

河南省小麦新品种(系)籽粒硬度等位变异检测

张福彦^{1,3}, 张建伟^{1*}, 杨保安¹, 程仲杰¹, 鄧洋军², 崔党群³

(1. 河南省科学院 同位素研究所有限责任公司, 河南省核农学重点实验室, 河南 郑州 450015;

2. 新郑市农业农村工作委员会, 河南 新郑 451100; 3. 河南农业大学 农学院, 河南 郑州 450002)

摘要: 为了解河南省最新培育的小麦品种(系)的籽粒硬度概况和 *Puroindoline* 等位变异类型及其分布, 以参加河南省小麦预试及区域试验的 145 份小麦新品种(系)为材料, 采用单籽粒谷物特性测定仪(SKCS)、分子标记技术、限制性内切酶技术以及 DNA 测序技术, 对其 SKCS 硬度表型及 *Puroindoline* 的不同等位变异类型进行了测试和鉴定。结果表明, 参试材料中硬质麦比例较高, 为 64.1%, 而混合型和软质麦比例较低, 分别为 18.9% 和 20.0%, SKCS 硬度指数范围较宽, 为 13.0~75.9。在硬质麦的 *Puroindoline* 基因型检测中, 共检测到 *Pina-D1b*、*Pinb-D1b* 和 *Pinb-D1p* 3 种类型, 其中 *Pinb-D1b* 所占比例最高, 占 87.1%, 而 *Pina-D1b* 和 *Pinb-D1p* 则分别为 4.3% 和 8.6%。不同 *Puroindoline* 基因型的籽粒硬度也存在差异, 其中 *Pina-D1b* 突变型的硬度值最高, 为 72.3, *Pinb-D1a* (野生型)最低, 为 62.3, 并且 *Pina-D1b* 与 *Pinb-D1b* 2 种硬质类型的籽粒硬度呈显著性差异, 而 *Pina-D1b* 与 *Pinb-D1p* 的籽粒硬度无显著性差异。

关键词: 普通小麦; 籽粒硬度; *Puroindoline*; STS 标记**中图分类号:** S512.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2012)12-0033-05

Allelic Variation of Grain Hardness in New Varieties(Lines) of Bread Wheat in Henan Province

ZHANG Fu-yan^{1,3}, ZHANG Jian-wei^{1*}, YANG Bao-an¹, CHENG Zhong-jie¹,
ZHI Yang-jun², CUI Dang-qun³(1. Isotope Institute Co., Ltd Henan Key Laboratory of Nuclear Agricultural Sciences,
Henan Academy of Sciences, Zhengzhou 450015, China;

2. Xinzheng City Agriculture and Rural Work Committee, Xinzheng 451100, China;

3. Agronomy College of Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: In order to know the situation of kernel hardness and the allelic distribution of *Puroindoline* genes in new wheat varieties or lines of Henan province, a total of 145 wheat varieties or advanced lines recently participating in Henan Wheat Pre-test and Regional Test were used to identify the phenotypes of grain texture and the genotypes of *Puroindoline* genes by means of the technologies of Single Kernel Characterization System (SKCS), molecular marker, restriction enzyme and DNA sequencing. The results showed that the hard wheat was predominant, with a percentage of 64.1%, while the mixed wheat and soft wheat accounted for 18.9% and 20.0%, respectively. Based on SKCS test, the grain hardness index of wheats ranged widely from 13.0 to 75.9. Three *Puroindoline* alleles of *Pina-D1b*, *Pinb-D1b* and *Pinb-D1p* were detected in hard

收稿日期: 2012-07-08

基金项目: 河南省重点科技攻关项目(112102110199); 河南省小麦产业技术体系建设专项资金项目(Z2010-01-04); 公益性行业(农业)科研专项(201103007)

作者简介: 张福彦(1983-), 男, 河南正阳人, 在读博士研究生, 研究方向: 小麦遗传育种。E-mail: zhangfuyan704@163.com

* 通讯作者: 张建伟(1964-), 男, 河南新野人, 研究员, 研究方向: 小麦遗传育种。E-mail: zjw10308@163.com

wheats, of which *Pinb-D1b* was the most prevalent, with a percentage of 87.1%, while *Pina-D1b* and *Pinb-D1p* was only 4.3% and 8.6%, respectively. The kernel hardness was different in different Puroindoline genotypes. The kernel hardness index of mutant *Pina-D1b* was the highest and that of *Pina-D1a/Pinb-D1a* was the lowest in all genotypes. There were significant difference in the kernel hardness index between genotypes of *Pina-D1b* and *Pinb-D1b*, but the difference was not significant between *Pina-D1b* and *Pinb-D1p*.

Key words: bread wheat; grain hardness; *Puroindoline*; STS marker

普通小麦的籽粒硬度具有很高的遗传率, 是最重要的小麦品质性状之一。普通小麦可分为硬质、软质和混合麦 3 种类型, 且被位于 5D 染色体短臂上的 Ha 位点所控制, 此位点包括 *Puroindoline a*、*Puroindoline b* 基因(*Pina-D1* 和 *Pinb-D1*) 以及 *Gsp-1* 基因, 且三者之间的顺序为 *Pinb-Pina-Gsp-1*^[1]。*Puroindoline* 基因是小麦籽粒硬度形成的分子遗传基础, 其任一基因发生突变都会导致小麦质地变硬^[1-2]。目前, 在世界范围内已发现的 20 多种 *Puroindoline* 基因中, *Pina-D1b* 和 *Pinb-D1b* 是最常见的 2 种变异类型, 其他突变类型 *Pinb-D1* 和 *Pinb-D1b-g* 只会出现在一些特殊的种质中^[3-8]。赵新等^[9]和 Chen 等^[10]的研究表明, 不同 *Puroindoline* 变异类型之间在磨粉、馒头、面包等加工品质上存在很大差别。马冬云等^[11]利用 *Puroindoline b* 位点近等基因系进行研究, 结果表明, *Pinb-D1d*、*Pinb-D1g* 和 *Pinb-D1e* 类型是品质性状相对优异的类型。

关于小麦籽粒硬度 *Puroindoline* 基因型鉴定的研究已有很多^[12-14, 17], 但以小麦新品种(系)为试验材料研究较少, 而河南省正在实施国家粮食战略工程—河南粮食核心区建设, 小麦育种单位有近百家, 每年选育、审定出大量的优异品系和品种, 为此, 本试验选用河南省最新审定的小麦品种和参加河南省预试及区试的小麦新品种(系)为材料进行籽粒硬度 *Puroindoline* 基因的等位变异测试和分子检测, 旨在为优质专用小麦育种提供优异的基因资源。

1 材料和方法

1.1 试验材料

选用 145 份 2010 年参加河南省小麦预试的小麦新品种(系), 按随机区组试验设计种植在河南农业大学试验园区, 每个小区 12 行, 长 6 m, 宽 2.5 m。田间管理同大田生产, 抽穗后及时去杂, 收获后自然干燥, 水分在 11%~13% 时进行硬度测试和分子检测。

1.2 SKCS 硬度指数测定

随机选取 100 粒有代表性的种子, 利用单籽粒谷物硬度测试仪(SKCS)测定, 并进行统计分析, 显示每个样品的平均值、标准差并绘图, 可以同时测定籽粒千粒重、直径、硬度指数和水分含量, 并且给出小于 33、34~46、47~59 和大于 60 四个级别的籽粒分布频率, 其最终的硬度级别划分是根据硬度指数和分布频率给出的硬度类型(硬质 H、软质 S 和混合型 M)确定其硬度级别: 硬质麦(1、2 级)、软质麦(4、5 级)或混合麦(3 级)。

1.3 *Puroindoline-D1* 变异类型鉴定

采用单粒法快速提取试验材料的基因组 DNA^[15]。参照 Chen 等^[5]使用的方法鉴定 *Pinb-D1b* 类型, 根据 Chen 等^[16]开发的 STS 标记, 直接用 PCR 扩增的方法鉴定 *pina* 缺失类型(*Pina-D1b*), 同时参照 Li 等^[17]采用的酶切方法鉴定 *Pinb-D1p* 类型(表 1)。

表 1 普通小麦中鉴定 *Puroindoline-D1* 的引物汇总

基因型	上游引物(5'-3')	下游引物(5'-3')	退火温度/℃	片段大小/bp
<i>Pina-D1</i>	CATCTATTTCATCTCCACCTGC	GTGACAGTTTATTAGCTAGTC	58	524
<i>Pina-D1b</i>	AATACCACATGGTTCTAGATACT	GCAATACAAAGGACCTCTAGATT	60	776
<i>Pinb-D1</i>	GAGCCTCAACCCATCTATTCATC	CAAGGGTGATTTTATTCATAG	58	597
<i>Pinb-D1b</i>	ATGAAGGCCCTCTTCCTCA	CTCATGCTCACAGCCGCT	58	250
<i>Pinb-D1b2</i>	ATGAAGGCCCTCTTCCTCA	CTCATGCTCACAGCCGCC	58	250

PCR 扩增在 ABI9700 型 PCR 扩增仪中进行, 25 μ L 的扩增体系中包含 200 ng 的基因组 DNA, 1 \times PCR 缓冲液(50 mmol KCl, 10 mmol Tris-HCl,

pH 值 9.0、2.0 mmol MgCl₂, pH 值 8.0), 10 pmol 的上下游引物, 200 μ mol 的 dNTP 和 1.0 U 的 *Taq* 酶。反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 45

s,58~60℃退火 45 s(表 1),72℃延伸 2 min,共循环 35 次;最后 72℃延伸 10 min。取 5 μL PCR 扩增产物用 1.5% (W/V)琼脂糖凝胶电泳分离,溴化乙锭(EB)染色,在凝胶成像系统下扫描照相,并保存至计算机以备分析。

PCR 产物酶切鉴定 *Pinb-D1p* 类型时,反应体系:1×Buffer,10 U *Pf*1MI,400 ng PCR 产物,加 ddH₂O 至 20 μL,放置于 37℃水浴锅中 4 h。2.5% (W/V)琼脂糖凝胶电泳分离,溴化乙锭(EB)染色,在凝胶成像系统下扫描照相,并保存至计算机以备分析。

1.4 数据分析

利用 Chromas 1.4.5 软件对测序图谱进行分析,以核查测序结果的可靠性,用 DNAMAN 6.0 软

件将可靠的测序结果与已知的等位基因序列进行比对,确定其基因型。利用 Excel 进行 SKCS 平均值和标准差等参数进行统计,并用多重比较对 SKCS 硬度值进行差异显著性比较。

2 结果与分析

2.1 小麦籽粒硬度表型分布

采用分子标记技术对参试材料中的所有硬质品种进行鉴定,部分材料鉴定结果见表 2。SKCS 测试结果表明,供试的 145 份材料中硬质麦为 93 份,占 64.1%;混合麦为 23 份,占 18.9%;软质麦为 29 份,占 20.0%。籽粒硬度的分布范围为 13.0~75.9,这说明参加河南省预试的小麦新品系硬度变异范围较广,且以硬质麦为主。

表 2 河南省预试小麦新品种(系)部分材料的硬度表型以及 *Puroindoline-D1* 鉴定

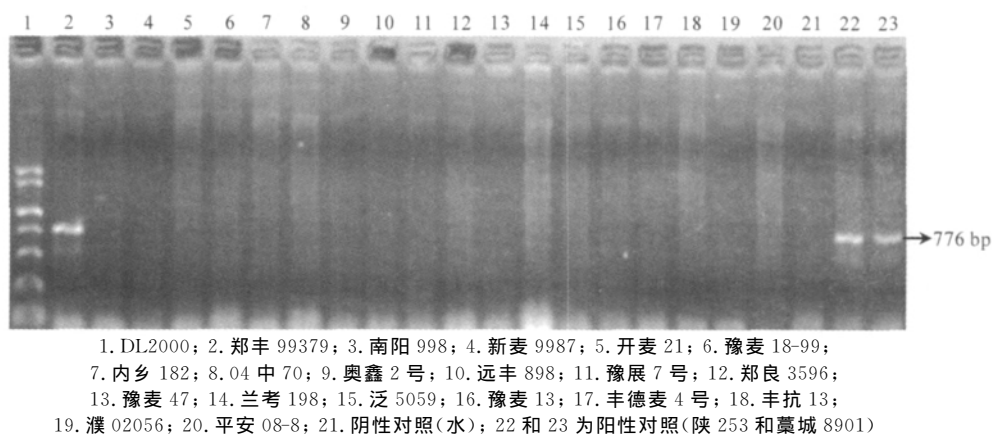
品种(系)	表现型	SKCS 硬度	频率分布/%	硬度级别	<i>Puroindoline-D1</i>
泛 5059	软质	18.2	92-5-2-1	5	<i>Pina-D1a/Pinb-D1a</i>
偃展 4110	软质	13.0	94-6-0-0	5	<i>Pina-D1a/Pinb-D1a</i>
豫麦 18-99	软质	16.3	91-6-2-1	5	<i>Pina-D1a/Pinb-D1a</i>
平安 08-8	软质	31.0	59-29-10-2	5	<i>Pina-D1a/Pinb-D1a</i>
郑农 01059	软质	25.0	75-22-3-0	5	<i>Pina-D1a/Pinb-D1a</i>
周麦 18	硬质	58.0	2-13-40-45	1	<i>Pina-D1a/Pinb-D1b</i>
天禾 3 号	硬质	60.0	0-9-41-50	1	<i>Pina-D1a/Pinb-D1b</i>
郑麦 00314	硬质	51.1	8-25-37-30	2	<i>Pina-D1a/Pinb-D1b</i>
开麦 21	硬质	54.0	4-25-36-35	1	<i>Pina-D1a/Pinb-D1b</i>
豫农 3096	硬质	54.0	10-24-34-32	2	<i>Pina-D1a/Pinb-D1b</i>
郑丰 99379	硬质	75.9	2-5-9-84	1	<i>Pina-D1b/Pinb-D1a</i>
周 99233	硬质	71.9	1-2-21-76	1	<i>Pina-D1b/Pinb-D1a</i>
郑麦 1410	硬质	63.0	1-8-27-64	1	<i>Pina-D1a/Pinb-D1p</i>
兰考 008	硬质	69.9	0-1-17-82	1	<i>Pina-D1a/Pinb-D1b</i>
郑麦 0856	硬质	72.0	0-0-15-85	1	<i>Pina-D1b/Pinb-D1a</i>
宝麦 6 号	混合型	26.3	74-18-2-6	3	—
粮丰 998	混合型	41.9	31-38-18-13	3	—
濮育 1 号	混合型	47.5	11-39-33-17	3	—
豫展 7 号	混合型	57.4	12-12-27-49	3	—

籽粒硬度分布频率分别指 SKCS 硬度值≤33、34~46、47~59、≥60 的籽粒所占测试籽粒总数的百分比,可以反映小麦品种籽粒的均匀情况。从表 2 中可以看出,有些品种(系)均匀度较高,如软质麦中的泛 5059 和偃展 4110,SKCS 硬度值≤33 的籽粒频率达 92% 以上;硬质麦中 SKCS 硬度值≥60 的籽粒频率范围是 30%~85%,其中郑丰 99379、兰考 008、郑麦 0856 的籽粒均匀度较高,籽粒频率在 82% 以上,而其余硬质或者软质麦的均匀度较低。

2.2 *Puroindoline-D1* 变异类型的分布

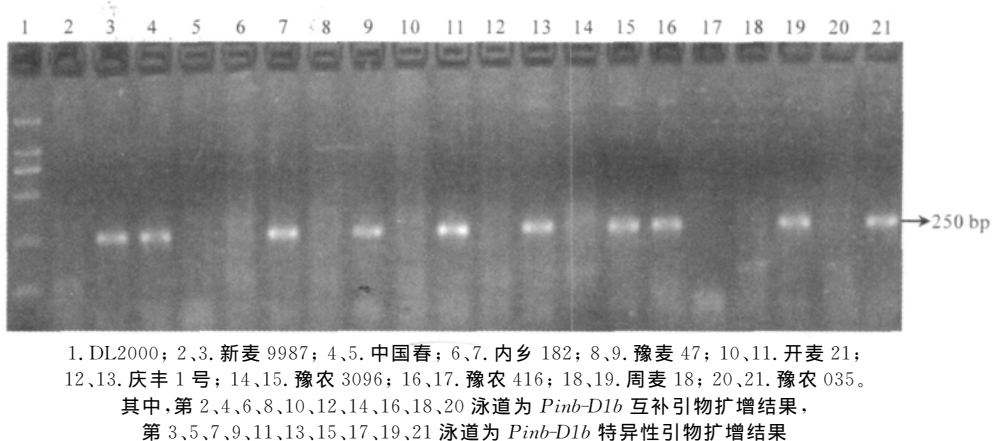
国内外研究表明,软质型品种被认为是 *Puroindoline-D1* 野生型(*Pina-D1a/Pinb-D1a*)^[1-4]。混合型品种因可能包含 2 种或 2 种以上的基因型^[5,17],故本试验没有对软质型和混合型的材料进行鉴定。

根据 Chen 等^[16]开发的 STS 标记进行 PCR 扩增,结果表明,除阳性对照陕 253 和藁城 8901 外,只有郑丰 99379 出现了 776 bp 的条带,即为 *pina* 缺失类型(*Pina-D1b*),其余则不属于 *Pina-D1b* 类型(图 1)。

图 1 *Pina-D1b* 标记对部分材料基因组 DNA 的 PCR 扩增结果

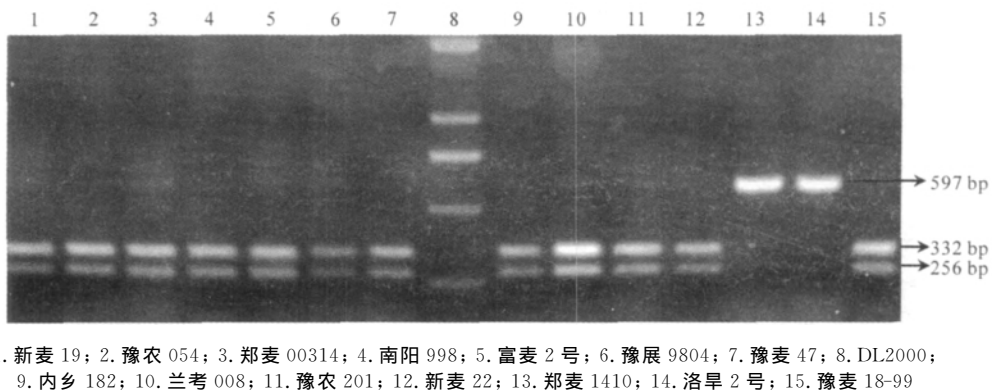
用 2 对互补的丝氨酸密码子特异引物进行 PCR 扩增,结果表明,82 个小麦品种(系)属于 *Pinb-D1b* 类型。部分品种(系)的扩增结果如图 2 所示,其中,中国春为野生型对照。可以看出,新麦 9987、内乡 182、豫麦 47、兰考 008、开麦 21、豫农 3096、周麦 18 和豫农 035 均能扩增出 250 bp

带型,表明它们的 *Pinb* 基因中第 46 位点甘氨酸(Gly)突变为丝氨酸(Ser),属于 *Pinb-D1b* 变异类型。野生型对照(中国春)与豫农 416 未能扩增出 *Pinb-D1b* 特异性引物的 250 bp 条带,而扩出了其互补引物带型,说明豫农 416 不属于 *Pinb-D1b* 类型。

图 2 *Pinb-D1b* 特异引物及其互补引物对部分参试小麦品系的 PCR 扩增结果

采用限制性内切酶鉴定 *Pinb-D1p* 类型(图 3),即采用内切酶 *Pfl*MI 对 *Pinb-D1* 的 PCR 扩增产物进行酶切。可以看出,只有郑麦 1410 和洛旱 2 号的电泳谱带没有被切开,而剩余材料均被内切酶

*Pfl*MI 所切开,酶切片段分别为 332 bp 和 256 bp;表明郑麦 1410 和洛旱 2 号的 *Puroindoline b* 基因上第 213 位点碱基 A 缺失,导致移码突变,致使第 60 位氨基酸变成终止密码子,而属于 *Pinb-D1p* 类型。

图 3 部分参试品种(系)*Pinb-D* 的 *Pfl*MI 酶切图谱

在参加河南省预试试验的小麦新品系中共鉴定出 3 种 *Puroindoline-D1* 类型,其中 *Pinb-D1b* 变异类型所占比例最高,为 87.1%,而 *Pina-D1b* 和 *Pinb-D1p* 2 种类型仅占供试材料中硬质麦比例的 4.3%和 8.6%。3 种 *Puroindoline-D1* 类型之间的 SKCS 籽粒硬度值间也存在显著差异,*Pina-D1b* 类型的硬度值最高,均值达到 72.3,*Pinb-D1p* 略低,为 64.7,而 *Pinb-D1b* 类型的最小,为 62.3,*Pina-D1b* 和 *Pinb-D1b* 类型之间籽粒硬度差异达到了显著水平。

3 结论与讨论

小麦籽粒硬度已成为品质改良的重要指标之一,明确小麦籽粒硬度概况以及 *Pina* 和 *Pinb* 等位变异基因分布特点非常重要。本研究对参加河南省小麦预试试验的优异苗头品系和优良新品种进行了研究,结果表明,河南小麦新品系的硬度变化范围较广(13.0~75.9),硬质、软质和混合型 3 种类型分布的比例不同,但以硬质类型为主,占参试材料的 64.1%,混合型和软质类型比例相对低些,硬质类型中只检测出 *Pina-D1b*、*Pinb-D1b* 和 *Pinb-D1p* 3 种类型,其中 *Pinb-D1b* 所占的比例最高,这与李根英等^[12]和郭世华等^[13]对我国小麦品种硬度分布的研究结果基本一致。

不同 *Puroindoline-D1* 变异类型对籽粒硬度大小的影响存在很大差异。Chen 等^[5]和王亮等^[14]的研究结果表明,几乎所有 *Puroindoline* 变异类型的 SKCS 硬度值都显著高于野生型(*Pina-D1a*/*Pinb-D1a*),*pina* 缺失类型(*Pina-D1b*)的 SKCS 硬度值显著高于 *Pinb-D1b* 和 *Pinb-D1p* 类型。本研究表明,*Pina-D1b*、*Pinb-D1b* 和 *Pinb-D1p* 3 种变异类型间籽粒硬度大小也存在差异,*Puroindoline-D1* 突变类型的硬度值显著高于 *Pina-D1a*/*Pinb-D1a*,其中 *pina* 缺失类型(*Pina-D1b*)的硬度值最高(72.3),与 *Pinb-D1b* 类型的最低(62.3)差异显著,但与 *Pinb-D1p* 类型的(64.7)差异不显著,这与王亮等^[14]的研究结论有所不同。

河南省小麦育种目标以选育冬性和半冬性、中强筋硬质小麦品种为主。河南居民的主食主要以面条和馒头为主,但由于河南小麦品质育种研究仍处于初级阶段,近些年来虽已选育出一些品质相对较好的小麦品种如郑麦 366、新麦 26 等,但是做出的面包、馒头和面条等食品仍不能满足市场需求。前人研究认为,拥有 *Pinb-D1b*、*Pinb-D1d*、*Pinb-D1e* 等类型的小麦品种在磨粉、馒头和面包等食品加工品质中优于其他变异类型^[9-11]。而本试验材料中只鉴定出包括野生型

在内的 4 种 *Puroindoline-D1* 类型。说明河南省培育的小麦新品系的 *Puroindoline-D1* 变异类型比较单一,因此,建议小麦育种工作者在培育优质品种的过程中应多选用 *Pinb-D1d*、*Pinb-D1e* 和 *Pinb-D1g* 等品质性状相对优异的类型作育种材料,从而加快河南省专用小麦品种的培育进程。

参考文献:

- [1] Morris C F. *Puroindolines*: The molecular genetic basis of wheat grain hardness[J]. *Plant Molecular Biology*, 2002, 48: 633-647.
- [2] Bhavne M, Morris C F. Molecular genetics of *Puroindolines* and related genes: allelic diversity in wheat and other grasses[J]. *Plant Molecular Biology*, 2008, 66: 205-219.
- [3] 陈锋,董中东,程西永,等. 小麦 *Puroindoline* 及其相关基因分子遗传基础研究进展[J]. *中国农业科学*, 2010, 43 (6): 1108-1116.
- [4] Morris C F, Bhavne M. Reconciliation of D-genome *Puroindoline* allele designations with current DNA sequence data[J]. *Journal of Cereal Science*, 2008, 48: 277-287.
- [5] Chen F, He Z H, Xia X C, et al. Molecular and biochemical characterization of *Puroindoline* a and b alleles in Chinese landraces and historical cultivars[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2006, 112: 400-409.
- [6] Wang J, Sun J Z, Liu D C, et al. Analysis of *Pina* and *Pinb* alleles in the micro-core collections of Chinese wheat germplasm by EcoTilling and identification of a novel *Pinb* allele[J]. *Journal of Cereal Science*, 2008, 48: 836-842.
- [7] Wang L, Li G Y, Xia X C, et al. Molecular characterization of *Pina* and *Pinb* allelic variations in Xinjiang landraces and commercial wheat cultivars[J]. *Euphytica*, 2008, 164: 745-752.
- [8] Ikeda M T, Cong H, Suzuki T, et al. Identification of new *Pina* null mutations among Asian common wheat cultivars[J]. *Journal of Cereal Science*, 2010, 51: 235-237.
- [9] 赵新,王步军. 不同硬度小麦品质差异的分析[J]. *麦类作物学报*, 2009, 29(2): 246-251.
- [10] Chen F, He Z H, Chen D S, et al. Influence of *Puroindoline* alleles on milling performance and qualities of Chinese noodles, steamed bread and pan bread in spring wheats[J]. *Journal of Cereal Science*, 2007, 45: 59-66.
- [11] 马冬云,张艳,夏先春,等. *Puroindoline* b 位点近等基因系对小麦面粉及面包和馒头品质的影响[J]. *作物学报*, 2010, 36(2): 261-266.
- [12] 李根英,夏先春,何中虎,等. 山东小麦籽粒硬度演变规律研究[J]. *作物学报*, 2007, 33(8): 1372-1374.
- [13] 郭世华,岳淑芳,王金霞,等. 小麦籽粒硬度及其 *Pinb-D1* 基因等位变异的 STS 标记检测[J]. *麦类作物学报*, 2008, 28(4): 600-606.
- [14] 王亮,穆培源,桑伟,等. 新疆小麦品种籽粒硬度及 *Puroindoline* 基因等位变异的分子检测[J]. *麦类作物学报*, 2010, 30(1): 17-22.
- [15] Chen F, He Z H, Xia X C, et al. A new *Puroindoline* b mutation presented in Chinese winter wheat cultivar Jingdong 11[J]. *Journal of Cereal Science*, 2005, 42: 267-269.
- [16] Chen F, Zhang F Y, Morris C F, et al. Molecular characterization of the *Puroindoline* a-D1b allele and development of an STS marker in wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. *Journal of Cereal Science*, 2010, 52: 80-82.
- [17] Li G Y, He Z H, Lillemo M, et al. Molecular characterization of allelic variations at *Pina* and *Pinb* loci in Shandong wheat landraces, historical and current cultivars[J]. *Journal of Cereal Science*, 2008, 47: 510-517.