

小麦胚乳 Wx 蛋白缺失对籽粒淀粉含量的影响

师凤华 徐杰 李保云 刘广田

(农业部作物基因组学与遗传改良重点开放实验室/北京市作物遗传改良重点实验室/作物杂种优势研究与利用教育部重点实验室/中国农业大学 农学与生物技术学院,北京 100094)

摘要 旨在通过比较不同的小麦胚乳 Wx 蛋白亚基缺失类型材料籽粒的 Wx 蛋白总量支直链淀粉含量及总淀粉含量,明确胚乳 Wx 蛋白对支直链淀粉合成的作用。利用 SDS-PAGE 方法鉴定了 13 个品种 Wx 蛋白亚基组成,并测定了这些品种的 Wx 蛋白总量、直、支链淀粉含量及直/支比。结果表明,任何 Wx 基因缺失都会造成 Wx 蛋白合成数量的明显减少,随着 Wx 基因不表达的数量增多,Wx 蛋白合成的减少量增多;糯麦的直链淀粉含量最少。Wx 蛋白含量与直链淀粉含量和直/支链淀粉含量之间存在极显著和显著的正相关, $r = 0.8600$, $r = 0.8108$;Wx 蛋白含量与支链淀粉含量之间呈中度相关, $r = 0.4027$,这说明 Wx 蛋白总含量对直链淀粉含量的大小起到决定性作用,而对支链淀粉和总淀粉含量只有一定影响;通过操纵 Wx 基因可以改变籽粒胚乳中的直链淀粉含量和淀粉的直/支比,进而达到改进淀粉理化特性和加工特性的作用。

关键词 小麦; Wx 蛋白; 直链淀粉; 支链淀粉; 淀粉

中图分类号 S 512.1.01

文章编号 1007-4333(2006)06-0041-04

文献标识码 A

Effects of wheat endosperm Wx protein deficiencies on starch content

Shi Fenghua, Xu Jie, Li Baoyun, Liu Guangtian

(Key Laboratory of Crop Genomics and Genetic Improvement, Ministry of Agriculture/Beijing Key Laboratory of Crop Genetic Improvement/Key Laboratory of Crop Heterosis Research and Utilization, Ministry of Education/College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract To explore the effects of Wx protein content on starch content and composition, an improved SDS-PAGE was used to identify Wx protein composition of 13 wheat varieties. The Wx protein content as well as amylose, amylopectin and starch content of the varieties were measured. Results showed that any Wx gene mutation could result in the reduction of amylose content, and with an increase in the number of Wx gene deficiencies, the amylose content decreased. The amylose content of waxy wheat was nearly zero. The correlation coefficient of Wx protein content with amylose was 0.8600, amylopectin content was 0.4027, starch content was 0.7512, and am/ap was 0.8108, indicating that the Wx protein played a key role in the amylose synthesis. The amylose content can be a good index for the early generation selection of noodle wheat and we can improve the starch property by manipulating the Wx gene.

Key words *Triticum aestivum* L.; Wx protein; amylose; amylopectin; starch

淀粉的含量和组成通过影响淀粉的糊化特性和膨胀特性而对面粉的加工品质尤其是面条的品质产生重要影响^[1-2]。淀粉颗粒结合酶(CBSS)亦称 Wx 蛋白,是直链淀粉合成途径中的关键酶^[3]。普通小麦编码 Wx 蛋白的基因有 3 个位点,是位于染色体 7A 短臂上的 Wx-A1 位点、位于 4B 长臂上的

Wx-B1 位点及位于 7D 短臂上的 Wx-D1 位点,它们分别负责编码 Wx 蛋白的 3 个亚基^[4]。普通小麦根据缺失的蛋白亚基的种类及数目,有 8 种 CBSS 的表现型^[5-6]。已有报道 Wx-A1、Wx-B1 及 Wx-D1 这 3 个亚基对直链淀粉含量的影响不同^[7-8]。Wx 蛋白质总量对直链淀粉含量成正相关,但是没有研

收稿日期:2006-03-16

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30270823、30471076);国家高技术研究发展计划项目(2003AA207080)

作者简介:师凤华,博士研究生,E-mail:fenghuas@163.com;李保云,副教授,通讯作者,主要从事小麦品质遗传改良研究,E-mail:libaoyun0065@sina.com

究它对支链淀粉含量、总淀粉含量及淀粉组成(直/支链淀粉含量)的影响。由于没有近等基因系,本试验从研究具有不同类型的 W_x 蛋白亚基材料的各种淀粉性状(支直链淀粉含量及总淀粉含量、淀粉组成)和 W_x 蛋白总含量入手,采用以往人们对这个基因作用的传统的统计学方法,从育种的角度出发,探讨这个基因在不排除遗传背景干扰下, W_x 蛋白亚基及 W_x 蛋白总含量对籽粒支直链淀粉含量的影响,为面条小麦亲本材料的筛选及选育手段提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验选用的 13 个品种均来自中国农业大学小麦品质育种课题组,分别为荷兰小麦、Sturdy、Santanta、江苏白火麦、IKE、关东 107、糯麦 1 号、Erada、Gemeny、玉麦、贵 442M8695、贵 452M8640 和贵 49Z8644。

于 2003—2004 年度在中国农业大学昌平试验站种植,收获后籽粒用 Brabender Quadrumat Junior 实验磨制粉,过 100 目筛,面粉熟化 1 个月后测定。

1.2 试验方法

1.2.1 W_x 蛋白的 SDS-PAGE 鉴定^[9-10] 蛋白提取:将单个籽粒砸碎,置于 1.5 mL 离心管中。加入 30 μ L 水充分湿润,再加入 700 μ L 水充分搅拌挤压,挑去种皮和面筋,10 000 g 离心 5 min,弃上清液,用丙酮漂洗 1 次,晾干。漂洗液(70 mM Tris-HCl, pH6.8, 2%(质量分数)-巯基乙醇, 2%(质量分数)

SDS)漂洗 2 次,去离子水漂洗 2 次,最后用丙酮漂洗 1 次,晾干,得粗淀粉。按每 mg 粗淀粉加入 30 μ L 提取液的比率加上样提取液(70 mmol/L Tris-HCl, pH6.8, 2%(质量分数)-巯基乙醇, 2 g/mL SDS, 20%(质量分数)甘油),充分搅拌混匀,沸水浴煮 4 min, 10 000 g 离心 5 min,得 W_x 蛋白的上样液。

电泳:分离胶采用的胶联度为 30 0.155,质量浓度为 0.15 g/mL, pH7.8 的 SDS-PAGE 胶,电压 300 V,指示剂出胶后剥胶银染。

1.2.2 W_x 蛋白定量 准确称取用 1.2.1 的方法提取的粗淀粉 22 mg,加入 600 μ L 提取液。跑出的胶片用 FluorChemTM 5500 凝胶成像系统扫描定量。设定 W_x 基因正常材料的 W_x 蛋白平均含量为 1。

1.2.3 淀粉含量的测定 采用双波长法^[11],分别以小麦京 9428 的纯支链淀粉、直链淀粉(纯度为 97%)和糯麦 1 号的支链淀粉为标准淀粉制作普通小麦和糯麦的标准曲线。非糯麦直链淀粉测定波长为 650 nm,参比波长为 443 nm;支链淀粉测定波长为 525 nm,参比波长为 725 nm。糯麦支链淀粉测定波长为 535 nm,参比波长为 780 nm。2 次重复。

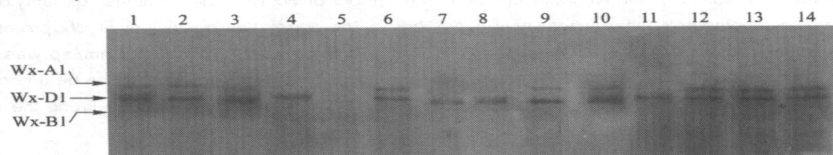
1.3 统计分析

利用 EXCEL 和 SPSS 进行数据统计分析。

2 结果与分析

2.1 鉴定结果

图 1 的 SDS-PAGE 鉴定结果见表 1。



品种:1. 中国春;2. 江苏白火麦;3. 关东 107;4. 贵 442M8639;5. 糯麦 1 号;6. Erada;7. 荷兰小麦;8. Sturdy;9. 玉麦;10. IKE;11. Gemeny;12. IKE;13. satanta;14. 贵 452M8640

品种:1. 中国春;2. 江苏白火麦;3. 关东 107;4. 贵 442M8639;5. 糯麦 1 号;6. Erada;7. 荷兰小麦;8. Sturdy;9. 玉麦;10. IKE;11. Gemeny;12. IKE;13. satanta;14. 贵 452M8640

图 1 小麦 W_x 蛋白的 SDS-PAGE 鉴定

Fig. 1 SDS-PAGE of wheat endosperm W_x protein

2.2 W_x 蛋白缺失对淀粉含量的影响

W_x 蛋白缺失对籽粒直链淀粉含量、直链淀粉占总淀粉的比例以及直/支链淀粉含量比例有显著影响。除淀粉及支链淀粉含量略低于正常类型,未达到显著水平外,其他性状在不同 W_x 亚基缺失类型材料间的差异均达到显著水平(表 2)。由此可

见, W_x 蛋白亚基的缺失对直链淀粉含量的影响存在着剂量效应:随着缺失亚基数目的增多,直链淀粉含量、直链淀粉占总淀粉的比值及直/支链淀粉的比值明显降低。缺失 1 个亚基直链淀粉含量减少约 4%,直链占总淀粉含量的比值减小约 2.4%,直/支链淀粉的比值减小约 5%;而缺失 2 个亚基直链淀

表 1 供试材料的 W_x 蛋白亚基组成Table 1 Comparison of amylose and amylopectin content among wheat cultivars with different W_x protein deficiencies

W _x 蛋白亚基类型序号	小麦品种	W _x -A1	W _x -B1	W _x -D1
1	关东 107、IKE	-	-	+
2	Erada、Gemeny、Satanta、 贵 452M8640	+	-	+
3	荷兰小麦、Sturdy、	-	+	+
4	玉麦、江苏白火麦	+	+	-
5	贵 442M8639、贵 49Z8644	+	+	+
6	糯麦 1 号	-	-	-

表 2 不同 W_x 蛋白缺失类型的淀粉平均含量比较Table 2 Comparison of amylose、amylopectin content among wheat cultivars with different W_x protein deficiencies %

W _x 蛋白亚基类型	w (直链淀粉)	w (支链淀粉)	w (总淀粉)	w (AM)	w (AP)	直/支链淀粉质量比
1	11.74 c	56.08 a	67.83 a	17.29 c	82 ab	0.21 cd
2	15.62 b	57.55 a	73.17 a	21.35 b	78 c	0.27 b
3	14.8 bc	55.68 a	70.50 a	20.99 bc	79 bc	0.26 bc
4	16.20 b	56.07 a	72.28 a	22.40 ab	77 cd	0.28 ab
5	17.75 a	56.63 a	74.39 a	23.95 a	76 b	0.31 a
6	2.14 d	49.51 ab	51.66 ab	3.45 d	96 a	0.039 d

注: W_x 蛋白亚基类型序号同表 1, 同列数据字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$), 下同。

71%; W_x-B1 基因位点发生缺失突变时, W_x 蛋白含量为正常类型的 72%; W_x-D1 亚基时, W_x 蛋白含量为正常类型的 80%; 2 个位点同时发生缺失突变例如 W_x-A1 和 W_x-B1 基因位点同时发生缺失突变时, W_x 蛋白含量仅为正常类型的 35%; 不同 W_x 基因位点缺失数目的材料 W_x 蛋白含量之间的差异达到了显著水平, 随着 W_x 基因位点缺失数目的增加, W_x 蛋白含量显著减少(表 3), 反之亦然。

表 3 不同 W_x 基因缺失类型材料的 W_x 蛋白相对积分光密度的比较Table 3 Comparison of relative content of W_x proteins of 12 wheat varieties with different W_x gene composition

W _x 蛋白亚基类型序号	W _x -A1	W _x -B1	W _x -D1	W _x
1	0.00	0.00	0.35	0.35 c
2	0.29	0.00	0.43	0.72 b
3	0.29	0.51	0.00	0.80 b
4	0.00	0.37	0.34	0.71 b
5	0.31	0.37	0.33	1.00 a

对上述 12 个样品分别作 W_x 蛋白总含量与直链淀粉含量、支链淀粉含量及总淀粉含量的简单相关分析, 结果见图 2。W_x 蛋白含量增加, 直链淀粉含量、直/支链淀粉含量、总淀粉含量明显增多, 其相关系数分别为 0.860 0、0.810 8 和 0.751 2, 正相关

粉含量减少 6.0%, 直链占总淀粉含量的比值减小约 6.6%, 直链与支链的比值减小约 10%; 缺失 3 个亚基即成为糯麦, 有极少量直链淀粉产生, 只占淀粉总量的 3.45%, 直支链淀粉质量比例低到 3.9%。

2.3 W_x 基因的缺失突变对 W_x 蛋白含量的影响

由于糯麦 W_x 基因没有蛋白产物, 只能对余下 12 个品种的 W_x 蛋白进行扫描定量分析(表 3)。以积分光密度值反映其含量, 发现 W_x 基因的缺失突变对 W_x 蛋白含量有显著影响。若设类型 5(正常类型)的 W_x 蛋白总含量为 1, 那么 W_x-A1 基因位点发生缺失突变时, W_x 蛋白含量为正常类型的

达到极显著和显著水平; W_x 蛋白含量与支链淀粉含量呈正相关, 相关系数 0.402 7, 只达到中度相关水平。说明 W_x 基因对直链淀粉的合成和直/支链淀粉含量起关键性作用, 它决定了淀粉的组成, 同时对总淀粉和支链淀粉含量也有一定影响。

3 讨论

尽管有遗传背景的干扰, W_x 蛋白总含量与籽粒胚乳的直链淀粉含量仍呈极显著正相关, 说明它对直链淀粉合成起决定作用。W_x 蛋白的表达量与其亚基数目之间呈显著正相关, 故直链淀粉的合成也表现为受亚基数目的影响: 直链淀粉合成能力按含 3、2 和 1 个亚基的顺序降低, 完全缺失的糯麦合成直链淀粉最少。基于以上 2 点, 在小麦育种实践中通过选择 W_x 基因来选择直链淀粉含量是完全可靠的。由于没有单独含有 W_x-B1 亚基和 W_x-A1 亚基的缺失类型材料, 故不能对单个亚基对淀粉合成的作用作出评价, 只能从缺失单个亚基直链淀粉合成的减少量来推测不同亚基作用。根据本试验结果, 缺失 W_x-A1 亚基对直链淀粉合成的损失要大于缺失 W_x-B1 和 W_x-D1 亚基, 这与 W_x-B1 亚基对淀粉合成最重要^[12-13]的结论不符, 但可以从本试验的 W_x 蛋白含量与直链淀粉含量呈极显著正相关这一

结论得到解释:缺失 $Wx-A1$ 亚基使 Wx 蛋白总含量损失比缺失 $Wx-B1$ 亚基多,另外就是由参试材料的遗传背景不同造成的^[14,15]。

Wx 蛋白对支链淀粉含量和总淀粉含量的影响

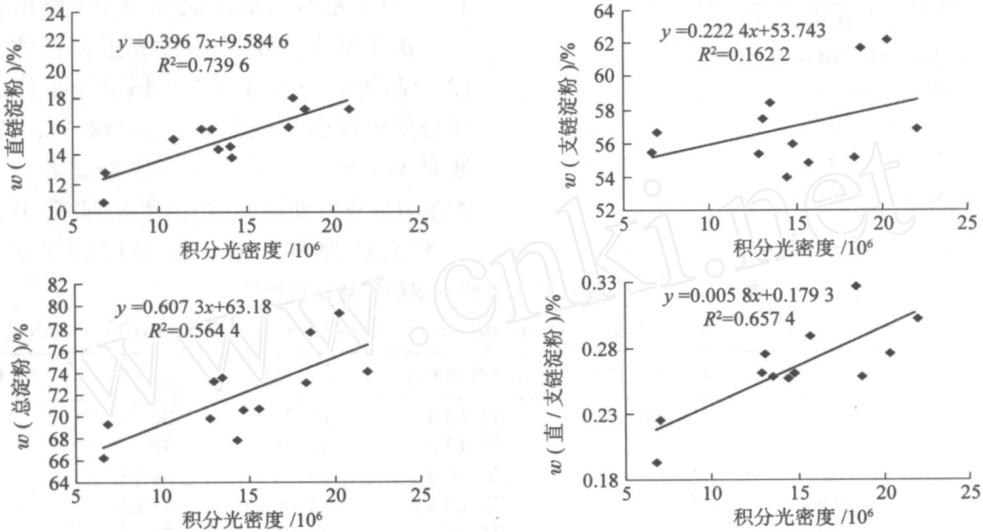


图2 Wx 蛋白与各种淀粉含量指标的相关性

Fig. 2 Correlation between contents of Wx protein with amylose, amylopectin, starch and am/ap

从以上 Wx 蛋白含量和淀粉含量的相关关系可以作出如下推测,可以通过操纵 Wx 基因改变淀粉含量进而影响籽粒胚乳淀粉的理化和糊化特性。一般认为直链淀粉含量低、高峰黏度和膨胀势高的小麦品种具有优良的面条品质。由于直链淀粉含量的测定所用样品量少,操作简单、迅速,可以作为杂种早代中优质面条专用小麦的选择指标。

参 考 文 献

- [1] Crosbie GB, Ross A S, Moro T, et al. Starch and protein quality requirements of Japanese alkaline noodles (Ramen) [J]. *Cereal Chem*, 1999, 76(3): 328-334
- [2] Crosbie G B. The relationship between starch swelling properties, paste viscosity and boiled noodle quality in wheat flours [J]. *J Cereal Sci*, 1991, 13(2): 145-150
- [3] Nakamura T, Yamamori M, Hisashi H, et al. Identification of three Wx proteins in wheat [J]. *Biochem Genet*, 1993, 31: 75-86
- [4] Yamamori M, Nakamura T, Endo T R, et al. Waxy protein deficiency and chromosomal location of coding genes in common wheat [J]. *Theor Appl Genet*, 1994, 89: 178-184
- [5] Araki E, Miura H, Sawada S. Differential effects of the null alleles at the three Wx loci on the starch-pasting properties of wheat [J]. *Theor Appl Genet*, 1991, 97: 199-205
- [6] Zhao X C, Sharp P J. Production of all eight genotypes of null allele at waxy loci in bread wheat [J]. *Plant Breeding*, 1998, 117: 488-490
- [7] Miura H, Tani S, Nakamura T, et al. Genetic control of amylase content in wheat endosperm starch and differential effects of three Wx genes [J]. *Theor Appl Genet*, 1994, 89: 276-280
- [8] Miura H, Araki E, Tarui S. Amylose synthesis capacity of the three Wx gene of wheat cv. Chinese Spring [J]. *Euphytica*, 1999, 108(2): 91-95
- [9] Zhao X C, Sharp P J. An improved 1-D SDS-PAGE method for the identification of three bread wheat waxy proteins [J]. *J Cereal Sci*, 1996, 23: 191-193
- [10] 王子宁, 郭北海, 李洪杰, 等. 多倍体麦类作物 Wx 蛋白检测的 SDS-PAGE 方法 [J]. *遗传*, 2000, 22(3): 169-171
- [11] 何照范. 粮油籽粒品质及其分析技术 [M]. 北京: 农业出版社, 1985: 257-297
- [12] Miura H, Sugawara A. Dosage effects of the three Wx gene on amylase synthesis in wheat endosperm [J]. *Theor Appl Genet*, 1996, 93(7): 1066-1070
- [13] Yamamori M, Quynh N T. Differential effects of $Wx-A1$, $B1$ and $D1$ protein deficiencies on apparent amylase content and starch pasting properties in common wheat [J]. *Theor Appl Genet*, 2000, 100(1): 32-38
- [14] Mikami I, Dung L V, Hirano H Y, et al. Effects of the two most common Wx alleles on different genetic backgrounds in rice [J]. *Plant Breeding*, 2000, 119: 505-508
- [15] Mikami I, Aikawa M, Hirano H Y, et al. Altered tissue-specific expression at the Wx gene of the opaque mutants in rice [J]. *Euphytica*, 1999, 105: 91-97