黄色素含量基因在黑龙江省小麦品种中的分布

张春利[1],邵立刚[2],王 岩[2],赵海滨[1],李长辉[2],宋庆杰[1],于海洋[1]
(1.黑龙江省农业科学院作物育种研究所,哈尔滨 150086;2.黑龙江省农业科学院克山分院,克山 161606)

摘要:面粉及其制品的色泽是衡量小麦品质的一项重要指标,并且随着人们生活水平的提高而受到越来越多的重视。为了解黑龙江省小麦品种 *Psy-A1* 位点上控制黄色素含量的等位基因分布状况,本研究利用功能标记 *YP7A* 对95份推广品种的 *Psy-A1* 位点等位变异进行了检测。结果表明,在 *Psy-A1* 位点控制低黄色素含量的等位基因 *Psy-A1b* 的材料在黑龙江省小麦中的分布频率为58.9%,而控制高黄色素含量的等位基因 *Psy-A1a* 的材料在黑龙江省小麦中的分布频率为41.1%,说明黑龙江省小麦品种 *Psy-A1* 位点以 *Psy-A1b* 为主。但从单个品种上看,当前黑龙江省主栽小麦品种及骨干亲本却大多以高黄色素含量的等位基因 *Psy-A1a* 为主,如龙麦26、龙麦30、龙辐麦12、龙辐麦16、克旱18、克旱19、克旱20等。而克丰6号、克丰10号、克丰12及龙辐麦15为低黄色素含量的等位基因 *Psy-A1b* 类型。

关键词:小麦;黄色素;功能标记
中图分类号:S513 文献标识码:A 文章编号:1002-2767(2008)06-0001-04

Distribution of Genes Associated with Yellow Pigment Content in Heilongjiang Wheat Cultivars

ZHANG Chun-li[1], SHAO Li-gang[2], WANG Yan[2], ZHAO Hai-bin[1], LI Chang-hui[2], SONG Qing-jie[1], YU Hai-yang[1]
(1.Crop Breeding Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086; 2.Keshan Sub-academy of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Keshan 161606)

Abstract: Colour is an important trait, exerting significant influences on the apparence of wheat-based products. In the present study, a total of 95 cultivars, collected from Heilongjiang province, were used to identify the allelic variation at *Psy-A1 loci*. The results showed that both of the genotypes associated with higher and lower PPO activity were found, the proportion of the allelic variations at *Psy-A1* loci controlling high and low YP content were 41.1% and 58.9%, respectively. However, most representive cultivars backbone parents, such as longmai 26, longmai 30, longfumai 12, longfumai 16, kehan 18, kehan 19, and kehan 20, present *Psy-A1a* controlling high YP content, it may due to the lack of selective pressure.

Key words: wheat; yellow pigment(YP); functional marker

黄色素是小麦籽粒中最主要的天然色素,小麦籽粒黄色素含量与面粉及面团黄度的相关系数高达0.8~0.9[1]。日本和东南亚国家消费的加碱面条要求亮黄色,高黄色素含量有利于提高其外观性状,澳大利亚等地区已将提高黄色素含量作为重要的育种目标[2]。但是我国面条、馒头等传统食品要求色白,因此降低黄色素含量则是我国普通小麦品质改良的重要目标[3]。研究表明,面粉黄度和黄色素含量是影响面包、面条黄度的主要因素,二者与面包和面条黄度的相关系数分别为0.78、0.76和0.83、0.76[4]。Lin等[5]研究表明,馒头的表面色泽和瓤色与面粉的黄色度呈极显著的负相关。此外,黄色素含量与所有面包品质性状呈显著负相关,与面条适口性、韧性、黏性等品质性状也表现为较大的负向相关[3-4]。可见,降低黄色素含量不仅有利于面制品颜色性状的改良,也有助于其他相关品质性状的改良。葛秀秀[6]对我国312份普通冬小麦品种(系)

收稿日期:2008-05-20
基金项目:黑龙江省农业创新工程重点项目(2005CHJ01A03;2006CHJ01A02)
第一作者简介:张春利(1970-),男,黑龙江省勃利县人,在读博士,副研究员,从事小麦遗传育种研究。Tel:13260470697;E-mail:zclwheat@126.com。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

籽粒黄色素含量进行分析，结果表明在品种间存在很大差异，变化范围为 0.35～3.42 mg·kg^{-1}，选择潜力很大。环境虽然对黄色素含量有一定影响[7]，但基因型的影响更大。因此，培育不同黄色素含量的小麦品种是对面制品尤其是面条的色泽性状进行改良的重要途径。

近年来对于影响小麦黄色素含量的主效基因定位取得了很大进展，研究表明 7A 和 7B 染色体上的基因对籽粒黄色素含量起着重要作用。Parker 等[8] 在 Schomburgk/Yarralinka 的 150 个 SSD 系中定位了位于 7A 染色体的主效 QTL，可解释黄色素含量表型变异的 60.0%。Patil 等[9] 对硬粒小麦杂交组合 PDW 233/Bhalegaon 4 的 140 个重组自交系进行研究，在 1A、3B、5B、7A 和 7B 染色体上发现了主效 QTL，其中位于 7A 染色体的 QTL 可以解释 55.22% 的表型变异。张立平等[10] 在中优 9507/CA9632 的 DH 群体中定位了一个位于 7AL 上的主效 QTL，在不同环境中解释 12.9%～37.6%的表型变异。

在黄色素含量的 QTL 定位工作中发现了一些与 QTL 紧密连锁的分子标记。如 Parker 等[8] 发现一个与 7A 染色体上黄色素含量的主效 QTL 紧密连锁的 AFLP 标记 *Xwua*26－7*A*.4，并随后将其转化为 STS 标记[11]。但 Sharp 等[12] 的研究表明，这一标记只对与定位群体来源相同的亲本有效，而与其它品种的黄色素含量关系较弱，因此不能广泛用于分子辅助育种。其原因可能是对于不同品种，主效 QTL 的位点会有所差异，未必都在 7A 上。另外，该 STS 标记并非基因特异性的功能标记，不能与目标基因共分离，因此会造成对表型预测的偏差。He 等[13] 根据普通小麦 7A 染色体上 *PSY*1 基因 *Psy-A*1 的序列差异开发了共显性标记 *YP*7*A*，该标记在具有等位基因 *Psy-A*1*a* 的材料中可以扩增出 194 bp 的片段，与高黄色素含量相关；而在具有等位基因 *Psy-A*1*b* 的材料中扩增出 231 bp 的片段，与低黄色素含量相关。

黑龙江省是我国春麦主要产区之一。其中，大兴安岭沿麓地区已被划为我国优质中筋、强筋小麦优势产业带[14]。该区光照时间长、昼夜温差大、土壤肥沃，有利于蛋白质积累，使得该区小麦具有优良的营养品质。近年来，随着生态派生系谱法与早代品质跟踪相结合等多种育种手段的广泛应用，小麦加工品质潜力得到很大提高。但该区品质育种的目标一直集中于面筋强度上，对面粉及其制品色泽的研究尚未开展。为此，本研究利用近年来开发出的黄色素含量的功能标记对黑龙江省建国以来推广的 95 份小麦品种进行检测，以期为该区小麦育种提供不同黄色素基因类型的亲本，同时也为该区小麦分子育种奠定基础。

1　材料与方法

1.1　材料

选取 95 份黑龙江省小麦品种作供试材料（见表 1）。这些品种是该麦区建国以来生产上的主栽品种，基本上反映了该麦区小麦生产和育种的历史与现状。

1.2　方法

1.2.1　供试引物　黄色素含量检测利用 He 等[13] 开发的分子标记 *YP*7*A*。该标记引物的序列见表 2。所有引物由北京奥科生物技术有限责任公司（http://www.augct.com）合成。

1.2.2　DNA 提取　每一供试材料选取 3 粒有代表性的种子充分研碎后放入 2 mL 离心管中，加入 800 μL 样品提取液（成分为 288 mM NaCl，200 mM pH8.0 Tris·HCl，25 mM EDTA 和 0.5% SDS）；放入 65 ℃的水浴箱中 30～60 min，期间每隔 5 min 摇晃混匀 1 次；加入 800 μL 酚/氯仿（1∶1），室温下混匀 5 min 后于 10 000 r·min^{-1}下离心 5 min；将上清液转移至 1.5 mL 离心管中，加入 0.6 倍体积的异丙醇，轻轻混匀；放入－20 ℃冰箱中 20 min 以上，沉淀 DNA；低速离心将 DNA 集于管底，倒出上清液；加入 500 μL 70% 乙醇洗涤 2 次，于室温干燥；加入 500 μL TE 溶解，置于 4 ℃保存。

1.2.3　PCR 扩增　*YP*7*A* 的 20 μL PCR 反应体系为：模板 DNA 50 ng，Taq 酶 1U（北京天根生化科技公司），上、下游引物（5 μmol·L^{-1}）各 1.0 μL，dNTP（25 μmol·L^{-1}）0.2 μL，10× PCR 缓冲液 2 μL，用无菌蒸馏水补充反应体系至 20 μL。PCR 反应采用步降（Touch down）退火程序：首先 95 ℃ 5 min；然后 95 ℃ 30 s，由 66 ℃开始，每个循环的退火温度降低 0.3 ℃，退火时间 30 s，72 ℃ 1 min，共 40 个循环；最后 72 ℃ 5 min，4 ℃保温。

PCR 扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离，采用缓冲体系为 1× TAE 溶液，用北京“六一”厂的 DYC-34A 型电泳槽，200V 电压电泳 30 min，0.5% 溴化乙锭（ethidium bromide，EB）染色 10 min，蒸馏水漂洗后在 GelDoc XR System 成像系统上用紫外灯扫描成像并存入计算机。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

表 1　黑龙江小麦品种 *Psy-A*1 位点等位基因组成

序号	品种	*Psy* 基因的 PCR 产物	序号	品种	*Psy* 基因的 PCR 产物	序号	品种	*Psy* 基因的 PCR 产物
1	龙麦 10 号	194	33	新曙光 1 号	231	65	克丰7 号	231
2	龙麦 11	194	34	合作 4 号	194	66	克丰8 号	231
3	龙麦 12	194	35	合作 6 号	194	67	克丰9 号	231
4	龙麦 13	231	36	松花江 3 号	194	68	克丰 10 号	231
5	龙麦 14	231	37	克进 2 号	231	69	克丰 11	231
6	龙麦 15	194	38	克进 3 号	231	70	克丰 12	231
7	龙麦 16	231	39	克旱 1 号	231	71	克涝1 号	231
8	龙麦 19	231	40	克旱 3 号	231	72	克涝2 号	231
9	龙麦 20	194	41	克旱 4 号	231	73	克涝3 号	231
10	龙麦 23	194	42	克旱 5 号	231	74	克涝4 号	194
11	龙麦 24	231	43	克旱 6 号	231	75	克涝5 号	231
12	龙麦 26	194	44	克旱 7 号	231	76	克涝6 号	194
13	龙麦 27	194	45	克旱 8 号	194	77	克进1 号	194
14	龙麦 29	194	46	克旱 9 号	231	78	克进4 号	194
15	龙麦 30	194	47	新克旱 9 号	231	79	克进5 号	194
16	垦九 1 号	194	48	克旱 10 号	231	80	克进6 号	194
17	垦鉴麦 2 号	194	49	克旱 11	231	81	克珍	231
18	垦鉴麦 1 号	231	50	克旱 12	231	82	克强	194
19	垦九 9 号	194	51	克旱 13	231	83	克丰3 号	231
20	垦九 10 号	194	52	克旱 14	231	84	克健	194
21	龙辐麦 5 号	231	53	克旱 15	231	85	克茂	194
22	龙辐麦 6 号	231	54	克旱 16	231	86	克全	231
23	龙辐麦 7 号	194	55	克旱 17	231	87	克华	194
24	龙辐麦 8 号	231	56	克旱 18	194	88	克凤	231
25	龙辐麦 9 号	194	57	克旱 19	194	89	克钢	231
26	龙辐麦 10 号	231	58	克旱 20	194	90	克鉴	194
27	龙辐麦 11	231	59	克旱 2 号	231	91	克红	231
28	龙辐麦 12	194	60	克丰 1 号	231	92	克津	194
29	龙辐麦 13	231	61	克丰 2 号	231	93	早红	231
30	龙辐麦 14	231	62	克丰 4 号	231	94	克群	194
31	龙辐麦 15	231	63	克丰 5 号	231	95	克壮	194
32	龙辐麦 16	194	64	克丰 6 号	231			

表 2　引物序列表

标记	引物序列(5'-3')	PCR 产物的大小(bp)	参考文献
YP7A	Forward: GCCAGCCCTTCAAGGACATG Reverse: TGACGGTCTGAAGTGAGAATGA	194 231	[13]

2　结果与分析

YP7A 是一个共显性的功能标记, 该标记在具有等位基因 *Psy-A*1*a* 的材料中可以扩增出 194 bp 的片段, 与高黄色素含量相关; 而在具有等位基因 *Psy-A*1*b* 的材料中扩增出 231 bp 的片段, 与低黄色素含量相关。在本研究中, 95 份推广品种中有 39 份材料扩增出 194 bp 特异条带, 56 份品种扩增出 231 bp 特异条带(见表 3, 图 1)。

表 3　黑龙江省不同育种单位材料 *YP7A* 检测结果汇总

来源	*YP7A*			
	194 bp		231 bp	
克字号品种	18	30.5%	41	69.5%
龙字号品种	13	68.4%	6	31.6%
龙辐号品种	4	33.3%	8	66.7%
垦字号品种	4	80.0%	1	20.0%
全部品种	39	41.1%	56	58.9%

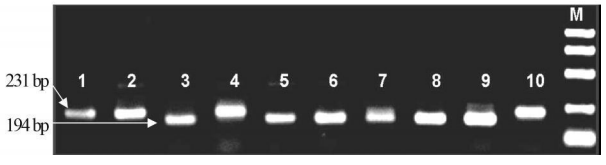

图 1　10 份黑龙江省小麦品种 *YP7A* 扩增结果

1 为龙辐麦 5 号, 2 为龙辐麦 6 号, 3 为龙辐麦 7 号, 4 为龙辐麦8 号, 5 为龙辐麦 9 号, 6为龙辐麦 12, 7 为克旱 18, 8 为克旱 19, 9 为克旱 20, 10 为克旱 2 号, M 为DNA 分子量标准 DL2000

从品种来源上看, 克字号系列 59 份品种中有 18 份品种扩增出 194 bp 特异条带, 41 份品种扩增出 231 bp 特异条带; 龙字号系列 19 份品种中有 6 份品种扩增出 194 bp 特异条带, 13 份品种扩增出 231 bp 特异条带; 龙辐号系列12份品种中有 4 份品种扩增出 194 bp 特异条带, 8 份品种扩增出 231 bp 特异条带; 垦字号系列 5 份品种中有 1 份品种扩增出 194 bp 特异条带, 4 份品种扩增出 231 bp 特

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

异条带。

上述结果表明，在 *Psy-A*1 位点控制低黄色素含量的等位基因 *Psy-A*1*b* 的材料在黑龙江省小麦中的分布频率为 58.9%，而控制高黄色素含量的等位基因 *Psy-A*1*a* 的材料在黑龙江省小麦中的分布频率为 41.1%，说明黑龙江省小麦品种 *Psy-A*1 位点以 *Psy-A*1*b* 为主。从材料来源上看，克字号及龙辐号小麦的表现与全省总体趋势基本一致，而龙字号小麦却以高黄色素含量的等位基因 *Psy-A*1*b* 为主，占 68.4%。但从单个品种上看，当前黑龙江省主栽小麦品种及骨干亲本却大多以高黄色素含量的等位基因 *Psy-A*1*b* 为主，如龙麦 26、龙麦 30、龙辐麦 12、龙辐麦 16、克旱 18、克旱 19、克旱 20 等。而克丰 6 号、克丰 10 号、克丰 12 及龙辐麦 15 为低黄色素含量的等位基因 *Psy-A*1*a* 类型。

3　讨论

黑龙江省小麦商品率很高，随着市场对面粉专用化要求程度的提高，黄色素含量成为决定小麦市场竞争力的重要指标之一。本研究所选用的材料为黑龙江省建国以来所推广的历史品种及当前生产上的主栽品种，可以很好地代表黑龙江省小麦品种的历史及现状。从本研究结果可以看出，在黄色素含量方面，黑龙江省小麦品种的高含量与低含量特异条带并存，且低含量条带占主体，为 69.5%，这有利于加工面条、馒头等传统食品。但从单个品种上看，当前主栽小麦品种及骨干亲本却大多以高黄色素含量的等位基因 *Psy-A*1*b* 为主，应该引起育种者的重视。

本研究还表明 *YP7A* 在黑龙江省小麦品种中均具有良好的多态性。由于 *Psy-A*1 位点能够解释品种绝大部分的黄色素含量变异，根据其等位基因组成可以间接预测品种的黄色素含量范围[17]，因此我们可以采用标记跟踪与选择性回交转育相结合的方法定向改造当前生产上应用的综合性状优良但黄色素含量偏高的一些品种。利用目标品种作母本，以具有低黄色素含量特异条带的材料作供体，半粒法标记跟踪，连续回交转育 5～6 代，选育出与目标品种除目标位点外其余遗传背景基本相同的改良系，从而达到定向改良目标品种的目的。该方法具有目的性强、所需群体小、利于消除不利基因连锁且选育周期短、适于与温室或南繁加代相结合加速育种进程的的优点。除标记跟踪与选择性回交转育相结合定向改造当前品种的方法外，在育种过程中我们还可以将上述标记与系谱法早世代跟踪筛选相结合，选育综合性状优良且低黄色素含量的品种。由于加入了标记筛选这一环节，选择群体应适当扩大。

参考文献：

[1] Symons S J. Computer analysis of fluorescence for the measurement of flour refinement as determined by flour ash content, flour grade colour and tristimulus colour measurements [J]. Cereal Chemistry, 1991, 68: 454-460.

[2] Kruger J E, Matsuo R R, Preston K. A comparison of methods for the prediction of Cantonese noodle colour [J]. Cereal Chemistry, 1992, 72: 1021-1029.

[3] He Z H, Yang J, Zhang Y, et al. Pan bread and dry white Chinese noodle quality in Chinese winter wheats [J]. Euphytica, 2004, 139: 257-267.

[4] 杨金，张艳，何中虎，等. 小麦品质性状与面包和面条品质关系分析[J]. 作物学报，2004，30：739-744.

[5] Lin Z J, Miskelly D M, Moss H J. Suitability of various Australian wheat for Chinese-style steamed bread [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 1990, 53: 203-213.

[6] 葛秀秀，何中虎，杨金，等. 我国冬小麦品种多酚氧化酶活性的遗传变异及其与品质性状的相关分析[J]. 作物学报，2003，29：481-485.

[7] Miskelly D M. Flour components affecting paste and noodle colour [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 1984, 35: 463-471.

[8] Parker G D. Mapping loci associated with flour color in wheat [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1998, 97: 238-245.

[9] Patil R M, Oak M D, Tamhankar S A, et al. Mapping and validation of a major QTL for yellow pigment content on 7AL in durum wheat (*Triticum turgidum L. ssp.* durum) [J]. Molecular breeding, 2008, 5: 1380-3743.

[10] 张立平，阎俊，夏先春，等. Mark W Sutherland，普通小麦籽粒黄色素含量的 QTL 分析[J]. 2006，32：41-45.

[11] Park H, Kreunen S S, Cuttriss A J, et al. Identification of the carotenoid isomerase provides insight into carotenoid biosynthesis, prolamellar body formation and photomorphogenesis [J]. Plant Cell, 2002, 14: 321-332.

[12] Sharp P J, Johnston S, Brown G, et al. Validation of molecular markers for wheat breeding [J]. Australian Journal of Agricultural Research, 2001, 52: 1357-1366.

[13] He X Y, Zhang YL, He Z H, et al. Characterization of phytoene synthase 1 gene (Psy1) located on common wheat chromosome 7A and development of a functional marker [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2008, 116: 213-221.

[14] 何中虎，王龙俊，肖志敏，等. 中国小麦品质区划的研究 [J]. 中国农业科学，2002，35(4)：359-364.

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net