

糯性春小麦杂交早代的基因型鉴定与筛选

高凤梅,邵立刚,王 岩,李长辉,车京玉,马 勇,张起昌

(黑龙江省农业科学院 克山分院,黑龙江 克山 161606)

摘要:为筛选出糯性小麦材料,研究糯性小麦籽粒的出现频率,明确各分离群体的 Wx 基因型,使筛选的糯性与非糯性材料呈现出表现型与基因型的统一,以生产上大面积推广应用的普通小麦品种克早 16、克春 5 号为母本,糯性小麦品种宁糯 1 号、南农 09P18 为父本 4 个杂交组合的 F₂ 代分离群体为研究对象,以半籽粒碘染色与分子检测法为研究手段,对 F₂ 分离群体进行糯与非糯性材料鉴定与筛选。结果表明:组合克早 16/宁糯 1 号、克春 5 号/宁糯 1 号、克早 16/南农 09P18、克春 5 号/南农 09P18 糯性小麦的出现频率分别为 1.1%、1.4%、1.4%、1.3%;从 4 个组合的 F₂ 群体 100 个单株中筛选到了共 11 株 Waxy 基因全缺型的植株,与碘染色结果一致。

关键词:糯性春小麦;杂交早代;糯蛋白

中图分类号:S512 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-2767(2015)06-0001-04 DOI:10.11942/j.issn1002-2767.2015.06.0001

淀粉是小麦籽粒的主要成分,约占小麦籽粒的 60%~70%。淀粉包括直链淀粉和支链淀粉,直链淀粉占淀粉总量的 20%~30%,支链淀粉占淀粉总量的 70%~80%。小麦籽粒中不含直链淀粉或直链淀粉含量很低(<1%),被称为糯性小麦^[1-3]。

糯性小麦具有高支链淀粉、低直链淀粉、高峰粘度、膨胀势高、持水能力高及凝陈和老化速度低等特点^[4-6],因此,在食品工业、制造业和理论研究上具有重要的应用价值,因此,糯性小麦的研究为国内外育种家所重视。

在普通小麦中,颗粒结合型淀粉合成酶(Granule-bound starch synthase)简称 GBSS 或称 Waxy 蛋白(或糯性蛋白)为合成直链淀粉的关键酶,Waxy-A1、Waxy-B1、和 Waxy-D1 为 Waxy 蛋白中的 3 个亚基,编码这 3 个蛋白亚基的基因分别称为 Wx-A1、Wx-B1、Wx-D1,如果当这 3 对基因同时缺失或发生突变时则表现糯质胚乳,自然界中六倍体小麦的全糯质突变体目前未被发现^[7-10]。目前糯小麦主要通过人工创造,利用已有的全糯质材料和普通小麦杂交或部分糯小麦间杂交,对后代进行鉴定来选择糯性小麦材料及品种,因此糯性小麦杂交早代选择、鉴定在糯性小麦育种中占

据重要的位置^[11]。

本试验采用半籽粒碘染色与分子检测法结合,对普通小麦品种与糯性小麦品种杂交的 F₂ 分离群体进行鉴定与筛选,筛选出糯性小麦材料,研究全糯质籽粒的出现频率,明确 F₂ 分离群体的 Wx(Wx-A1、Wx-B1、Wx-D1)基因型,丰富黑龙江省农业科学院克山分院小麦类型,在分子水平上进行糯性小麦的早代鉴定、育种材料选择及应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为以当前生产上大面积应用推广的普通小麦品种克早 16、克春 5 号为母本,糯性小麦品种南农 09P18、宁糯 1 号(春化处理)为父本配制的 4 个杂交组合 F₂ 籽粒。

1.2 方法

试验于 2012 年在黑龙江省农业科学院克山分院试验地进行。

1.2.1 籽粒剖面碘染色 收获后将 F₂ 籽粒远离胚端横切,在远离胚一端用 0.2% I₂-2% KI 试剂染色,观察染色后颜色,显示蓝色为部分糯和非糯性籽粒,棕红色的为糯性籽粒。统计糯性籽粒个数。

1.2.2 F₂ 分离群体 Wx 的基因鉴定 将近胚端半籽粒种子在温室中发芽并在一叶期后盆栽,待植株长分蘖期取叶片提取 DNA,对 F₂ 群体进行 Wx 的基因鉴定。具体方法:

1)DNA 的提取:在分蘖前期,取小麦叶片,蒸

收稿日期:2015-01-12

基金项目:国家现代农业小麦产业技术体系东北综合试验站资助项目(CARS-03);黑龙江省农业科学院创新工程资助项目

第一作者简介:高凤梅(1971-),女,山东省寿光市人,在读博士,副研究员,从事小麦遗传育种研究。E-mail: Fengmeigao2007@163.com。

馏水清洗, DNA 提取参照 Murrya (1950) 的 CTAB 法。

2)引物的扩增: Wx-A1 位点的分子鉴定: PCR 反应体系为 25 μL ; 10 \times PCRbuffer2. 5 μL ; 0. 2 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ dNTP 2 μL ; 25 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ MgCl₂ 1. 5 μL , 上下引物 5 pmol; 2. 5 $\mu\text{M}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ Taq plus 聚合酶 0. 3 μL , DNA 含量 100~200 ng。PCR 扩增条件为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 65 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min, 32 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min。扩增产物 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶上电泳分离。

Wx-B1 位点的分子鉴定: PCR 反应体系和扩

增条件同 Wx-A1 位点的分子鉴定。扩增产物在 3. 5% 的琼脂糖凝胶上电泳分离。

Wx-D 位点的分子鉴定: PCR 反应体系为 25 μL ; 10 \times PCRbuffer2. 5 μL ; 0. 2 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ dNTP2 μL ; 25 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ MgCl₂ 1. 5 μL , 左右引物 5 pmol; 2. 5 $\mu\text{M}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ Taq plus 聚合酶 0. 4 μL , DNA 含量 100~200 ng。PCR 扩增条件为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 63 $^{\circ}\text{C}$ 降到 55 $^{\circ}\text{C}$ (每个循环降低 1 $^{\circ}\text{C}$) 退火 1 min, 9 个循环; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 33 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。扩增产物在 2% 琼脂糖凝胶上电泳。

表 1 分子标记引物序列

Table 1 PCR primers of molecular markers

等位基因 Allele	标记名称 Primers	引物序列(5'-3') Prioneer sequence	扩增片段/bp Amplified fragment
Wx-A1a	AFC and AR2	AFC: TCGTGTTCGTCGCGCCGAGATGG	389
Wx-A1b		AR2:CCGCGCTTGTAGCAGTGGAAGTACC	370
Wx-B1a	BDFL and BRD	BDFL:CTGGCCTGCTACCTCAAGAGCAACT	425
Wx-B1b		BRD:CTGACGTCCATGCCGTTGACGA	-
Wx-D1a	BDFL and DRSL	BDFL:CTGGCCTGCTACCTCAAGAGCAACT	2307
Wx-D1b		DRSL:CTGTTTCACCATGATCGCTCCCTT	1731

1. 2. 3 数据统计分析 统计 F₂ 分离群体中每个组合总粒数和糯性籽粒数及 F₂ 分离群体中每个组合不同个体 Wx(Wx-A1a、Wx-B1a 和 Wx-D1a, 缺失个体的基因: Wx-A1b、Wx-B1b 和 Wx-D1b) 的基因型。

2 结果与分析

2. 1 杂交组合的 F₂ 分离群体糯性分析

由表 2 可知, 组合克早 16/ 宁糯 1 号中糯性籽粒出现的个数为 22 个, 组合克春 5 号/ 宁糯 1 号中糯性籽粒出现的个数为 28 个, 组合克早 16/ 南农 09P18 中糯性籽粒出现的个数为 27 个, 组合克春 5 号/ 南农 09P18 中糯性籽粒出现的个数为 25 个。由于材料不同, 组合间糯性籽粒的个数存在一定的差异。F₂ 代籽粒染色显示红棕色和蓝色两种颜色, 说明 0. 2% I₂-2% KI 剖面染色只识别全糯籽粒和非糯性籽粒。从表 2 还可看出糯性籽粒出现的频率偏低, 碘剖面染色法操作简单, 但选择效率较低。

2. 2 Wx 基因的 PCR 分子标记检测

2. 2. 1 Wx-A1 位点的 PCR 分子标记检测 AFC 和 AR2 是一对共显性标记, 在野生型亲本中

表 2 4 个杂交组合 F₂ 代糯性籽粒出现频率
Table 2 The frequency of waxy grain in F₂ population from different cross combination

组合 Combination	混合籽粒/个 Max	糯性籽粒/个 Waxy grain	糯性籽粒出现频率/% Frequency of waxy grain
克早 16/ 宁糯 1 号	2000	22	1. 1
克春 5 号/ 宁糯 1 号	2000	28	1. 4
克早 16/ 南农 09P18	2000	27	1. 4
克春 5 号/ 南农 09P18	2000	25	1. 3

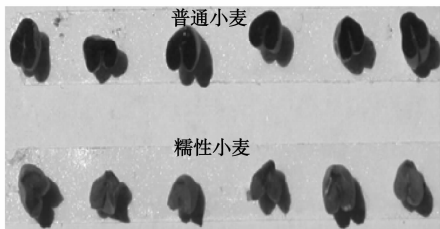


图 1 普通籽粒与全糯籽粒 I-KI 染色后纵切面比较
Fig. 1 Comparison on longitudinal section between commom grain and waxy grain stained by I-KI

扩增出 389 bp 的片断,在突变型中扩增出 370 bp 的片断,相应的等位基因分别是 *Wx-A1a* 和 *Wx-A1b*。用引物 AFC and AR2 分别对组合克早 16/宁糯 1 号、克春 5 号/宁糯 1 号、克早 16/南农 09P18、克春 5 号/南农 09P18 的 F₂ 株系的 100 个单株 DNA 进行扩增,扩增出 *Wx-A1b* 的材料分别为 13、9、12、11 株。从图 1 中看出,缺失 *Wx-A1a* 亚基的单株与纯合 *Wx-A1b* 基因的 PCR 带型相对应。

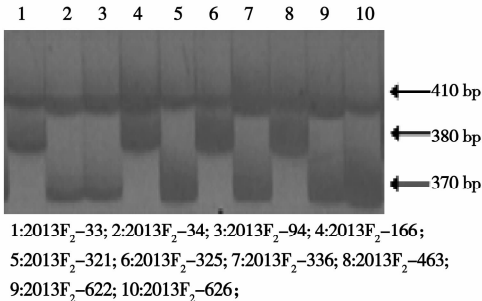


图 2 AFC and AR2 的部分扩增结果

Fig. 2 PCR amplified results of AFC and AR2

2.2.2 *Wx-B1* 位点的 PCR 分子标记检测 *BDFL* 和 *BRD* 是一对显性标记,含有 *Wx-B1a* 的材料扩增出 425 bp 的片断,含 *Wx-B1b* 的材料无扩增片断。用引物 *BDFL* 和 *BRD* 分别对组合克早 16/宁糯 1 号、克春 5 号/宁糯 1 号、克早 16/南农 09P18、克春 5 号/南农 09P18 的 F₂ 株系的 100 个单株 DNA 进行扩增,扩增出 *Wx-A1b* 的材料分别为 21、15、17、23 株。

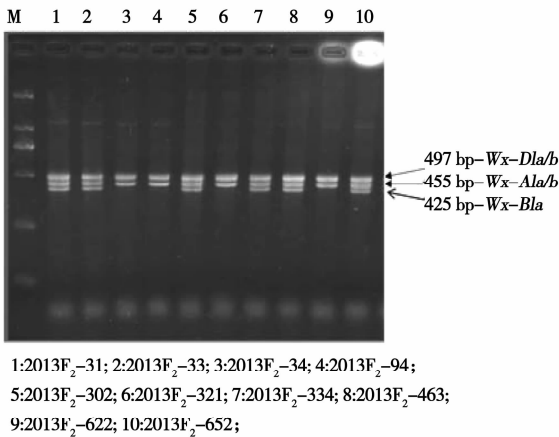


图 3 *BDFL* 和 *BRD* 的部分扩增结果

Fig. 3 PCR amplified results of *BDFL* and *BRD*

2.2.3 *Wx-D1* 位点的 PCR 分子标记检测 *BD-FL* 和 *DRSL* 是一对共显性标记,含有 *Wx-D1a* 的材料扩增出 2 307 bp 的片断,含 *Wx-D1b* 的材

料扩增出 1 731 bp 左右的片断。用引物 *BDFL* 和 *DRSL* 分别对组合克早 16/宁糯 1 号、克春 5 号/宁糯 1 号、克早 16/南农 09P18、克春 5 号/南农 09P18 的 F₂ 株系的 100 个单株 DNA 进行扩增,扩增出 *Wx-A1b* 的材料分别为份 15、9、12、14 株。

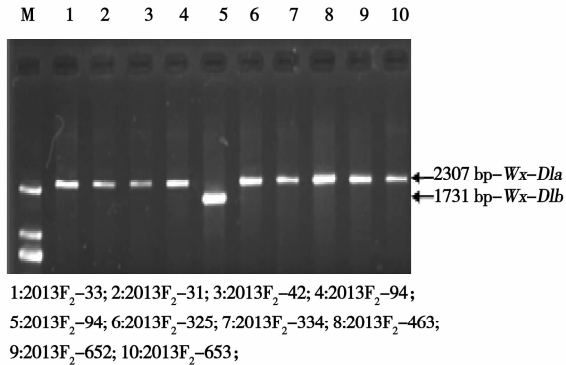


图 4 *BDFL* 和 *DRSL* 的部分扩增结果

Fig. 4 PCR amplified results of *BDFL* and *DRSL*

由 *Wx-A1*、*Wx-B1*、*Wx-D1* 位点的 PCR 分子标记检测结果可知,组合克早 16/宁糯 1 号、克春 5 号/宁糯 1 号、克早 16/南农 09P18、克春 5 号/南农 09P18 同时具有 *Wx-A1b*、*Wx-B1b* 和 *Wx-D1b* 这 3 个基因型的材料分别为 3、5、3、3 株。

3 结论与讨论

基因鉴定、蛋白电流鉴定和碘染色法为目前鉴定糯性小麦常用的 3 种方法。基因鉴定和蛋白电流鉴定虽然准确可靠,但耗费大、耗时长;碘染色法鉴定优点是费用小、节省时间,对于杂交早代大量材料的鉴定较为适用,但这种方法只能区分全糯和非糯性小麦^[12]。本试验用 0.2% I₂-2% KI 试剂染色处理 4 个组合(克早 16/宁糯 1 号、克春 5 号/宁糯 1 号、克早 16/南农 09P18、克春 5 号/南农 09P18),糯性小麦的出现频率分别为 1.1%、1.4%、1.4%、1.3%,选择效率偏低。

PCR 分子标记由于在基因型鉴定中具有准确、简单和快速等特点被育种者广泛应用,并且其在植株整个生育时期和不同部位都可以取材检测。利用与 *Wx* 基因紧密连锁的分子标记辅助选择,将大大加快专用糯性小麦的育种进程。目前 *Wx* 突变等位基因为隐性遗传基因。分子标记辅助选择是鉴定隐性基因的有效方法^[13]。

本试验中引用的用于鉴定 *Wx-A1*、*Wx-B1*、*Wx-D1* 位点的 PCR 标记 AFC 和 AR2、*BDFL* 和

BRD、BDFL 和 DRSL,扩增条带清晰,容易辨认,重复性好。从克早 16/宁糯 1 号、克春 5 号/宁糯 1 号、克早 16/南农 09P18、克春 5 号/南农 09P18 四个组合的 F_2 代群体 100 个单株中筛选到了共 11 株 Waxy 全隐性基因的植株,这一结果得到了碘染色的验证。由于工作量较大,本试验未对全部籽粒进行碘染色和全部单株进行 PCR 检测,因此对于糯性小麦 F_2 的分离比例和分离规律没有进行分析,有待进一步研究。

参考文献:

[1] 陈新民. 糯小麦(Waxy Wheat)研究进展[J]. 麦类作物学报,2000,20(3):82-85.

[2] Miura H,Sugawara A. Dosage effects of the three Wx genes on amylose synthesis in wheat endosperm[J]. Theoretical and Applied Genetics,1996,93(7):1066-1070.

[3] Nakamura T,Yamamori M,Hirano H,et al. Production of waxy(amylose-free) wheats[J]. Molecular and General Genetics,1995,248(3):253-259.

[4] Yasui T,Sasaki T,Matsuki J. Milling and flour pasting properties of waxy endosperm mutant lines of bread wheat(*Triticum aestivum* L)[J]. J. Sci. Food Agric. 1999, 79: 687-692.

[5] Zeng M,Morris C F,Batey I L,et al. Sources of variation

for starch gelatinization ,pasting,and gelation properties in wheat[J]. Cereal Chemistry,1997,74(1):63-71.

[6] Hayakawa K,Tanaka K,N akamura T,et al. Quality characteristics of waxy hexaploid wheat: Properties of starch gelatinizationand retrogradation [J]. Cereal Chemistry, 1997,74(5):576-580.

[7] Zhao X C,Sharp P J. An improved 1D-SDS-PAGE method for the identification of three waxy bread wheat waxy protein. J[J]. Cereal Sci,1996,23:191-193.

[8] Nakamura T,Yamamori M,Hirano H,et al. Decrease of waxy protein in two wheat cultivars with low amylose contents[J]. Plant Breeding,1993,111:99-105.

[9] Miura H,Tani S. Endosperm starch properties in several wheat varieties preferred for Japanese noodles[J]. Euphytica,1994,72:171-175.

[10] Mirua H,Sugawara A. Dosage effects of the three Wx genes on amylose synthesis in wheat endosperm[J]. Theoretical Appl Genetics,1996,93(7):1066-1070.

[11] 陈新民. 糯小麦(Waxy Wheat)研究进展[J]. 麦类作物学报,2000,20(3):82-85.

[12] 李中安,宁锟. 糯小麦研究初报[J]. 麦类作物学报,2001, 21(3):95-96.

[13] 梁荣奇,张义荣,刘守斌,等. 利用 Wx 基因分子标记辅助选择培育糯小麦[J]. 遗传学报,2001,28 (9):856-863.

Genotype Identification and Screening of Hybrid Early Generation of Waxy Spring Wheat

GAO Feng-mei, SHAO Li-gang, WANG Yan, LI Chang-hui, CHE Jing-yu, MA Yong, ZHANG Qi-chang

(Keshan Branch of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Keshan, Heilongjiang 161606)

Abstract: In order to screen waxy wheat ,study frequency of waxy wheat grain,determine Wx genotype of segregation population ,presented unification of phenotype and genotype ,taking wheat varieties(Kehan 16 and Kechun 5) as female parents,waxy wheat varieties(Ningno 1,Nannong 09P18) as male parents,identification and screen of waxy and non-waxy wheat from F_2 separation population of 4 cross combinations was studied with half grain iodine dyeing and molecular examination . The results indicated that the waxy wheat appearance frequency of Kehan 16/Ningnuo 1,Kechun 5/Ningnuo 1,Kehan 16/Nannong 09P18 and Kechun 5/Nannong 09P18 were 1.1%,1.4%,1.4%,and 1.3% respectively, there was 11 plants with waxy genes all deletion were screened from 100 individual plants of F_2 generation population of four cross combinations by using the Wx molecular mark identification,this result obtained the confirmation by the iodine dyed way.

Keywords: waxy spring wheat; hybrid early generation; waxy protein

(该文作者还有刘宁涛、邹东月、王志坤、程睿钰,单位同第一作者)