

蓝、紫粒小麦 Wx 基因分子检测及 部分氨基酸含量分析

任文斌¹, 谢三刚¹, 吴翠翠¹, 杨慧勇², 李素娟³,
杨娜¹, 高明¹, 宋昱¹, 谢飒英¹

(1. 山西省农业科学院 棉花研究所, 山西 运城 044000; 2. 山西省农业科学院 高粱研究所,
山西 晋中 030600; 3. 山西省农业科学院 现代农业研究中心, 山西 太原 030031)

摘要: 利用 3 对引物对 47 份品系进行 Wx 基因分子检测, 其中 3 份白粒小麦为野生型材料, 22 份蓝粒小麦和 22 份紫粒小麦为 Wx 基因全突变型材料, 即全糯小麦。对其部分氨基酸含量进行多重比较, 结果表明, 总体上蓝粒糯小麦氨基酸含量高于紫粒糯小麦, 紫粒糯小麦高于白粒小麦; 3 种类型小麦精氨酸、半胱氨酸、赖氨酸、蛋氨酸、苏氨酸、缬氨酸含量差异极显著; 异亮氨酸、色氨酸含量差异达显著水平。

关键词: 蓝粒小麦; 紫粒小麦; Wx 基因; 氨基酸

中图分类号: S512.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7091(2014)01-0103-05

Wx Gene Molecular Detection and Statistical Analysis on Part of the Amino Acid Content of Blue or Purple Grain Wheat

REN Wen-bin¹, XIE San-gang¹, WU Cui-cui¹, YANG Hui-yong², LI Su-juan³,
YANG Na¹, GAO Ming¹, SONG Yu¹, XIE Sa-ying¹

(1. Cotton Research Institute, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Yuncheng 044000, China;

2. Sorghum Research Institute, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Jinzhong 030600, China;

3. Research Center of Modern Agriculture, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Taiyuan 030031, China)

Abstract: Three primer pairs of Wx gene were used in molecular detection from forty-seven wheat strains. Three white wheats were wild type material, twenty-two Blue grain and twenty-two purple grain of wheats were Wx gene mutation type materials, named the full waxy wheats. Multiple comparative analysis on part of the amino acid content. The results showed that amino acid content of the blue waxy wheats was higher than the purple waxy wheats, the purple waxy wheats was higher than white wheats; Arg, Cys, Lys, Met, Thr, Val content of the three types of wheat were extremely significant different, Ile, Trp content were significantly different.

Key words: Blue grain wheat; Purple grain wheat; Wx gene; Amino acid

蓝、紫、紫黑等小麦粒色较深, 一般统称为黑小麦^[1]。其粗蛋白及氨基酸含量均显著高于白粒小麦^[2-4]。蓝、紫粒小麦中富含维生素、微量元素、Fe、I、P 等元素^[5-9]。糯小麦是人工创制的新物种, 主要特征是在小麦染色体中受 7A、4A、7D 共 3 对隐性基因控制, 当 3 种 Wx 蛋白亚基即 Wx-A1、Wx-B1 和 Wx-D1 全部缺失时, 小麦胚乳中直链淀粉含量几乎为零, 称为全糯小麦^[10-13]。小麦直链淀粉与支链淀

粉的比例影响淀粉的黏度、成胶性、糊化特性和凝胶化作用。糯性小麦具有支链淀粉含量高、糊化温度低、高峰粘度高和膨胀势高等特点^[14-17]。蓝、紫粒糯小麦也具有相同的特性。对紫粒糯小麦部分氨基酸含量的测定, 国内还未见相关报道。

本试验运用蓝、紫粒小麦和糯小麦杂交, 通过改良系谱法选育、分子标记辅助选择, 选育出农艺性状较好、具有黑粒小麦营养价值同时又具有糯小麦优

收稿日期: 2013-11-13

基金项目: 山西省科技攻关项目(20130311001-3); 山西省农业科学院育种工程项目(11yzgc102)

作者简介: 任文斌(1980-), 男, 山西沁源人, 助理研究员, 硕士, 主要从事小麦遗传育种与栽培研究。

良加工特性的材料,这对食品行业来说是一个新型的小麦原料,对小麦育种来说也是一个材料创新。

1 材料和方法

1.1 试验材料

蓝粒小麦 22 份、紫粒小麦 22 份、白粒小麦 3 份(表 1)。均由山西省农科院棉花研究所提供。蓝、紫粒小麦品系采用改良系谱法选育而成。

1.2 试验方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取及 PCR 检测 每个品系选择 3~4 个幼苗叶片,采用 CTAB 法^[18]提取小

麦基因组 DNA。PCR 反应体系为 15 μ L,包含 3 μ L 30~100 ng 基因组 DNA,1.5 μ L 10 \times PCR Buffer,1 μ L 2 mmol/L $MgCl_2$,0.5 μ L 200 mmol/L dNTP,0.2 μ mol/L 的左右引物各 2.0 μ L,0.5 U *Taq* DNA 聚合酶,其余由 ddH₂O 补至 15 μ L。

PCR 扩增程序为:95 $^{\circ}C$ 预变性 5 min;94 $^{\circ}C$ 变性 30 s,55 $^{\circ}C$ 退火 45 s(*Wx-A1* 引物);65 $^{\circ}C$ 退火 45 s(*Wx-B1* 引物);56 $^{\circ}C$ 退火 45 s(*Wx-D1* 引物);72 $^{\circ}C$ 延伸 1.5 min,33 个循环;最后 72 $^{\circ}C$ 延伸 10 min,4 $^{\circ}C$ 保存待用。

表 1 供试 47 份小麦材料编号及名称

Tab. 1 Names and code of the 47 wheat materials in this study

序号 Code	品系名称 Strains	序号 Code	品系名称 Strains	序号 Code	品系名称 Strains
1	晋麦 84	17	Ln14	33	Zn8
2	运麦 218	18	Ln15	34	Zn9
3	舜麦 1718	19	Ln16	35	Zn10
4	Ln1	20	Ln17	36	Zn11
5	Ln2	21	Ln18	37	Zn12
6	Ln3	22	Ln19	38	Zn13
7	Ln4	23	Ln20	39	Zn14
8	Ln5	24	Ln21	40	Zn15
9	Ln6	25	Ln22	41	Zn16
10	Ln7	26	Zn1	42	Zn17
11	Ln8	27	Zn2	43	Zn18
12	Ln9	28	Zn3	44	Zn19
13	Ln10	29	Zn4	45	Zn20
14	Ln11	30	Zn5	46	Zn21
15	Ln12	31	Zn6	47	Zn22
16	Ln13	32	Zn7		

注:Ln 代表蓝粒小麦;Zn 代表紫粒小麦。

Note:Ln representative blue grain of wheat;Zn representative purple grain of wheat.

1.2.2 特异性标记引物 试验中所用特异引物由上海生工生物技术公司合成,*Wx-A1*^[19]引物序列为:F 5'-CCAAAGCAAAGCAGGAAACC-3',R 5'-TAC-CTCGGAGATGACGCTGG-3';野生型特征带 336 bp,突变型特征带为 317 bp。*Wx-B1*^[20]引物序列为:F 5'-CTGGCCTGCTACCTCAAGAGCAACT-3',R 5'-CTGACGTCCATGCCGTTGACGA-3';野生型特征带 425 bp,突变型特征带缺失。*Wx-D1*^[21]引物序列为:F 5'-ACAGGATCTCTCCTGGAAG-3',R 5'-GCAAGGAA AATAGTGAAGC-3';野生型特征带为 867 bp,突变型特征带为 279 bp。品系中 3 个基因都为突变型的全糯型小麦。

1.2.3 各品系部分氨基酸含量检测 利用 Perten Laboratory Mill 3100 型实验磨对各品系籽粒进研磨,所磨面粉利用 Foss NiRsystems 5000 型谷物分析

仪进行部分氨基酸含量分析,标准曲线由中国农科院提供。

2 结果与分析

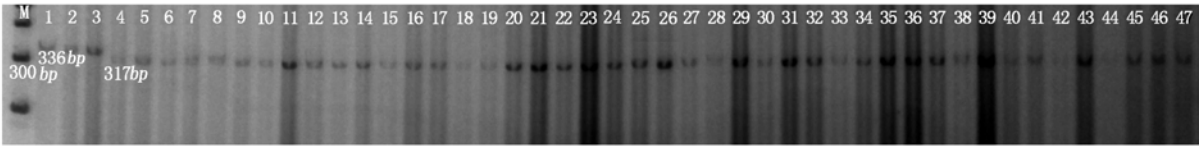
2.1 *Wx-A1* 基因分子标记检测

利用 *Wx-A1* 基因特异标记对 47 份品系进行检测,第 1~3 泳道的 3 个白小麦品系扩增出野生型 336 bp 的特征带;22 份蓝粒小麦和 22 份紫粒小麦扩增出 317 bp 突变型条带,表明这 44 份蓝、紫粒品系在 *Wx-A1* 基因位点是突变型材料(图 1)。

2.2 *Wx-B1* 基因分子标记检测

利用 *Wx-B1* 基因特异标记对 47 份品系进行检测,第 1~3 泳道的 3 个白小麦品种,分别为晋麦 84、运麦 218、舜麦 1718,扩增出野生型 425 bp 的特征带,22 份蓝粒小麦和 22 份紫粒小麦 425 bp 的特

征带为缺失,表明这 44 份蓝、紫粒品系在 *Wx-B1* 基因位点是突变型材料(图 2)。



M. Marker;1. 晋麦 84;2. 运麦 218;3. 舜麦 1718;4~25. 蓝粒小麦;26~47. 紫粒小麦。图 2~3 同。
M. Marker;1. Jinmai 84;2. Yunmai 218;3. Shunmai 1718;4~25. Blue wheat;26~47. Purple wheat. The same as Fig. 2~3.

图 1 47 份品系 *Wx-A1* 标记多态性检测结果

Fig. 1 Result of polymorphic test with *Wx-A1* for 47 strains

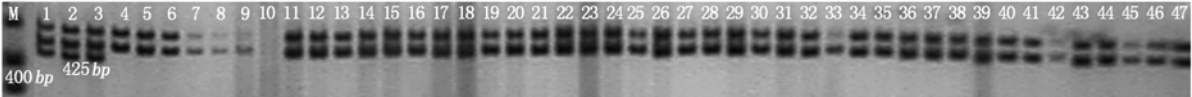


图 2 47 份品系 *Wx-B1* 标记多态性检测结果

Fig. 2 Result of polymorphic test with *Wx-B1* for 47 strains

2.3 *Wx-D1* 基因分子标记检测

利用 *Wx-D1* 基因特异标记对 47 份品系进行检测,第 1~3 泳道的晋麦 84、运麦 218、舜麦 1718;扩增出野生型 867 bp 的特征带;22 份蓝粒小麦和 22

份紫粒小麦扩增出 279 bp 的突变型特征带,表明这 44 份蓝、紫粒品系在 *Wx-D1* 基因位点是突变型材料(图 3)。

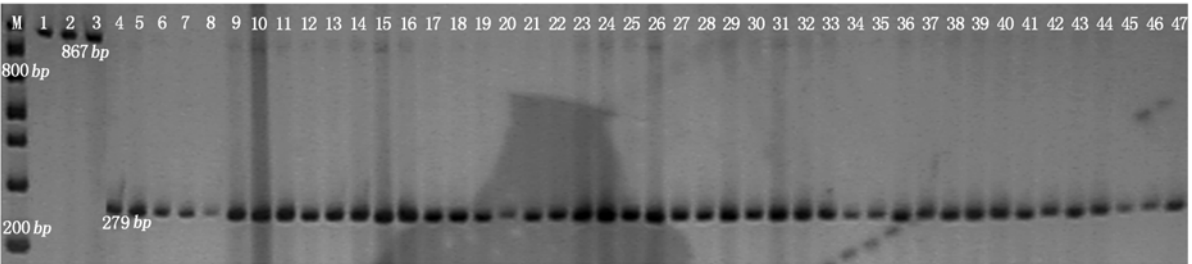


图 3 47 份品系 *Wx-D1* 标记多态性检测结果

Fig. 3 Result of polymorphic test with *Wx-D1* for 47 strains

2.4 各品系部分氨基酸含量分析

对 22 份蓝糯小麦 9 种氨基酸含量进行测定,结果表明,蛋氨酸的变异系数最高,为 6.63%,色氨酸变异系数最低,为 4.17%;亮氨酸变幅最大,为 0.23%(表 2)。其中品系 Ln6 精氨酸含量为

0.95%、半胱氨酸为 0.43%、异亮氨酸为 0.63%、亮氨酸为 1.24%、赖氨酸为 0.45%、苏氨酸为 0.54%、缬氨酸为 0.82%,为所测品系中最高值,是一个很好的育种材料;Ln5 蛋氨酸含量最高,为 0.31%;Ln17 色氨酸含量最高为 0.20%。

表 2 22 份蓝糯小麦部分氨基酸含量统计分析

Tab. 2 Statistical analysis on part of the amino acid content of 22 the blue waxy wheat

氨基酸名称 Amino acids	最小值 Min.	最大值 Max.	平均值 Mean	变异幅度 Range	标准差 SD	变异系数 CV
精氨酸 Arg	0.77	0.95	0.85	0.18	0.05	5.58
半胱氨酸 Cys	0.35	0.43	0.39	0.08	0.02	5.49
异亮氨酸 Ile	0.52	0.63	0.56	0.11	0.03	5.75
亮氨酸 Leu	1.01	1.24	1.11	0.23	0.07	6.22
赖氨酸 Lys	0.36	0.45	0.41	0.09	0.02	5.50
蛋氨酸 Met	0.25	0.31	0.27	0.06	0.02	6.63
苏氨酸 Thr	0.44	0.54	0.48	0.10	0.03	5.72
色氨酸 Trp	0.18	0.20	0.19	0.02	0.01	4.17
缬氨酸 Val	0.68	0.82	0.74	0.14	0.04	5.25

对 22 份紫糯小麦 9 种氨基酸含量进行测定,结果表明,赖氨酸变异系数最高,为 6.63%;色氨酸的变异系数最低,为 5.13%;亮氨酸变幅最大,为 0.18%(表 3)。其中品系 Zn10 精氨酸含量为 0.83%、异亮

氨酸为 0.54%、亮氨酸为 1.06%、苏氨酸为 0.47%、色氨酸为 0.18%、缬氨酸为 0.71%,在紫糯小麦中均最高。Zn13 半胱氨酸含量最高,为 0.39%;Zn16 赖氨酸、蛋氨酸含量最高,分别为 0.41%、0.27%。

表 3 22 份紫糯小麦部分氨基酸含量统计分析

Tab. 3 Statistical analysis on part of the amino acid content of 22 the purple waxy wheat

%

氨基酸名称 Amino acids	最小值 Min.	最大值 Max.	平均值 Mean	变异幅度 Range	标准差 SD	变异系数 CV
精氨酸 Arg	0.67	0.83	0.76	0.16	0.05	6.48
半胱氨酸 Cys	0.32	0.39	0.35	0.07	0.02	5.46
异亮氨酸 Ile	0.44	0.54	0.49	0.10	0.03	6.08
亮氨酸 Leu	0.88	1.06	0.97	0.18	0.06	6.04
赖氨酸 Lys	0.33	0.41	0.37	0.08	0.02	6.63
蛋氨酸 Met	0.22	0.27	0.24	0.05	0.01	6.08
苏氨酸 Thr	0.38	0.47	0.43	0.09	0.03	6.40
色氨酸 Trp	0.15	0.18	0.17	0.03	0.01	5.13
缬氨酸 Val	0.58	0.71	0.65	0.13	0.04	5.98

对 3 种类型小麦 9 种氨基酸含量多重比较表明:精氨酸、半胱氨酸、赖氨酸、蛋氨酸、苏氨酸、缬氨酸含量差异极显著,异亮氨酸、色氨酸含量差异达显著水平,亮氨酸含量蓝粒糯小麦与紫粒糯小麦达显

著水平(表 4)。总体上,蓝粒糯小麦的 9 种氨基酸含量高于紫粒糯小麦,紫粒糯小麦高于白粒小麦,由于白粒小麦材料较少,需进一步加大进行测定。

表 4 三种类型小麦部分氨基酸含量比较分析

Tab. 4 Comparative analysis on part of the amino acid content of 3 types of wheat

小麦品系 Wheat strain	精氨酸 Arg	半胱氨酸 Cys	异亮氨酸 Ile	亮氨酸 Leu	赖氨酸 Lys	蛋氨酸 Met	苏氨酸 Thr	色氨酸 Trp	缬氨酸 Val
白粒小麦 White grain wheat	0.68aA	0.31aA	0.46aA	0.91aA	0.32aA	0.21aA	0.38aA	0.16aA	0.60aA
蓝粒糯小麦 Blue grain waxy wheat	0.85cC	0.39cC	0.56cB	1.11bB	0.41cC	0.27cC	0.48cC	0.19cB	0.74cC
紫粒糯小麦 Purple grain waxy wheat	0.76bB	0.35bB	0.49bA	0.97aA	0.37bB	0.24bB	0.43bB	0.17bA	0.65bB

注:不同小写字母表示在 0.05 水平上差异显著;不同大写字母表示在 0.01 水平上差异显著。

Note: Different lowercase letters mean significant difference at 0.05 level; Different capital letters mean significant difference at 0.01 level.

3 讨论

糯小麦的研究已经很多,糯小麦的鉴定主要通过籽粒剖面用 0.2% 的 I-KI 染色^[22]、SDS-PAGE 验证、分子标记筛选^[23] 3 种途径进行鉴定。由于 0.2% 的 I-KI 染色只能鉴定全糯小麦,也就是 3 对 Wx 基因全部为突变型材料。而对于缺失 1 对或 2 对的半糯型材料无法鉴定,所以它的应用具有局限性。但在 F_2 的全糯鉴定中表现为快速、准确、简单。而另外 2 种方法可以鉴定半糯型材料,但操作比较繁琐,价格相对较高。

通过分子标记鉴定糯性小麦的引物较多,引物序列各不相同。本研究使用的引物是在查阅大量文献的基础上,筛选 3 对引物进行蓝、紫糯小麦的鉴定。本试验表明,22 份蓝粒小麦和 22 份紫粒小麦为全糯小麦。通过图 1~3 可以区分野生型和突变型材料,可以鉴定 8 种基因型,这为培育半糯型的蓝、紫粒小麦提供了理论依据。根据舒守贵等^[24] 的研究,缺失不同 Wx 基因的材料,直链淀粉含量差异显著。单缺失 $Wx-2B1b$ 的材料,直链淀粉减少效应最大,单缺失 $Wx-2A1b$ 的材料,直链淀粉减少效应最小。而在国内北京、山西、陕西、云南的材料 $Wx-$

$B1$ 突变频率最高^[25],这些材料可以直接应用于创造缺失不同 Wx 基因的蓝、紫半糯小麦、这些蓝、紫半糯小麦直链淀粉减少效应与白粒小麦是否具有相同趋势还需进一步研究。

本试验材料主要通过改良系谱法选育而成,父本蓝、紫粒小麦株高较高,旗叶宽长,株型松散;母本穗部细长、产量较低等,所以试验材料农艺性状还需进一步改良,特别是在产量方面与白粒小麦相比还有很大差距。

蓝粒小麦和紫粒小麦中各种氨基酸种类丰富,赖氨酸、苯丙氨酸、苏氨酸和异亮氨酸几种限制性氨基酸的评分均远远超过白粒小麦^[26]。本试验结果表明,蓝、紫粒糯小麦的 9 种氨基酸含量也均高于白粒小麦,都达到显著水平,部分氨基酸含量达到极显著水平。这些独特的材料必然为品质育种提供种质基础,为提高食品营养,改善人们膳食结构提供新的原材料。

参考文献:

- [1] 裴自友,孙 玉,孙善澄,等. 中国黑小麦研究利用现状[J]. 种子,2002(4):42-44.
- [2] 孙善澄,孙 玉,袁文业,等. 优质黑粒小麦 76 的选育

- 及品质分析[J]. 作物学报, 1999, 25(1): 50-54.
- [3] 李帮秀, 宗学风, 张建奎. 黑粒小麦的营养特性研究[J]. 西南农业大学学报: 自然科学版, 2004, 26(6): 753-755.
- [4] 任文斌, 谢三刚, 宋 昱, 等. 黑小麦农艺性状和品质性状分析[J]. 山西农业科学, 2010, 38(4): 11-13, 17.
- [5] 李志辉, 李建钊, 靳巧玲. 蓝、紫(黑)粒小麦种质评价及其在育种中的应用[J]. 中国种业, 2003(6): 13-14.
- [6] 王秋叶, 姚景珍, 李秀绒, 等. 河东乌麦营养特性、品质性状及其在食品中的应用[J]. 耕作与栽培, 2007(6): 35-37.
- [7] 孙 玉, 孙善澄, 刘少翔, 等. 高营养饲料粮兼用全黑小麦的选育[J]. 山西农业科学, 2009, 37(12): 3-6.
- [8] 李杏普, 兰素缺, 刘玉平. 蓝、紫粒小麦籽粒色素及其相关生理生化特性的研究[J]. 作物学报, 2003, 29(1): 157-158.
- [9] 李杏普, 侯红军, 刘玉平, 等. 紫粒小麦的营养品质研究[J]. 华北农学报, 2002, 17(1): 21-24.
- [10] 李继刚, 梁荣奇, 张义荣, 等. 糯性普通小麦的产生及其淀粉特性研究[J]. 麦类作物学报, 2001, 21(2): 10-13.
- [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] 何中虎. 糯小麦的研究概况[J]. 作物杂志, 1999(2): 7-9.
- [14] 宋建民. 小麦 *Wx* 蛋白对淀粉理化特性和面条品质的影响及其作用机理研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2003.
- [15] 张 剑, 张 杰, 李梦琴, 等. 糯小麦对面粉及面条品质的影响[J]. 河南农业大学学报, 2008, 42(4): 446-460.
- [16] 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.) [J]. Euphytica, 1992, 64: 215-219.
- [17] Zhao X C, Batey I L, Sharp P J, et al. A single genetic locus associated with starch granule proteins and noodle quality in wheat [J]. Journal of Cereal Science, 1998, 27: 7-13.
- [18] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [19] 刘迎春, 朱惠兰, 程顺和. 小麦 *Wx*-A1 和 *Wx*-D1 位点的 PCR 分子标记[J]. 麦类作物学报, 2005, 25(1): 1-5.
- [20] Nakamura T, Vrinten P, Saito M, et al. Rapid classification of partial waxy wheats using PCR-based markers [J]. Genome, 2002, 45(6): 1150-1156.
- [21] 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 [J]. Plant Breeding, 2001, 120: 121-124.
- [22] 姚大年, 张文明, 王昌初. 小麦 Waxy 蛋白亚基缺失类型组合后代糯小麦材料选择的研究[J]. 安徽农业大学学报, 2002, 29(4): 363-364.
- [23] 邓万洪, 晏本菊, 任正隆. 利用 *Wx* 基因的分子标记筛选部分糯小麦的研究[J]. 麦类作物学报, 2007, 27(6): 982-988.
- [24] 舒守贵, 孙家柱, 张爱民, 等. 糯小麦回交改良群体中 *Wx* 基因的遗传和品质效应[J]. 应用与环境生物学报, 2007, 13(5): 624-629.
- [25] 王子宁, 郭北海, 张艳敏, 等. 小麦糯性突变体的筛选[J]. 华北农学报, 2002, 17(3): 14-19.
- [26] 刘玉平, 权书月, 李杏普, 等. 蓝、紫粒小麦蛋白质含量、氨基酸组成及其品质评价[J]. 华北农学报, 2002, 17(增刊): 103-107.