

网络出版时间:2014-01-08

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.7606/j.issn.1009-1041.2014.01.04.html>

## 青海小麦籽粒硬度等位变异研究

王雪玲<sup>1,2,3,4</sup>, 李建民<sup>2</sup>, 魏乐<sup>2</sup>, 李红琴<sup>1</sup>, 刘宝龙<sup>1,3,4</sup>, 张怀刚<sup>1,3,4</sup>

(1. 中国科学院西北高原生物研究所, 青海西宁 810001; 2. 青海师范大学生命与地理科学学院, 青海西宁 810008;  
3. 中国科学院高原生物适应与进化重点实验室, 青海西宁 810001; 4. 青海省作物分子育种重点实验室, 青海西宁 810001)

**摘要:** 为了解小麦品种籽粒硬度的遗传多样性, 利用单粒谷物硬度测定、PCR 扩增和核苷酸测序技术, 分析了 66 份青海小麦品种籽粒硬度主效基因的等位变异。结果表明, 青海小麦以硬质类型为主, 比例达到 47.0%, 混合麦比例为 19.7%, 软质麦比例为 33.3%。硬度基因有 5 种组合类型: 野生型、*Pina-D1a/Pinb-D1b*、*Pina-D1a/Pinb-D1c*、*Pina-D1a/Pinb-D1x* 和 *Pina-D1b/Pinb-D1a*。野生型小麦类型比例最高, 占 59.09%, SKCS 硬度指数平均为 44.12, 变化范围为 12.75~84.89。突变类型的品种籽粒均为硬质。因此, 在青海硬质小麦可以通过突变类型的分子标记进行选育, 软质小麦选育需在利用硬度基因分子标记筛选的基础上进一步考察籽粒硬度性状的表现型。

**关键词:** 青海省; 小麦; 籽粒硬度; 等位变异

中图分类号: S512.1; S330

文献标识码: A

文章编号: 1009-1041(2014)01-0023-05

## Genetic Variation of Grain Hardness of Wheat Cultivars in Qinghai Province

WANG Xueling<sup>1,2,3,4</sup>, LI Jianmin<sup>2</sup>, WEI Le<sup>2</sup>, LI Hongqin<sup>1</sup>,  
LIU Baolong<sup>1,3,4</sup>, ZHANG Huaigang<sup>1,3,4</sup>

(1. Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining, Qinghai 810001, China;  
2. College of Biologic and Geographic Sciences, Qinghai Normal University, Xining, Qinghai 810008, China;  
3. Key Laboratory of Adaptation and Evolution of Plateau Biota (AEPB), Chinese Academy of Sciences, Xining, Qinghai 810001, China; 4. Qinghai Province Key Laboratory of Crop Molecular Breeding, Xining, Qinghai 810001, China)

**Abstract:** Grain hardness is an important trait in wheat, affecting the quality of final products. Research about genetic diversity of grain hardness can provide theoretical guidance for wheat quality improvement. In this study, single kernel characterization system (SKCS), PCR and nucleotide sequencing were employed for evaluating genetic diversity of grain hardness of wheat cultivars in Qinghai province. According to hardness value, 31 hard, 13 semi-hard and 22 soft wheat cultivars were classified in 66 Qinghai wheat cultivars. The hardness values of 8 cultivars were less than 30, which mean they could be used for biscuit. Five types of Puroindoline gene combinations existed in these cultivars. They were wild-type, *Pina-D1a/Pinb-D1b*, *Pina-D1a/Pinb-D1c*, *Pina-D1a/Pinb-D1x* and *Pina-D1b/Pinb-D1a*. The proportion of wild-type reached 59.09%. The average hardness value of wild type was 44.12, and range was from 12.75 to 84.89. Wheat varieties with wild-type Puroindoline gene were not always soft, but almost all cultivars with mutation Puroindoline were hard. Thus, molecular

收稿日期: 2013-09-15

修回日期: 2013-12-04

基金项目: 青海省高原作物种质资源创新与利用国家重点实验室培育基地开放课题(2011-07); 中国科学院知识创新工程重要方向项目; 国家自然科学基金项目(31260322)。

第一作者 E-mail: qhsdweile@aliyun.com

通讯作者: 张怀刚 (E-mail: hgzhang@nwipb.cas.cn)

markers can be used for hard wheat breeding in Qinghai province, while the phenotype should be taken to consideration more seriously in soft wheat cultivar breeding except molecular marker.

**Key words:** Qinghai Province; Wheat; Grain Hardness;

籽粒硬度是国内外小麦市场分级和定价的重要依据。硬度值小的小麦磨制的面粉颗粒度较小,破损淀粉含量低,吸水能力较弱,而硬度值大的小麦磨制的面粉颗粒度大,破损淀粉含量高,具有较强的吸水能力<sup>[1]</sup>。这些特性影响面团揉制特性,进而影响制作食品的类型及品质。软质小麦磨制的面粉适合制作饼干和糕点等甜食类食品,而硬质小麦的面粉适合制作面包和优质面条等食品。四倍体小麦中的硬粒小麦的籽粒硬度更高,适合于加工成通心粉(Semolina),用于制作意大利面品(Pasta)<sup>[2]</sup>。

小麦的籽粒硬度性状主要由位于小麦 5D 染色体短臂上的 *Pina* 和 *Pinb* 基因调节<sup>[3]</sup>。*Pina* 和 *Pinb* 都处于野生状态时,籽粒表现为软质;当 *Pina* 或 *Pinb* 任一基因缺失或突变时,籽粒表现为硬质;当缺乏 D 组染色体时,籽粒硬度最大,称硬粒麦,又称杜伦麦(Durum)<sup>[2]</sup>。目前,已在普通小麦中发现大量 *Pina* 和 *Pinb* 基因的突变类型<sup>[4-7]</sup>,大部分的突变类型表现为硬质麦。但夏兰芹等<sup>[8]</sup>发现,京 411 中的 *Pinb* 基因相对于野生型 *Pinb* 基因序列中 223 位点的鸟嘌呤(G)突变为腺嘌呤(A),导致该基因的氨基酸序列中第 46 位点的甘氨酸(Glycine, Gly)突变为丝氨酸(Serine, Ser),但并未造成小麦质地变硬。不同的突变类型对硬度影响有所差异,进而导致最终制作食品的品质差异。Martin 等<sup>[9]</sup>发现, *Pinb-D1b* 类型的小麦籽粒比 *Pina-D1b* 类型小麦籽粒软,出粉率、皮磨出粉率、磨粉评分较高,面包体积较大,面粉灰分和面包结构评分较低。

春小麦是青海省主要的粮食作物。从 20 世纪 50 年代至今,青海省小麦的总产和单产不断提高,但品质较差,主要表现为小麦蛋白质含量低,面筋的延伸性、粘弹性差,加工的面条、饺子等水煮制品耐煮性和口感均不好,易断条、糊汤;馒头起发性差,无弹性、粘牙<sup>[10]</sup>。由于青海省春小麦品质相对较差,每年需从内地调进大量的小麦。与其他地区相比,青海省小麦品种尤其是小麦籽粒硬度的遗传多样性研究基础较为薄弱<sup>[11-13]</sup>。本研究拟通过对青海春小麦育成品种籽粒硬度和 Puroindoline 基因的综合评价,发掘该地区的优

异种质资源和基因资源,为该地区小麦籽粒硬度改良提供信息。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

本试验以《青海省作物志》中的 66 个春小麦育成品种为材料。66 份材料于 2010 年和 2011 年种植在中科院西北高原生物研究所下红庄生态农业试验站,随机区组设计,3 个区组,每个区组 2 行,行长 2 m,行距 20 cm,每行 30 粒种子,常规田间管理。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 籽粒硬度的测定

测定籽粒硬度时小麦样品的水分含量控制在 11%~13%。利用 Perten 4100 型单粒谷物硬度仪(Single Kernel Characterization System, SKCS),每个品种测定 300 粒样品的硬度指数。硬度指数值小于 40 为软质麦,大于 60 为硬质麦,介于二者之间多为混合麦<sup>[14-17]</sup>。

#### 1.2.2 基因组 DNA 的提取

每个品种选取 3 粒种子,充分研磨,将粉末放入灭菌的 2.0 mL Eppendorf 管中,按照陈锋等<sup>[18]</sup>的 CTAB 法提取基因组 DNA,略有改动,CTAB 提取液:称取 CTAB 4 g,NaCl 16.364 g,量取  $1 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$  Tris-HCl 20 mL (pH 8.0), $0.5 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$  EDTA 8 mL,定容至 200 mL 高压灭菌。

#### 1.2.3 PCR 反应及琼脂糖凝胶电泳

根据 NCBI 数据库中 EU835982 中 *Pina* 和 *Pinb* 的基因组核苷酸序列,设计基因全长引物。*Pina* 基因全长引物扩增出一个包含有 *Pina* 基因全长的 524 bp 片段,上游引物 5'-CATCTATTCATCTCCACCTGC-3';下游引物 5'-GTGACAGTTTATTAGCTAGTC-3'。*Pinb* 基因全长引物能扩增出一个包含有 *Pinb* 基因全长的 673 bp 片段,上游引物 5'-GTGAGCATTAGCAAAGC-3';下游引物 5'-CAGATCAATATA-CAAGGGTG-3'。所有引物均由北京六合华大基因科技股份有限公司合成。PCR 反应体系与扩增程序、琼脂糖凝胶电泳均按照陈锋等<sup>[18]</sup>的方法进行。

1.2.4 测序鉴定

将上述经琼脂糖凝胶电泳检测含有目标条带的 45  $\mu$ L PCR 扩增产物送样测序, DNA 测序结果由北京六合华大基因科技股份有限公司完成。

1.2.5 统计分析

用 SPSS 软件对籽粒 SKCS 硬度指数的平均值、标准差和变幅进行统计,并用 LSD(Least significant difference)法进行样本间多重比较。用 BioEdit 和 DNAMAN 软件完成序列比对和分析。

2 结果与分析

2.1 小麦籽粒硬度分布规律

青海省育成品种籽粒硬度指数偏高,平均值为 53.67,变化范围为 12.75~84.89。硬度指数大于 60 的硬质品种有 31 个,占总品种数的 47.0%;混合麦占 19.7%;软质麦占 33.3%(表 1)。硬度指数小于 30 的品种有 8 个,分别为高原 182、互助红、互麦 12、柴春 018、山旱 901、墨波、

张春 811 和青农 524。

2.2 Puroindoline 基因变异类型的分布

用 *Pina* 和 *Pinb* 的基因全长引物将各品种基因组中的 *Pina* 和 *Pinb* 基因编码区扩增后,通过 BioEdit 和 DNAMAN 软件进行序列比对分析发现,66 个品种中,野生型有 39 份(表 2),占 59.09%;含 *Pina-D1b* 和 *Pinb-D1b* 的各有 10 份,各占 15.15%;含 *Pinb-D1c* 的有 6 份,占 9.09%,含 *Pinb-D1x* 的有 1 份,占 1.52%,该材料相对于野生型在第 257 位点 C 突变为 A,与 Wang J 等<sup>[6]</sup>鉴定结果相同,为稀有类型,代表材料为高原 671,硬度指数为 67.51,属于硬质小麦。

表 1 青海省小麦品种籽粒硬度值

Table 1 Grain hardness of wheat cultivar in Qinghai province

级别 Class	硬度指数 Hardness index	品种数 Number of cultivars	比例/% Ratio
硬质 Hard	>60	31	47.0
混合 Mixed	40~60	13	19.7
软质 Soft	<40	22	33.3

表 2 青海省小麦硬度基因类型

Table 2 Puroindoline type of 66 Qinghai wheat cultivars

Puroindoline a	Puroindoline b	品种数 Number of cultivars	比例 Percentage	代表品种 Cultivars
<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1a</i>	39	59.09%	青春 570,青春 587,高原 363,互麦 14,柴春 044,瀚海 304,宁春 26,青农 524,高原 412,青春 415,青春 952,高原 466,高原 465,高原 182,高原 932,高原 448,互麦 13,乐麦 6 号,源卓 3,高原 205,高原 584,高原 158,互助红,互麦 11,互麦 12,民和 853,民和 588,乐麦 5 号,阿勃,青农 469,新哲 9 号,香农 3,柴春 018,山旱 901,墨波,张春 811,通麦 1,兰天 3,高原 356 Qingchun 570, Qingchun 587, Gaoyuan 363, Humai 14, Chaichun 044, Hanhai 304, Ningchun 26, Qingnong 524, Gaoyuan 412, Qingchun 415, Qingchun 952, Gaoyuan 466, Gaoyuan 465, Gaoyuan 182, Gaoyuan 932, Gaoyuan 448, Humai 13, Lemai 6, Yuanzhuo 3, Gaoyuan 205, Gaoyuan 584, Gaoyuan 158, Huzhuhong, Humai 11, Humai 12, Minhe 853, Minhe 588, Lemai 5, Abo, Qingnong 469, Xinzhe 9, Xiangnong 3, Chaichun 018, Shanhan 901, Mobo, Zhangchun 811, Tongmai 1, Lantian 3, Gaoyuan 356
<i>Pina-D1b</i>	<i>Pinb-D1a</i>	10	15.15%	青春 254,高原 602,高原 v028,高原 448,高原 115,墨引 1,墨引 2,曹选 5,高原 142,高原 437 Qingchun 254, Gaoyuan 602, Gaoyuan v028, Gaoyuan 448, Gaoyuan 115, Moyin 1, Moyin 2, Caoxuan 5, Gaoyuan 142, Gaoyuan 437
<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1b</i>	10	15.15%	青春 37,高原 506,高原 175,高原 913,高原 314,柴春 236,柴春 901,甘春 20,东春 1,高原 338 Qingchun 37, Gaoyuan 506, Gaoyuan 175, Gaoyuan 913, Gaoyuan 314, Chaichun 236, Chaichun 901, Ganchun 20, Dongchun 1, Gaoyuan 338
<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1c</i>	6	9.09%	青春 38,青春 39 青春 533,青春 144,青春 891,互麦 15 Qingchun 38, Qingchun 39, Qingchun 533, Qingchun 144, Qingchun 891, Humai 15
<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1x</i>	1	1.52%	高原 671 Gaoyuan 671

### 2.3 Puroindoline 基因等位变异类型对籽粒硬度的影响

5 种 Puroindoline 基因等位变异类型中,野生型的硬度指数平均值最小,仅为 44.12;其他基因型的硬度指数均显著高于野生型(表 3)。*Pinb-D1c* 类型的硬度指数最高,为 77.21; *Pinb-D1x* 类型的硬度指数次之,为 67.51; *Pina-D1b* 和 *Pinb-D1b* 类型的硬度指数分别为 65.53 和 64.39。*Pinb-D1c* 类型的硬度指数显著高于 *Pinb-D1b* 类型,而 *Pinb-D1c* 与 *Pina-D1b* 类型之间以及 *Pina-D1b* 和 *Pinb-D1b* 类型之间硬度指数差异均不显著。

表 3 不同 Puroindoline 基因类型的籽粒硬度指数

Table 3 Relation between puroindoline genotype and grain character

基因型 Genotype	样品数 Cultivar number	SKCS 硬度指数 SKCS hardness		
		平均值 Average	SD	变化范围 Range
<i>Pina-D1a/Pinb-D1b</i>	10	64.39b	5.71	56.89~72.59
<i>Pina-D1a/Pinb-D1c</i>	6	77.21a	2.02	74.81~80.08
<i>Pina-D1b/Pinb-D1a</i>	10	65.53ab	11.84	41.61~75.94
<i>Pina-D1a/Pinb-D1a</i>	39	44.12c	18.58	12.75~84.89
<i>Pina-D1a/Pinb-D1x</i>	1	67.51		
总计 Total	66	53.67	19.45	12.75~84.89

同列数值后无相同字母表示不同基因型间差异显著( $P < 0.05$ )。

The different letters after values with in a same column represent the difference significance among the genotypes at the 0.05 level.

### 3 讨论

青海省 66 个小麦育成品种的平均硬度指数为 53.67,变化范围为 12.75~84.89。与我国其他省区相比,硬度指数为中等。66 个小麦品种中硬质麦占 47.0%,混合麦的比例为 19.7%,软质麦比例仅为 33.3%。岳淑芬等<sup>[18]</sup>研究认为,青藏高原冬春麦中混合类型比例偏高,而陈锋的研究又认为青藏高原没有软质小麦品种<sup>[19]</sup>。这些研究结果的差异可能是由于所收集到的品种不同所造成的。本研究中所采用的 66 个小麦品种是青海省编写品种志时所能收集到的育成品种,能够代表该省小麦的遗传特征。

本研究中,Puroindoline 的野生型品种有 39 份,占参试品种数的 59.09%,平均硬度指数为 44.12,变化范围为 12.75~84.89。除 22 份软质小麦,有 17 份材料虽然具有野生型的 Puroindoline,但其籽粒硬度表现为混合型或硬质小麦。这种具有野生型的 Puroindoline 的小麦品种仍表现为硬质小麦,需要进一步的研究来揭示其遗传机理。同时野生型小麦品种表现为硬质小麦的比例也远高于国内的其他研究,其原因可能由于青海小麦收获时,天气干燥,籽粒脱水干燥快,容易形成硬质籽粒性状。参试小麦品种除极少数表现为混合类型外,均为硬质麦。因此,在青海省利用突变类型的分子标记进行硬质小麦品种选育是可行的,而软质小麦新品种的选育,需在利用 Puroindoline 野生型的分子标记筛选的基础进一步考察籽粒硬度性状的表现型。

4 种 Puroindoline 基因变异类型分别为 *Pinb-D1b*、*Pinb-D1c*、*Pinb-D1x* 及 *Pina-D1b* 类型。*Pinb-D1b* 和 *Pina-D1b* 类型比例达到 15.15%。有研究表明,*Pinb-D1b* 类型的磨粉、面包烘焙品质以及面条和馒头的加工品质均优于 *Pina-D1b* 类型<sup>[9]</sup>。本研究中,*Pinb-D1b* 类型和 *Pina-D1b* 类型比例相当,因此在以后进行面包、馒头和面条类型的小麦新品种培育过程中,应当充分考虑 *Pina-D1b* 类型带来的不利影响,降低 *Pina-D1b* 比例,提高 *Pinb-D1b* 的比例。本研究发现,有 6 份材料属于 *Pinb-D1c* 类型,硬度指数显著高于 *Pinb-D1b*,但差异不显著,这与陈锋等<sup>[19]</sup>的研究结果一致。另外,在该地区发现了 *Pinb-D1x* 类型,此类型在青海育成品种中也只有 1 份材料即高原 671,籽粒硬度指数为 67.51,为典型的硬质麦。因为该类型材料数量较少,未与其他类型进行平均数的差异显著性比较,因此该类型与其他类型之间硬度差异也需进一步探讨。

#### 参考文献:

- [1] Sourdille P, Perretant M R, Charmet G, et al. Linkage between RSLP markers and genes affecting kernel hardness in wheat [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1996, 93(4): 580-586.
- [2] Guo S H (郭世华), He Z H (何中虎), Ma Q (马庆), et al. The research advance of kernel hardness in wheat [J]. *Journal of Triticeae Crops* (麦类作物学报), 2005, 25(2): 107-11 (in Chinese with English abstract).
- [3] Greenwell P, Schofield J D. A starch granule protein associat-

- ed with endosperm softness in wheat [J]. *Cereal Chemistry*, 1986, 63(4): 379-380.
- [4] Xia L Q, Chen F, He Z H, *et al.* Occurrence of Puroindoline alleles in Chinese winter wheats [J]. *Cereal Chemistry*, 2005, 82(1): 38-43.
- [5] Chang C, Zhang H P, Xu J, *et al.* Identification of allelic variations of Puroindoline genes controlling grain hardness in wheat using a modified denaturing PAGE [J]. *Euphytica*, 2006, 152(2): 225-234.
- [6] Li G Y, He Z H, Lillemo M, *et al.* Molecular characterization of allelic variations at *Pina* and *Pinb* loci in Shandong wheat landraces, historical and current cultivars [J]. *Journal of Cereal Science*, 2008, 47(3): 510-517.
- [7] Ram S, Jain N, Shoran J, *et al.* New frame shift mutation in Puroindoline B in Indian wheat cultivars Hyb65 and NI5439 [J]. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 2005, 14(1): 45-8.
- [8] Xia L Q(夏兰芹), He Z H(何中虎), Chen X M(陈新民), *et al.* Cloning and sequence analysis of gene *Pina* and *Pinb* for kernel hardness in wheat [J]. *Acta Agronomica Sinica* (作物学报), 2003, 29(1): 25-30 (in Chinese with English abstract).
- [9] Martin J M, Froberg R C, Morris C F, *et al.* Milling and bread baking traits associated with Puroindoline sequence type in hard red spring wheat [J]. *Crop Science*, 2001, 41(1): 228-34.
- [10] Zhang H G(张怀刚), Eczarnecki O. Comparative study of spring wheat cultivars between China and Canada [J]. *Collected Papers of Plateau Biology* (高原生物学集刊), 1992, 11(1): 51-62 (in Chinese with English abstract).
- [11] Shang W(桑伟), Mo P Y(穆培源), Xu H J(徐红军), *et al.* Study on the grain traits, milling quality and their relationships in Xinjiang winter and spring wheat cultivars [J]. *Journal of Triticeae Crops* (麦类作物学报), 2010, 30(1): 50-55 (in Chinese with English abstract).
- [12] Zhang F Y(张福彦), Chen F(陈锋), Dong Z D(董中东), *et al.* Molecular identification of hardness-related genes of bread wheat new lines in Huanghuai wheat region and their influence on yield characters [J]. *Scientia Agricultura Sinica* (中国农业科学), 2011, 44(16): 3289-3296 (in Chinese with English abstract).
- [13] Zhang J(张晶), Zhang X K(张晓科), Wang K Z(王可珍), *et al.* Distribution of grain hardness in Shaanxi wheats and Puroindoline genotypes of hard wheats [J]. *Journal of Triticeae Crops* (麦类作物学报), 2011, 31(4): 666-671 (in Chinese with English abstract).
- [14] Gaines C S, Finney P F, Fleege L M, *et al.* Predicting a hardness measurement using the single-kernel characterization system [J]. *Cereal Chemistry*, 1996, 73(2): 278-83.
- [15] Ohm J B, Chung O K, Deyoe C W. Single-kernel characteristics of hard winter wheats in relation to milling and baking quality [J]. *Cereal Chemistry*, 1998, 75(1): 156-161.
- [16] Chen F(陈锋), He Z H(何中虎), Xia X C(夏先春). The tests of genetic variations of kernel hardness in wheat CIM-MYT [J]. *Acta Agronomica Sinica* (作物学报), 2005, 31(10): 1277-83 (in Chinese with English abstract).
- [17] Zhang Q J(张岐军). The evaluation of biscuit quality in soft wheat [D]. Beijing: A thesis of master's degree in Chinese Agriculture Institute, 2004 (in Chinese with English abstract).
- [18] Yue S F(岳淑芳), Guo S H(郭世华), Hou G F(侯国峰), *et al.* The study of distribution of kernel hardness in wheat [J]. *Journal of Inner Mongolia Agricultural University* (内蒙古农业大学学报), 2008, 29(2): 31-36 (in Chinese with English abstract).
- [19] Chen F(陈锋), He Z H(何中虎), Chen D S(陈东升), *et al.* The genetice variation detection of gene Puroindoline of kernel hardness in Chinese spring wheat [J]. *Scientia Agricultura Sinica* (中国农业科学), 2007, 40(2): 217-224 (in Chinese with English abstract).