



青海糯性春小麦综合标记辅助育种研究

刘永安^{1,2}, 陈志国¹, 王海庆¹, 沈裕琥¹, 窦全文¹*

(1 中国科学院 西北高原生物研究所, 西宁 810001; 2 中国科学院 研究生院, 北京 100039)

摘要: 选用全糯小麦品种‘糯麦 1 号’与青海主要栽培品种‘阿勃’杂交, 综合利用改良碘染色法、SDS-PAGE 法和 *Waxy* 基因的分子标记等, 对杂交后代进行了鉴定筛选。最终从 F₂ 代鉴定出了 5 粒全糯种子, 从 F₃ 代鉴定出 8 株 *Wx-B1* 亚基缺失的植株。对全糯株系 F₃ 代的农艺性状进行评价, 5 个全糯株系的综合农艺性状都优于‘糯麦 1 号’, 与‘阿勃’较接近。测定全糯株系和 *Wx-B1* 亚基缺失植株 F₄ 代种子的直链淀粉含量, 5 个全糯株系 F₄ 代种子的直链淀粉含量接近于 0, 8 个 *Wx-B1* 亚基缺失植株 F₄ 代种子的直链淀粉含量在总体上比‘阿勃’的直链淀粉含量低。研究表明, 采用综合标记辅助选择可快速而准确地获得适合在青海栽培的全糯和部分糯性小麦。

关键词: 糯性小麦; 分子标记; *Waxy* 蛋白; SDS-PAGE; 直链淀粉

中图分类号: Q789 文献标识码: A

Integrated Marker-assisted Selection on Waxy Spring Wheat in Qinghai

LIU Yong-an^{1,2}, CHEN Zhi-guo¹, WANG Hai-qing¹, SHEN Yu-hu¹, DOU Quan-wen¹*

(1 Northwest Plateau Institute of Biology, the Chinese Academy of Sciences, Xining 810001, China; 2 Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Abstract: Hybridization was made between waxy wheat cultivar ‘Nuomai 1’ and spring wheat cultivar ‘Abbondanza’ which is popularized in Qinghai region. The progenies were identified and screened with improved iodine dyeing method, SDS-PAGE and *Waxy* gene molecular marker. The results showed that 5 waxy kernels among F₂ and 8 plants with null *Wx-B1* among F₃ were identified. Evaluation of the agronomic traits of the 5 waxy lines in F₃ showed that the comprehensive agronomic traits of them were better than that of waxy wheat ‘Nuomai 1’, but were similar to that of ‘Abbondanza’. Amylose content of target lines and plants in F₄ were determined. The results showed that the amylose content of the 8 plants with null *Wx-B1* were lower than ‘Abbondanza’ on the whole, the amylose content of the 5 waxy lines were almost zero. It showed that we could get waxy and partial waxy wheat quickly and accurately by using integrated marker-assisted selection.

Key words: waxy wheat; molecular marker; *Waxy* protein; SDS-PAGE; amylose

淀粉是小麦籽粒的主要成分之一, 包括直链淀粉和支链淀粉两部分, 约占成熟籽粒的 65% 左右^[1]。据研究, 颗粒结合淀粉合成酶 (granule-bound starch synthase I, 简称 GBSS I), 亦称 *Waxy* (简称 *Wx*) 蛋白, 控制直链淀粉的合成^[2]。普通六倍体小麦的胚乳中

含有 3 个 *Waxy* 蛋白亚基: *Wx-A1*、*Wx-B1* 和 *Wx-D1*, 其控制基因分别位于 7AS、4AL 和 7DS 上^[3,4], 其表达型等位基因称为 *wx-A1a*、*wx-B1a* 和 *wx-D1a*, 缺失型等位基因称为 *wx-A1b*、*wx-B1b* 和 *wx-D1b*。小麦直链淀粉含量与 *Wx* 蛋白相对含量呈高度正相关,

* 收稿日期: 2007-11-23; 修改稿收到日期: 2008-04-28

基金项目: 中国科学院院长基金

作者简介: 刘永安 (1980 -), 男 (汉族), 在读硕士研究生, 主要从事植物遗传育种研究。E-mail: liuanliuan123@163.com

* 通讯作者: 窦全文, 博士, 副研究员, 主要从事小麦遗传育种研究。E-mail: douqw@nwipb.ac.cn

不同 W_x 蛋白亚基缺失时,直链淀粉合成能力有不同程度的下降^[5-8],缺失 W_x-B1 亚基时,直链淀粉含量下降最大, W_x-D1 亚基次之, W_x-A1 亚基最小。如果 3 个 W_x 蛋白亚基同时缺失,则其胚乳中直链淀粉的含量接近于 0,称为糯小麦。在食品加工中,缺失 W_x-B1 亚基的小麦品种,其面粉的直链淀粉含量较低,高峰黏度大,膨胀势高,面条加工品质优良^[9,10]。另外,在普通小麦粉中添加适量的糯小麦粉,可以提高面条的色泽和光滑性,增加面条的韧性和粘性,改善馒头的口感和储藏性能^[11,12]。

春小麦是青海省的主要粮食作物之一,播种面积和总产分别占全省粮食播种面积和总产的 50% 和 60%。青海省又是全国小麦著名的高产区,1978、1984 和 1988 年曾 3 次出现产量 15 t/hm² 以上的高产记录。但由于过去在品种引进与选育时,只注重丰产、早熟、抗病性等农艺性状,忽视了对品质的选择,加上高原独特的自然生态条件对春小麦品质的负面影响,造成青海省春小麦加工品质普遍比内地小麦品质差,主要表现为小麦蛋白质含量低,面筋的延伸性、粘弹性差等^[13],用其做成的面条、饺子等水煮制品,耐煮性和口感均不佳,易断条、糊汤;制作的馒头起发性差,无弹性、粘牙。随着人民生活水平的提高,人们对食品品质的要求也越来越高,提高春小麦的品质已成为青海省春小麦育种的主要研究内容之一。

利用 SDS-PAGE 方法可对 3 个 W_x 蛋白亚基进行鉴定,但由于 W_x-B1 亚基和 W_x-D1 亚基的分子量和等电点相近,分离效果不佳,而且仅能用于鉴定小麦籽粒。而分子标记是基于 DNA 水平上的遗传标记,在小麦整个发育时期任何部位都可以取材检测,不受小麦生长季节的限制,具有准确性好、效率高的特点,弥补了 SDS-PAGE 方法的不足。近年来,随着对普通六倍体小麦 3 个 W_x 基因的分离和测序^[14],以及对这 3 个基因 DNA 序列特点的分析,国内外已开发了多个 W_x 基因的分子标记^[15-17],如 Briney 等设计的 W_x-B1 位点引物,宋建民等设计的 W_x-A1 和 $D1$ 位点引物。利用这些分子标记可快速鉴定小麦品种或杂(回)交后代分离群体中的个体所含有的 W_x 基因类型,对培育和改良糯性小麦有重要意义。

本研究综合利用改良碘染色法、SDS-PAGE 方法和 W_x 基因分子标记,从不同角度和层次来鉴定各亲本及杂交后代 W_x 基因类型,并在早期测定各个中选植株籽粒的直链淀粉含量,结合农艺性状的

鉴定,以期培育出适宜在青海种植的全糯和部分糯性的春小麦新品种。

1 材料和方法

1.1 材料

本研究所用的材料主要为‘糯麦 1 号’(缺失 W_x-A1 、 W_x-B1 和 W_x-D1 亚基)和‘阿勃’(非糯,为在青海广泛种植的春小麦品种),并以部分糯性小麦‘关东 107’(缺失 W_x-A1 、 W_x-B1 亚基)‘江苏白火麦’(缺失 W_x-D1 亚基)和‘荷兰小麦’(缺失 W_x-A1 亚基)作为对照。

1.2 方法

1.2.1 杂交后代的选择与分析 将‘糯麦 1 号’与‘阿勃’杂交,得到少量 F_1 代种子; F_1 代种子自交而得到 F_2 代种子,用改良碘染色法鉴定出全糯种子,鉴定出的全糯种子连续自交得到 F_4 代种子;对于其它 F_2 代种子(包括部分糯性和非糯性)根据 F_2 代植株主要农艺性状(株高、穗长、小穗数、穗粒数和熟性等)从中选出农艺性状表现较好的植株,利用 SDS-PAGE 电泳鉴定中选植株的 F_3 代种子(每株鉴定 1 粒种子),从中筛选出 W_x-B1 亚基缺失的种子,再用分子标记进一步鉴定其 W_x 基因类型,将这些 F_3 代植株自交而得到 F_4 代种子。

1.2.2 改良碘染色法 参照杜壮丽等^[18]的方法,并略有改动。用电工钢丝钳的钳刃将小麦籽粒远离胚 1/3 部分夹下,再用钳咀将其夹碎,置于一张干净称量纸上,用研钵棒仔细研磨,将磨好的面粉转移到 1.5 mL 的离心管中,加入 400 μ L 蒸馏水和 40 μ L 0.2% I₂-KI 溶液,充分振荡。若离心管内的颜色为棕红色,则认为被鉴定的小麦籽粒为全糯;若离心管内的颜色为蓝色,则认为被鉴定的小麦籽粒为部分糯性或非糯。

1.2.3 W_x 蛋白提取和 SDS-PAGE 电泳 W_x 蛋白提取液、洗液以及浓缩胶和分离胶的配制参照潘志芬等^[19]的方法, W_x 蛋白提取过程参照王子宁等^[20]和余春梅等^[21]的方法,对上样和染色方法进行了改进,即将得到的 W_x 蛋白室温干燥 10 min 后,加入 30 μ L W_x 蛋白提取液,沸水浴 5 min;将其 30 μ L W_x 蛋白提取液全部上样;80 V 稳压电泳 20 h,考马斯亮蓝染色 4 h,用考马斯亮蓝脱色液脱色至条带清晰;倒掉脱色液,将胶片保存在自来水中。

1.2.4 DNA 提取和 W_x-A1 、 $B1$ 和 $D1$ 位点鉴定 参照柴建芳等^[22]的方法提取 DNA。鉴定 W_x-A1 、 $B1$ 和 $D1$ 位点时,PCR 扩增体系均为 25 μ L,包括

2.5 μL 10 \times PCR Buffer (含 Mg^{2+} 离子), 1 μL dNTPs(各 2.5 mmol/L), 5 端引物、3 端引物各 1 μL (10 $\mu\text{mol/L}$), 0.3 μL *Taq* 酶(5 U/ μL), 1 μL 模板 DNA, 18.2 μL 重蒸水。

鉴定 W_x-A1 位点时, 5 端引物为 5-GCAT-GAACCTCGTGTTC-3; 3 端引物为 5-TGATCT-GCGAGATCCAG-3^[17]。扩增条件为 94 2 min; 94 30 s, 48 45 s, 72 1 min, 35 个循环; 72 5 min。扩增产物在 8% 的 PAGE 胶(Acr bis = 29 1) 上电泳。

鉴定 W_x-B1 位点时, 5 端引物为 5-AACCAG-CA GCGCTTCA GCCT-3; 3 端引物为 5-TTGA GCT-GCGCGAA GTCGTC-3^[16]。扩增条件为 94 2 min; 94 30 s; 56 40 s, 72 50 s, 35 个循环; 72 10 min。扩增产物在 8% 的 PAGE 胶(Acr bis = 29 1) 上电泳。

鉴定 W_x-D1 位点时, 5 端引物为 5-CGCTC-CCTGAA GA GA GAAA GAA-3; 3 端引物为 5-TA GTGCGTCCA GACTCACAG-3^[17]。扩增条件为 94 2 min; 94 30 s, 60 45 s, 72 1 min, 35 个循环; 72 10 min。扩增产物在 2% 琼脂糖凝胶上电泳。

1.2.5 小麦籽粒中直链淀粉含量的测定与全糯株系农艺性状的评价 参照潘志芬等^[23]的方法进行籽粒直链淀粉含量的测定。在成熟期测定 5 个全糯 (F_3 代) 株系的株高、穗长、穗粒数、千粒重等主要农艺性状, 用 SPSS 对数据进行分析, SSR 检验进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 改良碘染色法对糯性小麦的鉴定和筛选

利用改良碘染色法鉴定时, 当小麦籽粒中含有直链淀粉, 离心管内的颜色为蓝色; 当只有支链淀粉(直链淀粉含量为 0) 时, 离心管内的颜色呈棕红色。‘阿勃’、‘关东 107’、‘江苏白火麦’和‘荷兰小麦’的颜色为蓝色, ‘糯麦 1 号’的颜色为棕红色, 在‘糯麦 1 号’ \times ‘阿勃’ F_2 代中检测到 5 粒种子的颜色为棕红色, 表明这 5 粒种子只含有支链淀粉(图 1)。

2.2 SDS-PAGE 对糯性小麦的鉴定和筛选

改良碘染色法只能鉴定小麦籽粒是否全糯, 而不能区分非糯和部分糯性小麦, 于是采用 SDS-PAGE 鉴定小麦籽粒 W_x 蛋白亚基类型。由图 2, A 可以看出, ‘阿勃’的 3 个 W_x 蛋白亚基都不缺失, ‘荷兰小麦’缺失 W_x-A1 亚基, ‘江苏白火麦’缺失

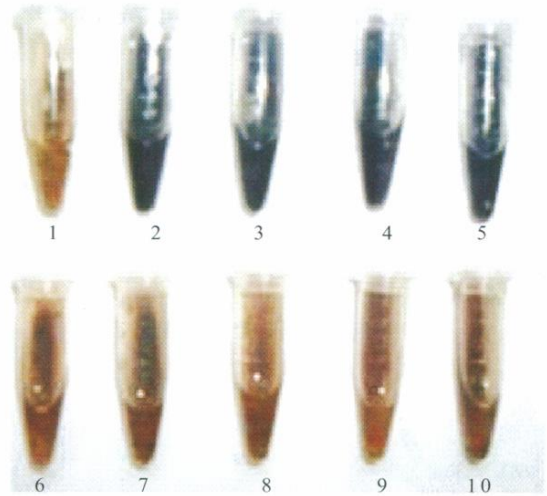


图 1 改良碘染色法鉴定糯小麦籽粒的结果

1. 糯麦 1 号; 2. 阿勃; 3. 江苏白火麦; 4. 荷兰小麦; 5. 关东 107; 6~10. 全糯籽粒

Fig. 1 The identification of waxy wheat kernels using improved iodine dyeing method

1. Nuomai 1; 2. Abbondanza; 3. Jiangsu baihuomai; 4. Holland wheat; 5. Kanto 107; 6~10. waxy grains

W_x-D1 亚基, ‘关东 107’缺失 W_x-A1 和 W_x-B1 亚基, ‘糯麦 1 号’缺失 3 个 W_x 蛋白亚基, 这与已知的结果相同。图 2, B、C 为鉴定杂交后代的结果, 其中图 2, B 中的第 7 泳道缺失 W_x-B1 亚基, 第 8 泳道缺失 W_x-A1 和 W_x-B1 亚基, 第 9 泳道缺失 W_x-A1 亚基, 并可能缺失 W_x-B1 亚基; 图 2, C 中的第 1~4 泳道都缺失 3 个 W_x 蛋白亚基, 说明这 4 粒种子为全糯小麦。通过 W_x 蛋白的 SDS-PAGE 鉴定, 从‘糯麦 1 号’ \times ‘阿勃’ F_3 代种子中筛选出 26 粒 W_x-B1 亚基缺失或可能缺失的种子, 在这 26 粒种子中, 有 2 粒还缺失 W_x-A1 亚基, 1 粒缺失 W_x-D1 亚基, 同时也验证了用改良碘染色法鉴定出来的 5 个全糯小麦株系(‘糯麦 1 号’ \times ‘阿勃’ F_3 代)。

2.3 分子标记对糯性小麦的鉴定和筛选

2.3.1 W_x-A1 位点的分子标记 W_x-A1 位点为 w_x-A1b 的植株, 其扩增产物有 327 bp 条带, 而 W_x-A1 位点为 w_x-A1a 的植株则没有此带^[17]。从图 3, A 可以看出, ‘糯麦 1 号’、‘关东 107’和‘荷兰小麦’的扩增产物都有 327 bp 条带, 而‘江苏白火麦’和‘阿勃’没有此带。图 3, B 为部分杂交后代 W_x-A1 位点的分子标记结果, 其中, 第 4 和第 5 泳道有 327 bp 条带, 说明这 2 株后代 W_x-A1 位点为 w_x-A1b , 即缺失 W_x-A1 亚基。

2.3.2 W_x-B1 位点的分子标记 W_x-B1 位点为 *w_x-B1a* 的植株,其扩增产物有 440 bp 条带,而 W_x-B1 位点为 *w_x-B1b* 的植株则没有此带^[16]。‘糯麦 1 号’和‘关东 107’的扩增产物没有 440 bp 条带,而‘江苏白火麦’、‘荷兰小麦’和‘阿勃’都有此带(图 4,A)。图 4,B 为部分杂交后代 W_x-B1 位点的分子标记结果,从中可以看出第 3、第 5 和第 8 泳道没有 440 bp 条带,说明这 3 株后代 W_x-B1 位点为 *w_x-B1b*,即缺失 W_x-B1 亚基。

2.3.3 W_x-D1 位点的分子标记 W_x-D1 位点为

w_x-D1a 的植株,其扩增产物有 700 bp 条带,而 W_x-D1 位点为缺失型 *w_x-D1b* 的植株则没有此带^[17]。‘糯麦 1 号’和‘江苏白火麦’W_x-D1 位点为 *w_x-D1b*,因而它们没有 700 bp 条带,而‘关东 107’、‘荷兰小麦’和‘阿勃’W_x-D1 位点为 *w_x-D1a*,因而它们的扩增产物有此带(图 5,A)。从图 5,B 部分杂交后代 W_x-D1 位点的分子标记结果可以看出,第 3 泳道没有 700 bp 条带,说明该植株 W_x-D1 位点为 *w_x-D1b*,即缺失 W_x-D1 亚基。

利用 W_x-A1、W_x-B1 和 W_x-D1 位点的分子标

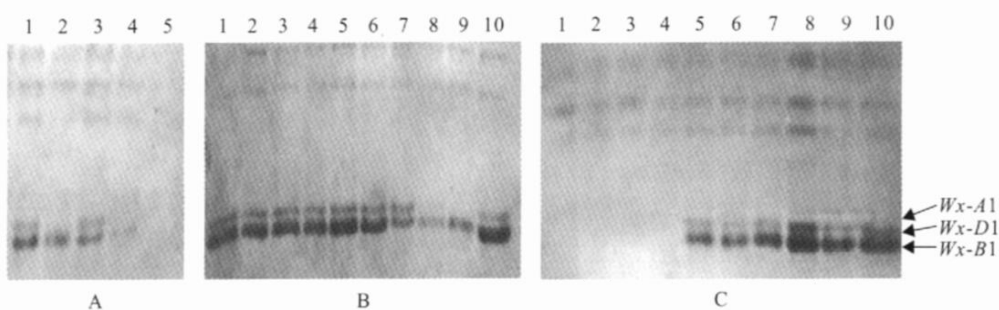


图 2 小麦不同植株 Waxy 蛋白 SDS-PAGE 电泳图谱

A: 1. 阿勃; 2. 荷兰小麦; 3. 江苏白火麦; 4. 关东 107; 5. 糯麦 1 号; B, C: 1~10. 杂交后代植株

Fig. 2 The SDS-PAGE of waxy protein in different wheat plants

A: 1. Abbondanza; 2. Holland wheat; 3. Jiangsu baihuomai; 4. Kanto 107; 5. Nuomai 1; B, C: 1~10. Descendants from crossing

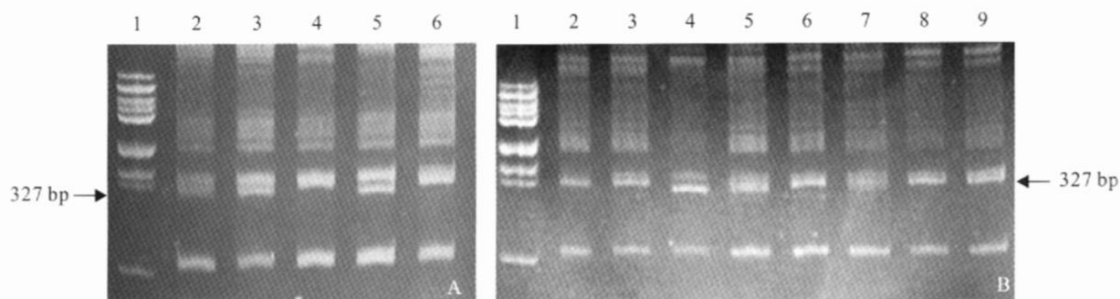


图 3 W_x-A1 位点 PCR 扩增产物 8% PAGE 图谱

A: 1. Marker, 2. 糯麦 1 号, 3. 关东 107, 4. 江苏白火麦, 5. 荷兰小麦, 6. 阿勃; B: 1. Marker, 2~9 为部分杂交后代植株。下同

Fig. 3 8% PAGE of PCR products amplified by W_x-A1 specific tagged sequences

A: 1. Marker, 2. Nuomai 1, 3. Kanto 107, 4. Jiangsu baihuomai, 5. Holland wheat, 6. Abbondanza;

B: 1. Marker, 2~9 are some descendants from crossing. The same as below

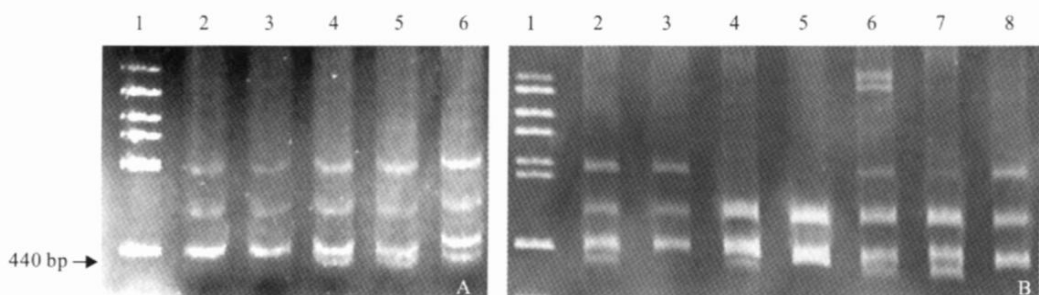


图 4 W_x-B1 位点 PCR 扩增产物 8% PAGE 图谱

Fig. 4 8% PAGE of PCR products amplified by W_x-B1 specific tagged sequences

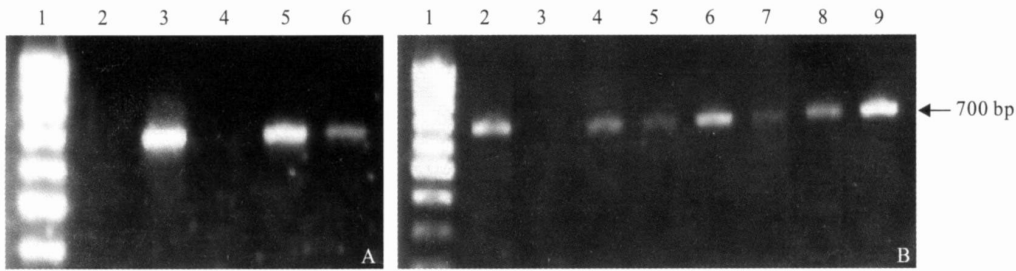


图 5 W_x -D1 位点 PCR 扩增产物 2% 琼脂糖凝胶电泳图谱

Fig. 5 2% agarose gels of PCR products amplified by W_x -D1 specific tagged sequences

记,从 SDS-PAGE 筛选出来的 26 粒种子长出的植株中准确鉴定出 8 株 W_x -B1 亚基真正缺失的植株,同时确定有 2 株既缺失 W_x -B1 亚基,又缺失 W_x -A1 亚基,有 1 株既缺失 W_x -B1 亚基,又缺失 W_x -D1 亚基。

2.4 直链淀粉含量测定结果

为了解上述后代和各亲本籽粒中直链淀粉含量的情况,对其 F_4 代株系种子进行了测定。结果表明

(表 1),部分糯性(缺失 1 个或 2 个 W_x 蛋白亚基)植株,其直链淀粉含量在 11.97% ~ 18.01% 之间,在总体上比‘阿勃’的直链淀粉含量(19.74%)低。‘糯麦 1 号’以及全糯株系 1 ~ 5 的直链淀粉含量呈负值,其原因主要是因为小麦种皮中不含淀粉,且不易磨碎,在碱分散液中易吸附沉淀,分散度较差,造成测定结果偏小^[23],这表明‘糯麦 1 号’以及全糯株系 1 ~ 5 的直链淀粉含量极低,可以说接近于 0。

表 1 不同小麦植株的直链淀粉含量

Table 1 Amylose content of different wheat plants

亲本或杂交后代 Parent or their descendant	W_x 基因类型 Type of W_x gene	直链淀粉含量 Amylose content/ %	杂交后代 Descendant	W_x 基因类型 Type of W_x gene	直链淀粉含量 Amylose content/ %
糯麦 1 号 Nuomai 1	$w_xA1b, B1b, D1b$	- 1.90	部分糯性后代 5 号单株 Partial Wx descendant plant 5	$w_xA1a, B1b, D1a$	17.08
关东 107 Kanto 107	$w_xA1b, B1b, D1a$	14.99	部分糯性后代 6 号单株 Partial Wx descendant plant 6	$w_xA1a, B1b, D1a$	18.01
荷兰小麦 Holland wheat	$w_xA1b, B1a, D1a$	15.76	部分糯性后代 7 号单株 Partial Wx descendant plant 7	$w_xA1a, B1b, D1a$	11.97
江苏白火麦 Jiangsu baihuomai	$w_xA1a, B1a, D1b$	19.61	部分糯性后代 8 号单株 Partial Wx descendant plant 8	$w_xA1a, B1b, D1a$	14.89
阿勃 Abbondanza	$w_xA1a, B1a, D1a$	19.74	全糯株系 1 Wx line 1	$w_xA1b, B1b, D1b$	- 0.68
部分糯性后代 1 号单株 Partial Wx descendant plant 1	$w_xA1a, B1b, D1a$	16.50	全糯株系 2 Wx line 2	$w_xA1b, B1b, D1b$	- 0.74
部分糯性后代 2 号单株 Partial Wx descendant plant 2	$w_xA1a, B1b, D1b$	16.88	全糯株系 3 Wx line 3	$w_xA1b, B1b, D1b$	- 1.64
部分糯性后代 3 号单株 Partial Wx descendant plant 3	$w_xA1b, B1b, D1a$	14.80	全糯株系 4 Wx line 4	$w_xA1b, B1b, D1b$	- 0.58
部分糯性后代 4 号单株 Partial Wx descendant plant 4	$w_xA1b, B1b, D1a$	14.41	全糯株系 5 Wx line 5	$w_xA1b, B1b, D1b$	- 2.41

表 2 不同品种或株系的主要农艺性状

Table 2 The main agronomic traits of different cultivars or lines

品种或株系 Cultivar or line	株高 Plant height/ cm	穗长 Spike length/ cm	总小穗数(个) Total spikelet number	不实小穗数(个) Sterile spikelet number	穗粒数(粒) Grain per spike	千粒重 1 000-grain weight/ g
阿勃 Abbondanza	95.95 bAB	8.90 aA	16.55 abAB	0.55 aA	48.20 bB	42.27aA
糯麦 1 号 Nuomai 1	64.00 fE	6.70 bB	14.00 cC	0.10 aA	39.80 cC	17.93gG
全糯株系 1 Wx line 1	86.50 cdCD	9.53 aA	16.15 abAB	0.40 aA	48.00 bB	33.40dD
全糯株系 2 Wx line 2	81.47 deD	8.93 aA	15.73 bAB	0.00 aA	52.00 abAB	24.67fF
全糯株系 3 Wx line 3	79.00 eD	9.25 aA	15.67 bB	0.17 aA	53.17 abAB	26.60eE
全糯株系 4 Wx line 4	91.60 bcBC	9.38 aA	16.20 abAB	0.55 aA	48.95 bAB	39.17bB
全糯株系 5 Wx line 5	102.70 aA	8.90 aA	17.25 aA	0.60 aA	56.15 aA	37.32cC

2.5 全糯株系的农艺性状

将早期鉴定出来的5个全糯株系 F_3 代的种子播于大田中,成熟期测定这些株系和亲本的主要农艺性状。结果表明(表2),各全糯株系的株高分布在79.00~102.70 cm之间;总小穗数分布在15.67~17.25个之间;穗粒数分布在48.00~56.15粒之间;千粒重分布在24.67~39.17 g之间,综合农艺性状均比‘糯麦1号’好,已经与青海省大面积种植的‘阿勃’接近。

3 讨论

本研究从不同角度和层次验证了‘糯麦1号’和‘阿勃’等的 W_x 基因类型,并对其杂交后代分离群体进行鉴定和筛选。在研究中使用的几种方法能够相互补充、相互验证,说明本研究所得到的结果是可信的。在以往的研究中所用的碘染色法^[24],是用刀片将远离胚的一端剖开,用0.2% I_2 -KI溶液染色,由于观察面小,再加上 I_2 -KI溶液用量的不同,容易造成错误的判断,而采用改良碘染色法,观察面大,鉴定各样品时 I_2 -KI溶液用量一致,因而所得到的结果十分可靠。另外,本研究在用SDS-PAGE鉴定小麦籽粒 W_x 蛋白亚基类型时,改进了上样和染色方法,即将每个样品所提取的 W_x 蛋白全部上样,采用考马斯亮蓝染色。结果表明,该方法与姚大年等^[25]和王子宁等^[20]的方法相比,在上样时增加了 W_x 蛋白的浓度和上样量,将繁琐的银染法改为较

简单的考马斯亮蓝染色,同样得到清晰的条带,降低了实验难度,提高了试验效率。

本研究虽然改进了SDS-PAGE方法,但该方法的效率仍然较低,不能十分准确地判断 W_x -B1亚基、 W_x -D1亚基是否缺失,以及缺失其中的哪个亚基。而用分子标记鉴定 W_x 基因类型,具有较高的效率和准确性。根据本实验中的体会,先用改良碘染色法鉴定小麦籽粒是否全糯,再用SDS-PAGE法和DNA分子标记鉴定非糯或部分糯性小麦 W_x 基因类型,是鉴定和筛选杂交后代群体比较快捷、有效的方法。

由于 W_x -B1亚基缺失的小麦,其面条加工品质优良,在普通小麦粉中添加适量的糯小麦粉,也可以提高面条的品质,改善馒头的口感和储藏性能,所以本实验中比较注重杂交后代群体中全糯和 W_x -B1亚基缺失植株的筛选,在确定 W_x -B1亚基缺失的基础上,兼顾对 W_x -A1和 W_x -D1亚基缺失的鉴定和筛选。所筛选出来的5个全糯株系的综合农艺性状已经与生产上应用的品种‘阿勃’非常接近;在鉴定出的8株 W_x -B1亚基缺失的植株中,有2株既缺失 W_x -B1亚基,又缺失 W_x -A1亚基,有1株既缺失 W_x -B1亚基,又缺失 W_x -D1亚基。对这些全糯及部分糯性后代作进一步的农艺性状、品质性状以及遗传稳定性的鉴定和筛选,有望在最近1~2年内选育出适合在青海种植的优质小麦新品种(系)。

参考文献:

- [1] RAHMAN S. Genetic manipulation of starch properties in wheat[J]. *Chemistry in Australia*, 1994, **69**(9): 517 - 518.
- [2] MCDONALD F D, PREISS J. Partial purification and characterization of granule-bound starch synthases from normal and waxy maize[J]. *Plant Physical*. ,1985, **78**: 849 - 852.
- [3] NAKAMURA T, YAMAMON M. Identification of three W_x proteins in wheat[J]. *Biochemical*. ,1993, **31**: 75 - 86.
- [4] NAKAMURA T, YAMAMON M, HUDA KA S, *et al.* Variation of starch granule proteins and chromosome mapping of their coding genes in common wheat[J]. *Theor. Appl. Genet.* ,1996, **93**: 275 - 281.
- [5] NAKAMURA T, YAMAMORI M, HOSHINO H, HIDA KA S. Decrease of waxy (W_x) protein in two common wheat cultivars with low amylose content[J]. *Plant Breed*, 1993, **111**(1): 99 - 105.
- [6] ARAKI E, MIURA H, SAWADA S. Differential effects of the null alleles at the three W_x loci on the starch-pasting properties of wheat[J]. *TAG*, 2000, **100**(7): 1113 - 1120.
- [7] YAMAMORI M, QUYNH N T. Differential effects of W_x -A1, B1 and D1 protein deficiencies on apparent amylose content and starch-pasting properties in common wheat[J]. *TAG*, 2000, **100**(1): 32 - 38.
- [8] MIURA H, WICKRAMASINGHE M H A, SUBASINGHE R M, ARAKI E, KOMAE K. Development of near-isogenic lines of wheat carrying different null W_x alleles and their starch properties[J]. *Euphytica*, 2002, **123**(3): 353 - 359.

- [9] ZHAO X C, BATEY I L, SHARP P J, CROSBIE G, *et al.* A single genetic locus associated with starch granule properties and noodle quality in wheat[J]. *J. Cereal Sci.*, 1998, **27**(1): 7 - 13.
- [10] 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]. *J. Cereal Sci.*, 2002, **35**(1): 51 - 63.
- [11] HUANG X F(黄兴峰), SUN H(孙 辉), JIANG W L(姜薇莉), TIAN X H(田晓红). Study of the effect of quality of Chinese noodle which made of glutinous wheat flour and common wheat flour[J]. *Science and Technology of Cereals, Oils and Foods(粮油食品科技)*, 2006, **14**(4): 1 - 4(in Chinese).
- [12] GUO X K(郭学科), DING W P(丁文平). Study of the physicochemical property of waxy wheat flour and its use in steamed bread[J]. *Machinery for Cereals Oil and Food Processing(粮油加工与食品机械)*, 2005, (12): 69 - 71(in Chinese).
- [13] 陈集贤. 青海高原春小麦生理生态[M]. 北京:科学出版社, 1994:159 - 184.
- [14] 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.
- [15] VRINTEN P, NAKAMURA T, YAMAMORI M. Molecular characterization of *Waxy* mutations in wheat[J]. *Mol. Gen. Genet.*, 1999, **261**(3): 463 - 471.
- [16] ANN BRINEY, ROBIN WILSON, ROBERT H. POTTER, *et al.* A PCR-based marker for selection of starch and potential noodle quality in wheat[J]. *Molecular Breeding*, 1998, (4): 427 - 433.
- [17] SONG J M(宋健民), LIB Y(李保云), YOU M SH(尤明山), LIANG R Q(梁荣奇), CHANG CH(常 成), LIU SH B(刘守斌), TANG ZH H(唐朝辉), LIU G T(刘广田). Molecular identification of wheat granule bound starch synthase gene polymorphism[J]. *Acta Genetica Sinica, January(遗传学报)*, 2004, **31**(1): 81 - 86(in Chinese).
- [18] DU ZH L(杜壮丽), WANG CH SH(王成社), YANG J R(杨进荣), LIU J(刘 俊). Identification of black kernel waxy wheat material [J]. *Journal of Triticeae of Crops(麦类作物学报)*, 2007, **27**(3): 433 - 437(in Chinese).
- [19] PAN ZH F(潘志芬), DENG GB(邓光兵), WANG T(王 涛), YU M Q(余懋群). An improved ID-SDS-PAGE method for identification of waxy wheat protein[J]. *Chin. J. Appl. Environ. Biol. (应用与环境生物学报)*, 2000, **5**(5): 487 - 489(in Chinese).
- [20] WANG Z N(王子宁), GUO B H(郭北海), LI H J(李红杰), ZHANG Y M(张艳敏), WEN ZH L(温之丽). SDS-PAGE for the detection of Wx protein in polyploid wheats[J]. *Hereditas(遗传)*, 2000, **22**(3): 169 - 171(in Chinese).
- [21] YU CH M(余春梅), CHEN P D(陈佩度). Study on common wheat (*T. aestivum* L.) germplasm for waxy protein[J]. *Journal of Nanjing Agricultural University(南京农业大学学报)*, 2003, **26**(3): 1 - 6(in Chinese).
- [22] CHAI J F(柴建芳), LIU X(刘 旭), JIA J Z(贾继增). A rapid isolation method of wheat DNA suitable for PCR analysis[J]. *Journal of Plant Genetic Resources(植物遗传资源学报)*, 2006, **7**(2): 246 - 248(in Chinese).
- [23] PAN ZH F(潘志芬), DENG GB(邓光兵), CHEN J(陈 静), MA X R(马欣荣), YU M Q(余懋群). A determination method for amylose content in wheat grain[J]. *Journal of Triticeae of Crops(麦类作物学报)*, 2003, **23**(3): 10 - 12(in Chinese).
- [24] YAO D N(姚大年), ZHANG W M(张文明), WANG CH CH(王昌初), MA CH X(马传喜), DONG ZH R(董召荣), HUANG ZH L(黄正来). Selection of waxy mutant materials in crosses of null-type of waxy protein subunits in common wheat[J]. *Journal of Anhui Agricultural University(安徽农业大学学报)*, 2002, **29**(4): 363 - 365(in Chinese).
- [25] YAO D N(姚大年), WANG X W(王新望), LIU ZH Y(刘志永), LIU G T(刘广田). Identification and screen of Waxy protein in wheat [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology(农业生物技术学报)*, 1999, **7**(1): 1 - 9(in Chinese).