

小麦 *Wx* 基因及其在农业生产中的潜在应用

王芳* 王宪泽** 郭尚敬

山东农业大学生命科学学院, 泰安 271018

Wx Genes in Wheat and Their Possible Application in Agricultural Production

WANG Fang*, WANG Xian-Ze**, GUO Shang-Jing

College of Life Sciences, Shandong Agricultural University, Taian 271018

提要 围绕影响小麦品质的蜡质基因, 介绍了小麦蜡质基因突变体筛选、蜡质基因对淀粉合成的影响、蜡质基因的分子遗传和蜡质小麦培育的研究近况, 并对 *Wx* 基因的结构特征和分子标记辅助选择进行了分析, 还就 *Wx* 基因的研究前景和问题作了分析和展望。

关键词 蜡质基因; 遗传; 分子标记; 育种

Waxy 蛋白是结合在禾谷类胚乳淀粉上的一种蛋白, 即颗粒结合淀粉合成酶 (GBSS)。此酶的表达与否制约着直链淀粉的合成, 其基因位点为 *Wx*。普通六倍体小麦 (*Triticum aestivum*, AABBDD) 含有 3 种 Waxy 蛋白亚基, 即 *Wx-A1*、*Wx-B1*、*Wx-D1*, 其编码基因^[1] *Wx-A1*、*Wx-B1*、*Wx-D1* 分别位于 7A、4A、7D 染色体上^[2, 3]。已发现小麦胚乳中直链淀粉和支链淀粉的含量与这 3 个基因的表达有关。这组基因中有 1 个缺失时, 即会导致淀粉合成酶活性下降, 直链淀粉含量降低和支链淀粉含量增加^[4], 从而改变小麦的淀粉构成、面粉品质、面团的加工和食用价值^[5]。3 种 *Wx* 蛋白全部缺失的小麦胚乳中直链淀粉含量几乎为零, 成为自然界中不存在的所谓“糯性小麦”。

1 *Wx* 基因的结构和序列特征

成熟小麦 Waxy 蛋白的分子量为 60 kD, 有 615 个氨基酸, 蛋白质前体还包括一个分子量为 7 kD 的转运肽, 有 75 个氨基酸, 与其他作物不同的是, 小麦 N 端有一个 11 个氨基酸的插入序列^[6]。3 种 *Wx* 亚基对直链淀粉含量的作用大小不同^[5, 7], *Wx-B1* 亚基的缺失对直链淀粉含量的影响最大, *Wx-A1* 和 *Wx-D1* 亚基的缺失影响较小。研究发现, 六倍体小麦中 *Wx-A1*、*Wx-B1*、*Wx-D1* 基因的基因组的核苷酸序列长度分别是 2 781、2 794、2 862 bp^[8]。Murai 等^[9] 研究六倍体小麦中编码 GBSS 的 3 个基因的特征时, 发现每个基因由 11 个外显子和 10 个内含子组成; 成

熟的蛋白质区域中核苷酸序列同源性为 95.6%~96.3%, 转运肽区域是 88.7%~93.0%, 内含子区是 70.5%~75.2%; *Wx-4A* 基因在转运肽的编码区含有 1 个三核苷酸 (CAA) 的插入的序列。Clarka 等^[4] 以“中国春”小麦开花后 20 d 的发育籽粒分离 Poly(A)⁺ mRNA, 并克隆进 λ gt10, 再用 pcWX27 (代表大麦 Waxy 蛋白 mRNA 的 cDNA 克隆) 筛选, 构建小麦 *Wx* 基因的 cDNA 文库, 证明这一 cDNA 基因的长度为 2 189 bp, 并认为其代表了 *Wx* (cDNA) 基因的全部长度。Fujita 等^[10] 比较六倍体小麦中 *Wx-7A*、*Wx-4A*、*Wx-7D* 基因编码的氨基酸序列和 N 端成熟 *Wx* 蛋白序列时, 发现编码转运肽和信号肽的区域为: *Wx-7A* 中 210~1 605 bp, *Wx-4A* 中 213~1 605 bp, *Wx-7D* 中 210~1 605 bp。转运肽区的核苷酸替换率比成熟 Waxy 蛋白的编码区高 (表 1)。

Nakamura 和 Yamamon^[2] 用气相色谱仪分析小麦 3 个 *Wx* 蛋白亚基的 N 端氨基酸序列 (17 或 18 个 aa), 并与小麦基因的 cDNA 克隆的翻译产物比较, 发现 *Wx-A1*、*Wx-D1* 和 *Wx* (cDNA) 基因翻译产物的 N 端氨基酸序列相同, 它们的第 5 个氨基酸均为甘氨酸 (Gly); 但 *Wx-B1* 基因产物的 N 端第 5 个氨基酸为丙氨酸 (Ala): *Wx-A1* 为

收稿 2003-04-14 修定 2003-10-20

资助 山东省三 0 工程项目。

* E-mail: wangfang19710302@163.com, Tel: 0538-8242922

** 通讯作者 (E-mail: xzwang@sdau.edu.cn, Tel: 0538-8249697)。

表1 六倍体小麦3个蜡质基因之间的同源性、相似性和非同义转换与同义转换的比率

基因	基因组DNA序列的同源性/%				aa序列相似性/%		非同义转换:同义转换	
	从起始密码子 到终止密码子	外显子区		内含子区	转 运 肽	成熟Waxy蛋白	转 运 肽	成熟Waxy蛋白
		转运肽编码区	成熟Waxy 蛋白编码区					
<i>Wx-7A/4A</i>	87.8	88.7	95.9	75.2	84.5	96.5	0.663	0.134
<i>Wx-7A/7D</i>	85.8	91.0	95.6	70.5	87.1	96.8	0.564	0.095
<i>Wx-4A/7D</i>	87.6	93.0	96.3	74.0	94.4	97.4	0.180	0.091

ATGSGGMNLFVFGAEMAP; *Wx-B1* 为 ATGSA₁G MNLFVFGAEMA; *Wx-D1* 为 ATGSGGMNLFVFGAEMA; *Wx* (cDNA) 为 ATGSGGMNLFVFGAEMAP。

Clarka等^[4]比较 *Wx* 基因5'~3' 端10个内含子时, 发现9个内含子的3' 末端剪接位点符合GT-AG的普遍规律, 而第4个内含子的3' 末端剪接位点是GG-AG, 不符合GT-AG的普遍规律。这证明3个 *Wx* 基因的第4个内含子与其它9个内含子有明显的差异: *Wx-7A* 为……cttggtgctgCCATGCTATGCCGTGCCGCGCCGCGCAGGGGAAGAC……; *Wx-4A* 为……cttggtgctgCCACGCCATGCTATGCCGCGCCACGCCGCGCAGGGGAAGAC……; *Wx-7D* 为……tgtatctggTGCCGTCGTCGTCCTTGTTCGCGCCGCGCAGGGGAGGAC…… (小写字母代表内含子, 大写字母代表外显子^[9])。

2 *Wx* 基因的分子遗传学

在许多所谓的糯性小麦材料筛选中, 澳大利亚的Zhao和Sharp^[11]只筛选到Waxy-B1和Waxy-A1缺失材料。日本学者Yamamori等^[12]分析世界各地的1960份小麦的结果表明, 小麦中Waxy蛋白缺失的品系分布广泛, 土耳其、日本、朝鲜小麦的Wx-A1缺失频率较高, 澳大利亚和印度小麦则是Wx-B1缺失的频率较高, 我国小麦品种中亦为Wx-B1缺失的频率较高。Graybosch等^[13,14]鉴定和分析200多个北美的六倍体小麦品种的Wx蛋白时, 获得了同时具有Wx-A1和Wx-B1位点缺失的品种。小麦品种“Ike”也同时具有Wx-A1和Wx-B1缺失位点。但是未发现有Wx-D1位点缺失的品种。我国小麦品种资源丰富, 王子宁等^[15]用

SDS-PAGE技术, 从河北省及其它地方900份小麦品种中鉴定出一份普通小麦Waxy-D1基因缺失小麦, 6份Waxy-B1基因缺失小麦。姚大年等^[16]从鉴定的“中国春”小麦及有关染色体缺体-四体系、中国地方小麦品种“白火麦”和国内外400多份品种的Waxy蛋白亚基类型中筛选出43份不同的Waxy蛋白亚基缺失类型小麦, 特别是筛选出3份Wx-D1亚基缺失小麦。这些材料的发现, 为我国开展品质育种研究打下了基础。

Yamamori等^[17]分析四倍体二粒小麦(AABB)及其相应染色体缺体-四体系(N7AT7B, N7AT7D, N4AT4B, N4AT4D, N7DT7B)的Wx蛋白的结果证明, Wx-A1和Wx-B1分别位于7A和4A上, 并认为小麦的Wx基因存在等位变异。Ainsworth等^[6]用“中国春”小麦的缺体-四体和二倍体分析进一步确证了3个Wx基因位点(Wx-A1, Wx-B1, Wx-D1)所在的染色体臂, Wx-A1位于7AS上, Wx-B1和Wx-D1分别位于4AL和7DS上。Nakamura和Yamamori^[2]用Southern和PCR方法分析“Kanto107”和“白火麦”, 发现两者均存在3个Wx位点的结构基因, 说明Wx基因并不缺失, 但Wx-A1和Wx-B1位点的结构基因分别有一中间缺失段(30~50 bp)和一个插入段(20 bp), 但在Wx-D1位点的结构基因中未发现缺失或插入段, 认为Waxy蛋白亚基的缺失可能是遗传障碍导致基因不能表达而造成的。Nelson等^[18]用染色体配对分析二倍体小麦和原始六倍体小麦的结果显示, 4AL末端和7BS曾发生过染色体片段相互易位, 并发现4AL末端和7AS、7DS具有部分同源性。Miura和Sugawara^[7]发现“中国春”缺体4A和携Wx-B1基因的染色体段缺失系的直链淀粉含

量降低3%以上,其染色体代换系的情况与此一致。这证明 *Wx-B1* 基因的缺失对降低直链淀粉的合成具有强烈的效应。去除携带 *Wx-A1* 基因或 *Wx-D1* 基因的染色体后,直链淀粉含量至少可以降低2%。姚大年等^[16]分析二倍体小麦和原始六倍体小麦(西藏小麦)的 *Waxy* 蛋白带型时进一步确证,在小麦进化过程中,染色体4AL上的片段曾与7BS发生过相互易位,原来在7BS上的荷载有 *Wx-B1* 基因的片段易位到4AL上。

3 *Wx*基因的分子标记和表达调控

分子标记可显著提高育种的准确性和效率。近年来,应用分子标记研究小麦 *Wx* 基因越来越多。Briney等^[19]比较禾谷类作物的 *Wx* 基因及其相应的 mRNA 时发现其间差别主要是10个内含子,特别是第4个内含子变异显著。Shariflou等^[20]根据小麦 *Wx* 基因的3'端的微卫星序列设计PCR引物,从“中国春”中扩增出204和265 bp 2条带,并用非整倍体将之定位于7D和7A上。在加工面包较好的小麦 *Wx* 基因核苷酸序列中发现一段3'端的(AT)_n简单重复序列(SSR),并设计一对引物“Sun1F/Sun1R”对该(AT)_n重复序列进行PCR扩增,结果在135个澳大利亚品种中发现染色体7A上有8个等位基因。梁荣奇等^[21]采用“中国春”及其缺体-四体系(N7AT7B, N7AT7D, N4AT4B, N4AT4D, N7DT7B)对 *wx-B1* 基因的STS标记和 *wx-A1*、*wx-D1* 的微卫星(SSR)标记进行了定位。有人联合应用这两种分子标记,对12个小麦品种和5个高代糯性小麦株系做了鉴定,已从中国地方品种“白火麦”中筛选到 *Wx* 缺失基因^[22]。Yamamori等^[17]用四倍体的二粒小麦、野生二粒和硬粒小麦筛选到 *Wx-A1*(a, b, d, e)和 *Wx-B1*(a, d)多态性基因。

反义RNA技术是调节基因表达的有效途径之一。Visser等^[23]将一个反义的编码GBSS的基因导入马铃薯后,马铃薯本身的GBSS基因表达即受到抑制,块茎中的直链淀粉含量降低。Nakanura和Yamamon^[23]在以Southern杂交和PCR方法研究“Kanto107”、“白火麦”和四倍体小麦(AABB)的 *Wx* 等位基因位点中,用“Kanto107”(缺失 *Wx-A1* 和 *Wx-B1*)分别与“Aldura”(硬粒小麦)、“白火麦”(缺失 *Wx-D1*)杂交,培育出六倍体“糯性小麦”。

4 问题与展望

六倍体普通小麦 *Wx* 基因及其编码 *Wx* 蛋白的机制比二倍体植物复杂得多^[24]。玉米、水稻、大麦等二倍体植物中都存在一个 *Wx* 位点,合成一种 *Wx* 蛋白。而六倍体小麦存在3个 *Wx* 位点,合成3种 *Wx* 蛋白。一些小麦品种具有 *Wx-A1* 或 *Wx-B1* 缺失位点,甚至有些品种如“Kanto1107”和“Ike”的这两个位点同时缺失,但是, *Wx-D1* 位点上的突变为何如此之少,其原因尚不清楚^[6]。另外,3种 *Wx* 基因编码的淀粉合成酶控制直链淀粉合成的机制,以及 *Wx* 基因编码的3种 *Wx* 蛋白的氨基酸序列及等电点范围是否相同,都待进一步研究。

Wx 蛋白亚基及其基因检测方法尚需简单和准确化。尽管双向SDS-PAGE可以区分 *Wx* 蛋白亚基^[2],但操作繁琐,难度大,效率低;单向SDS-PAGE虽操作简单^[15, 25],但由于 *Wx-B1* 的分子量和等电点与 *Wx-D1* 相近,用普通的电泳技术很难将二者分开。由于DNA二级结构等因素的影响,非变性连续聚丙烯酰胺凝胶电泳分离PCR扩增产物也受到一定影响,由于琼脂糖凝胶的分辨率低,测序胶的仪器和操作又比较繁杂,这就使应用小麦品质改良的分子标记辅助选择育种受到很大限制,需要开发更加简便、高效的分子标记,以加快小麦品质的改良。

此外,转反义 *Wx* 基因等外源基因使直链淀粉含量下降后,籽粒产量是否会受到影响,这一问题也应深入研究。

相信今后随着 *Wx* 基因生物化学和遗传机制研究的深入,人们有可能对谷物直链淀粉含量和谷物食用品质的改良提出新的思路,发展新的技术,最终高直链淀粉或高支链淀粉的谷物将会问世。

参考文献

- 1 Chao S, Sharp PJ. RFLP-based genetic maps of wheat homologous group 7 chromosomes. *Theor Appl Genet*, 1989, 78:495~504
- 2 Nakamura T, Yamamon M. Identification of three *Wx* proteins in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Biochem Genet*, 1993, 31:75~86
- 3 Yamamori M, Endo TR. Variation of starch granule proteins and chromosome mapping of their coding genes in common

- wheat. *Theor Appl Genet*, 1996, 93:275~281
- 4 Clark JR, Robertson M, Anisworth CC. Nucleotide sequences of a wheat cDNA clone encoding the waxy protein. *Plant Mol Biol*, 1991, 16:1099~1101
 - 5 Miura H, Tani S. Endosperm starch properties in several wheat varieties preferred for Japanese noodles. *Euphytica*, 1994, 72: 171~176
 - 6 Ainsworth CC, Clarke J, Balston J. Expression, organization and structure of the genes encoding the Waxy protein (granule-bound starch synthase) in wheat. *Plant Mole Biol*, 1993, 22:67~82
 - 7 Miura H, Sugawara A. Dosage effects of the three *Wx* genes on amylose synthesis in wheat endosperm. *Theor Appl Genet*, 1996, 93(7):1066~1070
 - 8 Rober MS, Plaschke J, Kong SU et al. Abundance, variability and chromosomal location of microsatellites in wheat. *Mol Gen Genet*, 1995, 246:327~333
 - 9 Murai J, Taira T, Ohta D. Isolation and characterization of the three *Waxy* genes encoding the granule-bound starch synthase in hexaploid wheat. *Gene*, 1999, 234:71~79
 - 10 Fujita N, Wadano A, Kozaki S et al. Comparison of the primary structure of Waxy proteins (granule-bound starch synthase) between polyploid wheats and related diploid species. *Biochem Genet*, 1996, 34:403~401
 - 11 Zhao XC, Sharp PJ. Wheat "waxy" proteins: DS-PAGE separation and variation in Australian cultivars. *Proceeding of the 7th Wheat Breeding Society of Australian Assembly, Adelaide*, 1994. 253~256
 - 12 Yamamori M, Nakamura T, Endo TR et al. Waxy protein deficiency and chromosomal location of coding genes in common wheat. *Theor Appl Genet*, 1994, 89:179~184
 - 13 Graybosch RA. Waxy wheat: origin, properties, and prospects. *Trends Food Sci Technol*, 1998, 8(4):135~142
 - 14 Graybosch RA, Peterson CJ, Hansen S et al. Identification and characterization of US wheat carrying null alleles at the *Wx* Loci. *Cereal Chem*, 1998, 75(1):162~165
 - 15 王子宁, 郭北海, 李洪杰等. 小麦 (*T. aestivum*) *Waxy-D1* 基因缺失材料的发现及分析. *作物学报*. 2000, (5):257~260
 - 16 姚大年, 王新望, 刘志勇等. 小麦品种蛋白的鉴定和筛选. *农业生物技术学报*, 1999, 7(1):1~9
 - 17 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.). *Euphytica*, 1992, 64:215~219
 - 18 Nelson OE, Chourey PS, Chang MT. Nucleotide diphosphate sugar-starch glucosyl. *Plant Physiol*, 1978, 62:383~386
 - 19 Briney A, Wilson R, Potter RH et al. A PCR-based marker for selection of starch and potential noodle quality in wheat. *Mol Breed*, 1998, 4(5):427~433
 - 20 Shariflou MR, Sharp P. A polymorphic microsatellite in the 3' end of 'waxy' genes of wheat. *Plant Breed*, 1999, 118:275~277
 - 21 梁荣奇, 张义荣, 刘守斌等. 利用 *Wx* 基因分子标记辅助选择培育糯性小麦. *遗传学报*, 2001, 28(9):856~863
 - 22 Nakamura T, Yamamon M. Decrease of Waxy (Wx) protein in two common wheat cultivars with low amylose content. *Plant Breed*, 1993, 111:99~105
 - 23 Visser RGF, Somhoust I, Kuipers G J et al. Inhibition of the expression of the gene for granule-bound starch synthase in potato by antisense constructs. *Mol Gene Genet*, 1991, 225:289~296
 - 24 Echt CS, Schwartz D. Evidence for the inclusion of controlling elements within the structural gene at the *Waxy* locus in maize. *Genetics*, 1981, 99:275~284
 - 25 Zhao XC, Sharp PJ. An improved 1D-SDS-PAGE method for the identification of three waxy bread wheat waxy protein. *J Cereal Sci*, 1996, 23:191~193