾向于京411, 在胚根中有58.3%的蛋白质斑点变化倾向于京411(表1)。这也许是因为NIL是连续7次与京411杂交后得到的, 但这一现象需进一步研究。

表1 6AL/6VS、京411和NIL特异蛋白斑点表达特性

Table 1 Expression characterization of special protein spots in 6AL/6VS, Jing 411 and NIL

组织 Tissue	斑点号 Spot No.	特异蛋白质斑点表达特性 Expression characterization of special protein spots			倾向性 Tendency	
					6AL/6VS	Jing 411
		6AL/6VS	Jing 411	NIL		
Leaves	1、2、3、9	much	little	little		√
	4、8、13、14	little	much	much		√
	5、12	little	much	little	√	
	6、7、10、11、16	much	little	much	√	
	15	much	little	little		√
Roots	1	inexistence	existence	existence		√
	2、9	little	much	little	√	
	3、4、11	much	little	much	√	
	5、6、7、8	little	much	much		√
	10、12	much	little	little		√

### 2.3 特异斑点的质谱鉴定

选择了NIL的叶片和胚根中28个特异蛋白斑点, 进行了胰蛋白酶消化的MALDI-TOF MS分析, 其中

叶片中的斑点7、8和胚根中的2、4、8三个斑点未能鉴别。23个蛋白质斑点的归属得到鉴别。图4是叶片中斑点1的质谱结果图, 作为质谱分析例子。

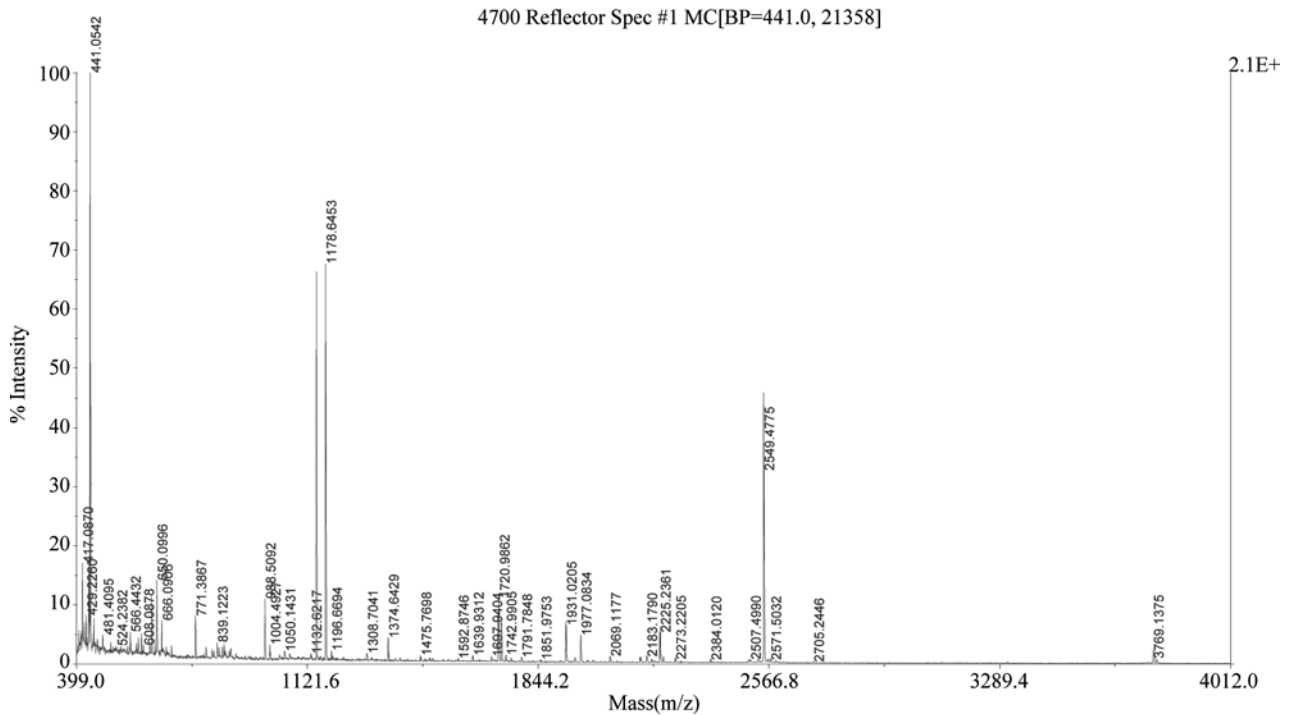


图4 NIL叶片中斑点1的质谱鉴别

Fig.4 Identification of spot 1 of NIL leaves

表2 蛋白质斑点的质谱鉴别

Table 2 Identification of protein spots by MS/MS

组织	蛋白 质点	序列号	分子量	等电点	蛋白质名称	蛋白质 得分	序列覆 盖率(%)	归属	
Tissue	Spot	Accession	Molecular weight	Isoelectric point	Protein name	Protein score	Sequence coverage(%)	Taxonomy	
Leaves	1	gi 2792202	55192	7.7	NBS-LRR resistance protein	52	33	<i>H. vulgare</i>	
	2	gi 3327870	26388	5.29	COP1-interacting protein 7	27	28	<i>A. thaliana</i>	
	3	gi 77963974	78444	5.35	Cryptochrome 1a	50	24	<i>H. vulgare</i>	
	4	gi 289599801	6456	11.93	Ribosomal protein L16	34	57	<i>H. dentata</i>	
	5	gi 255583916	23105	5.03	Transcription initiation factor TFIID subunit	31	27	<i>R. communis</i>	
	6	gi 168034819	24155	5.21	Rab7/RabG-family small GTPase	42	33	<i>P. patens subsp</i>	
	9	gi 25555104	68497	8.51	Transcription factor	43	13	<i>R. communis</i>	
	10	gi 226503992	67226	5.90	Serine/threonine-protein kinase Haspin	40	8	<i>Z. mays</i>	
	11	gi 195628050	27782	4.83	F-actin capping protein beta subunit	50	18	<i>Z. mays</i>	
	12	gi 255073599	14238	8.26	Mitochondrial protein translocase family	41	29	<i>M. sp. RCC299</i>	
	13	gi 71891344	31506	9.36	Maturase K	48	17	<i>H. barbata</i>	
	14	gi 45594108	41029	8.71	NADH dehydrogenase subunit F	45	10	<i>Q. indica</i>	
	15	gi 116000410	13483	11.74	Chloroplast Tha 4-2	46	72	<i>O. tauri</i>	
	16	gi 223527418	110058	6.86	Mitochondrial translational initiation factor	64	13	<i>R. communis</i>	
	Roots	1	gi 147225062	23557	4.89	23.5 kDa heat-shock protein	44	56	<i>T. monococcum</i>
		3	gi 10720233	43623	9.2	POR	50	60	<i>D. carota</i>
5		gi 226461913	33453	9.46	Glycosyltransferase family 2 protein	52	51	<i>M. pusilla</i>	
6		gi 30685713	24182	9.89	RIC1	45	65	<i>A. thaliana</i>	
7		gi 255582911	60003	6.01	ATP synthase beta subunit	42	54	<i>R. communis</i>	
9		gi 223539111	20984	8.63	ATP binding protein	40	19	<i>R. communis</i>	
10		gi 25990319	2900	9.69	SNF-1 related kinase	43	100	<i>H. vulgare</i>	
11		gi 163311872	7399	4.96	Heat shock protein 70	36	82	<i>C. annuum</i>	
12		gi 77548668	43111	6.99	Lipase family protein	46	24	<i>O. sativa</i>	

表3 特异蛋白的部分氨基酸序列

Table 3 The partial amino acid sequence of protein spots which were identified by MS/MS

组织 Tissue	序列 Sequence
叶 Leaf	
Spot 1: NBS-LRR resistance protein	
1	LE DVGIPSTDTN
101	SRSKLILTSR YQEVCFQMNA QRSLIKMQIL GNDASWELFL SK S CGGLPLALNV IGTAVAGLEE SEWK
201	
301	L PRISIMSNNI TELSFSPKCK TMSCLKVL DLSYTAITSL PECDTLVALE
401	HLNLSHITHIM R HLDLSVT VALEDTLNNC SKLHK
Spot 2: COP1-interacting protein 7	
1	DPRTK SVS DQISK
101	STALSKTKG ETDGDTVEEN SK VLE NRKAALCKEQ AMAYAR
201	MWVDQITAMQ AFPRP
Spot 3: Cryptochrome 1a	
1	TVV WFRR WWLSQ SLK RLGASR
101	CLCMVDPPAP MLPPKRINSG DLTR
201	KVF HQVRMKQLTW SNESNR SIG
301	LREYSR TGYPLVD AGMRELWATG WLHDR VVV SSFFVKVLQL PWR
401	ELDR IDNPQFEGYK FDPYGEYVRR
501	RADQMVPSI TSSLVR
601	EQVASDGTA AR LMNWNQL SQSS
Spot 4: Ribosomal protein L16	
1	ICFGRYA LQALEPAWIT SRQIEAGRRA MTRN
Spot 5: Transcription initiation factor TFIID subunit	
1	MTVFIKSRAM K FPS TADPK
101	YESFRR SALQKANMRR LLVSITGSQK IVMTE R RSV
201	PR
Spot 6: Rab7/RabG-family small GTPase	
1	MSARK KFSNQYKAT IGADFLTKEV QVEDR
101	VDVDGG NSRVVSEK GGI PYFETSAKED FNVDAAFQVI AKNALK
Spot 9: Transcription factor	
1	AS VNVALSEHSS R
101	
201	YCECFQ ANILCSENCK
301	S PLAGILQPQD VKK
401	MDMQPGGD DNR
501	DFLN RLITCGSIK
601	ALLPIGN GEVNPENK
Spot 10: Serine/threonine-protein kinase Haspin	
1	
101	GMGQNLIHD LPAILER
201	KL GEGTYGEAYR
301	VCQGPY DPFLISAWED YDAKR
Spot 11: F-actin capping protein beta subunit	
1	ESLKEYIL CEYNR
101	QSGTFNL SGSIRR
201	MIEEME GKLRLSLDQV YFGK
Spot 12: Mitochondrial protein translocase family	
1	EQTVFNRL DK VT VRVGTGMTGY GR QHVPVHVVD GAGR
Spot 13: Maturase K	
1	KSIYIFSQS NPR VFLE
101	RIYFYGK YQGKF ILSSK HSLDFLGY LSSVR
Spot 14: NADH dehydrogenase subunit F	
1	SQNM VLMGGLKK
101	NM IRPFITIPRF GPQK

续表3

组织	序列
Tissue	Sequence
201	HWNLLNLFV
301	KR
Spot 15: Chloroplast Tha 4-2	
1	ATATSTPA SLRSTTRRTH RERTVRSRT SAPRAVAHK DRVVVRGLFG LGLPEIVVIG GVAAVLFGPQ K
101	MGWGETDASR SVSCGGDIAR ER
Spot 16: Mitochondrial translational initiation factor	
1	
101	
201	LESQSSFPLR PVQPPLRPQ K
301	QPILVDKF ARK
401	MICK EHDVEVIDVA PVRFEEMAR
501	VL T PVDGKMPCV FLDTPGHEAF GAMRARGAR
601	
701	AEARAELL RNERITAKAG DGK
801	
901	AV FSSGSGRVAG CMVTDGKVVK TIHVGVLDS LR
胚根 Root	
Spot 1: 23.5kDa heat-shock protein	
1	MASAVDCKGE DSAPASLLK EVSR YDDDDYSAR
101	VWAKEDDD AVYLVKMPMG LTKHEVEVRA DKNILVIKGE GEKQPWDGDD DDSKVPRYNR RIEVPAADAY KMDKIKAEKM NGVLWVTLK
Spot 3: POR	
1	MALQAASFLP SSFSINKEGK TDFSSLRTRR GCRQISQTGA IRSQAVATTP SVN RATGEGK K GSVII TGASSGLGLA
101	TAKALAETGK WHVIMACRDF LK SA GMPKENYTIM HLDLASLDSV R
201	LLDDL NKS DYPSKR GLA GGLNGMNSSA MIDGAEFDGA KAYKDSKVCN MLTMQEFHR
301	EHIPLF RTLPPPFQKY ITKGYVSEAE SGKRLAQVVS EPSLTKSGVY WSWNK KVWEV SEKLVGLA
Spot 5: Glycosyltransferase family 2 protein	
1	MSSTRRSRPRV GDA A AAR RLDVDA FVAFARASTR EIRDRA PA GAVEILADRA
101	NVGKAEAVRR GLR L FRDVFETRPE IDIVFGARVG LLGRDISRSM TRHYMGR M
201	FK TRWVFDVEML ARFHALAVAD GSAPVRERVY EFPLLRWK ASDV VK DDDS
301	S
Spot 6: RIC1	
1	ATTMKGLLK EQEMQIG FPTDVK GQVVS R GNSNKYNPQG TNQRGAGLK
101	QKTRRKPGG AASP NHNGSP PRKSSGNAAS SDEPSKHSRH NRS AHGSTD S SNDQEPSVR GGIPAPDT EVPNQIPDGS APPR
201	KSSKG KPENSVD TTC NDII
Spot 7: ATP synthase beta subunit	
1	MASRRLLSSL LRSSTRRSVS K LSTPSPISTR TSEYATSAA AAAAPPSTSE GVKGSGGGK GAI GQVCQVIGAV
101	VDVRFDEGLP PILTALEVL D HSIR T IAMDGTEGLV R AT LGRIINVIGE PIDEKGLKT DHFLPIHREA
201	PSFVDQATEQ QILVTGIKVV DMLAPYQRGG K TVLIMELI NNVAKAHGGF SVFAGVGER EGN DLYREM IESGVIKLGD QAESKCALV
301	YGMNEPPGA R IPSA VGYQPTLATD LGGLQERITT TK
401	KIQK
501	ESV ASFQGVLDGK YDDLPEQSFY MGGIEEVIA KADK
Spot 9: ATP binding protein	
1	MAAPGKCLLV SGPPGVGKTT LIMR
101	EDTDLF IIDEVGK
Spot 10: SNF-1 related kinase	
1	MDRNNRGGGH SEVLKKNY NLG KTLGLGT
Spot 11: Heat shock protein 70	
1	QTTIEIDS LY EGIDFYSTIT RAR CMPEVE KCLRDAKMDK STVHDVVLVG GSTR
Spot 12: Lipase family protein	
1	T CYP SAAVARR GGGGGRCCSV VRSSLATSSP ATCKPSGMMR AAY ASFD FDGGAP
101	SSYGSCR VTGIL HAASTAPGW LSCR DVVI AFRGTATCGE WVDNFK

表2和表3分别是NIL叶片和胚根中鉴别的蛋白质种类和部分氨基酸序列。所鉴别的蛋白质为, 叶片中: 斑点1, NBS-LRR resistance protein; 斑点2, COPI-interacting protein 7; 斑点3, cryptochrome 1a; 斑点4, ribosomal protein L16; 斑点5, transcription initiation factor TFIID subunit; 斑点6, Rab7/RabG-family small GTPase; 斑点9, transcription factor; 斑点10, serine/threonine-protein kinase haspin; 斑点11, F-actin capping protein beta subunit; 斑点12, mitochondrial protein translocase family; 斑点13, maturase K; 斑点14, NADH dehydrogenase subunit F; 斑点15, chloroplast Tha 4-2; 斑点16, mitochondrial translational initiation factor。胚根中: 斑点1, 23.5 kDa heat-shock protein; 斑点3, POR; 斑点5, glycosyltransferase family 2 protein; 斑点6, RIC1; 斑点7, ATP synthase beta subunit; 斑点9, ATP binding protein; 斑点10, SNF-1 related kinase; 斑点11, heat shock protein 70; 斑点12, lipase family protein。

它们的功能涉及能量代谢、糖代谢、信号转导、光合反应、蛋白质合成、DNA合成和环境胁迫等。

### 3 讨论

#### 3.1 6AL/6VS中含抗白粉病基因*Pm21* NIL的创建和小麦抗病育种中的应用

NIL是具有供体目标基因和轮回亲本优良特性的一种特殊遗传材料。小麦中, 通过杂交和多代回交已培育了包括抗病性在内的许多目标性状的NILs, 这不仅为目标基因的克隆、目标基因遗传特性的研究奠定了基础, 而且在生产上也有重要的应用价值<sup>[24-27]</sup>。6AL/6VS中含有对小麦白粉病免疫的*Pm21*, 因此, 创建具有*Pm21*的小麦NIL, 对于小麦抗病育种实践有重要意义, 我们利用6AL/6VS与对白粉病敏感优良小麦品种京411杂交、回交, 培育了NIL 6AL/6VS×京411<sup>7</sup>, 利用华北地区流行的白粉菌15号优势小种检测, 表明我们培育的NIL具有强抗白粉病的特性, 证明抗病基因*Pm21*已转移至NIL。具簇毛麦6VS NIL的培育成功对改善目前小麦白粉病抗原缺乏、原有白粉病抗病基因抗性减弱、丧失和白粉菌生理小种不断出现的被动局面是有帮助的。

#### 3.2 利用蛋白质组技术检测NIL的选择效率

NIL的培育和选择周期长, 用于本研究的6AL/6VS×京411<sup>7</sup>需8年时间, 因此, 对于选择效率的评

价尤为重要。以往, 多数研究者们利用回交代数和外部形态来评价选择效率, 但这种方法容易受发育和环境条件影响。近几年, 利用分子检测技术如AFLP<sup>[8]</sup>、SSR<sup>[11]</sup>、SNP<sup>[12]</sup>来评价NIL的选择效率, 发现这种从分子水平上跟踪和评价NIL的选择效率, 可靠性高, 不受发育和环境条件制约, 可以提高NIL的培育进程和选择效率, 但这种方法也有明显的局限性。因为NIL需兼具供体和轮回亲本的双重优良特性, 而分子检测主要是侧重在NIL中寻找与目标基因相连锁的分子标记, 并不能反映出轮回亲本的选择效率。本研究中, 我们尝试利用蛋白质组技术检测NIL的选择效率, 得出的结果表明, NIL中同时具有6AL/6VS和京411的蛋白质组特征, 如在叶片中, 斑点1、2、3、4、8、9、13、14、15偏轮回亲本京411, 而斑点5、6、7、10、11、12、16则偏目的基因供体6AL/6VS; 在胚根中, 斑点1、5、6、7、8、10、12偏轮回亲本京411, 而斑点2、3、4、9、11则偏6AL/6VS。也就是说, 利用蛋白质组技术, 分别找到了能反映出双亲选择效率的蛋白质组谱型, 这一尝试目前还未见报道, 也许在今后的NIL培育与选择效率的评估中会有一些的用处。

#### 3.3 NIL的蛋白质组变化与抗白粉病特性的关系

6AL/6VS抗白粉病, 而京411则对白粉病高度敏感, 以6AL/6VS为抗病供体, 与京411杂交、回交而得到的NIL对白粉病表现强抗, 叶片和胚根中的蛋白质组也反映出双亲的谱型特征, 能不能从NIL的蛋白质谱型上找到与抗性间存在的某些关系, 对于提高NIL的抗白粉病选择效率有一定意义。但在本研究中我们未能在NIL中找到与抗白粉病相关的蛋白质斑点, 多数蛋白质斑点在表达量上的变化是倾向于敏感亲本京411的。

这一结果似乎表明, NIL中蛋白质的谱型变化与抗性间不存在直接的关系, 但如果我们从NIL的蛋白质组分析结果与6AL/6VS、京411相比较, 有以下两个方面值得思考: (1)NIL兼具了6AL/6VS和京411的谱型特征, 能反映出NIL的培育与选择效率; (2)质谱分析表明, NIL中有表达量变化的蛋白质涉及功能上的多样性(表1)。尽管NIL中有56.2%(叶子)和58.3%(胚根)的蛋白质斑点变化倾向于感病亲本京411, 但毕竟也有43.8%(叶子)和41.7%(胚根)的蛋白质斑点变化倾向于6AL/6VS。NIL中抗白粉病特性可能是众多功能蛋白质间互作效应产生的。作者



认为本工作中, 利用蛋白质组技术结合白粉菌的人工胁迫方法来检测NIL的选择效率是有一定意义的。

### 参考文献 (References)

- 1 Chen PD, Qi LL, Zhou B, Zhang SZ, Liu DJ. Development and molecular cytogenetic analysis of wheat-*Haynaldia villosa* 6VS/6AL translocation lines specifying resistance to powdery mildew. *Theor Appl Genet* 1995; 91(6): 1125-8.
- 2 刘金元, 陶文静, 刘大钧, 陈佩度, 李万隆. 小麦-簇毛麦易位系6VS/6AL中6VS的遗传传递及其所携*Pm21*基因的遗传稳定性分析. *植物学报*(Liu Jinyuan, Tao Wenjing, Liu Dajun, Chen Peidu, Li Wanlong. Transmission of 6VS chromosome in wheat-*Haynaldia villosa* translocation lines and genetic stability of *Pm21* carried by 6VS. *Acta Bot Sin*) 1999; 41(10): 1058-60.
- 3 齐莉莉, 陈佩度, 刘大钧, 周波, 张守中, 盛宝钦, 等. 小麦抗白粉病新抗原-基因*Pm21*. *作物学报*(Qi Lili, Chen Peidu, Liu Dajun, Zhou Bo, Zhang Shouzhong, Sheng Baoqin, et al. The gene *Pm21*- a new source for resistance to wheat powdery mildew. *Acta Agron Sin*) 1995; 21(3): 257-62.
- 4 Chen X, Shi AN, Shang LM. Response of *Haynaldia villosa* to various powdery mildew isolates and the express of the resistance gene in different wheat backgrounds. *Acta Phytopathol Sin* 1997; 27(1): 17-22.
- 5 Huang XQ, Hsam SLK, Zeller FJ. Identification of powdery mildew resistance gene in common wheat (*Triticum aestivum* L. em Thell.). IX. Cultivars, land races and breeding lines grown in China. *Plant Breed* 1997; 116(3): 233-8.
- 6 刘大钧, 齐莉莉, 陈佩度, 周波, 张守中. 导入小麦的外源染色体片段的准确鉴定及外源抗性基因的稳定性分析. *遗传学报*(Liu Dajun, Qi Lili, Chen Peidu, Zhou Bo, Zhang Shouzhong. Precise identification of an alien chromosome segment introduced in wheat and the stability of its resistance gene. *Acta Genet Sin*) 1996; 23(1): 18-23.
- 7 Young ND, Zamir D, Ganai MW, Tanksley SD. Use of isogenic lines and simultaneous probing to identify DNA markers tightly linked to the *Tm-2a* gene in tomato. *Genetics* 1988; 120(2): 579-85.
- 8 田清震, 周荣华, 贾继增. 小麦抗白粉病近等基因系遗传背景分子标记检测. *作物学报*(Tian Qingzheng, Zhou Ronghua, Jia Jizeng. Molecular evaluation on the background of wheat near isogenic lines for powdery mildew resistance. *Acta Agron Sin*) 2004; 30(3): 205-9.
- 9 张毅, 李云峰, 谢戎, 杨正林, 钟秉强, 沈福成, 等. 水稻小穗簇生性近等基因系的构建及其近等性评价. *作物学报*(Zhang Yi, Li Yunfeng, Xie Rong, Yang Zhenglin, Zhong Binqiang, Shen Fucheng, et al. Development of NILs with *Cl*-gene of rice restorer and evaluation on the near-isogenic level. *Acta Agron Sin*) 2006; 32(3): 397-401.
- 10 Harrach BD, Fodor J, Pogány M, Preuss J, Barna B. Antioxidant, ethylene and membrane leakage responses to powdery mildew infection of near-isogenic barley lines with various types of resistance. *Eur J Plant Pathol* 2008; 121(1): 21-33.
- 11 刘立科, 侯宁, 刘建成, 刘根奇, 刘春光. 小麦D<sup>2</sup>型细胞质雄性不育恢复基因近等基因系筛选和遗传背景分子检测. *麦类作物学报*(Liu Like, Hou Ning, Liu Jiancheng, Liu Genqi, Liu Chunguang. Screening of the near-isogenic lines (NILs) of fertility restorer genes for D<sup>2</sup>-type cytoplasmic male sterility (CMS) in wheat and molecular characterization of the genetic backgrounds. *Journal of Triticeae Crops*) 2006; 26(5): 1-4.
- 12 马守才, 张改生, 牛娜. 小麦多子房性状近等基因系的选育及遗传背景的检测. *核农学报*(Ma Shoucai, Zhang Gaisheng, Niu Na. Breeding of near-isogenic lines of multi-ovary character in wheat and their genetic background evaluation. *Journal of Nuclear Agricultural*) 2007; 21(6): 585-8.
- 13 Kaczorowski KA, Kim KS, Diers BW, Hudson ME. Microarray based genetic mapping using soybean near-isogenic lines and generation of SNP markers in the *Rag1* aphid resistance interval. *Plant Gen* 2008; 1(2): 89-98.
- 14 Martin GB, Williams JGK, Tanksley SD. Rapid identification of markers linked to a *Pseudomonas* resistance gene in tomato by using random primers and near-isogenic lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88(6): 2336-40.
- 15 夏军红, 郑用琰. 玉米*Rf3*近等基因系的分子标记辅助回交选育与效益分析. *作物学报*(Xia Junhong, Zheng Yonglian. Molecular marker-assisted backcross breeding of maize *Rf3* NIL and its efficient analysis. *Acta Agron Sin*) 2002; 28(3): 339-44.
- 16 Liu Z, Sun QX, Ni ZF, Yang TM. Development of SCAR markers linked to the *Pm21* gene conferring resistance to powdery mildew in common wheat. *Plant Breed* 1999; 118(3): 215-9.
- 17 Wolfe MS. Physiologic specialization of *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici* in United Kingdom. *Trans Br Mycol Soc* 1965; 48(2): 315-26.
- 18 Yan SP, Tang ZC, Su W. Proteomic analysis of salt stress-responsive proteins in rice root. *Proteomics* 2005; 5(1): 235-44.
- 19 Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt Biochem* 1976; 72: 248-254.
- 20 Castro AJ, Carapito C, Zorn N, Magne C, Leize E, Dorsseleer AV, et al. Proteomic analysis of grapevine (*Vitis vinifera* L.) tissues subjected to herbicide stress. *J Exp Bot* 2005; 56(421): 2783-95.
- 21 Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227(5259): 680-5.
- 22 Wary W, Boulikas T, Wary VP, Hancock R. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 1981; 118(1): 197-203.
- 23 Sweetlove LJ, Heazlewood JL, Herald V, Holtzapffel R, Day DA, Leaver CJ, et al. The impact of oxidative stress on *Ara-bidopsis* mitochondria. *Plant J* 2002; 32(6): 891-904.
- 24 Mumtaz S, Khan IA, Ali S, Zeb B, Iqbal A, Shah Z, et al. Development of RAPD based markers for wheat rust resistance gene cluster (*Lr37-Sr38-Yr17*) derived from *Triticum ventricosum* L.. *Afr J Biotechnol* 2009; 8(7): 1188-92.
- 25 Zhu S, Walker DR, Boerma HR, Ail JN, Parrott WA. Effects of defoliating insect resistance QTLs and a *cry1Ac* transgene in soybean near-isogenic lines. *Theor Appl Genet* 2008; 116(4): 455-63.

- 26 Brevis JC, Chicaiza O, Khan IA, Jackson L, Morris CF, Dubcovsky J. Agronomic and quality evaluation of common wheat near-isogenic lines carrying the leaf rust resistance gene *Lr47*. *Crop Sci* 2008; 48(4): 1441-51.
- 27 Zhou RH, Zhu ZD, Kong XY, Huo NX, Tian QZ, Li P, *et al.* Development of wheat near-isogenic lines for powdery mildew resistance. *Theor Appl Genet* 2005; 110(4): 640-8.

## Cultured and Proteomic Evaluation of Resistance Powdery Mildew Near-isogenic Line Contained the *H. villosum* 6VS

Duan Shuang, Wang Lian, Gan Fu, Liu Xiaoying, Wang Zhenying, Peng Yongkang\*  
(College of Life Science, Tianjin Normal University, Tianjin 300387, China)

**Abstract** In this study, we cultured a near-isogenic line (NIL) of Jing 411 and we are also evaluation the selection effects of near-isogenic line by proteomic techniques. Jing 411, which is a fine wheat variety but susceptible to powdery mildew pathogen, was crossed with wheat (*H. villosum*) chromosome translocation line 6AL/6VS. The donor of the resistance gene, F<sub>1</sub> individuals then were back-crossed with Jing 411 seven times and selfed to produce progenies (NIL). The proteome of leaves and roots were investigated and the results indicated that 43.8% protein spots changed had a tendency to 6AL/6VS and 56.2% had a tendency to recurrent parent Jing 411 in leaves of NILS. In roots, 41.7% protein spots changed had a tendency to 6AL/6VS and 58.3% protein spots changed tended to recurrent parent Jing 411. 23 protein spots were identified by MS/MS. They were ATP synthase beta subunit, glycosyltransferase family 2 protein, Rab7/RabG-family small GTPase, COP1-Interacting protein 7, cryptochrome 1a, ribosomal protein L16, transcription initiation factor TFIID subunit, 23.5 kDa heat-shock protein, POR, RIC1, NBS-LRR resistance protein, transcription factor, serine/threonine-protein kinase haspin, F-actin capping protein beta subunit, mitochondrial protein translocase family, maturase K, NADH dehydrogenase subunit F, chloroplast Tha 4-2, mitochondrial translational initiation factor, ATP binding protein, SNF-1 related kinase, heat shock protein 70 and lipase family protein. The identified proteins were found to be involved in diverse biological processes, covering energy pathway, glucose-metabolism, signal transduction, photoreaction, DNA and RNA synthesis and defense response. Proteome technique can be used to evaluation the selection effect of NIL.

**Key words** near-isogenic; 6AL/6VS; proteome; MALDI-TOF-MS; powdery mildew

Received: August 23, 2011 Accepted: April 5, 2012

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.31071671) and the Tianjin Key Science and Technology Program (No.11ZCKFNC00700)

\*Corresponding author. Tel: 86-22-2376569, E-mail: pykcell@yahoo.com.cn