

宋维富,杨雪峰,赵丽娟,等.强筋小麦龙麦 26 *Glu-A3d* 基因遗传效应初步研究[J].黑龙江农业科学,2023(2):6-10.

强筋小麦龙麦 26 *Glu-A3d* 基因遗传效应初步研究

宋维富,杨雪峰,赵丽娟,刘东军,宋庆杰,白光宇,张春利,辛文利

(黑龙江省农业科学院 作物资源研究所,黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要:龙麦 26 是东北春麦区强筋小麦育种的核心亲本,为进一步提高该品种品质潜力,拓宽其遗传基础,利用分子标记和 6 次选择性回交相结合的手段,将 *Glu-A3* 位点最优基因 *Glu-A3d* 导入龙麦 26 遗传背景之中,利用 BC_5F_1 、 BC_6F_1 群体和龙麦 26 的 *Glu-A3* 位点近等基因系为试材进行 *Glu-A3d* 基因遗传效应评价。结果表明,在强筋小麦品种龙麦 26 遗传背景下,导入 *Glu-A3d* 基因使籽粒蛋白、干面筋、面筋指数、吸水率、形成时间和稳定时间等指标 3 年平均分别提高 0.07%、-2.13%、10.73%、0.13%、1.57% 和 4.97%。Zeleny 沉降值和粉质仪的断裂时间 2 年平均分别提高 3.05% 和 12.65%。以上结果表明,导入 *Glu-A3d* 基因使龙麦 26 品质性状均有不同程度提高。

关键词:强筋小麦;品质;低分子量麦谷蛋白亚基;*Glu-A3d* 基因

小麦面筋是决定小麦加工品质的主要因素,主要由醇溶蛋白和麦谷蛋白组成,醇溶蛋白影响面团延展性,麦谷蛋白决定面团弹性,面团良好的弹性和延展性是制作各种面食制品的基础^[1]。目前,优化麦谷蛋白亚基构成仍是强筋小麦育种的主要突破口。在十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE)图谱中,麦谷蛋白可以分成高分子量麦谷蛋白亚基(High Molecular Weight Glutenin Subunit, HMW-GS)和低分子量麦谷蛋白亚基(Low Molecular Weight Glutenin Subunit, LMW-GS),编码 HMW-GS 的基因位于第一部分同源群染色体长臂上的 *Glu-A1*、*Glu-B1* 和 *Glu-D1* 位点(统称 *Glu-1* 位点),编码 LMW-GS 的基因分别位于第一部分同源群染色体短臂上的 *Glu-A3*、*Glu-B3* 和 *Glu-D3* 位点(统称 *Glu-3* 位点)^[1-3]。LMW-GS 在小麦籽粒中含量丰富,占贮藏蛋白的 1/3,约占麦谷蛋白的 60%^[4]。LMW-GS 构成与面团延展特性和加工品质密切相关^[5-6]。*Glu-3* 位点在小麦面团强度和延展性改良中的作用越来越受到重视,该位点与品质性状的关系已成为国际上的热点研究领域之一。目前,*Glu-3* 位点编

码的各亚基对面团强度贡献大小基本明确,其中,*Glu-A3d*、*Glu-B3g* 和 *Glu-D3d* 被确立为 *Glu-3* 位点优质基因^[7]。

为了将 *Glu-3* 位点最优基因 *Glu-A3d* 定向导入到东北春麦区强筋小麦遗传背景之中,本研究以强筋小麦品种龙麦 26(HMW-GS 组成为:1, 7+9, 5 + 10; LMW-GS 组成为: *Glu-A3c*, *Glu-B3g*)为轮回亲本,以克旱 19 为 *Glu-A3d* 基因供体,利用分子标记与选择性回交相结合的手段开展该基因的转育工作。在 2018 年、2019 年和 2020 年分别利用 BC_5F_1 群体、 BC_6F_1 群体和 BC_6F_1 同一株自交分离获得龙麦 26(*Glu-A3c*)和龙麦 26(*Glu-A3d*)纯合基因型为试材进行 *Glu-A3d* 基因遗传效应评价,以期为东北春麦区强筋小麦育种提供有益信息。

1 材料与方法

1.1 材料

强筋小麦品种龙麦 26 导入 *Glu-A3d* 基因的 BC_5F_1 、 BC_6F_1 群体分别于 2018 年和 2019 年种植在黑龙江省农业科学院小麦试验地。

1.2 方法

1.2.1 田间试验设计 采用 70 cm 双条平播,小行距 25 cm,大行距 45 cm,行长 1.5 m,株距 5 cm,人工点播。秋季施底肥,施氮肥 71.5 kg·hm⁻²、磷肥 60.0 kg·hm⁻²、钾肥 32.6 kg·hm⁻²。苗期单株挂牌,取叶片进行目的基因检测,收获时按照检测结果进行分组,即阳性为导入优质亚基组,阴性为对照组。2020 年以 BC_6F_1 同一株自交获得的 BC_6F_2 代龙麦 26(*Glu-A3c*)、龙麦 26(*Glu-A3d*)

收稿日期:2022-10-08

基金项目:黑龙江省自然科学基金(YQ2020C039);黑龙江省博士后科研启动基金(LBH-Q20176);黑龙江省省属科研院所科研业务费(CZKYF2021-2-B007)。

第一作者:宋维富(1982—),男,博士,副研究员,从事小麦品质遗传育种研究。E-mail:songweifu1121@126.com。

通信作者:张春利(1970—),男,博士,研究员,从事小麦遗传育种研究。E-mail:zclwheat@126.com。

2个基因型材料为试材,在池栽条件下,2个基因型材料相邻种植为一组,采用双列对比排列,行长2.5 m,3次重复,施肥条件同田间。

1.2.2 DNA 提取和目的基因检测方法 采用CTAB法提取小麦籽粒基因组DNA。利用紫外分光光度计检测DNA浓度,稀释至终浓度 $100\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 。

1.2.3 引物序列的合成 根据文献^[8]合成*Glu-A3*位点蛋白亚基*gluA3ac*和*gluA3d*特异性STS标记引物,由上海生工有限公司合成。引物序列见表1。

表 1 特异性STS标记引物序列

引物	引物序列(5'-3')
<i>gluA3ac</i>	F-AAACAGAATTATTAAGCCGG
	R-GTGGCTGTGTGAAAACGA
<i>gluA3d</i>	F-TTCAGATGCAGCCAAACAA
	R-TGGGGTTGGGAGACACATA

1.2.4 PCR 反应的体系及程序 模板DNA 50 ng,*Taq*酶1 U[宝生物工程(大连)有限公司],上、下游引物($10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)各0.6 μL ,dNTP($2.5\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)0.8 μL , $10\times$ buffer(Mg^{2+} plus)2.5 μL ,用无菌蒸馏水补充反应体系至20 μL 。

PCR反应程序:首先94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min;然后94 $^{\circ}\text{C}$ 变性35 s,退火温度58 $^{\circ}\text{C}$ (*gluA3ac*)和60 $^{\circ}\text{C}$ (*gluA3d*)时间均为50 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸1 min,共35个循环;最后72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸10 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 保温。扩增产物进行1.5%琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像系统观察照相。

1.2.5 品质测定项目及方法 粒蛋白、湿面筋、面筋指数和粉质仪参数测定方法参照Song等^[9]方法,用德国Brabender公司的Quadrumat® Senior试验磨粉机按AACC26-20方法制粉;面粉蛋白含

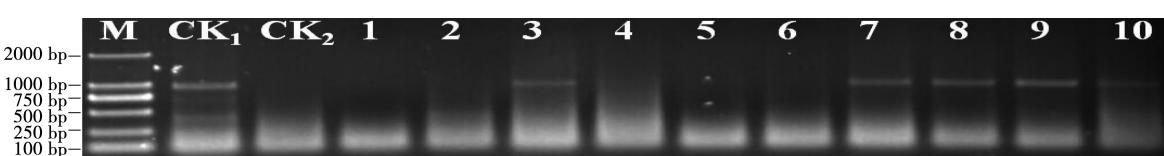
量用瑞典Perten公司的DA7200型连续光谱固定光栅分析仪(DA7200 Diode Array Analyzer)测定;干、湿面筋含量用瑞典Perten公司的Glutomatic2200面筋自动分析仪(Glutomatic System),按GB/T 14608—93和GB/T 10248—1995方法测定;Zeleny沉降值用德国Brabender公司摇混器,按AACC56-61方法测定;面团流变学特性用Brabender公司的粉质仪(Farinograph®),按AACC54-21方法测定。

1.2.6 品质测定项目与方法 用Excel 2017中的TTEST计算*Glu-A3d*和*Glu-A3c*基因间成对数据t检验的概率值。

2 结果与分析

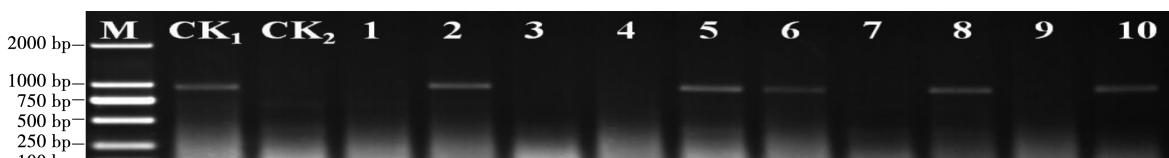
2.1 分子标记检测结果

由图1和图2可知,BC₅F₁和BC₆F₁回交群体中*Glu-A3d*基因检测结果表明*Glu-A3d*基因特异性标记在阳性对照品种克旱19,及BC₅F₁和BC₆F₁回交群体中的阳性单株中均能扩增出967 bp的特异片段,在阴性对照品种龙麦26中未扩增出特异条带,其扩增结果可作为BC₅F₁和BC₆F₁回交群体中分组的主要依据。由图3A、B可知,*Glu-A3d*基因特异性标记在克旱19和龙麦26(*Glu-A3d*)基因型中扩增出967 bp片段,在龙麦26(*Glu-A3c*)基因型中未见条带;*Glu-A3c*基因特异性标记在克旱19和龙麦26(*Glu-A3d*)基因型中未扩增出条带,在龙麦26(*Glu-A3c*)基因型中扩增出573 bp片段,表明从BC₆F₁同一株自交获得的BC₆F₂代2个基因型材料在*Glu-A3*位点已达纯合,可作为一对*Glu-A3*位点近等基因系进行*Glu-A3d*和*Glu-A3c*基因遗传效应研究。



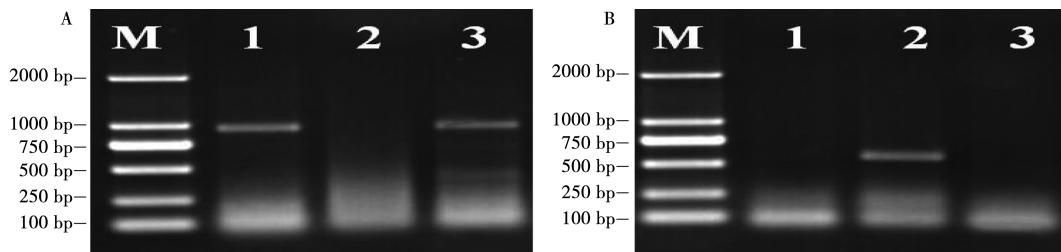
M. 2000 DNA Marker; CK₁. 克旱 19; CK₂. 龙麦 26; 泳道 1~10. BC₅F₁群体。

图 1 BC₅F₁群体 *Glu-A3d* 基因检测



M. 2000 DNA Marker; CK₁. 克旱 19; CK₂. 龙麦 26; 泳道 1~10. BC₆F₁群体。

图 2 BC₆F₁群体 *Glu-A3d* 基因检测



A. *Glu-A3d* 引物扩增结果; B. *Glu-A3c* 引物扩增结果; M. 2000 DNA Marker; 洼道 1. 克旱 19; 洼道 2. 龙麦 26 (*Glu-A3c*) 基因型; 洼道 3. 龙麦 26 (*Glu-A3d*) 基因型。

图 3 *Glu-A3* 位点近等基因系 *Glu-A3d* 和 *Glu-A3c* 基因检测

2.2 品质分析结果

如表 2 所示,在强筋小麦龙麦 26 遗传背景下,导入 *Glu-A3d* 基因,2018 年、2019 年和 2020 年度,籽粒蛋白分别提高 -1.4%、0.8% 和 0.8%,3 年平均提高 0.07%;湿面筋分别提高 -13.1%、2.6% 和 -10.4%,3 年平均提高 -6.97%;干面筋分别提高 0%、-0.8% 和 -5.6%,3 年平均提高 -2.13%;面筋指数分别提高 8.8%、10.9% 和 12.5%,3 年

平均提高 10.73%。Zeleny 沉降值 2019 和 2020 年度分别提高 0% 和 6.1%,2 年平均提高 3.05%。以上结果表明:*Glu-A3d* 基因主要提高面筋指数和 Zeleny 沉降值等反映面筋强度的指标,对干面筋等反映蛋白质数量的指标存在负向效应,湿面筋不仅与面筋数量有关,而且反映面团的持水能力,关于该基因与湿面筋指标的关系还有待于进一步探究。

表 2 强筋小麦品种龙麦 26 导入 *Glu-A3d* 基因的品质遗传效应分析

品质	2018 年		2019 年		2020 年		多年平均 提高/%
	<i>Glu-A3c</i>	<i>Glu-A3d</i>	提高/%	<i>Glu-A3c</i>	<i>Glu-A3d</i>	提高/%	
籽粒蛋白/%	17.3	17.0	-1.4	15.9	16.0	0.8	0.07
湿面筋/%	43.6	37.9	-13.1	34.7	35.6	2.6	-6.97
干面筋/%	1.3	1.3	0	12.2	12.1	-0.8	-2.13
面筋指数/%	89.0	96.8	8.8	88.2	97.8	10.9	10.73
沉降值/mL	-	-	-	48.0	48.0	0	3.05
吸水率/%	61.0	62.0	1.6	57.8	58.0	0.3	0.13
形成时间/min	5.7	6.5	14.0	9.7	7.7	-20.6	1.57
稳定时间/min	12.8	13.4	4.7	32.6	33.0	1.2	4.97
断裂时间/min	12.0	13.7	14.2	35.4	-	-	12.65

注:-表示缺失数据。

2.3 粉质仪参数的变化

如表 2 所示,在强筋小麦品种龙麦 26 遗传背景下,导入 *Glu-A3d* 基因后,在 2018 年、2019 年和 2020 年,吸水率分别提高 1.6%、0.3% 和 -1.5%,3 年平均提高 0.13%;形成时间分别提高 14.0%、-20.6% 和 11.3%,3 年平均提高 1.57%;稳定时间分别提高 4.7%、1.2% 和 9.0%,3 年平均提高 4.97%;断裂时间 2018 年和 2020 年分别提高 14.2% 和 11.1%,2 年平均提高 12.65%。*Glu-A3d* 基因对粉质仪参数的影响均表现为不同幅度提高。

3 讨论

一个多世纪以来,传统育种在作物产量提高方面取得了举世瞩目的成就^[10-12]。但是,当前育种家们在育种过程中还是不断面临着各种挑战:

(1)农业生产方式的变化,包括耕作技术的提高和栽培方式的改变,都需要培育具有相应农艺性状的品种;(2)农业生产环境的变化,包括主要病、虫害及逆境的改变均加速品种的更迭;(3)消费者和市场需求的改变等,都需要育种家提高新品种的培育进程来应对各种挑战^[13]。因此,通过常规育种方法很难实现产量、抗病(逆)性、品质等方面的同步改良^[14]。标记辅助选择技术在常规育种中的应用可以精准跟踪目标基因,发挥优异基因在品种改良中的作用,提高后代选择的准确性和效率,能够显著加快育种进程^[15]。黑龙江省农业科学院作物资源研究所“龙麦号”课题组从 1995 年开始利用生化标记与选择性回交相结合等手段向克旱 9 号、新克旱 9 号、克丰 3 号、克丰 6 号、垦大 4 号、龙麦 19 号、龙麦 20 号、龙辐麦 3 号、龙辐麦

10号、小冰麦33等黑龙江省主栽小麦品种(系)中导入了5+10亚基,1或2^{*}亚基,7+8亚基,17+18亚基,14+15亚基等,使这些小麦品种(系)在不改变原来农艺性状的情况下,烘烤品质得到较大提高^[11,16-18]。在完成这些工作的同时,创造了遗传背景相同的各种类型HMW-GS近等基因系(Nearly Isogenic Lines, NILs),如*Glu-A1*位点的Null与1亚基和2^{*}亚基NILs,*Glu-B1*位点7和7+8亚基,17+18和14+15亚基的NILs,*Glu-D1*位点2+12或3+12与5+10亚基的NILs。利用这些NILs的研究清楚地表明以5+10亚基代换2+12或3+12亚基,以1或2^{*}亚基代替Null亚基,以7+8代替7亚基,17+18代替14+15亚基后很多品质指标得到较大改善,为强筋小麦育种进程中利用这些亚基改善小麦品质提供了理论依据^[11,16-18]。

本研究利用分子标记和6次选择性回交相结合的手段将*Glu-3*位点最优基因*Glu-A3d*导入强筋小麦龙麦26遗传背景下,在不改变原品种其他各种优异农艺性状的基础上来改善品质性状,创制品质性状稳定的优异新种质。导入*Glu-A3d*基因在2018年、2019年和2020年平均结果表现为对面筋指数、Zeleny沉降值、粉质仪形成时间、稳定时间和断裂时间等反映面筋强度的指标存在正向效应。以上结果表明:在强筋小麦育种过程中,*Glu-A3d*基因可作为面筋强度改良的重要基因源通过标记辅助选择的手段加以重点利用,从而拓宽东北春麦区强筋小麦遗传基础,进一步提高该麦产区强筋小麦的育种效率。

我国是“蒸煮食品”消费大国,强筋小麦在我国主要用于饺子、面条和馒头等各类专用粉的配麦和配粉及生产高档面包粉^[18-19]。为满足国内强筋小麦市场需求,2012—2016年我国平均每年进口美国、加拿大等国家的强筋小麦373.2万t^[19]。与强筋小麦相比,超强筋小麦在配麦和配粉过程中二次加工品质稳定性更好,利用价值更高、市场潜力巨大^[18-19]。为了满足国内超强筋小麦需求,目前东北春麦区小麦育种目标已从强筋小麦为主调整为超强筋小麦为主,强筋小麦为辅。但超强筋小麦种质资源的极度匮乏,已成为限制该区超强筋小麦育种的瓶颈问题,加强超强筋小麦新种质的创制迫在眉睫。

4 结论

龙麦26是黑龙江省农业科学院作物资源研究所“龙麦号”课题组于1994年育成的强筋小麦品种,具有苗期抗旱、后期抗秆锈病、中感赤霉病(抗侵染类型)、产量性状协调、面筋强度高和品质稳定性好等优点。在东北春麦区年种植面积曾达46.67万hm²以上,并于2004年获得国家科技进步二等奖。近20年作为东北春麦区强筋小麦品质改良的核心亲本,利用龙麦26通过有性杂交先后育成了龙麦33、龙麦35等一批强筋小麦主栽品种,在东北春麦区强筋小麦生产中发挥了重要作用,为建设该区“硬红春”强筋小麦生产基地提供了品种保障。利用分子标记与选择性回交相结合的手段进一步改良其品质性状,提高品质潜力,有利于该品种继续发挥其在小麦生产和育种中的作用。

参考文献:

- [1] PENA R J, TRETHOWAN R, PFEIFFER W H, et al. Quality (End-Use) improvement in wheat[J]. Journal of Crop Production, 2002, 5:1-37.
- [2] PAYNE P I. Genetics of wheat storage protein and the effect of allelic variation on pan bread quality[J]. Annual Review Plant Physiology, 1987, 38:141-153.
- [3] SINGH N K, SHEPHERD K W. Linkage mapping of the genes controlling endosperm proteins in wheat, I. Genes on the short arms of group 1 chromosomes[J]. Theoretical and Applied Genetics, 1987, 66:628-641.
- [4] BIETZ J A, WALL J S. Isolation and characterization of gliadin-like subunits from glutenin[J]. Cereal Chemistry, 1973, 50(5):537-547.
- [5] VERAVERBEKE W S, DELCOUR J A. Wheat protein composition and properties of wheat glutenin in relation to breadmaking functionality[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2002, 42(3):179-208.
- [6] ZHANG P P, HE Z H, ZHANG Y, et al. Pan bread and chinese white salted noodle qualities of chinese winter wheat cultivars and their relationship with gluten protein fractions [J]. Cereal Chemistry, 2007, 84(4):370-378.
- [7] 金慧,何中虎,李根英,等.利用Aroona近等基因系研究高分子量麦谷蛋白亚基对面包加工品质的影响[J].中国农业科学,2013,46(6):1095-1103.
- [8] 王林海.普通小麦及其近缘种低分子量麦谷蛋白基因克隆与STS标记开发[D].北京:中国农业科学院,2009.
- [9] SONG W F, REN Z Y, ZHANG Y B, et al. Effects of allelic variation in glutenin subunits and gliadins on baking quality in NILs of common wheat Cv. Longmai 19 [J]. Cereal Research Communications, 2015, 43(2):284-294.
- [10] COLLARD B, MACKILL D J. Marker-assisted selection:

- an approach for precision plant breeding in the twenty-first century [J]. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 2008, 363:557-572.
- [11] EVANS L T. Adapting and improving crops: the endless task[J]. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 1997, 352:901-906.
- [12] GUPTA P K, LANGRIDGE P, MIR R R. Marker-assisted wheat breeding: present status and future possibilities [J]. Molecular Breeding, 2010, 26(2):145-161.
- [13] 王亚琦, 孙子淇, 郑峥, 等. 作物分子标记辅助选择育种的现状与展望[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(5):6-12.
- [14] LÜ X B, ZHANG Y B, SONG Q J, et al. Qualitative difference between HMW-GS 5+10 and 2+12 NILs of four spring wheat cultivars with high-quality genetic background [J]. Agricultural Sciences in China, 2004, 3(8):568-574.
- [15] 张延滨, 孙连发, 辛文利, 等. 主栽小麦品种中 5+10 亚基对品质改良的影响[J]. 中国农业科学, 2003, 36(3):242-247.
- [16] 张延滨, 赵海滨, 宋庆杰, 等. 龙麦 20 小麦品种中 7+8* 亚基和 17+18 亚基近等基因系间的品质差异[J]. 中国农业科学, 2008, 41(5):1536-1541.
- [17] 张延滨, 辛文利, 张春利, 等. 黑龙江省超强面筋小麦的育种策略和方法[J]. 黑龙江农业科学, 2005(1):1-3.
- [18] 吕晓波, 张延滨, 宋庆杰, 等. 5+10 亚基对超强面筋小麦品质的影响[J]. 麦类作物学报, 2004, 24(2):45-48.
- [19] 韩一军, 姜楠. 新时期中国粮食安全研究[M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2017.

Genetic Effects of *Glu-A3d* Gene in Strong-Gluten Spring Wheat Variety Longmai 26

SONG Weifu, YANG Xuefeng, ZHAO Lijuan, LIU Dongjun, SONG Qingjie, BAI Guangyu, ZHANG Chunli, XIN Wenli

(Crop Recourse Institute, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, China)

Abstract: Longmai 26 is the core parent of strong gluten wheat breeding in Northeastern Spring Wheat Zone of China. In order to further improve the quality potential and broaden the genetic basis of this variety, the novel gene *Glu-A3d* at the *Glu-A3* locus was transferred into the genetic background of Longmai 26 by six consecutive backcrosses using molecular marker-assisted selection. The genetic effects of *Glu-A3d* were evaluated by using BC₅F₁, BC₆F₁ populations and Longmai 26 nearly isogenic lines (NILs) at the *Glu-A3* locus. The results showed that the transfer of *Glu-A3d* gene, under the genetic background of strong gluten wheat variety Longmai 26, increased the grain protein, dry gluten, gluten index, water absorption, formation time and stability time in 3-year average by 0.07%, -2.13%, 10.73%, 0.13%, 1.57% and 4.97% ($P=0.96$) respectively in 3-year average. The Zeleny sedimentation and the breakdown time of the Farinograph in 2-year average increased by 3.05% and 12.65% respectively in 2-year average. The above results showed that the quality traits of Longmai 26 were improved by transferring *Glu-A3d* gene.

Keywords: strong-gluten wheat; quality; low molecular weight glutenin subunits; *Glu-A3d* gene

(上接第 5 页)

Mapping and Analysis of Rice Flag Leaf Width Gene Based on GWAS

WANG Jiangxu

(Office of Academic Research, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, China)

Abstract: Leaf shape is one of the important factors affecting photosynthesis and carbohydrate accumulation in rice (*Oryza sativa* Geng Group), while leaf width is one of the core traits determining leaf shape in rice. Mining and using new leaf width related genes/QTLs can further enrich molecular breeding theory and improve the effect of genetic improvement of leaf width traits. In this study, 295 natural populations of rice (*Oryza sativa* Geng Group) varieties were used to investigate the flag leaf width of each variety in 2020 and 2021. Combined with 788 396 high-quality polymorphic SNPs obtained by high-throughput re-sequence, GWAS was performed on the correlation of flag leaf width in rice. A total of 45 associated SNPs were detected, distributed on 12 chromosomes of rice, and the phenotypic contribution rate ranged from 8.61% to 15.76%. Among them, *qFL10* was detected repeatedly in two years, and the localization interval was 10.11 Mb-10.23 Mb, which contained 15 genes.

Keywords: rice; leaf shape; flag leaf width; GWAS; main QTLs