

小麦糯性突变体的筛选

王子宁, 郭北海, 张艳敏, 温之雨

(河北省农林科学院粮油作物研究所, 河北 石家庄 050031)

摘要: 利用 SDS-PAGE 技术, 从河北省小麦地方品种及国内外小麦育成种 1 270 份中, 发现 W_x-B1 突变体 63 份, W_x-D1 突变体 4 份, W_x-E 2 份。红蘖麦和白芒白等品种的发现, 丰富了品质育种的亲本; 长穗偃麦草的蜡质基因与小麦蜡质基因不同, 可以进行更深入的分子水平研究。研究表明, 地方品种和育成种具有相似的突变规律; 国外优良品质材料含有较高的 W_x-B1 突变频率; 国内以源自北京、山西、陕西、云南的材料突变频率最高; 河北、河南、山东、江苏等省份突变频率居中; 而四川、天津、黑龙江和安徽等省份的样本量太小, 突变频率也最低。该频率分布规律为今后育成种筛选的重点提供了帮助。

关键词: 普通小麦; 地方品种; 育成种; 蜡质基因; 突变体

中图分类号: S512.101 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7091(2002)03-0014-06

蜡质蛋白是结合在禾谷类胚乳淀粉颗粒上的一种蛋白, 也叫淀粉粒合成酶(GBSS), 该酶的表达与否直接影响直链淀粉的合成。小麦的蜡质蛋白编码基因 W_x-A1, W_x-B1 和 W_x-D1 分别位于 7A, 4A 和 7D 染色体上, 已发现小麦胚乳中直链淀粉和支链淀粉的含量与这三个基因的表达有关, 该组基因之一尤其是 W_x-B1 缺失时, 会导致淀粉粒合成酶含量减少, 使直链淀粉含量降低, 支链淀粉含量增加, 从而改变了小麦的淀粉构成、面粉品质、面团加工及食用品质。

自然界中没有天然的蜡质小麦, 许多国家争先进行蜡质小麦研究, 第一步就是突变材料的筛选。日本从 20 世纪 80 年代末就开始了小麦的淀粉构成与面条品质关系的研究, 并开始进行育种工作, 从各种来源的材料中筛选到了 W_x-B1 和 W_x-A1 基因缺失材料, 如关东 107 和农林 67, 并从一个中国地方品种白火麦中筛选到了 W_x-D1 基因缺失材料。澳大利亚也进行了筛选工作, 但只筛选到了 W_x-B1 和 W_x-A1 基因缺失材料^[1]。中国农业大学也从内乡白火麦和江苏白火麦中筛选到 W_x-D1 缺失材料^[2]。上述地方品种材料由于成熟期长、农艺性状差而难以在育种中应用。本研究对河北省地方品种及部分育种亲本进行蜡质基因筛选, 从中得到适用于我国蜡质小麦育种的亲本材料。

1 材料和方法

1.1 试验材料

试验所采用的小麦品种为河北省为主的地方品种 784 份, 国内外育成种 486 份。因地方品种为混杂群体, 每个品种按子粒颜色、形状等分为不同类型, 每类型各取 2~4 粒进行电

泳, 对电泳结果有差异的品种类型, 一般再鉴定 20~100 粒种子, 以保证结果的准确性和代表性。所采用的对照品种有: 中国春, Gabo, Norin67, Halbert, Sturdy, Kanto107, Gamaya, Satanta 及荷兰小麦。

1.2 试验方法

主要参考王子宁^[3]的方法, 并修改如下:

1.2.1 W_x 蛋白提取 (1)将种子用钳子夹裂, 放入 1.5 mL 离心管中, 加入 0.6 mL 漂洗缓冲液, 4 °C 过夜; (2)用专用杵将淀粉块捣开, 去掉种皮和面筋; (3)16 000 r/min 离心 1 min, 去上清, 加入 1 mL 漂洗缓冲液, 悬浮, 离心去上清液, 此步重复 2~3 次; (4)dH₂O 悬浮淀粉, 16 000 r/min 离心 1 min, 去上清, 重复 2~3 次; (5)按每粒小麦种子加入 0.6 mL 提取液, 悬浮淀粉; (6)100 °C 水浴煮沸 4 min; (7)趁热离心, 16 000 r/min 离心 6~10 min, 保留上清液。(8)依据凝胶厚度和加样孔的大小不同, 取 25~40 μL 上清液进样。

1.2.2 电泳 以 170 mm×150 mm×0.7 mm 垂直双板为例, 采用瑞典 Phamarcia 生产的 Multiphar II 电泳仪及 Protean II 电泳槽, 稳压条件下采用初始电压 130 V, 待溴酚蓝进入分离胶后调整电压 300 V, 电泳 5 h; 稳流条件下采用 15 mA/胶板, 电泳过夜, 约 17 h。

1.2.3 银染 (1)凝胶固定: 将凝胶放入 150 mL 固定液中, 固定过夜; (2)水洗: 用大量 dH₂O 洗胶 2 次, 每次 3 min; (3)银染: 将胶泡入 AgNO₃ 染液中, 浸染 30 min; (4)水洗: 用蒸馏水洗胶 20 s, 快速倒掉水; (5)显色: 用少量显影液快速洗胶 1 次, 倒掉浑浊显影液, 再倒入大量显影液, 轻轻摇动染色盒, 直至凝胶上带清晰而背景浅为好; (6)停显: 倒掉显影液, 用 3% 醋酸停显 10 min; (7)记录: 直接拍照或通过扫描仪记录于计算机中更好; (8)1~7 步在摇床上进行时可以使每次操作充分进行, 但摇床不是必须的。凝胶染色不好时, 可以用 Farmer's reducer 褪色液, 浸泡凝胶直至凝胶颜色退干净, 再用蒸馏水浸泡漂洗凝胶若干次, 直至凝胶上黄色漂洗干净, 再重复 1~7 步。

1.2.4 基因命名 根据小麦基因符号命名规则, 本研究将三个 W_x 蛋白亚基分别与 W_x-A1, W_x-B1 和 W_x-D1 三个编码基因对应起来分析。

2 结果与分析

2.1 小麦地方品种基因构成的特点

在 784 份小麦地方品种中, 只发现两个品种缺失 W_x-D1 基因, 品种名称分别为白芒白和红蘗麦, 来源于河北。在所检测的 10 份白火麦品种中, 本希望能发现 W_x-D1 缺失基因, 但从中只发现 2 份材料缺失 W_x-B1 基因, 编号为京 2377 和京 2297, 来自河南, 其中白火麦 2377 是否与内乡白火麦为同一品种, 还需做进一步研究; 从其他地方品种中发现 13 份 W_x-B1 基因缺失材料, 它们是六棱头、巨鹿申麦、白麦、大白皮、红蘗麦、红芒红和白葫芦头等, 产地均为河北。这些缺失 W_x-B1 基因的材料多为红粒品种或白粒蜡质性品种, 子粒质地硬, 胚乳接近蜡质类型。其他 767 份材料均具有三个显性 Waxy 基因。见表 1, 图 1。

2.2 小麦地方品种 W_x 基因突变频率

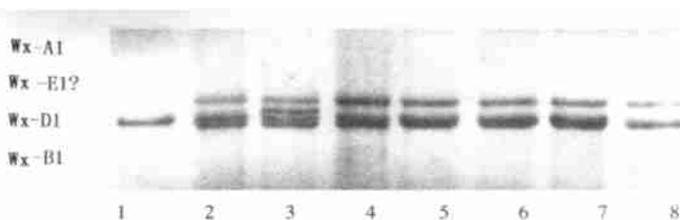
由以上结果可以看出, Waxy 蛋白表现正常的品种为 767 份, 约占所分析的地方品种的 97.83%; 河北省地方品种中 W_x-B1 突变类型为 13 份, 占 1.66%; W_x-D1 突变体 2 份, 占

所分析品种的 0.26%；省外地方品种 W_x-B1 隐性占其 20%，由于省外品种样本量太小，且都集中于以白火麦为主的已知的变异品种，这并不能代表省外品种的真实情况。但这一结果与 Zhao 等人的研究结果^[5]具有共同的特点：Waxy 蛋白正常类型出现频率 > W_x-B1 突变频率 > W_x-A1 或 D1 的突变频率，虽然从这些品种中未能发现 W_x-A1 突变体，但却找到了稀有的、在国外品种中找不到的 W_x-D1 缺失品种。我们以前对地方品种进行麦谷蛋白分析时，曾发现河北省的一些地方品种在 Glu-A1 和 B1 位点具有稀有等位基因^[4]。本研究再次证明，我国的地方品种具有自己独特的特点，与国外材料相比，含有许多稀有基因，具有丰富的遗传多样性，我们必须加以充分研究和利用。

表 1 部分小麦品种 Waxy 基因表现型

品种名称	W _x -A1	W _x -D1	W _x -B1	子粒颜色	成熟期
Gabo(ck)	+	+	-	红	中熟
Norin67(ck)	-	+	-	红	中熟
Halbert(ck)	+	+	-	红	中熟
Kanto107(ck)	-	+	-	红	早熟
Gamaya(ck)	+	+	-	红	晚熟
Satanta(ck)	+	+	-	红	晚熟
荷兰小麦(ck)	-	+	-	红	中熟
中国春(ck)	+	+	+	白	中晚
白芒白	+	-	+	白	中熟
白火麦	+	+	-	红	中熟
白火麦	+	+	-	红	中熟
大白皮	+	+	-	红	中熟
红蘖麦	+	+/-	-	红	晚熟
红芒红	+	+	-	红	中熟
白葫芦头	+	+	-	红	中熟
六棱麦	+	+	-	白	极晚熟
52 白×光头 2	+	+	-	红	中熟
巨鹿申麦	+	+	-	红	早熟
白麦	+	+	-	白	中熟
白芒麦	+	+	-	红	中晚熟
洋麦	+	+	-	白	中熟
小白芒	+	+	-	红	中熟
大白芒	+	+	-	白	早熟
五花头	+	+	-	红	中熟

注：表中+表示显性，-表示隐性



1 kanto107; 2 中国春; 3 冬小偃麦; 4 白麦; 5 大白皮; 6 白火麦; 7 白芒白; 8 红蘖麦

图 1 小麦地方品种 Wx 蛋白 SDS-PAGE 电泳图谱

2.3 小麦地方品种混杂群体的分析

由于小麦地方品种是多个基因型的混杂群体，在利用时有一定的难度，对有代表性的红蘖麦群体的 W_x 位点突变进行了详细研究。按其子粒基本性状将该群体分为 5 类：①长粒：细长有毛类型；②大粒：粒大表面光滑类型；③小粒：粒很小；④蜡质粒：无毛，极像蜡质粒；⑤其他：不符合上述特点的类型。

从表 2 看出，由于长期自然繁殖，红蘖麦群体中存在着比较复杂的变异类型，虽然其植株性状差异不大，但其子粒性状和蜡质基因产生了很多变异，如粒形、粒色和蜡质基因的显隐性等。五种子粒在 W_x-B1 位点分别有 3.33%至 45%发生突变，可以看出小粒、蜡

质粒、其他和长粒为红藜麦的主要突变类型, 大粒为其次要变异类型, 但育种过程中, 这几种类型都有可能成为我们利用的对象; 在 W_x-D1 位点只有长粒样本中有一粒发生变异, 表明自然界中存在极低的 W_x-D1 突变。对该群体的研究表明, 地方品种资源中存在着极为丰富的基因类型, 应继续挖掘和开发其可利用材料; 同时, 应对群体进行详细的归类分析, 以便有针对性地加以利用。

表 2 小麦地方品种红藜麦混合群体 W_x 突变分析

类型	粒数	W _x -B1 缺失基因	B1 缺失因基%	W _x -D1 缺失基因	D1 缺失基因%	正常
长粒	80	15	18.75	1	1.25	64
大粒	30	1	3.33	0	0	29
小粒	30	11	36.67	0	0	19
蜡质粒	40	13	32.50	0	0	27
其他	20	9	45.00	0	0	11
总计	200	49	24.50	1	0.50	150



图 2 红藜麦混合群体电泳图谱

2.4 小麦育成蜡质基因频率分布

在 14 个来源的 432 份小麦育成种中, 国外材料突变频率最高为 33.3%, 这可能是由于我国引种的国外材料多为品质优良的品种, 这些优良品种含有 W_x-B1 突变的频率一般高于国内常规品种, 这是多年品质选择的结果; 北京、山西、陕西、云南等省材料突变频率均在 25% 左右, 在国内属于蜡质基因突变频率最高的几个省份; 河北、河南、山东、江苏等省份突变频率在 6.82% ~ 8.52%, 由于样本量比较大, 这个频率范围代表了这几个省份真实的突变情况; 而四川、天津、黑龙江和安徽等省份的样本量太小, 突变频率也最低。另外,

有 4 份突变材料出现于 26 份未知来源材料中, 频率为 15.38%, 也表现出较高的突变率。在所有材料中共发现 54 份突变材料, 占总数的 12.50%。根据上述结果我们进一步筛选时, 可以从突变率高的省份开始。

2.5 小麦育成种 W_x 基因突变特点

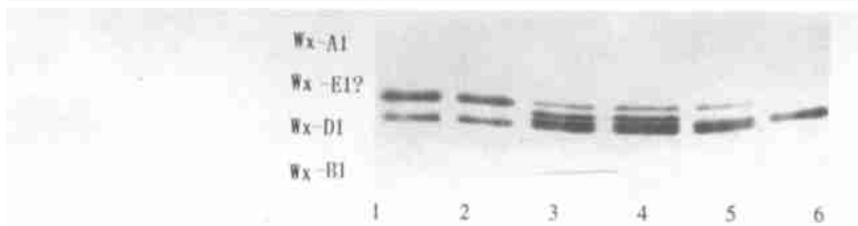
小麦育成种中 W_x 位点的变化趋势与地方品种一致, 出现频率为正常基因类型 (432 份)

表 3 W_x-1 基因突变在各地区的表现

品种来源	品种数	突变品种数	突变频率(%)
北京	39	10	25.64
河北	223	19	8.52
河南	28	2	7.14
山东	44	3	6.82
山西	12	3	25.00
陕西	19	5	26.32
江苏	14	1	7.14
四川	2	0	0
云南	4	1	25.00
天津	1	0	0
安徽	1	0	0
黑龙江	1	0	0
国外	18	6	33.33
未知	26	4	15.38
品种总数	432	54	12.50

表4 W_x蛋白亚基突变品种名称

突变类型	品 种 名 称
W _x -B1 缺失基因	京 411、京 12615、丰抗 7 号、94 中 26、93 中 6、95 中 85、94P3、95 中 637、CA80193、云南 753、鲁 935095、烟选一号、烟 214、郑资 957113、周 88114、临远 90-6011、临汾 90-5454、临 91-4002、7014R ₀ 、早 69-2、金陵 1 号、唐麦 4 号、冀麦 6 号、正定 308、A116、B45、河农 62-1、石 4185、石 89-5321、925-28-1、C619、6203、97M666、冀 95-5219、抗 11、耐热小麦、CSN5B-T5D、CSN5B-T5A、T. Mach、NPF _D 、CBMETWF15、CBMETWF62、萨拉托夫 29
W _x -B1 多态性	92-4204、94-5400、邯 94-5321、邯 94-5316、花 28
W _x -D1 缺失基因	小偃 7631-20-3、Roazon、89(931)、河农 85(972)-18
W _x -E 附加	小偃 693、冬小偃麦



1 89(913); 2 河农 85(972)-18; 3 小偃 693; 4 冬小偃麦; 5 中国春; 6 Kanto107

图3 小麦育成种部分电泳图谱

> W_x-B1(48份) > W_x-D1(4份) > 其他类型(2份)。突变品种年代不一，缺失 W_x-B1 的育成种中有比较著名的老品种如丰抗 7 号、小偃 6 号、冀麦 6 号、京 411 和正定 308 等，也有较新的品系如花 28、冀 95-5219 和 6203 等，多数品种为 20 世纪 90 年代的品种，其中不乏品质优良类型(如周 88114、郑资 957113、冀麦 6 号和唐麦 4 号等)。但品质优良的材料在品质和数量上距离我们的育种要求还相差太远，育种亲本亲缘关系越来越远、可选择资源越来越少，增大了我们的品质育种的难度，由于这些品种的系谱不清楚，其突变基因的来源有可能来自国内某几个亲本或国外的某些亲本，目前我们正在进行某些亲本的系谱整理，搞清品种的蜡质基因突变来源，为育种提供帮助。另外小偃 693 和冬小偃麦两个品种各具有一条普通小麦所不具备的亚基，本研究认为这两个品种是八倍体小偃麦，同时具有小麦 A、B、D 和长穗偃麦草的 E 染色体组，所附加的一条蜡质蛋白亚基应由长穗偃麦草的 4E 或 7E 控制(图 3)，这一研究仍在继续中。这些品种成为小麦育种中具有特殊应用价值的亲本，并为育种过程中优良基因的跟踪和筛选提供了帮助。

3 讨论

利用不同小麦 W_x 基因缺失材料培育蜡质小麦是该研究的最终目的。由于小麦与水稻、玉米不同，是一个异源多倍体，目前尚未发现三个 W_x 位点全都缺失的自然突变体，本研究共从地方品种和育成种中发现 W_x-B1 突变体 63 份，W_x-D1 突变体 4 份，W_x-E 2 份，红藜麦和白芒白等品种的发现，丰富了育种亲本，应用这些材料使得我们有可能创造出糯性的或不含直链淀粉的小麦新品系，我们已将上述品种应用于育种实践，并在近期内取得明显效果。如关东 107 和农林 67 中的 W_x-A1 和 B1 两个隐性基因与红藜麦和白火麦中的 W_x-D1 隐

性基因, 通过常规杂交将三个隐性基因整合到同一后代中, 利用小麦单倍体培育技术迅速纯化后代, 并通过电泳技术鉴定和跟踪这些基因, 提高育种的针对性和准确性。但在培育蜡质小麦时, 要把蜡质基因与影响小麦品质的麦谷蛋白、醇溶蛋白、淀粉等诸因素结合起来综合考虑, 特别应注意的是淀粉特性对品质的影响, 这是先前品质研究比较薄弱的地方。

本文所采用的电泳方法已在几个实践中应用并取得良好效果, 该方法省去了氯化铯梯度离心、丙酮处理等步骤, 操作简便实用, 既节省药品又适合国情, 可以作为材料筛选和育种过程中蜡质基因跟踪鉴定的有效方法。

参考文献:

- [1] Zhao X, Sharp P J. An improved 1D-SDS-PAGE method for the identification of three bread wheat waxy protein [J]. *Journal of Cereal Science*, 1996, 23: 191—193.
- [2] 姚大年, 王新望, 刘志勇, 等. 小麦品种 Waxy 蛋白的鉴定和筛选[J]. *农业生物技术学报*, 1999, 7(1): 1—9.
- [3] 王子宁, 郭北海. 多倍体麦类作物 Wx 蛋白检测的 SDS-PAGE 方法[J]. *遗传*, 2000, (3): 35—38.
- [4] 王子宁, 郭北海. 小麦地方品种 SDS-PAGE 分析[J]. *华北农学报*, 1992, 7(4): 53—57.

Mutant Screen of Wheat Cultivars (*T. aestivum*) for Waxy Genes (null) Types

WANG Zi-ning, GUO Bei-hai, ZHANG Yan-min, WEN Zhi-yu

(Institute of Food and Oil Crops Hebei Academy of Agricultural and Forestry
Sciences Shijiazhuang 050031, China)

Abstract: The technique of SDS-PAGE was used for the waxy gene(null) mutant selection among 1 270 varieties from both landraces and breeding lines of domestic and abroad origin. Sixty-three W_x-B1(null) varieties, 4 W_x-D1(null) mutants and 2 W_x-E materials were successfully obtained. The discovery of hongniemai and baimangbai enriched breeding parents and established a solid foundation for wheat quality breeding in China. This will enable us to create new waxy wheat cultivars. The waxy gene of *Elytrigia elongata* (HOST). Beauv is different form that of *Triticum aestivum* and further study on molecular level should be conducted. The result indicated that landraces and breeding lines follow the same mutant pattern. The frequency pattern provides us useful information in future mutant selection form breeding lines.

Key words: Common wheat; Landraces; Breeding line; Waxy gene; Mutant