

中国春小麦籽粒硬度 puroindoline 基因等位变异检测

陈 锋¹, 何中虎^{1,2}, 陈东升³, 张春利¹, 夏先春¹

(¹中国农业科学院作物科学研究所国家小麦改良中心/国家农作物基因资源与基因改良重大科学工程, 北京 100081;

²国际玉米小麦改良中心中国办事处, 北京 100081; ³宁夏农林科学院作物研究所, 永宁 750105)

摘要: 【目的】研究中国不同麦区春小麦籽粒硬度基因型分布规律, 为小麦品质改良和各麦区间资源交流提供依据。【方法】以中国 7 个省、自治区的 140 份春小麦主栽品种、高代品系和主要亲本为材料, 采用单籽粒谷物硬度测试仪、特异引物的 PCR 扩增、PCR 产物的酶切 (*PvuII* 内切酶) 和改进的 SDS-PAGE 凝胶电泳对其 SKCS 硬度及其基因型进行鉴定。【结果】中国春麦区以硬质类型为主, 共有野生型、*Pina-D1b*、*Pinb-D1b*、*Pinb-D1c* (先前未曾在中国冬麦区发现) 和 *Pinb-D1p* 共 5 种类型。其中, *Pinb-D1b* 在硬质麦占据主导地位, 为 51.5%; 其次是 *Pina-D1b*, 为 37.9%; *Pinb-D1c* 和 *Pinb-D1p* 类型分别为 4.9% 和 5.8%。后二者分布具有明显的地域性, *Pinb-D1c* 主要分布在青海, *Pinb-D1p* 则主要分布在甘肃。各 puroindoline 突变型 SKCS 硬度值显著高于野生型, *Pina-D1b* 和 *Pinb-D1c* 类型 SKCS 硬度值显著高于 *Pinb-D1b* 和 *Pinb-D1p* 类型。【结论】本试验明确了 puroindoline 基因在中国春麦区的分布规律, 总体上虽然以 *Pinb-D1b* 类型为主, 但 *Pina-D1b* 类型分布也较为广泛, 尤其在黑龙江等地区, 因其对品质加工有一定的负面影响, 建议该类型分布比例较高的地区多引进一些其它相对优良的基因型, 如 *Pinb-D1b* 类型等。

关键词: 春小麦; 籽粒硬度; Puroindoline 基因; 等位变异

Allelic Variation of Puroindoline Genes in Chinese Spring Wheats

CHEN Feng¹, HE Zhong-hu^{1,2}, CHEN Dong-sheng³, ZHANG Chun-li¹, XIA Xian-chun¹

(¹Institute of Crop Science National Wheat Improvement Center, The National Key Facility for Crop Gene Resources and Genetic Improvement, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081; ²CIMMYT China Office, Beijing 100081;

³Crop Research Institute, Ningxia Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Yongning 750105)

Abstract: 【Objective】Study of wheat kernel hardness is helpful to improving quality and introducing materials in Chinese spring wheat regions. 【Method】In total, 140 Chinese spring wheat cultivars, advanced lines, and breeding parents from seven provinces in China were examined by a Single Kernel Characterization System (SKCS), STS (sequence tagged site) marker, site-specific cleavage with *PvuII*, SDS-PAGE and sequencing to understand the distribution of grain hardness and its puroindoline alleles. 【Result】The results indicated that wild type, *Pina-D1b*, *Pinb-D1b*, *Pinb-D1c* (absent in Chinese winter wheats) and *Pinb-D1p* were present in Chinese spring wheats, and *Pinb-D1b* was the most popular genotype with a frequency of 51.5% in hard spring wheat. The percentages of *Pina-D1b*, *Pinb-D1c* and *Pinb-D1p* were 37.9%, 4.9% and 5.8% in hard spring wheats, respectively. *Pinb-D1c* and *Pinb-D1p* are mainly distributed in Qinghai and Gansu provinces, respectively. In addition, SKCS hardness indexes of mutation genotypes are significantly higher than that of wild type and SKCS hardness indexes of *Pina-D1b* and *Pinb-D1c* are significantly higher than those of *Pinb-D1b* and *Pinb-D1p*. 【Conclusion】This study characterized the distribution of puroindoline alleles in Chinese spring wheat and provided the fact that *Pinb-D1b* are the most popular genotype in Chinese spring wheat region. Also, *Pina-D1b* was very prevalent, especially in Heilongjiang, suggesting that some relatively superior genotypes should be introduced to regions with high percentages of *Pina-D1b* due to its inferior quality. This study could provide useful information for

收稿日期: 2006-01-05; 接受日期: 2006-02-27

基金项目: 国家自然科学基金 (30260061 和 30471085) 和国家“973”重点发展研究规划 (2002CB11130)

作者简介: 陈锋 (1978-), 男, 河南驻马店人, 博士, 研究方向为小麦遗传育种。通讯作者夏先春 (1963-), 男, 安徽六安人, 研究员, 博士, 研究方向为小麦遗传育种。Tel: 010-68918610; E-mail: xiexianchun@caas.net.cn

improvement of wheat quality in Chinese spring wheat region.

Key words: Spring wheat; Kernel hardness; Puroindoline gene; Allelic variation

0 引言

【研究意义】籽粒硬度是最重要的小麦品质性状之一，主要受位于 5D 染色体短臂上的一对主效基因控制^[1,2]。春小麦在中国生产中占有重要地位，主要包括东北春麦区、北部春麦区、西北春麦区、新疆春麦区和青藏春麦区，但国内对其品质尤其是籽粒硬度研究较少。【前人研究进展】一组大约 15 kD 的 friabilin 蛋白的发现大大加快了小麦籽粒硬度的研究进程^[3]。Puroindoline 蛋白是 friabilin 蛋白的主要成分，其两种组分 puroindoline a (PINA) 和 puroindoline b (PINB) 分别由两个基因 *Pina* 和 *Pinb* 编码，这是小麦籽粒硬度形成的基础^[4,5]。该蛋白表达量的高低直接决定小麦胚乳质地的软硬。自从 Giroux 和 Morris^[6]发现两个硬质麦品种 puroindoline 基因与野生型不同，命名为 *Pinb-D1b* 后，已发现多种 puroindoline 突变类型^[7~10]。Xia 等^[9]和 Chen 等^[11,12]先后对中国冬播小麦籽粒硬度进行了系统研究，发现 3 种新硬度变异类型，分别命名为 *Pinb-D1p*、*Pinb-D1q* 和 *Pinb-D1t*，并在农家品种中发现了 2 种 *Pina* 基因新变异类型，分别命名为 *Pina-D1l* 和 *Pina-D1n*，因此认为 *Pina* 基因也具有一定的多态性。目前一致认为，普通小麦中 *Pina* 和 *Pinb* 基因其一发生核苷酸变化（替代或缺失）或 PINA 蛋白缺失均造成小麦胚乳质地变硬^[4,5]，而山羊草中所发现的多个位点的核苷酸变化类型仍表现为软质^[13~15]。不同 puroindoline 类型对小麦磨粉品质和食品加工品质具有不同的影响，Giroux 等^[16]、Martin 等^[17]和 Cane 等^[18]的研究均表明，*Pinb-D1b* 磨粉和面包加工品质略优于 *Pina-D1b* 类型。陈锋等^[19,20]研究表明，PINA 蛋白缺失类型（*Pina-D1b* 类型）的水溶剂保持力和碳酸钠溶剂保持力显著高于野生型和 *Pinb-D1b* 类型，而 *Pinb-D1b* 面条和面包品质略优于 PINA 蛋白缺失类型。【本研究切入点】本实验室^[21]曾对中国春小麦的籽粒硬度基因型做过研究，但所用基因型偏少，加之当时设计的引物 *Pinb-D1d*、*Pinb-D1e*、*Pinb-D1f* 和 *Pinb-D1g* 不具有特异性及 *Pinb-D1b* 未加对照引物（即野生型引物），所以其结果有待进一步验证。【拟解决的关键问题】本试验以中国春麦区当前应用广泛的主栽品种和高代品系为材料，对其 SKCS 硬度和 puroindoline 基因型进行研究，旨在了解我国春小麦

puroindoline 类型分布的特点，为不同春麦区籽粒硬度改良提供依据，并对先前的结果进行矫正。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本试验材料为来自黑龙江（24 份）、辽宁（5 份）、内蒙（13 份）、宁夏（49 份）、新疆（5 份）、甘肃（35 份）和青海（9 份）7 个省的春小麦主栽品种和高代品系，共 140 份。这些材料为当地广泛应用的主栽品种、最新育成的高代品系和常用亲本，反映了当前中国春麦区普通小麦品种的应用现状和最新育种进展。

1.2 试验方法

1.2.1 籽粒硬度测定 将小麦样品置于同一条件下放置 3 d，水分控制在 11%~13%之间。利用 Perten 4100 型单粒谷物硬度仪 (Single Kernel Characterization System, SKCS) 测定 300 粒小麦样品的硬度值，根据测定结果确定其硬度级别，并同时记录千粒重和籽粒直径。一般硬度值小于 40 多为软质麦，大于 60 多为硬质麦，介于二者之间多为混合麦。

1.2.2 基因组 DNA 提取 选取 1 粒有代表性的种子（将其切割后根据其角质率判断是否与 SKCS 结果吻合），用锤子砸碎后放入 1.5 ml 离心管中，按 Lagudah 等^[22]方法，略有改动，提取基因组 DNA。DNA 提取液为 288 mmol·L⁻¹ NaCl，200 mmol·L⁻¹ Tris-HCl (pH 8.0)，25 mmol·L⁻¹ EDTA 和 0.5% SDS。

1.2.3 PCR 扩增及琼脂糖凝胶电泳 鉴定 *Pinb-D1b* 变异类型，即检测 *Pinb* 基因第 46 位点甘氨酸是否向丝氨酸的变化。所用引物、反应体积和 PCR 反应条件参照陈锋等^[23]。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，160 V 电压电泳 1.5 h，溴化乙锭 (EB) 染色。

1.2.4 Triton-X114 蛋白提取及 SDS-PAGE 电泳 每个样品选取 2 粒种子，参照陈锋等^[23]方法利用 Triton-X114 分别提取 puroindoline 蛋白后，进行 SDS-PAGE 电泳。样品在浓缩胶（浓度 T 为 4%，胶联度 C 为 2.67%）中采用电流为 40 mA 进行电泳，指示剂到达分离胶（浓度 T 为 13.5%，胶联度 C 为 2.6%）后功率转换成 12 W，待指示剂到达底部后再电泳 30 min。染色方法按 Morris 等^[24]进行。停显后的胶用蒸馏水浸泡 5 min 后在灯光下用数码相机照相。每版胶

均用中国春(野生型)和 Falcon(PINA 蛋白缺失型)作对照,从而鉴定出 PINA 蛋白缺失类型。

1.2.5 PCR 产物酶切 鉴定 *Pinb-D1c* 类型(即第 60 位点亮氨酸变成脯氨酸)时,首先采用 DNAMAN 设计的引物,其上游序列为 5'-GAG CCT CAA CCC ATC TAT TCA TC -3',下游序列为 5'-CAA GGG TGA TTT TAT TCA TAG -3',扩增出包含有 *Pinb* 基因全长 597 bp 的片段,然后用 *PvuII* 内切酶进行切割,第 60 位点亮氨酸没有发生突变的样品能被切割为 281 bp 和 316 bp 两个片段,突变成脯氨酸的样品不能被该酶切断,即为 *Pinb-D1c* 类型。

PCR 反应体系和扩增程序同 *Pinb-D1b* 鉴定体系和扩增程序。酶切反应体系为: 3 μ l 10 \times NE Buffer 2 (从基因公司购买), 0.2 U *Pvu II* 内切酶, 20 μ l 上述 PCR 扩增产物,加 ddH₂O 至 30 μ l,置于 37 $^{\circ}$ C 下酶切 2 h。在 2.0%琼脂糖凝胶上 80~100V 电泳分离,溴化乙锭(EB)染色,凝胶成像系统扫描照相。

1.2.6 测序鉴定 对于 SKCS 测试为硬质类型的样品,经丝氨酸特异引物的 PCR 扩增和 SDS-PAGE 检测后不属于 *Pinb-D1b* 和 PINA 蛋白缺失类型的样品,采用 *Pinb* 引物进行全长扩增后,将 PCR 产物送至奥科公司测序。另外,为保证 *Pinb-D1c* 类型鉴定的准确性,将本试验中利用 *PvuII* 内切酶鉴定出的 *Pinb-D1c* 类型也进行了测序。序列比对和分析采用 DNAMAN 软件进行。

2 结果与分析

2.1 籽粒硬度分布

所调查的 140 份我国春小麦品种(系)中,81 份为硬质麦,占 57.9%; 24 份为混合麦,占 17.1%; 35 份为软质麦,占 25.0%; SKCS 籽粒硬度的分布范围为 2~80,表明中国春麦区普通小麦硬度变异范围广泛,以硬质类型为主。不同春麦区硬度类型分布见表

表 1 中国不同春麦区硬度类型分布

Table 1 Frequencies of three hardness types in different Chinese spring wheat regions

麦区 Wheat region	样品数 Sample No.	硬麦 Hard (%)	混合麦 Mixed (%)	软麦 Soft (%)
东北春麦区 NESWR	29	55.2	6.9	37.9
北部春麦区 NSWR	13	46.1	38.5	15.4
西北春麦区 NWSWR	84	56.0	17.9	26.1
新疆冬春麦区 XJWSWR	5	80.0	20.0	0
青藏冬春麦区 QZWSWR	9	88.9	11.1	0
总计 Total	140	57.9	17.1	25.0

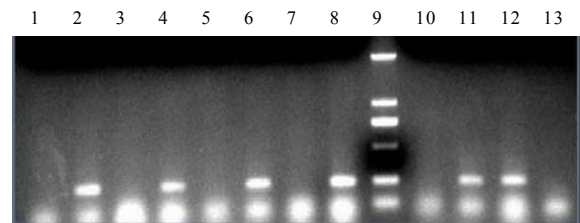
NESWR: Northeastern spring wheat region, NSWR: Northern spring wheat region, NWSWR: Northwestern spring wheat region, XJWSWR: Xinjiang winter and spring wheat region, QZWSWR: Qingzang winter and spring wheat region

1, 新疆和青藏冬春麦区硬麦比例显著高于其它春麦区。

选取其中推广面积较大品种、主要亲本及所有 *Pinb-D1c* 和 *Pinb-D1p* 类型的基因型和 SKCS 硬度分布列于表 2。

部分硬质春麦的丝氨酸密码子特异引物 PCR 扩增见图 1。可以看出,新春 9 号、蒙麦 28、永良 4 号、宁春 4 号和宁春 16 均用丝氨酸密码子特异引物扩增出了 250 bp 的条带,表明其属于 *Pinb-D1b* 类型,而对照中国春则用丝氨酸密码子特异引物的互补引物扩增出了 250 bp 的条带,表明其不属于 *Pinb-D1b* 类型。

将非 *Pinb-D1b* 类型的硬质麦和混合麦进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,部分样品电泳结果如图 2 所示。可以看出,新春 3 号与和尚头同野生型对照中国春相同,同时出现了 PINA 和 PINB 条带,不属于 PINA 缺



1 和 2 泳道: 新春 9 号; 3 泳道和 4 泳道: 蒙麦 28; 5 和 6 泳道: 永良 4 号, 7 和 8 泳道: 宁春 4 号; 9 泳道: DNA Maker DL2000; 10 和 11 泳道: 宁春 16; 12 和 13 泳道: 中国春(野生型对照)。其中,第 1、3、5、7、10 和 12 泳道为非 *Pinb-D1b* 特异引物的 PCR 扩增; 第 2、4、6、8、11、13 为 *Pinb-D1b* 特异引物的 PCR 扩增
Lane 1 and 2: Xinchun 9; Lane 3 and 4: Mengmai 28; Lane 5 and 6: Yongliang 4, Lane 7 and 8: Ningchun 4; Lane 9: DNA Maker DL 2000; Lane 10 and 11: Ningchun 16; Lane 12 and 13: Chinese spring. Non-*Pinb-D1b* specific primers were used for lanes of 1, 3, 5, 7, 10 and 12. *Pinb-D1b* specific primers were used for lanes of 2, 4, 6, 8, 11 and 13

图 1 丝氨酸密码子特异引物对小麦基因组 DNA 的 PCR 扩增
Fig. 1 The PCR amplification of genomic DNA of wheat using serine-codon specific primers

表 2 参试春小麦品种(系)名称、来源、SKCS 硬度分布和基因型

Table 2 Origin, phenotype, genotype and SKCS hardness distribution of surveyed spring wheats

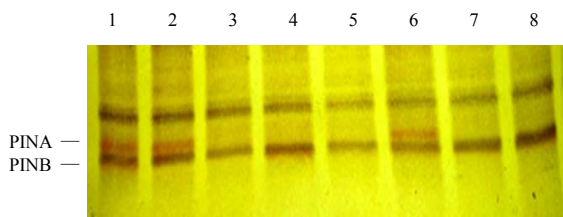
来源 Origin	品种 Cultivar	SKCS 硬度 SKCS hardness							基因型	
		级别 Class	平均值 Mean	SD	分布 Distribution %				Genotype	
					≤33	33~46	47~59	≥60	<i>Pina-D1</i>	<i>Pinb-D1</i>
黑龙江 Heilongjiang	克丰 4 Kefeng 4	5	25	16	69	20	9	2	a	a
黑龙江 Heilongjiang	龙辐麦 3 Longfumai 3	5	16	13	86	12	2	0	a	a
辽宁 Liaoning	辽春 17 Liaochun 17	5	41	13	20	48	28	4	a	a
宁夏 Ningxia	宁春 12 Ningchun 12	5	25	20	72	7	15	6	a	a
甘肃 Gansu	临麦 29 Linmai 29	5	2	18	96	1	1	2	a	a
甘肃 Gansu	高原 448 Gaoyuan 448	5	14	14	94	3	2	1	a	a
甘肃 Gansu	白大头 Baidatou	5	16	19	86	7	2	5	a	a
黑龙江 Heilongjiang	龙辐麦 1 Longfumai 1	4	33	21	48	20	22	10	a	a
黑龙江 Heilongjiang	龙辐麦 4 Longfumai 4	4	29	18	64	24	6	6	a	a
甘肃 Gansu	张春 15 Zhangchun 15	4	36	18	38	38	13	11	a	a
辽宁 Liaoning	辽春 10 号 Liaochun 10	3	60	12	6	33	32	29	a	b
辽宁 Liaoning	辽春 13 Liaochun 13	3	48	13	12	27	37	24	a	b
内蒙 Inner Mongolia	农品 5 号 NongPin 5	3	49	14	11	30	36	23	a	b
内蒙 Inner Mongolia	农麦 2 号 Nongmai 2	3	58	18	11	11	27	51	b	a
宁夏 Ningxia	争天 2 号 Zhengtian 2	3	45	18	23	21	36	20	a	b
宁夏 Ningxia	劲麦 2 号 Jinmai 2	3	63	22	16	3	9	72	a	b
宁夏 Ningxia	宁春 304 Ningchun 304	3	55	17	13	17	24	46	a	b
甘肃 Gansu	红农 1 号 Hongnong 1	3	51	18	14	20	30	36	a	p
甘肃 Gansu	老芒麦 Laomangmai	3	46	18	23	27	25	25	a	p
甘肃 Gansu	张春 16 Zhangchun 16	3	51	18	12	21	33	34	b	a
新疆 Xinjiang	新春 7 号 Xinchun 7	3	43	14	25	28	37	10	a	b
青海 Qinghai	001000	3	54	17	12	17	30	41	a	c
内蒙 Inner Mongolia	蒙麦 28 Mengmai 28	3	49	12	8	29	43	20	a	b
内蒙 Inner Mongolia	永良 4 Yongliang 4	2	56	15	7	21	31	41	a	b
内蒙 Inner Mongolia	蒙花 1 号 Menghua 1	2	53	14	8	17	42	33	b	a
内蒙 Inner Mongolia	蒙麦 33 Mengmai 33	2	57	18	9	16	27	48	b	a
宁夏 Ningxia	碧玉 Biyu	2	53	14	8	21	38	33	a	b
宁夏 Ningxia	宁春 16 Ningchun 16	2	52	17	9	27	26	38	a	b
宁夏 Ningxia	宁春 11 Ningchun 11	2	51	14	6	25	49	20	a	b
宁夏 Ningxia	宁春 10 号 Ningchun 10	2	58	20	5	7	33	55	a	b
宁夏 Ningxia	宁春 32 Ningchun 32	2	53	15	8	22	41	29	a	b
宁夏 Ningxia	宏图 Hongtu	2	54	15	10	25	24	41	a	b
甘肃 Gansu	陇春 15 Longchun 15	2	63	20	6	7	21	66	a	b
甘肃 Gansu	和尚头 Heshengtou	2	58	16	7	9	38	46	a	p
甘肃 Gansu	陇春 9 号 Longchun 9	2	53	13	7	18	44	31	a	p
新疆 Xinjiang	新春 2 号 Xinchun 2	2	51	13	7	26	42	25	b	a
青海 Qinghai	980185	2	50	13	9	28	40	23	b	a
黑龙江 Heilongjiang	克丰 10 Kefeng 10	1	65	15	1	11	21	67	a	b
黑龙江 Heilongjiang	龙麦 12 Longmai 12	1	75	14	0	2	10	88	b	a
黑龙江 Heilongjiang	龙麦 19 Longmai 19 *	1	76	13	0	0	11	89	b	a
黑龙江 Heilongjiang	龙麦 20 Longmai 20	1	67	14	1	7	21	71	b	a
黑龙江 Heilongjiang	龙麦 30 Longmai 30	1	70	14	0	5	14	81	b	a
黑龙江 Heilongjiang	克丰 3 Kefeng 3	1	75	15	0	3	17	80	b	a
黑龙江 Heilongjiang	克丰 6 Kefeng 6 *	1	65	14	1	3	18	78	a	b
黑龙江 Heilongjiang	新克早 9 Xinkehan 9 *	1	80	13	0	1	5	94	b	a
黑龙江 Heilongjiang	克早 16 Kehan 16 *	1	74	17	3	1	12	84	b	a
辽宁 Liaoning	辽春 12 Liaochun 12	1	57	11	0	17	40	43	b	a
辽宁 Liaoning	辽春 15 Liaochun 15	1	56	12	3	11	55	31	b	a
内蒙 Inner Mongolia	农麦 201 Nongmai 201	1	65	12	0	7	25	68	b	a

续表 2 Continue table 2

来源 Origin	品种 Cultivar	SKCS 硬度 SKCS hardness							基因型 Genotype	
		级别 Class	平均值 Mean	SD	分布 Distribution %				Genotype	
					≤33	33~46	47~59	≥60	<i>Pina-D1</i>	<i>Pinb-D1</i>
内蒙 Inner Mongolia	内麦 19 Neimai 19	1	57	13	4	13	37	46	b	a
宁夏 Ningxia	斗地 1 号 Doudi 1	1	59	15	5	16	34	45	a	b
宁夏 Ningxia	宁春 4 号 Ningchun 4	1	58	13	5	11	30	54	a	b
宁夏 Ningxia	阿玉 2 号 Ayu 2	1	58	11	0	12	41	47	a	b
宁夏 Ningxia	品引 1 号 Pinyin 1	1	75	14	1	1	10	88	b	a
甘肃 Gansu	高原 602 Gaoyuan 602 *	1	66	14	1	8	22	69	a	b
甘肃 Gansu	93 (6) -4-1	1	64	15	3	8	25	64	a	c
甘肃 Gansu	高原 314 Gaoyuan 314	1	57	12	2	14	41	43	a	b
甘肃 Gansu	定西 24 Dingxi 24	1	65	18	5	6	21	68	a	p
甘肃 Gansu	陇春 23 Longchun 23	1	69	15	1	6	15	78	b	a
甘肃 Gansu	甘麦 20 Ganchun 20	1	62	14	2	11	25	62	b	a
新疆 Xinjiang	新春 2 号 Xinchun 2 *	1	66	14	3	10	20	67	b	a
新疆 Xinjiang	新春 3 号 Xinchun 3	1	55	14	5	15	43	37	a	p
新疆 Xinjiang	新春 9 号 Xinchun 9 *	1	63	14	1	8	32	59	a	b
新疆 Xinjiang	新春 6 号 Xinchun 6 *	1	56	13	5	16	34	45	b	a
青海 Qinghai	99-2	1	63	12	0	9	34	57	b	a
青海 Qinghai	青春 587 Qingchun 587	1	65	17	3	11	20	66	b	a
青海 Qinghai	青春 533 Qingchun 533 *	1	67	14	2	6	15	77	a	c
青海 Qinghai	187	1	69	13	1	3	20	76	a	b
青海 Qinghai	193	1	62	15	1	9	32	58	a	c
青海 Qinghai	202	1	64	14	1	10	29	60	a	c

级别一栏中 1 和 2 为硬质、3 为混合麦、4 和 5 为软质。标记“*”的品种是对先前报道结果的矫正

In column of “class”, 1 and 2, 3, 4 and 5 are hard wheat, mixed wheat and soft wheat, respectively. Genotypes with marker of “*” indicated correction of our previous results



1. 中国春 (野生型对照); 2. 新春 3 号; 3. 新克早 9 号; 4. 克早 16; 5. 甘春 8104; 6. 和尚头; 7. 品引 1 号; 8. Falcon (PINA 缺失对照)
1. Chinese Spring (Control for wild type); 2. Xinchun 3; 3. Xinkehan 9; 4. Kehan 16; 5. Ganchun 8104; 6. Heshangtou; 7. Pinyin 1; 8. Falcon (Control for PINA null)

图 2 PINA 和 PINB 蛋白分离的 SDS-PAGE 电泳图

Fig. 2 Separation of PINA and PINB by SDS-PAGE electrophoresis

失类型; 而新克早 9 号、克早 16 和甘春 8104 则与 PINA 缺失对照 Falcon 相同, 只出现 PINB 条带, 表明其属于 PINA 缺失类型。

对于不属于 *Pinb-D1b* 和 PINA 缺失的硬麦和混合麦, 用 *PvuII* 内切酶对其 PCR 产物进行切割, 以检测其是否属于 *Pinb-D1c* 类型, 部分样品的酶切结果如图

3 所示。可以看出, 93 (6) -4-1、193、202 和 001000 与未加 *PvuII* 内切酶的对照中国春相同, 拥有完整的 597 bp 片段, 表明其属于 *Pinb-D1c* 类型; 而老芒麦、红农 1 号、张春 15、新春 3 号、和尚头、定西 24、陇春 9 号和龙麦 29 的 PCR 扩增产物均被 *PvuII* 内切酶切割成 281 bp 和 316 bp, 表明其不属于 *Pinb-D1c* 类型。因本试验是第一次采用 *PvuII* 内切酶鉴定出 *Pinb-D1c* 类型, 为确认该酶的可靠性, 将鉴定出的 *Pinb-D1c* 类型进行了测序, 证实其均属于 *Pinb-D1c* 类型 (数据未列出), 与酶切结果完全一致。

对经上述方法仍未鉴定出硬质麦品种新春 3 号、和尚头、定西 24、陇春 9 号、老芒麦和红农 1 号分别进行了测序, 发现上述品种 *Pinb* 基因的第 42 位氨基酸均有一碱基 A 缺失, 导致 *Pinb* 基因不能表达, 这与 Xia 等^[9]命名的 *Pinb-D1p* 序列一致, 表明其均属于 *Pinb-D1p* 类型。

2.2 Puroindoline 类型在春麦区的分布

在所调查的 140 份春麦中共有 53 份 *Pinb-D1b* 类型、39 份 *Pina-D1b* 类型、37 份野生型、5 份 *Pinb-D1c* 类型和 6 份 *Pinb-D1p* 类型, 共 5 种基因型。将中国的

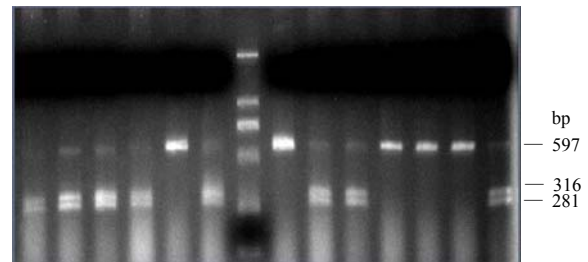
春小麦 puroindoline 基因型分布按地区来源列于表 3。可以看出, *Pinb-D1b* 类型在中国硬质春麦中占主导地位 (51.5%), 这与中国目前冬麦主栽品种的硬度基因型分布特点类似^[9, 19]。另外, *Pina-D1b* 在中国硬质春麦中也占有相当大的比例 (37.9%), 显著高于冬麦区 (6.5%)^[19]。 *Pina-D1b* 和 *Pinb-D1b* 在所调查的 7 个省份中均有分布。

从表 2 还可以看出, *Pinb-D1c* 和 *Pinb-D1p* 在中国硬质春麦中也占有一定的比例, 分别为 4.9% 和 5.8%。有趣的是, 5 份 *Pinb-D1c* 类型中, 有 4 份分布在青海, 分别为青春 533、193、202 和 001000; 1 份在甘肃, 为 93 (6) -4-1。6 份 *Pinb-D1p* 类型中, 有 5 份在甘肃分别为定西 24、陇春 9 号、和尚头、红农 1 号 and 老芒麦; 1 份在新疆, 为新春 3 号。

将不同 puroindoline 类型的样品数、表现型和 SKCS 硬度平均值、标准差、变异范围列于表 4。可以看出, 各种硬质类型 SKCS 硬度均显著高于野生型, *Pina-D1b* 和 *Pinb-D1c* 类型的硬度值显著高于 *Pinb-D1b* 和 *Pinb-D1p* 类型, 而 *Pina-D1b* 和 *Pinb-D1c*

类型之间以及 *Pinb-D1b* 和 *Pinb-D1p* 类型之间硬度值均未达显著差异。

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14



1. 老芒麦; 2. 红农 1 号; 3. 张春 15; 4. 新春 3 号; 5. 93 (6) -4-1; 6. 和尚头; 7. DNA marker DL2000; 8. 中国春 (未切割对照); 9. 定西 24; 10. 陇春 9 号; 11. 193; 12. 202; 13. 001000; 14. 龙麦 29
1. Laomangmai; 2. Hongnong 1; 3. Zhangchun 15; 4. Xinchun 3; 5. 93(6)-4-1; 6. Heshangtou; 7. DNA marker DL2000; 8. Chinese spring (CK); 9. Dingxi 24; 10. Longchun 9; 11. 193; 12. 202; 13. 001000; 14. Longmai 29

图 3 小麦 *Pinb* 基因 PCR 扩增产物的 *PvuII* 酶切图

Fig. 3 *PvuII* digested pattern of PCR product containing *Pinb* in spring wheat

表 3 不同来源中国春小麦 puroindoline 基因型分布

Table 3 Distribution of puroindoline genotypes in Chinese spring wheat from different origins

来源 Origin	样品数 Sample No.	软质 Soft			硬质 Hard	
		<i>Pina-D1a</i>	<i>Pina-D1b</i>		<i>Pina-D1a</i>	
		<i>Pinb-D1a</i>	<i>Pinb-D1a</i>	<i>Pinb-D1b</i>	<i>Pinb-D1c</i>	<i>Pinb-D1p</i>
宁夏 Ningxia	49	12	6	31		
甘肃 Gansu	35	11	12	6	1	5
黑龙江 Heilongjiang	24	11	8	5		
内蒙 Inner Mongolia	13	2	5	6		
青海 Qinghai	9		4	1	4	
新疆 Xinjiang	5		2	2		1
辽宁 Liaoning	5	1	2	2		
总计 Total	140	37	39	53	5	6

表 4 5 种 puroindoline 变异类型的表现型和 SKCS 硬度比较

Table 4 Comparison of phenotype and SKCS hardness index among 5 different puroindoline alleles

基因型 Genotype	样品数 No. of samples	表现型 Phenotype	SKCS 硬度		
			平均值 Mean	SD	变幅 Range
<i>Pina-D1a/Pinb-D1a</i>	37	软 Soft	24.2 c	10.3	2-48
<i>Pina-D1b/Pinb-D1a</i>	39	硬 Hard	65.8 a	8.9	52-80
<i>Pina-D1a/Pinb-D1b</i>	53	硬 Hard	51.4 b	7.1	43-72
<i>Pina-D1a/Pinb-D1c</i>	5	硬 Hard	62.2 a	4.2	54-66
<i>Pina-D1a/Pinb-D1p</i>	6	硬 Hard	54.6 b	6.0	46-65
总计 Total	140		50.0	19.1	2-80

不同字母表示差异达 5% 显著水平

Different letters indicate significant difference at 5% probability level

3 讨论

陈锋等^[19]和 Xia 等^[9]研究表明, 目前中国冬麦区主栽品种和高代品系中 *Pinb-D1b* 类型占主导地位, *Pina-D1b*、*Pinb-D1p* 和 *Pinb-D1d* 也有一定分布, 但未发现 *Pinb-D1c* 类型。本试验研究表明, 中国春麦区仍以 *Pinb-D1b* 类型为主, 与中国冬麦区硬度类型分布特点相同。但与冬麦区明显不同的是, *Pina-D1b* 类型比例较高。然而, *Pinb-D1b* 类型的磨粉和面包烘烤品质以及面条和馒头加工品质均略优于 *Pina-D1b* 类型^[16-18, 20]。因此, 中国春麦区在培育面包、面条和馒头类型的小麦品种中, 应充分考虑到 *Pina-D1b* 类型带来的不利影响。

各个春麦区 puroindoline 基因型分布的差异可能与不同麦区的引种情况有关, 东北春麦区引用美国和加拿大硬红春较多, 而北部春麦区和西北春麦区尽管过去曾大量引进和利用美国和意大利品种, 但近年来以 CIMMYT 材料做杂交亲本的日益增多。对本试验材料的来源进行分析, 发现绝大多数 *Pina-D1b* 类型的系谱中均有国外品种尤其是 CIMMYT 品种的参与。陈锋等^[15, 22, 25]研究表明, CIMMYT 硬质麦以 *Pina-D1b* 类型占主导地位, 这或许是造成中国春麦区主栽品种 *Pina-D1b* 类型比例显著高于冬麦区的主要原因。

Pinb-D1c 类型是 Lillemo 等^[7]在欧洲小麦中发现的一种变异类型, 其特点为 *Pinb* 基因的第 60 位氨基酸变成了脯氨酸。陈锋等^[20]已经报道, 来自青海的春麦品种青春 533 属于 *Pinb-D1c* 类型, 而中国冬麦区中目前尚未发现该类型。本试验中有 5 份春麦为 *Pinb-D1c* 类型 (包括青春 533, 但种子来源不同), 其中 4 份在青海, 表明 *Pinb-D1c* 类型在青海分布较广。该类型硬度值显著高于 *Pinb-D1b* 和 *Pinb-D1p* 类型, 但与 *Pina-D1b* 之间没有显著差异, 这与 Lillemo 等^[7]研究结果一致。

尽管 Ikeda 等^[26]也发现了 *Pinb-D1p* 类型 (命名不同), 但采用的是中国的地方品种, 迄今为止, *Pinb-D1p* 类型只在中国材料中发现^[9, 12, 19, 26]。Chen 等^[12]在中国农家品种中发现了 29 份 *Pinb-D1p* 类型, 其中有 18 份在甘肃, 推测中国甚至甘肃可能是 *Pinb-D1p* 的起源地。本试验所发现的 6 份 *Pinb-D1p* 类型中, 有 5 份在甘肃; 另一份为来自新疆的新春 3 号, 由墨麦诱变而产生, 因此, 诱变也可能是产生 *Pinb-D1p* 的一个原因。另外, 该类型硬度值与 *Pinb-D1b* 类型之间没有显著差

异, 但显著低于 *Pinb-D1c* 和 *Pina-D1b* 类型, 这与 Chen 等^[12]研究的 *Pinb-D1p* 和 *Pinb-D1b* 类型 SKCS 硬度值显著低于 PINA 蛋白缺失类型的特点一致。

4 结论

对中国春麦区的小麦籽粒硬度 puroindoline 基因型进行研究, 发现共有野生型、*Pina-D1b*、*Pinb-D1b*、*Pinb-D1c* 和 *Pinb-D1p* 5 种类型, 其中 *Pinb-D1b* 类型占主导地位。与中国冬麦区相比, 春麦区 *Pina-D1b* 类型分布比例偏高, 尤其在黑龙江等地区, 这对当地小麦品质改良较为不利, 因此, 建议 *Pina-D1b* 类型分布比例较高的地区多引进其它优良基因型, 如 *Pinb-D1b* 类型。另外, 本试验还发现了先前未曾在中国冬麦区发现的 *Pinb-D1c* 类型, 该类型在青海分布较广, 籽粒硬度差异显著性比较表明, *Pinb-D1c* 类型 SKCS 籽粒硬度显著高于 *Pinb-D1b* 和 *Pinb-D1p* 类型, 而与 *Pina-D1b* 类型之间没有显著差异, 其加工品质有待进一步研究。

致谢: 甘肃省农业科学院杨文雄先生、内蒙古自治区农业科学院吴晓华女士、青海省农业科学院马晓岗先生和新疆维吾尔自治区农业科学院吴振录先生为本试验提供了材料, 在此一并表示感谢。

References

- [1] Sourdille P, Perretant M R, Charmet G, Leroy P, Gautier M F, Joudrier P, Nelson J C, Sorrels M E, Bernard M. Linkage between RFLP markers and genes affecting kernel hardness in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 1996, 93: 580-586.
- [2] Perretant M R, Cadalen T, Charmet G, Sourdille P, Nicolas P, Boeuf C, Tixier M H, Branlard G, Bernard S. QTL analysis of bread-making quality in wheat using a doubled haploid population. *Theoretical and Applied Genetics*, 2000, 100: 1167-1175.
- [3] Greenwell P, Schofield J D. A starch granule protein associated with endosperm softness in wheat. *Cereal Chemistry*, 1986, 63: 379-380.
- [4] 陈 锋, 李根英, 耿洪伟, 夏兰芹, 夏先春, 何中虎. 小麦籽粒硬度及其分子遗传研究回顾与展望. *中国农业科学*, 2005, 38: 1088-1094.
Chen F, Li G Y, Geng H W, Xia L Q, Xia X C, He Z H. Review and prospect of wheat kernel hardness and its molecular genetics basis. *Scientia Agricultura Sinica*, 2005, 38: 1038-1054. (in Chinese)
- [5] Morris C F. Puroindolines: the molecular genetic basis of wheat grain hardness. *Plant Molecular Biology*, 2002, 48: 633-647.

- [6] Giroux M J, Morris C F. A glycine to serine change in puroindoline b is associated with wheat grain hardness and low levels of starch-surface friabilin. *Theoretical Applied Genetics*, 1997, 95: 857-864.
- [7] Lillemo M, Morris C F. A leucine to proline mutation in puroindoline b is frequently present in hard wheats from northern Europe. *Theoretical and Applied Genetics*, 2000, 100: 1100-1107.
- [8] Morris C F, Lillemo M, Simeone M C, Giroux M J, Babb S L, Kimberlee K K. Prevalence of puroindoline grain hardness genotypes among historically significant North American spring and winter wheats. *Crop Science*, 2001, 41: 218-228.
- [9] Xia L Q, Chen F, He Z H, Chen X M, Morris C F. Occurrence of puroindoline alleles in Chinese winter wheats. *Cereal Chemistry*, 2005, 82: 38-43.
- [10] Ram S, Jain N, Shoran J, Singh. New frame shift mutation in puroindoline b in Indian wheat cultivars Hyb65 and Ni5439. *Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 2005, 14: 45-48.
- [11] Chen F, He Z H, Xia X C, Lillemo M, Morris C F. A new puroindoline b mutation presented in Chinese winter wheat cultivar Jingdong 11. *Journal of Cereal Science*, 2005, 42: 267-269.
- [12] Chen F, He Z H, Xia X C, Xia L Q, Zhang X Y, Lillemo M, Morris C F. Molecular and biochemical characterization of puroindoline a and b alleles in Chinese landraces and historical cultivars. *Theoretical and Applied Genetics*, 2006, 112: 400-409.
- [13] Massa A N, Morris C F, Gill B S. Sequence diversity of puroindoline-a, puroindoline-b, and the grain softness protein genes in *Aegilops tauschii* cross. *Crop Science*, 2004, 44: 1808-1816.
- [14] Gedye K R, Morris C F, Bettge A D. Determination and evaluation of the sequence and textural effects of the puroindoline a and puroindoline b genes in a population of synthetic hexaploid wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 2004, 109: 1597-1063.
- [15] 陈 锋, 夏先春, 王德森, Morten Lillemo, 何中虎. CIMMYT 人工合成小麦与普通小麦杂交后代 puroindoline 基因等位变异检测. 中国农业科学, 2006, 39: 440-447.
Chen F, Xia X C, Wang D S, Lillemo M, He Z H. Detection of allelic variation for puroindoline alleles in CIMMYT germplasm developed from synthetic wheat crossing with common wheats. *Scientia Agricultura Sinica*, 2006, 39: 440-447. (in Chinese)
- [16] Giroux M J, Talbert L, Debrah K, Habernicht, Lanning S, Hemphill A, Martin J M. Association of puroindolines sequence type and grain hardness in hard red spring wheat. *Crop Science*, 2000, 40: 370-374.
- [17] Martin J M, Froberg R C, Morris C F, Talbert L E, Giroux M J. Milling and bread baking traits associated with puroindoline sequence type in hard red spring wheat. *Crop Science*, 2001, 41: 228-234.
- [18] Cane K, Spackman M, Eagles H A. Puroindoline genes and their effects on grains quality traits in southern Australian wheat cultivars. *Australian Journal of Agriculture Research*, 2004, 55: 89-95.
- [19] 陈 锋, 钱森和, 张 艳, 夏先春, 何中虎. 中国冬小麦 puroindoline 类型分布及其对溶剂保持力的影响. 中国农业科学, 2005, 38: 2173-2181.
Chen F, Qian S H, Zhang Y, Xia X C, He Z H. Distribution of puroindoline alleles in Chinese winter wheats and its effect on solvent retention capacity. *Scientia Agricultura Sinica*, 2005, 38: 2173-2181. (in Chinese)
- [20] 陈 锋, 陈东升, 钱森和, 张 艳, 夏先春, 何中虎. Puroindoline 基因对小麦磨粉及馒头和面条品质的影响. 作物学报, 2006, 32: 980-986.
Chen F, Chen D S, Qian S H, Zhang Y, Xia X C, He Z H. Influence of puroindoline gene on milling performance, steamed bread and noodle qualities in spring wheat. *Acta Agronomica Sinica*, 2006, 32: 980-986. (in Chinese)
- [21] 郭世华, 何中虎, 夏兰芹, 王洪刚, 张庆祝. 中国春小麦品种籽粒硬度等位变异的 STS 检测. 中国农业科学, 2004, 37: 1797-1803.
Guo S H, He Z H, Xia L Q, Wang H G, Zhang Q Z. Detection of allelic variation for grain hardness in Chinese spring wheat by STS maker. *Scientia Agricultura Sinica*, 2004, 37: 1797-1803. (in Chinese)
- [22] Lagudah E S, Appels R, McNeil D. The *Nor-D3* locus of *Triticum tauschii*: natural variation and genetic linkage to makers on chromosome 5. *Genome*, 1991, 34: 387-395.
- [23] 陈 锋, 何中虎, Lillemo M, 夏先春. CIMMYT 普通小麦籽粒硬度等位变异检测. 作物学报, 2005, 31: 1277-1283.
Chen F, He Z H, Lillemo M, Xia X C. Detection of allelic variation for grain hardness in CIMMYT bread wheats. *Acta Agronomica Sinica*, 2005, 31: 1277-1283. (in Chinese)
- [24] Morris C F, Massa A N. Puroindoline genotype of the U.S. national institute of standards & technology reference material 8441, wheat hardness. *Cereal Chemistry*, 2003, 80: 674-678.
- [25] 陈 锋, 夏先春, Manila William, Morten Lillemo, Richard Trethowan, Peña R J, 何中虎. CIMMYT 小麦的 puroindoline 基因型的进一步鉴定与分析. 中国农业科学, 2006, 39: 1518-1525.
Chen F, Xia X C, William M, Lillemo M, Trethowan R, Peña R J, He Z H. Determination and evaluation of puroindoline alleles in CIMMYT wheats. *Scientia Agricultura Sinica*, 2006, 39: 1518-1525. (in Chinese)
- [26] Ikeda T M, Ohnishi N, Nagamine T, Oda S, Hisatomi T, Yano H. Identification of new puroindoline genotypes and their protein products among wheat cultivars. *Journal of Cereal Science*, 2004, 41: 1-6.