

中国冬小麦品种 Waxy 蛋白分析及分子标记研究

徐兆华^{1,2}, 夏兰芹¹, 陈新民¹, 夏先春¹, 何中虎^{1,3}

(¹中国农业科学院作物科学研究所/国家小麦改良中心, 北京 100081; ²新疆农业科学院核技术生物技术研究所, 乌鲁木齐 830000;

³国际玉米小麦改良中心 (CIMMYT) 中国办事处, 北京 100081)

摘要: 利用 SDS-PAGE 分析了国内外 306 份小麦品种 (系) Waxy 蛋白的缺失类型, 筛选出缺失 Wx-B1 蛋白亚基的材料 46 份; 通过对济麦 19 × 豫麦 47 的 120 个 F₂ 单株 Waxy 蛋白亚基分析, 发现缺失 Wx-B1 的比例接近 1/4, 符合孟德尔分离规律。利用 3 个 STS 标记和 1 个 SSR 标记对不同 Waxy 蛋白缺失类型进行鉴定, 验证其在分子标记辅助育种中的有效性。结果表明, Wx-7A 位点的 STS 引物在野生型中扩增出 1 条 1 172 bp 的特异带, 而缺失 Wx-A1 蛋白亚基的突变材料中没有扩增出该特异带; Wx-4A 位点的 STS 引物在野生型中扩增出 1 条 440 bp 的特异带, 缺失 Wx-B1 蛋白亚基的突变材料中没有该扩增片段; Wx-7D 位点的 STS 引物在野生型中扩增出 1 条 940 bp 的特异带, 而在缺失 Wx-D1 蛋白亚基的突变材料中则扩增出 1 条 360 bp 的特异带; Wx-7D 位点的 SSR 引物在野生型中扩增出 1 条 204 bp 的特异带, 在缺失 Wx-D1 蛋白亚基的突变材料中没有扩增出该特异带。这 4 个标记可以用于分子标记辅助育种。

关键词: 普通小麦; Waxy 蛋白; SDS-PAGE; 分子标记

Analysis of Waxy Proteins in Chinese Winter Wheat Cultivars Using SDS-PAGE and Molecular Markers

XU Zhao-hua^{1,2}, XIA Lan-qin¹, CHEN Xin-min¹, XIA Xian-chun¹, HE Zhong-hu^{1,3}

(¹ Institute of Crop Science / National Wheat Improvement Center, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081;

² Nuclear and Biotechnological Research Institute, Xinjiang Academy of Agricultural Science, Urumqi 830000;

³ CIMMYT-China Office, c/o Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081)

Abstract: A total of 306 wheat cultivars and advanced lines from China, US and Australia were screened for the Waxy protein by SDS-PAGE. The results indicated that 46 of these cultivars were the null Wx-B1 type. The proportion of individuals with null Wx-B1 in 120 F₂ progenies derived from the Jimai19×Yumai47 was 1/4 approximately, in accordance with the theoretical ratio. Three STS and 1 SSR markers were used to analyze the wheat cultivars with different types of Waxy proteins. Validation of the markers was carried out for the detection of Wx-7A, Wx-4A and Wx-7D genes. The results indicated that a 1172 bp-fragment was amplified with Wx-7A specific STS marker from the wild genotypes, while the fragment was absent for the mutant with null Wx-A1; a 440 bp-fragment was detected with Wx-4A specific STS marker from the wild genotypes, whereas, the fragment was absent for the mutant with null Wx-B1; a 940 bp-fragment was amplified with Wx-7D specific STS marker from the wild genotypes, and a 360 bp-fragment was found for the mutant such as ‘Baihuomai’ with null Wx-D1; and a 204 bp-fragment was detected with Wx-7D specific SSR marker from the wild genotypes, while the fragment was absent for the mutant with null Wx-D1. These markers are useful tools to identify wheat cultivars with mutant and normal alleles of the Waxy genes in marker-assisted selection of wheat breeding programme.

Key words: *Triticum aestivum* L.; Waxy protein subunit; SDS-PAGE; Molecular marker

直链淀粉含量和糊化特性是影响小麦面条品质 优劣的重要因素^[1]。颗粒结合型淀粉合成酶 (granule-

收稿日期: 2004-07-05

基金项目: 国家重点基础研究发展规划项目 (2002CB111300)、‘948’重大国际农业科技合作项目和国家‘863’计划项目 (2002AA207003) 资助

作者简介: 徐兆华 (1969-), 男, 江苏泰州人, 硕士, 主要从事小麦遗传育种研究。何中虎为通讯作者, Tel: 010-62170333; Fax: 010-68918547; E-mail: zhhe@public3.bta.net.cn

bound starch synthase, GBSS) 或 *Waxy* 蛋白与直链淀粉的合成密切相关, 已发现两个同功酶 GBSS I 和 GBSS II, 前者是合成胚乳等贮藏器官中直链淀粉的关键酶, 后者是非贮藏器官如叶子和种皮中直链淀粉合成的关键酶^[2]。普通小麦籽粒胚乳中含有分子量分别为 62.8、56.7 和 58.7 kD 3 种 *Waxy* 蛋白亚基, 即 *Wx-A1*、*Wx-B1* 和 *Wx-D1*, 由位于 7AS、4AL 和 7DS 的基因 *Wx-7A*、*Wx-4A* 和 *Wx-7D* 编码^[3-5]。*Waxy* 蛋白相对含量与直链淀粉含量呈高度正相关, 亚基的缺失可降低小麦直链淀粉含量, 导致淀粉糊化特性和膨胀特性的改变, 进而影响小麦面条品质; 不同 *Waxy* 蛋白亚基对直链淀粉合成的影响程度不同, *Wx-B1* 缺失对直链淀粉含量影响最明显^[6,7]。普通小麦中 *Wx-B1* 缺失型最常见, 而 *Wx-D1* 缺失型非常罕见, 至今只有在中国的白火麦发现了这种类型; 双缺失体只有 *Wx-A1* 和 *Wx-B1* 以天然形式存在。缺失全部 3 个 *Waxy* 蛋白亚基的普通小麦称为糯小麦, 其籽粒胚乳直链淀粉含量接近于零^[8,9], 在自然界中尚未发现。优质面条小麦品种一般缺失 *Wx-B1* 亚基, 直链淀粉含量较低^[10,11]。因此, 分析和鉴定 *Waxy* 蛋白亚基对于选育优质面条小麦品种具有重要意义。

普通小麦及其相关二倍体、四倍体 cDNA 和 gDNA 的 *waxy* 基因克隆表明^[12-17], *Wx-A1a*、*Wx-B1a* 和 *Wx-D1a* 都包含 11 个外显子和 10 个内含子, 其长度分别为 2781 bp (*Wx-7A*)、2 794 bp (*Wx-4A*)、2 862 bp (*Wx-7D*); 近年又陆续发现了一些等位变异, 如 *Wx-A1 (b,c,d,e)*、*Wx-B1 (b,c,d,e)*、*Wx-D1 (b,c,d,e)* 等^[3,5,6,18-20]。分子标记是基于 DNA 水平上的遗传标记, 可显著提高选择的准确性和效率。目前已获得多个鉴别 *Wx-7A*、*Wx-4A* 和 *Wx-7D* 基因的 STS 标记和 SSR 标记, *Wx-4A* 基因的 STS 标记已成功用于澳大利亚优质面条小麦品种的选育^[10,11,14,21]。

中国小麦品种以缺失 *Wx-B1* 蛋白亚基居多, 但以往研究主要以地方品种为主, 对目前的主栽品种和苗头品系的 *Waxy* 蛋白组成缺乏研究; 中国的分子辅助育种工作刚刚起步, 侧重于标记的筛选和鉴定, 但忽视了对特异标记有效性的验证, 导致分子标记选择还未能真正用于育种实践^[22-25]。本文利用 SDS-PAGE 方法对中国冬麦区的 294 份主栽品种和高代品系以及 12 份美国和澳大利亚小麦品种 *Waxy* 蛋白亚基的组成类型进行鉴定, 目的是为小麦面条品质改良筛选适宜亲本; 同时, 验证 4 个 *Waxy* 基因特异分子标记的有效性, 为小麦淀粉品质改良提供有效的辅助选择手

段。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验材料

(1) 294 份国内品种(系)来自中国主要冬麦区, 其中, 北部冬麦区 75 份, 黄淮冬麦区 154 份, 长江中下游冬麦区 37 份, 西南冬麦区 28 份。这些品种(系)皆为各麦区目前的主栽品种或优良高代品系, 代表了现阶段中国小麦生产中推广品种和育种材料的水平; 12 份国外品种是本课题组从美国和澳大利亚收集的优质面包或面条小麦。

(2) 济麦 19 为 *Wx-B1* 正常类型, 豫麦 47 缺失 *Wx-B1* 蛋白亚基。济麦 19×豫麦 47 组合 F₂ 代 2001 年 10 月种植于北京, 按常规管理, 2002 年 6 月随机收获 120 个单株。

(3) 以中国春、白火麦、Kanto107 和 Norin67 等 4 个品种和中国春的 6 个缺体四体 (N7AT7B、N7AT7D、N4AT4B、N4AT4D、N7DT7A 和 N7DT7B) 作为蛋白检测和分子标记检测的对照品种(系)。

1.1.2 检测 *Waxy* 基因位点的引物

(1) 引物 1: *Wx-7A* 基因位点的 STS 引物。该引物是 Vrinten 等^[15]在研究小麦 *Waxy* 基因突变的分子特征时, 为克隆基因组 *Wx-7A* 基因而设计的引物。

上游引物 5'-TTGCTGCAGGTAGCCACACCC TG-3';

下游引物 5'-AGTTGCTCTTGAGGTAGC-3'。

(2) 引物 2: *Wx-4A* 基因位点的 STS 引物。该引物是 Briney 等^[11]发掘的一个 *Wx-4A* 基因 STS 标记, 目标扩增片段是包括第 4 内含子在内的一段 440 bp 序列。

上游引物 5'-AACCAGCAGCGCTTCAGCCT-3';

下游引物 5'-TTGAGCTGCGGAAGTCGTC-3'。

(3) 引物 3: *Wx-7D* 基因位点的 STS 引物。Vrinten 等^[15]在研究小麦 *Waxy* 基因突变的分子特征时, 为扩增基因组 *Wx-7D* 基因而设计了此引物。

上游引物 5'-TAGTGCGTCCAGACTCACAG-3';

下游引物 5'-GAGATGGTCAAGAACTGCAT-3'。

(4) 引物 4: *Wx-7D* 基因的 SSR 引物。Shariflou 等^[21]1999 年发掘的 *Wx-7D* 基因位点上的一个 SSR 标记, 目标扩增片段是包括 3'末端附近(AT)_n 重复序列在内的一段 204 bp 序列。

上游引物 5'-CGCTCCCTGAAGAGAGAAAG

AA-3';

下游引物 5'-ATAGGCACAACCCCTAAC-3'。

1.2 Waxy 蛋白的提取和 SDS-PAGE 电泳

参照 Zhao^[4] 的方法,并在淀粉提取、试剂和凝胶的配方以及电泳和银染等方面适当加以改进。

1.3 分子标记鉴定

1.3.1 基因组 DNA 的提取 采用 SDS 法提取基因组 DNA^[26]。

1.3.2 Wx-7A 基因位点的 STS 标记 PCR 反应体系为: 25 μl 总体积中含有 1 \times buffer (50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{KCl}$, 10 $\text{mmo}\cdot\text{L}^{-1}\text{Tris}\cdot\text{Cl}$, 1.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{MgCl}_2$, pH 8.3), Taq DNA 聚合酶 1U, dNTP (A、T、C、G) 各 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 每条引物 10 pmol, 模板 DNA 150ng。

PCR 反应条件为: 首先 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min; 然后 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min, 65 $^{\circ}\text{C}$ ~53 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min (每个循环降低 1 $^{\circ}\text{C}$), 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 13 个循环; 再 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min, 52 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 30 个循环; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。

扩增产物以 2% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 缓冲体系为 1 \times TAE 溶液, 155 V 电压电泳 2 h, 溴化乙锭染色后, 用 MultiGenius Gel Documentation and Analysis System 扫描成像并存入计算机。

1.3.3 Wx-4A 基因位点的 STS 标记 PCR 反应体系为: 25 μl 总体积中含有 1 \times buffer (50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{KCl}$, 10 $\text{mmo}\cdot\text{L}^{-1}\text{Tris}\cdot\text{Cl}$, 1.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{MgCl}_2$, pH 8.3), Taq DNA 聚合酶 1U, dNTP (A、T、C、G) 各 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 每条引物 10 pmol, 模板 DNA 100 ng。

PCR 反应条件为: 首先 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 3 min; 然后 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s, 64 $^{\circ}\text{C}$ 退火 2 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min, 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。

扩增产物在 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶上电泳分离, 缓冲体系为 1 \times TBE 溶液, 30~35 mA / 板电泳 2~3 h, 银染。

1.3.4 Wx-7D 基因位点的 STS 标记 PCR 反应体系为: 25 μl 总体积中含有 1 \times buffer (50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{KCl}$, 10 $\text{mmo}\cdot\text{L}^{-1}\text{Tris}\cdot\text{Cl}$, 1.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{MgCl}_2$, pH 8.3), Taq DNA 聚合酶 1U, dNTP (A、T、C、G) 各 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 每条引物 10 pmol, 模板 DNA 100 ng。

PCR 反应条件为: 首先 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 3 min; 然后 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min, 65 $^{\circ}\text{C}$ ~57 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min (每个循环降低 1 $^{\circ}\text{C}$), 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 9 个循环; 再 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min, 56 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 30 个循环; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。

扩增产物以 2% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 缓冲体系为 1 \times TAE 溶液, 155 V 电压电泳 2 h, 溴化乙锭染色后, 用 MultiGenius Gel Documentation and Analysis System 扫描成像并存入计算机。

1.3.5 Wx-7D 基因的 SSR 标记 PCR 反应体系为: 25 μl 总体积中含有 1 \times buffer (50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{KCl}$, 10 $\text{mmo}\cdot\text{L}^{-1}\text{Tris}\cdot\text{Cl}$, 1.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{MgCl}_2$, pH 8.3), Taq DNA 聚合酶 1U, dNTP (A、T、C、G) 各 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 每条引物 10 pmol, 模板 DNA 100 ng。

PCR 反应条件为: 首先 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 3 min; 然后 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min, 58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 6 个循环; 再 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min, 58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 50 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 50 s, 30 个循环; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。

扩增产物以 2% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 缓冲体系为 1 \times TAE 溶液, 155 V 电压电泳 2 h, 溴化乙锭染色后, 用 MultiGenius Gel Documentation and Analysis System 扫描成像并存入计算机。

2 结果与分析

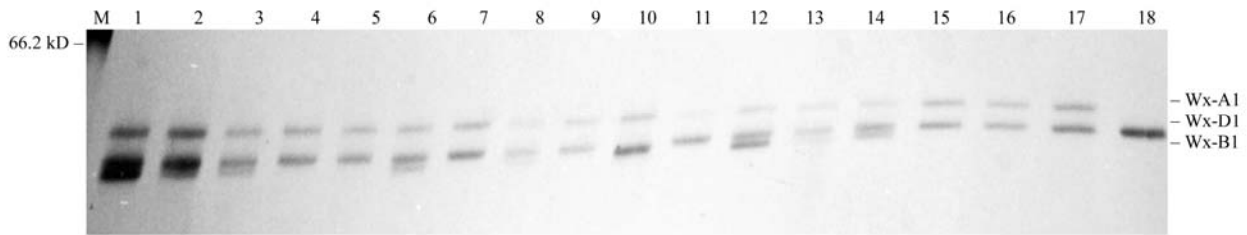
2.1 国内外小麦品种 Waxy 蛋白亚基鉴定

中国春和白火麦是两个地方品种, 前者为野生型, 有 Wx-A1、Wx-B1 和 Wx-D1 共 3 个 Waxy 蛋白亚基, 后者则是公认的缺失 Wx-D1 蛋白亚基的品种。Kanto107 和 Norin 67 是两个日本品种, 它们都缺失 Wx-A1 和 Wx-B1 蛋白亚基。以上述品种为对照, 可准确检测出小麦材料 Waxy 蛋白亚基的组成, 对照品种及部分国内外品种(系)电泳检测结果见图 1。

306 份国内外小麦品种(系)的 Waxy 蛋白亚基组成分析结果列于表 1。可以看出, 在 294 份国内品种(系)中, 共有 39 份缺失 Wx-B1 蛋白亚基, 占总数的 13%; 西南冬麦区品种(系) Wx-B1 蛋白亚基缺失比例远高于北部冬麦区、黄淮冬麦区和长江中下游冬麦区; 在 12 份国外小麦品种中有 7 份澳大利亚品种缺失 Wx-B1 蛋白亚基; 除 Wx-B1 缺失体外, 没有发现其它缺失体。可见, 国内冬小麦主栽品种 Waxy 蛋白亚基的缺失类型较少, 缺失比例偏低, 且在各麦区间分布不均。

2.2 Waxy 基因的分子标记

2.2.1 Wx-7A 基因位点的 STS 标记 本试验重新设定了引物 1 的 PCR 扩增体系和反应条件, 对照品种和 6 个缺体四体的检测结果见图 2。中国春 Wx-7A 基因为野生型, 表达正常, 扩增出 1 条 1172 bp 的特异片段; 白火麦扩增出 1172 bp 特异带, 蛋白检测其 Wx-A1



M. 低分子量蛋白 Marker (66.2 kD)

1. 中国春; 2. YS-27; 3. YS-29; 4. 云麦 42; 5. Y10-8; 6. 苏引 10; 7. Hartog; 8. YS-35; 9. Dollarbird; 10. 白火麦; 11. 川 89-107; 12. 济麦 19; 13. YS-39; 14. 中优 9507; 15. Eradu; 16. Gamenya; 17. Sunstate; 18. Kanto107。第 4、5、7、9、11、15、16、和 17 号品种缺失 Wx-B1 亚基, 白火麦缺失 Wx-D1 亚基, Kanto107 缺失 Wx-A1 和 Wx-B1 亚基

M. LMW Marker (66.2 kD)

1. CS; 2. YS-27; 3. YS-29; 4. Yunmai 42; 5. Y10-8; 6. Suyin 10; 7. Hartog; 8. YS-35; 9. Dollarbird; 10. Baihuomai; 11. Chuan 89-107; 12. Jimai 19; 13. YS-39; 14. Zhongyou 9507; 15. Eradu; 16. Gamenya; 17. Sunstate; 18. Kanto107. Entry 4, 5, 7, 9, 11, 15, 16 and 17 lack Wx-B1 protein, Baihuomai lacks Wx-D1 protein, Kanto 107 lacks Wx-A1 and Wx-B1 proteins

图 1 部分小麦品种 Waxy 蛋白亚基分析

Fig. 1 SDS-PAGE electrophoresis of Waxy proteins in wheat cultivars and lines

表 1 国内外小麦品种 (系) Waxy 蛋白亚基分析

Table 1 Composition of Waxy proteins in 306 winter wheat cultivars and lines

麦区 Region	品种数 Number	缺失 Wx-B1 Null Wx-B1	比例(%) Ratio	缺失 Wx-B1 的品种 Genotypes with null Wx-B1
北部冬麦区 NWWR	75	8	10.7	丰抗 8 号, 原冬 971, 原冬 8585, 京农 8318, 京冬 6, 京冬 8, 晋麦 215, 晋麦 218 Fengkang8, Yuandong971, Yuandong8585, Jingnong8318, Jingdong6, Jingdong8, Jinmai215, Jinmai218
黄淮冬麦区 YHVWWR	154	15	9.7	冀 5219, 冀 95-6023, 沧核 030, 中育 5 号, 85 中 33, 关封 2 号, 豫麦 47, 鲁 94(6)006, 鲁 9436, 烟 239, 烟农 18, 济宁 936898, 陕 160, 陕 93302, 西农 8925-13 Ji5219, Ji95-6023, Canghe030, Zhongyu5, 85zhong33, Guanfeng2, Yumai47, Lu94(6)006, Lu9436, Yan239, Yannong18, Jining936898, Shan160, Shan93302, Xinong8925-13
长江中下游冬麦区 MLYVWWR	37	5	13.5	宁 98084, 扬 96-152, 扬 97-65, 扬麦 5 号, 扬麦 9 号 Ning98084, Yang96-152, Yang97-65, Yangmai5, Yangmai9
西南冬麦区 SWWR	28	11	39.3	川 89-107, 川 89-114, 川 96003, 川麦 24, 绵阳 11, 绵阳 20, 绵阳 26, 绵阳 940112, 绵阳 98-17, 云麦 42, Y10-8 Chuan89-107, Chuan89-114, Chuan96003, Chuanmai24, Mianyang11, Mianyang20, Mianyang940112, Mianyang98-17, Yunmai42, Y10-8
国外品种 US and Australia	12	7	58.3	Dollarbird, Eradu, Gamenya, Hartog, Sunstate, Rosella, Cunningham
总计 In total	306	46	15.0	

NWWR=North winter wheat region, YHVWWR=Yellow and Huai Valleys winter wheat region, MLYVWWR=Middle and lower yangtze valleys winter wheat region, SWWR=Southwestern winter wheat region

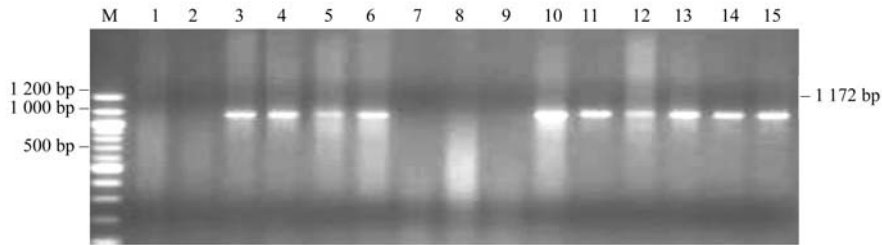
蛋白亚基表达正常 (结果未列出); Norin 67 和 Kanto107 没有扩增出该特异带, 蛋白检测表明二者缺失 Wx-A1 蛋白亚基。N4AT4B、N4AT4D、N7DT7A 和 N7DT7B 含有 7A 染色体和 Wx-7A 基因, 扩增出 1 条 1 172 bp 的特异片段; N7AT7B 和 N7AT7D 不含 7A 染色体, 和 Wx-7A 基因, 故未扩增出 1 172 bp 的特异带。这说明该 STS 标记扩增出的 1 172 bp 的片段确为

Wx-7A 基因的特异片段, 可以作为该基因的分子标记。利用引物 1 对国内外 286 份小麦品种 (系) 进行检验, 部分结果如图 2。泳道 11~15 的材料扩增出 1 条 1 172 bp 的特异带, 蛋白检测亦证明它们都未缺失 Wx-A1 蛋白亚基。

2.2.2 Wx-4A 基因位点的 STS 标记 对引物 2 的 PCR 扩增体系和反应条件作适当改进, 利用对照品种

来验证其有效性, 部分结果见图 3。中国春、白火麦和济麦 19 扩增出 440 bp 的特异带, 蛋白检测表明, 它们未缺失 Wx-B1 蛋白亚基; Norin67、Kanto107 和豫麦 47 没有扩增出该特异带, 蛋白检测它们缺失 Wx-B1 蛋白亚基。这说明该片段确为 Wx-4A 基因的特

异片段, 可以作为该基因的特异分子标记。利用引物 2 检测 286 份国内外小麦品种(系), 部分结果见图 3 中。泳道 8~11 和 15 的材料未扩增出 440 bp 特异带, 蛋白检测证明它们都缺失 Wx-B1 蛋白亚基。泳道 7 没有任何条带, 可能原因是扩增时未加入模板 DNA。



M. 100 bp ladder

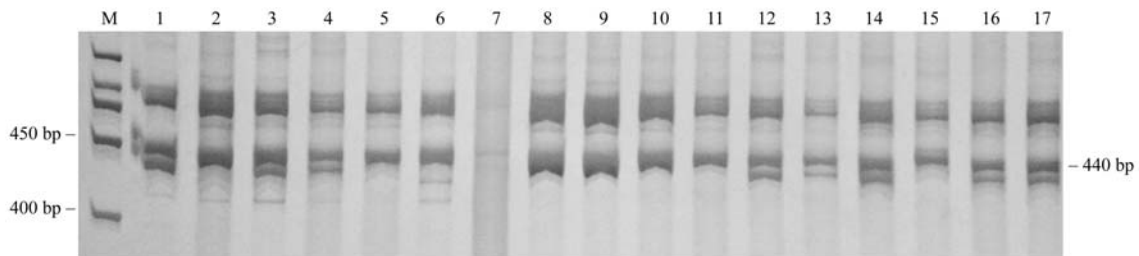
1. N7AT7B; 2. N7AT7D; 3. N4AT4B; 4. N4AT4D; 5. N7DT7A; 6. N7DT7B; 8. Norin67; 9. Kanto107; 10. 中国春; 11. 中优9507; 12. 济麦19; 13. 豫麦47; 14. Eradu; 15. Roeslla

M. 100 bp ladder

1. N7AT7B; 2. N7AT7D; 3. N4AT4B; 4. N4AT4D; 5. N7DT7A; 6. N7DT7B; 8. Norin67; 9. Kanto107; 10. CS; 11. Zhongyou9507; 12. Jimai19; 13. Yumai47; 14. Eradu; 15. Roeslla

图 2 对照品种、缺体四体及部分品种 Wx-7A 基因的分子标记

Fig. 2 Electrophoresis of PCR product amplified with Wx-7A specific marker for check lines and tested cultivars in agarose gel



M.100 bp ladder

1. 济麦 19; 2. Norin 67; 3. 中国春; 4. 白火麦; 5. Kanto 107; 6. 豫麦 47; 7. 济麦 19; 8. 绵阳 20; 9. 川麦 24; 10. Rosella; 11. Cunningham; 12. Suneca; 13. Janz; 14. Sunco; 15. 中育 5 号; 16. CA9614; 17. 宫面小麦

M.100 bp ladder

1. Jimai 19; 2. Norin 67; 3. CS; 4. Baihuomai; 5. Kanto107; 6. Yumai 47; 7. Jimai 19; 8. Mianyang 20; 9. Chuanmai 24; 10. Rosella; 11. Cunningham; 12. Suneca; 13. Janz; 14. Sunco; 15. Zhongyu 5; 16. CA9614; 17. Gongmianxiaomai

图 3 对照及部分品种 Wx-4A 基因的分子标记

Fig. 3 Electrophoresis of PCR product amplified with Wx-4A specific marker for check lines and tested cultivars in PAGE gel

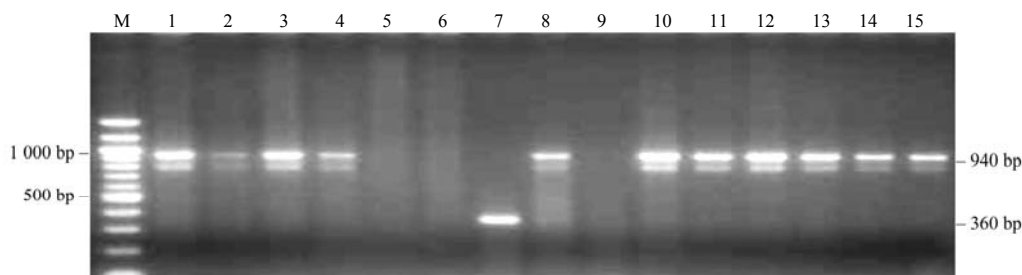
2. 2. 3 Wx-7D 基因位点的 STS 标记 对引物 3 的 PCR 扩增体系和反应条件稍做改进, 对照品种和 6 个缺体四体的检验结果见图 4。中国春 Wx-7D 基因为野生型, 扩增出 1 条 940 bp 的特异带; Kanto107 扩增出 1 条 940 bp 的特异带, 蛋白检测表明其 Wx-D1 亚基表达正常(结果未列出); Norin67 扩增出 1 条 940 bp 的特异带, 蛋白检测表明其 Wx-D1 亚基表达正常; 白

火麦没有扩增出 940 bp 的特异带, 但扩增出 1 条 360 bp 的特异带, 可能突变基因中缺失 1 段 580 bp 的碱基序列, 因而造成该基因不能正常表达合成 Wx-D1 蛋白亚基, 蛋白检测表明其缺失 Wx-D1 蛋白亚基。N7AT7B、N7AT7D、N4AT4B 和 N4AT4D 含有 7D 染色体和 Wx-7D 基因, 扩增出 1 条 940 bp 的特异带; N7DT7A 和 N7DT7B 不含 7D 染色体和 Wx-7D 基因,

没有扩增出任何片段。以上结果表明, 该标记 940 bp 的片段的确是 *Wx-7D* 基因的特异片段, 可以作为 *Wx-7D* 基因的特异分子标记。利用引物 3 检验了 286 份国内外小麦品种(系), 部分结果如图 4。泳道 11~15 的材料扩增出 1 条 940 bp 的特异带, 蛋白检测也表明它们都未缺失 *Wx-D1* 蛋白亚基。

2.2.4 *Wx-7D* 基因位点的 SSR 标记 用缺失 *Wx-D1* 蛋白亚基的对照品种和 286 份国内外小麦品种(系)来验证该标记的有效性, 部分结果见图 5。中国春的 *Wx-7D* 基因为野生型, 扩增出 1 条 204 bp 的特异带。白火麦没有扩增出 204 bp 的特异带, 蛋白检测表明其

缺失 *Wx-D1* 蛋白亚基; *Norin67* 和 *Kanto107* 扩增出 204 bp 的特异带, 同时它们也扩增出 1 条大小与 204 bp 特异带非常接近的条带, 且 204 bp 条带较弱, 不易分辨, 蛋白检测表明它们含 *Wx-D1* 蛋白亚基; 同样, 豫麦 47 和济麦 19 不缺失 *Wx-D1* 蛋白亚基, 扩增出 1 条 204 bp 的特异带。研究结果表明, 该标记定位于 7D 染色体上的 204 bp 片段可以作为 *Wx-7D* 基因的特异分子标记, 定位于 7A 染色体上的另一片段经鉴定在不同品种间存在多态性, 无法鉴别 *Wx-7A* 基因的缺失与否, 所以该标记只可用于对 *Wx-7D* 检测。



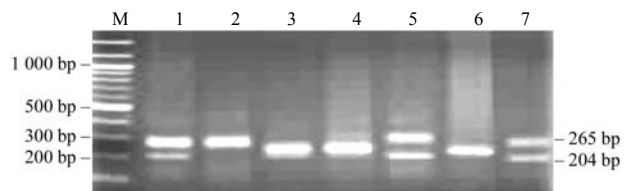
M.100 bp ladder

1.N7AT7B; 2.N7AT7D; 3.N4AT4B; 4.N4AT4D; 5.N7DT7A; 6.N7DT7B; 7.白火麦; 8.Norin67; 10.中国春; 11.中优 9507; 12.济麦 19; 13.豫麦 47; 14. Eradu; 15. Roeslla

M.100 bp ladder; 1.N7AT7B; 2.N7AT7D; 3.N4AT4B; 4.N4AT4D; 5.N7DT7A; 6.N7DT7B; 7.Baihuamai; 8.Norin67; 10.CS; 11.Zhongyou 9507; 12.Jimai 19; 13.Yumai 47; 14.Eradu; 15.Rosella

图 4 对照和部分品种 *Wx-7D* 基因分子标记

Fig.4 Electrophoresis of PCR product amplified with *Wx-7D* specific STS marker for check lines and tested cultivars in agarose gel



M.100 bp ladder; 1.中国春; 2.白火麦; 3.Kanto107; 4.Norin67; 5.豫麦 47; 6.C65-66 (糯小麦); 7.济麦 19

M.100 bp ladder; 1.CS; 2.Baihuomai; 3.Kanto107; 4.Norin67; 5.Yumai 47; 6.C65-66 (waxy line); 7.Jimai 19

图 5 对照和部分品种 *Wx-7D* 基因分子标记

Fig. 5 Electrophoresis of PCR product amplified with *Wx-7D* specific marker for check lines in agarose gel

3 讨论

Waxy 蛋白亚基的组成类型和频率在不同国家小麦品种间差异较大, 朝鲜、日本和土耳其小麦品种中 *Wx-A1* 蛋白亚基缺失频率较高, 澳大利亚、意大利和

印度小麦缺失 *Wx-B1* 蛋白亚基的频率较高, 几乎所有澳大利亚的优质面条小麦都缺失 *Wx-B1* 蛋白亚基, 而美国和加拿大品种中缺失 *Waxy* 蛋白亚基的较少^[1,8,11,27,28]。中国小麦品种中缺失 *Waxy* 蛋白亚基的比例不高, 并以缺失 *Wx-B1* 蛋白亚基为主, 其它缺失体极少^[22,23]。本研究从国内冬播麦区 294 份小麦品种(系)中筛选出 39 份缺失 *Wx-B1* 蛋白亚基的材料, 没有检测到其它缺失类型, 但缺失 *Wx-B1* 的比例略高于其他学者的研究结果, 并且其中绝大多数是主栽品种和优良高代品系, 可以作为育种亲本, 培育优质面条专用小麦。*Waxy* 蛋白亚基的缺失频率在各麦区间差异较大, 北部冬麦区、黄淮麦区和长江中下游春麦区的频率较低, 而西南冬麦区的频率较高, 可能与各麦区在育种中所用亲本的差异有关。

本研究还发现了两份 *Wx-B1* 蛋白亚基表现异常的品种, 运丰早 101 和中梁 93646。这两份材料的 *Wx-B1* 蛋白亚基与 Yamamori^[6]在“Baihuo”中发现的

Wx-B1e 非常相似, 用 *Wx-4A* 的特异引物检测, 运丰早 101 可扩增出 440 bp 的特异片段, 而中梁 93646 扩增不出来, 这两个变异体与其它变异体的关系还有待进一步研究。

在检测济麦 19×豫麦 47 F₂ 单株的 Waxy 蛋白亚基组成时, 不但检测到了缺失 *Wx-B1* 蛋白亚基的单株, 而且还在电泳图谱上观察到部分单株的 *Wx-B1* 蛋白亚基的迁移率与正常的蛋白亚基一样, 表达量却明显小于正常蛋白亚基, 这部分单株在该位点上可能是杂合的。说明利用电泳方法在蛋白质水平检测杂合体是可能的, 但是这种类型的单株在所有检测的 F₂ 单株中仅占为 38.3%, χ^2 测验结果与理论推测的比例 (50%) 不相符, 原因有待进一步研究。

Shariflou 等^[20]2001 年将引物 3 扩增片段发展为 *Wx-7D* 基因的 STS 标记, 在 *Wx-D1* 蛋白亚基表现正常的材料中扩增出一条长度 840 bp 的特异带, 而在与白火麦相同的该亚基变异体中扩增出 1 条长度 260 bp 的特异带。笔者将其扩增体系和反应条件稍做改进, 用对照品种 (系) 来验证, 则分别扩增出 940 bp 和 360 bp 两条特异带, 特异片段大小与 Shariflou 等的结果不一致。

分子标记辅助选择在育种上越来越受到重视, 世界各国在积极筛选简便、实用、可靠分子标记的同时, 还十分注重对已有标记的验证^[29]。本试验检测 4 个 *Wx* 蛋白亚基的分子标记, 证实了其作为分子标记的有效性。在对品种 (系) 进行分子标记检测时, 每对引物在蛋白亚基与分子标记之间的符合程度都超过了 95%, 说明这些分子标记可以用于育种实践, 辅助选择具有优质淀粉特性的小麦品种。

4 结论

从 306 份国内外小麦品种中筛选出 *Wx-B1* 蛋白亚基缺失材料 46 份, 分子标记的有效性验证表明, 3 个 STS 标记和 1 个 SSR 标记可用于不同 Waxy 蛋白缺失型的鉴定。*Wx-7A*、*Wx-4A* 和 *Wx-7D* 基因位点的 STS 引物及 *Wx-7D* 基因的 SSR 引物可以用于小麦品种 Waxy 蛋白亚基鉴定和分子标记辅助育种。

References

- [1] Boggini G, Cattaneo M, Paganori C, Vaccino P. Genetic variation for Waxy proteins and starch properties in Italian wheat germplasm. *Euphytica*, 2001, 199: 111-114.
- [2] Vrinten P L, Nakamura T. Wheat granule-bound starch synthase I and

- II encoded by separate genes that are expressed in different tissues. *Plant Physiology*, 2000, 122: 255-263.
- [3] Ainsworth C, Clark J, Balsdon J. Expression, organization and structure of the genes encoding the Waxy protein (granule-bound starch synthase) in wheat. *Plant Molecular Biology*, 1993, 22: 67-82.
- [4] Zhao X C, Sharp P J. An improved 1D-SDS-PAGE method for the identification of three bread wheat Waxy proteins. *Journal of Cereal Science*, 1996, 23: 191-193.
- [5] Yamamori M, Nakamura T, Endo T R, Nagamine T. Waxy protein deficiency and chromosomal location of coding genes in common wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 1994, 89: 179-184.
- [6] 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. *Theoretical and Applied Genetics*, 2000, 100: 32-38.
- [7] Miura H, Wickramasinghe M H A, Subasinghe R M, Araki E, Komae K. Development of near-isogenic lines of wheat carrying different null *Wx* alleles and their starch properties. *Euphytica*, 2002, 123: 353-359.
- [8] Nakamura T, Yamamori M, Hirano H, Hidaka S. Identification of three *WX* proteins in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Biochemical Genetics*, 1993, 31: 75-87.
- [9] Nakamura T, Yamamori M, Hirano H, Hidaka S, Nagamine T. Production of Waxy(amylose-free) wheat. *Molecular Genetics and Genomics*, 1995, 248: 253-259.
- [10] Zhao X C, Batey I L, Sharp P J, Crosbie G, Barclay I, Wilson R, Morell M K, Appels R. A single genetic locus associated with starch granule properties and noodle quality in wheat. *Journal of Cereal Science*, 1998, 27: 7-13.
- [11] Briney A, Wilson R, Potter R H, Barclay I, Crosbie G, Appels R, Jones M G K. A PCR marker for selection of starch and potential noodle quality in wheat. *Molecular Breeding*, 1998, 4: 427-433.
- [12] Clark J R, Robertson M, Ainsworth C C. Nucleotide sequence of a wheat (*Triticum aestivum* L.) cDNA clone encoding the waxy protein. *Plant Molecular Biology*, 1991, 16: 1 099-1 101.
- [13] Murai J, Moriyama Y, Taira T. Phylogenetic analysis based on the nucleotide sequences of the waxy genes in polyploid wheats and related diploid species. *Ninth International Wheat Genetics Symposium*, 1998, 2: 95-97.
- [14] Murai J, Taira T, Ohta D. Isolation and characterization of the three Waxy genes encoding the granule-bound starch synthase in hexaploid wheat. *Gene*, 1999, 234: 71-79.
- [15] Vrinten P, Nakamura T, Yamamori M. Molecular characterization of waxy mutations in wheat. *Molecular Genetics and Genomics*, 1999,

- 261: 463-471.
- [16] Yan L, Bhave M, Fairclough R, Konik C, Rahman S, Appels R. The genes encoding granule-bound starch synthases at the waxy loci of the A, B, and D progenitors of common wheat. *Genome*, 2000, 43: 264-272.
- [17] Yan L, Bhave M. Sequences of the Waxy loci of wheat: utility in analysis of Waxy proteins and developing molecular markers. *Biochemical Genetics*, 2000, 38: 391-411.
- [18] Yamamori M, Nakamura T, Kuroda A. Variations in the content of starch-granule bound protein among several Japanese cultivars of common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Euphytica*, 1992, 64: 215-219.
- [19] Yamamori M, Nakamura T, Nagamine T. Polymorphism of two Waxy proteins in the emmer group of tetraploid wheat, *Triticum dicoccoides*, *T. dicoccum* and *T. durum*. *Plant Breeding*, 1995, 114: 215-218.
- [20] Shariflou M R, Hassani M M, Sharp P J. A PCR-based DNA marker for detection of mutant and normal alleles of the *Wx-D1* gene of wheat. *Plant Breeding*, 2001, 120: 121-124.
- [21] Shariflou M R, Sharp P J. A polymorphic microsatellite in the 3' end of 'Waxy' genes of wheat, *Triticum aestivum*. *Plant Breeding*, 1999, 118: 275-277.
- [22] 姚大年, 王新望, 刘志勇, 刘广田. 小麦品种 Waxy 蛋白的鉴定和筛选. 农业生物技术学报, 1999, 7(1): 1-9
Yao D N, Wang X W, Liu Z Y, Liu G T. Identification and screen of Waxy protein in wheat. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 1999, 7(1): 1-9. (in Chinese)
- [23] 王小兰, 沈银柱, 黄占景, 王子宁, 李杏普. 缺失蜡质蛋白类型小麦在我国北方冬麦区的分布. 作物学报, 2001, 27(1): 127-129.
Wang X L, Shen Y Z, Huang Z J, Wang Z N, Li X P. Distraction of wheat cultivars lacking Waxy protein in Northern China. *Acta Agronomica Sinica*, 2001, 27(1): 127-129. (in Chinese)
- [24] 梁荣奇, 张义荣, 姚大年, 李保云, 尤明山, 刘广田. 小麦淀粉品质改良的综合标记辅助选择体系的建立. 中国农业科学, 2002, 35(3): 245-249.
Liang R Q, Zhang Y R, Yao D N, Li B Y, You M S, Liu G T. Establishment of the integrated marker-assisted selection system to improving common wheat starch quality. *Scientia Agricultura Sinica*, 2002, 35(3): 245-249. (in Chinese)
- [25] 宋建民, 李保云, 尤明山, 梁荣奇, 常成, 刘守斌, 唐朝晖, 刘广田. 小麦淀粉粒束缚淀粉合成酶基因多态性的分子鉴定. 遗传学报, 2004, 31(1): 81-86.
Song J M, Li B Y, You M S, Liang R Q, Chang C, Liu S B, Tang Z H, Liu G T. Molecular idenfification of wheat granule bound starch synthase gene polymorphism. *Acta Genetica Sinica*, 2004, 31(11): 81-86. (in Chinese)
- [26] Devos K M. The use of random amplified polymorphic DNA markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 1992, 84: 567-572.
- [27] Demeke T, Hucl P, Nair R B, Nakamura T, Chibbar R N. Evaluation of Canadian and other wheats for waxy proteins. *Cereal Chemistry*, 1997, 74: 442-444.
- [28] Graybosh R G, Peterson C J, Hansen L E, Rahman S, Hill A, Skerritt J H. Identification and characterization of U.S. wheats carrying null alleles at the wx loci. *Cereal Chemistry*, 1998, 75: 162-165.
- [29] Langridge P, Lagudah E S, Holton T A, Appels R, Sharp P J, Chalmers K J. Trends in genetic and genome analyses in wheat: a review. *Australian Journal of Agricultural Research*, 2001, 52: 1 043-1 077.

(责任编辑 孙雷心)