

青海高原春小麦糯性新品系的筛选及其直链淀粉含量

赵德勇^{1,2}, 窦全文¹, 陈志国¹, 畅喜云^{1,2}, 刘永安^{1,2}

(1. 中国科学院西北高原生物研究所, 青海西宁 810001;

2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要: 为了培育适合青海高原种植的春小麦糯性新品系, 利用 DNA 分子标记技术检测了 80 株青春 533 × 糯麦 1 号 F₂ 代材料的 *Wx* 基因缺失情况, 同时测定了不同 *Wx* 基因缺失类型 F₂ 代材料的小麦籽粒直链淀粉含量。结果表明, 在 80 株 F₂ 代分离群体材料中, 单缺失 *Wx-A1* 或 *Wx-B1* 或 *Wx-D1* 基因的材料分别为 8 份、11 份、9 份; 同时缺失 *Wx-A1* 和 *Wx-D1* 基因的材料为 10 份, 同时缺失 *Wx-B1* 和 *Wx-D1* 基因的材料为 12 份, 同时缺失 *Wx-A1* 和 *Wx-B1* 基因的材料为 9 份; *Wx-A1*、*Wx-B1* 和 *Wx-D1* 基因全部缺失的材料为 8 份。 *Wx* 基因的缺失数量与直链淀粉含量的高低有密切关系, 缺失 1 个 *Wx* 基因(部分糯小麦), 直链淀粉含量比对照(青春 533)降低 5.28%~11.35%; 缺失 2 个 *Wx* 基因(部分糯小麦), 直链淀粉含量比对照降低 10.73%~19.81%; 缺失 3 个基因(糯小麦)的直链淀粉含量为 0.97%, 比对照降低 30.53%。高原春小麦与糯性小麦杂交的 F₂ 代直链淀粉含量下降幅度要比前人所研究的材料下降幅度大, 并且 *Wx-B1* 单缺失引起直链淀粉含量下降(11.35%)比 *Wx-A1* 和 *Wx-D1* 双缺失所引起的下降幅度要大(10.73%)。

关键词: *Wx* 基因; 直链淀粉含量; 糯性小麦; 分子标记

中图分类号: S512.1; S330

文献标识码: A

文章编号: 1009-1041(2010)01-0034-05

Breeding New Waxy Spring Wheat Lines in Qinghai Plateau

ZHAO De-yong^{1,2}, DOU Quan-wen¹, CHEN Zhi-guo¹, CHANG Xi-yun^{1,2}, LIU Yong-an^{1,2}

(1. Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining, Qinghai 810001, China;

2. Graduate College of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: In order to breed new waxy spring wheat lines that adapt to the environment of Qinghai Plateau, 80 F₂ segregation plants of Qingchun 533 × Nuomai No1 were harvested, four PCR-based markers were used to detect the genotypes of these plants, amylose content determination of these progeny plants with different genotypes was also conducted. The number of plants that lacked of *Wx-A1*, *Wx-B1*, *Wx-D1* were 8, 11, 9 respectively; 10 plants lacked both *Wx-A1* and *Wx-D1*, 12 plants lacked both *Wx-B1* and *Wx-D1*, 9 plants lacked both *Wx-A1* and *Wx-B1*, 8 plants lacked the three *Wx* genes. The amylose content was 5.28%~11.35% lower than that of Qingchun 533 while one *Wx* gene was absent. When two *Wx* genes were absent in progeny plants, the amylose content was 10.73%~19.81% lower than that of Qingchun 533. The progeny plants with absence of three *Wx* genes had the lowest amylose content (0.97%). The results of this study were subtly different with the previous report, the decrease of amylose content was more acute when there was an absence of *Wx* gene (genes) in progeny plants, decrease of amylose content in progeny plants with absence of *Wx-B1* was more acute than that of progeny plants with absence of *Wx-A1* and *Wx-D1*.

Key words: *Wx* gene; Amylose content; Waxy wheat; Molecular marker

收稿日期: 2009-06-12

修回日期: 2009-07-04

基金项目: 中国科学院知识创新工程方向性项目(KSCX2-YW-N-052); 中国科学院“西部之光”人才培养计划项目。

作者简介: 赵德勇(1984-), 男, 在读硕士, 主要从事春小麦育种和栽培研究。E-mail: zdy1984@126.com

通讯作者: 陈志国(1963-), 男, 硕士, 研究员, 主要从事春小麦遗传育种和栽培研究。E-mail: zgchen@nwipb.ac.cn

小麦颗粒结合淀粉合成酶(GBSS I)(又称 *Wx* 蛋白)是小麦直链淀粉合成的关键酶。普通小麦(*Triticum aestivum* L.)含有3种 *Wx* 蛋白亚基:*Wx-A1*、*Wx-B1* 和 *Wx-D1*, 三种 *Wx* 蛋白亚基分别由位于染色体7AS、4AL和7DS上的 *Wx-A1*、*Wx-B1* 和 *Wx-D1* 基因位点编码^[1-2]。不同 *Wx* 蛋白亚基对直链淀粉合成的贡献有所差别,当不同 *Wx* 蛋白亚基缺失时,直链淀粉合成能力有不同程度的下降^[3-5]。许多研究表明,缺失 *Wx-B1* 亚基的小麦品种,面粉直链淀粉含量较低,高峰黏度大,膨胀势高,面条加工品质优良^[6-8]。中国小麦品种中缺失 *Wx* 蛋白亚基的比例不高,并以缺失 *Wx-B1* 蛋白亚基为主,缺失频率也表现出明显的地域差异。杜小燕等^[9]从1739份中国地方小麦品种中检测出 *Wx-A1* 缺失材料3份, *Wx-B1* 缺失材料25份, *Wx-D1* 缺失材料3份。邓万洪等^[10]用分子标记技术对260份中国核心小麦种质资源进行了分析,筛选出缺失 *Wx-A1* 蛋白亚基的品种2份,缺失 *Wx-B1* 蛋白亚基的品种14份,得到1份不同于“白火麦”的 *Wx-D1* 蛋白亚基缺失的地方品种“秃芒麦”。

DNA分子标记辅助选择技术已经被广泛地应用到小麦育种工作中,目前,国内外已开发出多种 *Wx* 基因的分子标记,如 Shariflou 等^[11]设计的 SSR 引物可用于鉴定 *Wx-D1* 位点, Briney 等^[6]设计的 STS-PCR 引物可作为 *Wx-B1* 位点的分子标记。迄今已有多篇文献报道利用 *Wx* 基因分子标记可培育面条专用优质小麦和全糯小麦^[12-14]。本研究以 *Wx* 全缺失材料糯麦1号作为供体亲本与轮回亲本青海省地方主栽品种青春533杂交,利用DNA分子标记技术来鉴定杂交后代的 *Wx* 基因缺失情况,并测定了不同 *Wx* 基因缺失类型材料的直链淀粉含量,以期为今后青海省糯性小麦的培育提供理论指导和技术支持,进而选育出适合青海省种植的糯性小麦材料。

1 材料与方法

1.1 试验材料

青春533,糯麦1号,80株青春533×糯麦1号 F_2 代分离植株。

1.2 直链淀粉的测定

采用李锐的微量样品直链淀粉含量测定方法^[15],并参照国标《直链淀粉含量测定方法》(GB8648-87)稍加改进。

1.3 小麦总DNA的提取

DNA的提取参照 Kim^[16]及王珍^[17]的方法,略

加改进。

1.4 PCR反应及琼脂糖凝胶电泳

引物1:检测 *Wx-A1* 位点,按 Vrinten 等^[18]提供的序列合成,含有 *Wx-A1* 基因的材料在该引物作用下,可扩增出1160 bp的特异带。上游引物:5'-TTG CTG CAG GTA GCC ACA CCC TG-3'; 下游引物:5'-AGT TGC TCT TGA GGT AGC-3'。

引物2:检测 *Wx-B1* 位点,该引物是 Briney 等^[6]发掘的一个 *Wx-B1* 基因 STS 标记,目标扩增片段是一段440 bp序列。上游引物:5'-AAC CAG CAG CGC TTC AGC CT-3'; 下游引物:5'-TTG AGC TGC GCG AAG TCG TC-3'。

引物3:检测 *Wx-D1* 位点,该引物由 Vrinten 等^[18]设计, *Wx-D1* 基因在该引物的作用下,正常材料可扩增出940 bp的特异带。上游引物:5'-TAG TGC GTC CAG ACT CAC AG-3'; 下游引物:5'-GAG ATG GTC AAG AAC TGC AT-3'。

引物4:可以检测 *Wx-A1* 和 *Wx-D1*,该引物是 Shariflou 等^[11]发掘的 *Wx-7D* 基因位点上的一个 SSR 标记, *Wx-A1* 基因可扩增出204 bp片段, *Wx-D1* 基因可扩增出265 bp片段。上游引物:5'-CGC TCC CTG AAG AGA GAA AGA A-3'; 下游引物:5'-ATA GGC ACA ACC CCT AAC-3'。

PCR反应体系和反应程序参照 Shariflou 的方法^[11]进行。

PCR扩增产物在2%的琼脂糖凝胶上电泳检测,缓冲体系为1×TAE溶液,155 V电压电泳2 h,溴化乙锭(EB)染色,凝胶扫描成像并存入计算机。

2 结果与分析

2.1 F_2 代材料中 *Wx* 位点的缺失情况

利用4种引物对青春533×糯麦1号的80株 F_2 代分离群体材料 *Wx* 基因位点缺失情况进行检测,部分结果见图1至图5。在图1中,泳道10、18中没有出现1160 bp的特异带,说明 *Wx-A1* 基因可能发生了缺失,而其他泳道均扩增出1160 bp的特异带,说明 *Wx-A1* 基因没有缺失。图2中,泳道1、6、8、9、11均未出现440 bp的特异带,说明这几个杂交后代材料缺失 *Wx-B1* 基因。图3中,泳道3出现940 bp的特异带,表明 *Wx-D1* 基因没发生缺失,其他泳道均扩增出现360 bp特异带,说明 *Wx-D1* 位点基因都发生了变异。图4中,泳道2、3、4、9、14、15扩增出360 bp带,说明缺失 *Wx-D1* 基因;泳道5、7、10、19出现940 bp带,说明 *Wx-D1* 基因没发生缺失。图5中,泳道2缺失265 bp和204 bp

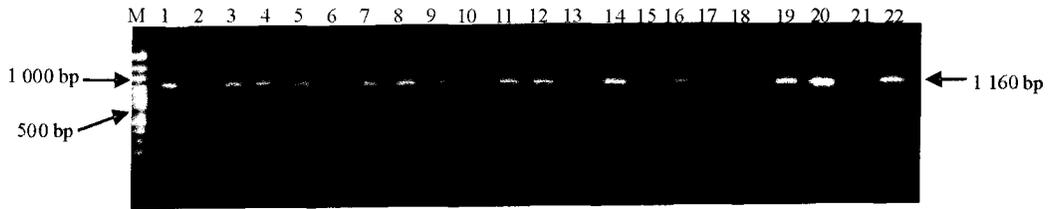
带,说明 *Wx-A1*、*Wx-D1* 基因发生突变而缺失;除泳道 3、7、12、14、16、18、20 之外,其他泳道都缺失 265 bp,表明 *Wx-D1* 基因缺失。

在 80 株 F_2 代分离群体材料中,单缺失 *Wx-A1* 基因的材料为 8 份(如图 1 至图 4 中的 18、21 号材料;文中给出的只是部分电泳图谱,所以每一种缺失类型在图中并不能标全,下同),单缺失 *Wx-B1* 基因的材料为 11 份(如图 1 至图 4 中的 1、12 号材料),单缺失 *Wx-D1* 基因的材料为 9 份(如图 1 至图 4 中的 11 号材料);同时缺失 *Wx-A1* 和 *Wx-D1* 基因的材料为 10 份(如图 1 至图 4 中的 2、13 号材料),同时缺失 *Wx-B1* 和 *Wx-D1* 基因的材料为 12 份(如图 1 至图 4 中的 14、20 号材料),同时缺失 *Wx-A1* 和 *Wx-B1* 基因的材料为 9 份(如图 1 至图 4 中的

10 号材料);*Wx-A1*、*Wx-B1* 和 *Wx-D1* 基因全部缺失的材料为 8 份(如图 1 至图 4 中的 6、17 号材料)。

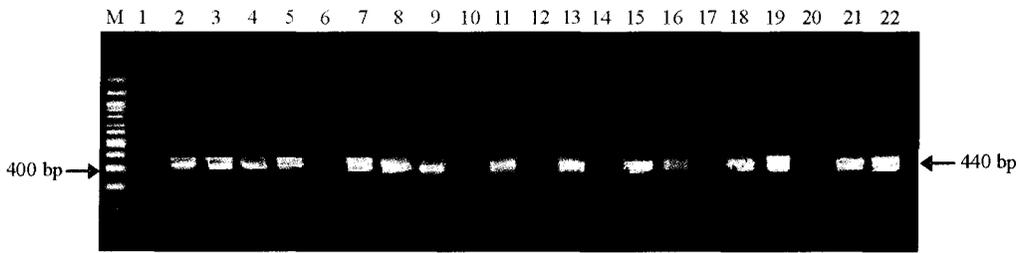
2.2 不同 *Wx* 位点缺失对直链淀粉含量的影响

从表 1 中可以看到,缺失 1 个 *Wx* 基因,直链淀粉含量比对照(青春 533)降低 5.28%~11.35%;缺失 2 个 *Wx* 基因,直链淀粉含量比对照降低 10.73%~19.81%;缺失 3 个 *Wx* 基因的直链淀粉含量为 0.97%。其中在缺失 1 个 *Wx* 基因位点类型中,由 *Wx-B1* 缺失引起直链淀粉含量下降幅度最大(11.35%),其次是 *Wx-D1* 缺失(7.23%)和 *Wx-A1* 缺失(5.28%)。双 *Wx* 基因位点缺失中,*Wx-A1* 和 *Wx-B1* 缺失(19.81%)>*Wx-B1* 和 *Wx-D1* 缺失(15.25%)>*Wx-A1* 和 *Wx-D1* 缺失(10.73%)。



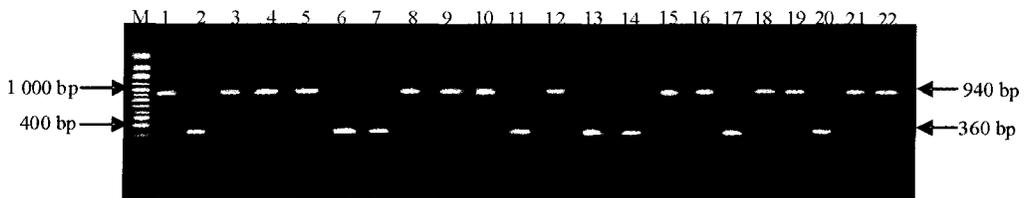
1~22:青春 533×糯麦 1 号的 F_2 后代 1~22: F_2 progeny of Qingchun 533×Nuomai 1

图 1 *Wx-A1* 位点分子标记
Fig. 1 PCR product of *Wx-A1*



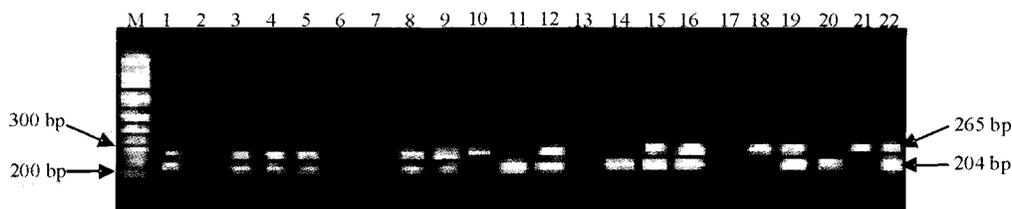
1~22:青春 533×糯麦 1 号的 F_2 后代 1~22: F_2 progeny of Qingchun 533×Nuomai 1

图 2 *Wx-B1* 位点分子标记
Fig. 2 PCR product of *Wx-B1*



1~22:青春 533×糯麦 1 号的 F_2 后代 1~22: F_2 progeny of Qingchun 533×Nuomai 1

图 3 *Wx-D1* 位点分子标记
Fig. 3 PCR product of *Wx-D1*

1~22:青春 533×糯麦 1 号的 F₂ 后代 1~22:F₂ progeny of Qingchun 533×Nuomai 1图 4 *Wx-D1* 位点分子标记
Fig. 4 PCR product of *Wx-D1*表 1 缺失不同 *wx* 基因类型小麦的 F₂ 代直链淀粉含量
Table 1 The amylose content of different null *Wx* gene wheats

<i>Wx</i> 缺失类型 <i>Wx</i> null type	F ₂ 代材料数 Number of F ₂ progeny	F ₂ 代直链 淀粉含量(%) Amylose content of F ₂	F ₂ 代直链 淀粉下降% Decrease of amylose content
正常 Normal	13	31.50	0
缺失 <i>Wx-D1</i> Null of <i>Wx-D1</i>	9	26.22	5.28
缺失 <i>Wx-A1</i> Null of <i>Wx-A1</i>	8	24.27	7.23
缺失 <i>Wx-B1</i> Null of <i>Wx-B1</i>	11	20.15	11.35
缺失 <i>Wx-A1</i> 和 <i>Wx-D1</i> Null of <i>Wx-A1</i> and <i>Wx-D1</i>	10	20.77	10.73
缺失 <i>Wx-B1</i> 和 <i>Wx-D1</i> Null of <i>Wx-B1</i> , <i>D1</i>	12	16.25	15.25
缺失 <i>Wx-A1</i> 和 <i>Wx-B1</i> Null of <i>Wx-A1</i> and <i>Wx-B1</i>	9	11.69	19.81
全缺 Null of <i>Wx-A1</i> , <i>Wx-B1</i> 和 <i>Wx-D1</i>	8	0.97	30.53

3 讨论

本研究利用分子标记技术,从 80 份青春 533×糯麦 1 号 F₂ 代材料中鉴定出 28 份 *Wx* 单缺失材料、31 份 *Wx* 双缺失材料、8 份糯性材料(*Wx* 全缺失)。分别缺失 *Wx-A1*、*Wx-B1*、*Wx-D1* 的单缺失类型材料,其直链淀粉含量比亲本青春 533 分别降低 7.23%、11.35%、5.28%,分别缺失 *Wx-A1* 和 *Wx-D1*、*Wx-B1* 和 *Wx-D1*、*Wx-A1* 和 *Wx-B1* 的双缺失类型材料,其直链淀粉含量比亲本青春 533 分别降低了 10.73%、15.25%、19.81%。Yamamoto^[19]等研究表明,*Wx* 基因单缺失和 *Wx* 基因双缺失后代的直链淀粉含量比亲本分别降低 1%~2%、3%~9%;Yamauch^[20]等研究结果为,*Wx* 基因单缺失和 *Wx* 基因双缺失后代的直链淀粉含量比亲本分别降低 2.0%~3.3%、4.8%~7.3%;姚金保^[21]等研究表明,*Wx* 基因单缺失和 *Wx* 基因双缺失后代的直链淀粉含量比亲本分别降低 3.29%~7.15%、9.45%~13.82%。本研究结果表明,由单个基因缺失所引起的 F₂ 代直链淀粉含量下降趋势与前人结果一致,但下降的幅度较大。这可能是因为青海高原昼夜温差大、强紫外线等独特的气候影响到 *Wx* 基因的表达,当 *Wx* 基因缺失时,相应的直链淀粉含量合成能力下降的幅度较大。值得注意的是缺失 *Wx-B1* 引起直链淀粉含量下降(11.35%)

比双缺失 *Wx-A1* 和 *Wx-D1* 所引起的下降要大(10.73%),这与前人全缺失>双缺失>单缺失的结论不太一致,但进一步说明了 *Wx-B1* 基因位点缺失对降低小麦直链淀粉含量的重要作用。

对于 *Wx-A1*、*Wx-B1* 和 *Wx-D1* 基因位点的检测,也可以通过检测小麦籽粒中的 *Wx* 蛋白组成情况来完成,已有文献报道可以利用双向 SDS-PAGE^[1]和单向 SDS-PAGE^[22-23]方法对小麦籽粒的 3 种亚基进行鉴定。但是利用 SDS-PAGE 进行鉴定,操作繁琐,难度大,效率低,同时 *Wx-B1* 和 *Wx-D1* 蛋白亚基分子量和迁移率相近,分离效果不理想,使得该法在大量检测分离后代时受到限制。随着 Murai 等^[24]分离和识别了六倍体小麦的 3 个 *Wx* 基因及 Vrinten 等^[18]分析了这 3 个基因在 DNA 序列上的特点,多种 *Wx* 基因的分子标记已经被开发出来,利用 DNA 分子标记技术可以高效、准确地鉴定小麦杂种分离后代的 *Wx* 基因缺失情况。

本研究利用分子标记技术,从 80 份青春 533×糯麦 1 号 F₂ 代材料中鉴定出不同 *Wx* 缺失类型的材料,并且明确了不同 *Wx* 缺失类型与小麦籽粒直链淀粉含量之间的关系。说明将鉴定出的 *Wx* 缺失材料作为供体亲本和轮回亲本青春 533 杂交,结合分子标记技术可以准确高效地选育适合青海高原环境的全糯或部分糯性小麦新品系。

致谢:本试验得到王海庆副研究员和沈裕虎副

研究员在技术方面的帮助,在此表示感谢。

参考文献:

- [1] Nakamura T, Yamamori M, Hirano H, *et al.* Identification of three *Wx* proteins in wheat[J]. *Biochemical Genetics*, 1993, 31(1):75-78.
- [2] Yamamori M, Nakamura T, Endo T R, *et al.* Waxy protein deficiency and chromosomal location of coding genes in common wheat[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1994, 89(2): 179-184.
- [3] Nakamura T, Yamamori M, Hoshino H, *et al.* Decrease of waxy (*Wx*) protein in two common wheat cultivars with low amylose content [J]. *Plant Breed*, 1993, 111(1):99-105.
- [4] Araki E, Miura H, Sawada S. Differential effects of the null alleles at the three *Wx* loci on the starch-pasting properties of wheat[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2000, 100(7): 1113-1120.
- [5] Miura H, Wickramasinghe M H A, Subasinghe R M, *et al.* Development of near-isogenic lines of wheat carrying different null *Wx* alleles and their starch properties[J]. *Euphytica*, 2002, 123(3):353-359.
- [6] Briney A, Wilson R, Potter R H, *et al.* A PCR-based Marker for selection of starch and potential noodle quality in wheat[J]. *Molecular Breeding*, 1998, 4(5): 427-433.
- [7] Zhao X C, Batey I L, Sharp P J, *et al.* A single genetic locus associated with starch granule properties and noodle quality in wheat[J]. *Journal of Cereal Science*, 1998, 27(1):7-13.
- [8] Epstein J, Morris C F, Huber K C. Instrumental texture of white salted noodles prepared from recombinant inbred lines of wheat differing in the three granule bound starch synthase(*waxy*)genes[J]. *Journal of Cereal Science*, 2002, 35(1):51-63.
- [9] 杜小燕,郝晨阳,张学勇,等.我国部分地方品种 *Waxy* 基因多样性研究[J]. *作物学报*, 2007, 33(3)503-506.
- [10] 邓万洪,晏本菊,任正隆.利用 *Wx* 基因的分子标记筛选部分糯小麦的研究[J]. *麦类作物学报*, 2007, 27(6):982-988.
- [11] Shariflou M R, Sharp P J. A polymorphic microsatellite in the 3' end of 'waxy' genes of wheat, *Triticum aestivum* [J]. *Plant Breeding*, 1999, 118:275-277.
- [12] 梁荣奇,张义荣,唐朝晖,等.利用 *Wx* 基因分子标记辅助选择培育面条专用优质小麦[J]. *农业生物技术学报*, 2001, 9(3):269-273.
- [13] 梁荣奇,张义荣,刘守斌,等.用 *wx* 基因分子标记辅助选择糯性小麦[J]. *遗传学报*, 2001, 28(9):856-863.
- [14] 任丽娟,蔡士宾,马鸿翔,等.用一个 SSR 标记快速检测小麦杂种后代 *Waxy* 基因型[J]. *麦类作物学报*, 2004, 24(3):9-12.
- [15] 李锐,黄超武.水稻单粒直链淀粉含量测定方法[J]. *广东农业科学*, 1988(5):7-9.
- [16] Kim C S, Lee C H, Shin J S, *et al.* A simple and rapid method for isolation of high quality genomic DNA from fruit trees and conifers using PVP[J]. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(5): 1085-1086.
- [17] 王珍,方宜钧.分子植物育种实验室方法(一):植物 DNA 分离[J]. *分子植物育种*, 2003, 1(2):281-288.
- [18] Vrinten P, Nakamura T, Yamamori M. Molecular characterization of waxy mutations in wheat[J]. *Molecular and General Genetics*, 1999, 261:463-471.
- [19] Yamamori M, Quynh N T. Differential effects of *Wx-A1*, *-B1* and *-D1* protein deficiencies on apparent amylose content and starch pasting properties in common wheat[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2000, 100: 32-38.
- [20] Yamauch H, Noda T, Takigawa S, *et al.* Mechanical properties of yellow alkaline noodle from nearisogenic wheat lines with different *wx*-protein deficiency[C]// *Proceedings of 54th Australian cereal chemistry conference and 11th wheat breeders assembly*, 2004, 421-424.
- [21] 姚金保,Sharma R, Jenner C F,等.缺失不同 *Wx* 蛋白对普通小麦直链淀粉含量及淀粉特性的影响[J]. *麦类作物学报*, 2005, 25(6): 29-33.
- [22] Zhao X C, Sharp P J. An improved 1D-SDS-PAGE method for the identification of three bread wheat 'waxy' proteins[J]. *Cereal Science*, 1996, 23(2):191-193.
- [23] 王子宁,郭北海,李洪杰,等.多倍体麦类作物 *Wx* 蛋白检测的 SDS-PAGE 方法[J]. *遗传*, 2000, 22(3):169-171.
- [24] Murai J, Taira T, Ohta D. Isolation and characterization of the three *Waxy* genes encoding the granule-bound starch synthase in hexaploid wheat[J]. *Gene*, 1999, 234(1):71-79.