

糜子种质资源淀粉含量与 *Waxy* 基因等位变异分析

王红梅¹,董孔军²,何继红²,白斌³,刘天鹏²,任瑞玉²,刘新星¹

¹甘肃省农业科学院生物技术研究所,兰州 730070;²甘肃省农业科学院作物研究所,兰州 730070;

³甘肃省农业科学院小麦研究所,兰州 730070)

摘要:本研究测定了100份糜子种质资源的直链淀粉和支链淀粉含量,采用分子标记对胚乳直链淀粉合成调控基因 *Waxy* 进行基因分型,并选取不同直链淀粉含量代表种质资源进行基因测序和差异位点分析。结果表明,100份糜子种质资源直链淀粉含量变化幅度为0~22.78%,平均6.07%,直链淀粉含量低于3.7%的糯性材料占36%,完全糯性材料占24%;支链淀粉含量变化幅度为4.55%~56.73%,平均15.30%。分子标记M5/R11扩增产物能有效区分 S_0 、 S_{-15} 和 S_0S_{-15} 基因型;标记 int5Ll/R3 和 M12/R12 的 PCR 产物利用内切酶 *ACC I* 和 *EcoNI* 剪切,可鉴别出 L_C 、 L_Y 、 L_F 基因型。100份糜子种质共发现9种基因型,其中 S_0/L_C 数量最多,占33%, S_{-15}/L_F 占25%,杂合型 S_0S_{-15}/L_F 、 S_0S_{-15}/L_C 、 S_0S_{-15}/L_YL_F 各占2%。通过 *Waxy* 基因序列比对,在地方品种甘谷黑蝉背、黑糜子、庆阳饿死牛,育成品种晋黍9号、赤糜2号等种质资源中发现了大量新的SNPs位点,可用于基因功能和糜子育种材料创制研究。本研究结果为糜子分子育种工作及品质改良提供了理论依据。

关键词: 糜子;直链淀粉含量;*Waxy* 基因;基因分型;等位变异

Analysis of Amylose Content and Allelic Variation of *Waxy* Gene in Broomcorn Millet Germplasm Resources

WANG Hongmei¹, DONG Kongjun², HE Jihong², BAI Bin³, LIU Tianpeng², REN Ruiyu², LIU Xinxing¹

¹Institute of Biotechnology, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730070; ²Crop Research Institute, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730070; ³Wheat Research Institute, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730070)

Abstract: The amylose and amylopectin contents of 100 broomcorn millet germplasm resources were measured, and they were genotyped by molecular markers targeting the *Waxy* gene, the key factor modulating amylose synthesis. Some representative resources showing different amylose content were sequenced by Sanger approach. The amylose content in the collection ranged from 0 to 22.78%, with an average of 6.07%. 36% of germplasm resources were detected with amylose content less than 3.7%, including 24% detected without amylose. The amylopectin content ranged from 4.55% to 56.73%, with an average of 15.30%. The functional marker M5/R11 was able to effectively distinguish S_0 , S_{-15} and S_0S_{-15} genotypes, and PCR products of markers int5Ll/R3 and M12/R12 were digested by endonucleases *Acc I* and *EcoNI*, enabling the identification of L_C , L_Y and L_F alleles. Nine genotypes at the *Waxy* locus were found in the collection. The genotype S_0/L_C accounted for 33%, and S_{-15}/L_F accounted for 25%. The genotypes remained heterozygous (S_0S_{-15}/L_F , S_0S_{-15}/L_C and S_0S_{-15}/L_YL_F), and each of them accounted for 2%. A large number of new SNPs were found among landraces such as Gangu Heichanbei, Black millet, Qingyang Esiniu, as well as the varieties Jinshu 9 and Chimi 2. These SNPs serve a

收稿日期: 2023-12-26 网络出版日期: 2024-01-31

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20231226004>

第一作者研究方向为作物种质资源评价与利用, E-mail: wanghm@gsagr.ac.cn

通信作者: 董孔军, 研究方向为杂粮作物育种, E-mail: broommillet@163.com

基金项目: 甘肃省农业科学院农业科技自主创新专项(2021GAAS02); 国家现代农业产业技术体系项目(CARS-06-14.5-A8); 国家自然科学基金(31860378)

Foundation projects: The Agricultural Science and Technology Independent Innovation Project of Gansu Academy of Agricultural Sciences (2021GAAS02); The China Agriculture Research System Project (CARS-06-14.5-A8); The National Natural Science Foundation of China (31860378)

potential in future gene function analysis and innovative breeding in broomcorn millet. Collectively, this study provided theoretical basis for molecular breeding and quality improvement in broomcorn millet.

Key words: broomcorn millet; amylose content; Waxy gene; genotyping; allelic variation

糜子(*Panicum miliaceum* L.)是禾本科黍属草本植物,具有抗旱、耐贫瘠、耐盐碱、抗逆性强、适应性广、生育期短、C4光合属性等特点,是轮作倒茬、山荒瘠薄地修复改良的先锋作物^[1-2],在旱作农业生产中占有重要地位。糜子营养丰富,富含淀粉、蛋白质、酚类活性物质、膳食纤维以及人体必需的氨基酸和钙、铁、镁、锌等多种微量元素,有食用、药用、饲用价值,在现代功能性食品研究开发中具有很大潜力^[3-5]。糜子脱壳后为黄米,常被用来制作米粥、炒米及各种风味小吃如年糕、汤圆等^[6-7],同时也是黄酒制作原料^[8]。随着人们膳食结构多元化及特色产品开发,糜子相关制品倍受消费者关注和青睐^[7,9]。

淀粉是糜子籽粒的重要组成成分,占胚乳的70%左右,淀粉含量和结构与谷物蒸煮食味品质密切相关。研究糜子淀粉含量与组成对于评价其品质特性、加快遗传改良和引导粮食种植结构优化调整具有重要的科学意义^[10]。根据分子结构的不同,淀粉分为直链淀粉和支链淀粉,分子结构和分子聚集状态的差异决定了两种淀粉不同的理化性质和应用领域^[11]。日本学者Nakayama等^[12]根据直链淀粉含量高低将谷子分为非糯(17.0%~31.9%)、低直链淀粉含量(7.8%~16.0%)和糯质(0~3.5%)3种类型,直链淀粉含量>3.5%的为粳性。柴岩^[3]研究认为,糜子胚乳直链淀粉含量<3.7%的为糯性。关于谷类淀粉理化特性与加工品质的研究较多,罗志祥等^[13]的研究表明,稻米中直链淀粉含量与米饭硬度、咀嚼性和膨胀性呈显著正相关,而与黏度呈显著负相关。杨清华等^[14]对40份糜子育成品种研究发现粳糯糜子之间蒸煮食味品质与加工工艺有显著差异,粳性糜子饭吸水率、糊化时间、体积膨胀率、米汤固形物含量、米汤碘蓝值均高于糯性糜子。邵欢欢等^[15]测定40份糜子淀粉含量,发现总淀粉含量为58.43%~75.45%,直链淀粉含量为0~20.34%,不同来源地的糜子直链淀粉含量差异较显著。田翔等^[16]采用单波长法测定80份山西糜子,发现直链淀粉含量变化幅度为0~27.96%,提出了不同直链淀粉含量范围的材料类型,为糜子品质育种亲本的选配提供依据。

禾谷类作物胚乳淀粉合成受Waxy基因控制,

Waxy基因编码颗粒结合型淀粉合成酶(GBSSI, granule-bound starch synthase I),颗粒结合型淀粉合成酶是合成直链淀粉的关键酶^[17]。若Waxy基因发生突变,颗粒结合型淀粉合成酶不能正常表达或酶活性降低,导致直链淀粉和支链淀粉含量及比例发生变化,淀粉性状则由粳性转变为糯性^[18]。由Waxy基因突变引起的粳糯性改变现象在水稻^[19]、玉米^[20]、谷子^[21]、糜子^[22]等作物中广泛存在。王倩等^[23]在GenBank数据库中搜索了22种植物颗粒结合型淀粉合成酶蛋白基因序列,发现大多数植物Waxy基因存在于不同染色体,一般含有14个外显子和13个内含子,编码氨基酸约514~660 aa。糜子是异源四倍体物种(2n=4x=36),Hunt等^[24]对糜子Waxy基因测序发现,Waxy基因包含2种位点(GBSSI-S和GBSS I-L),其中,GBSSI-S基因在外显子10区域存在15 bp碱基的缺失(突变型为S₁₅,野生型为S₀),该缺失导致葡糖基转移酶结构域GTD1缺失5个氨基酸,使GBSSI-S基因酶的活性丧失,胚乳淀粉由粳性转变为糯性;GBSS I-L位点有3个等位基因(L_F、L_Y、L_C),L_F由位于第9外显子区域的移码突变(腺嘌呤残基A的插入)得到,L_Y是第7外显子序列发生了单碱基替换(A替换G),由半胱氨酸变成酪氨酸得到,L_C为GBSS I-L基因上不存在移码突变和单碱基突变的基因型。刘晓欢^[25]对来自中国17个省的241份糜子地方品种的颗粒结合型淀粉合成酶序列进行基因分型研究,发现了5种基因型,最多的是S₁₅/L_F,但没有发现基因型S₁₅/L_C,分析可能与中国糜子的起源与进化有关。丁敏等^[26]根据糜子Waxy位点颗粒结合型淀粉合成酶基因开发了3个功能标记,其中InDel标记(RYW214)能有效区分粳、糯和杂合3种变异类型,分子检测与表型鉴定结果吻合度达93.3%,为糜子粳糯性鉴定提供了有效的检测工具。

直链淀粉含量是稻米国家标准中的一项重要技术参数,其含量的高低对于评价粮食品质和农业选种具有重要参考价值^[27-28]。直链淀粉定量测定是对禾谷类成熟籽粒磨粉后进行测定,具有局限性。DNA分子标记技术在作物生长发育的任何时期、任何组织都可对目标性状进行快速、准确鉴定,尤其在杂交育种遗传群体早代选择中可发挥重要作用。Hunt等^[24]研究发现糜子糯质类型与S位点

15 bp 缺失呈 100% 对应关系。Wang 等^[29]对 132 份中国糜子 *Waxy* 基因的多态性位点进行分子检测,基于测序结果对研究材料进行基因分型,进一步证实了突变体 S₁₅ 基因型与糜子糯质性相关。目前,我国糜子育种仍处于以杂交育种为主要方法的常规育种阶段,早熟、高产、抗逆是糜子主要的育种目标,品质育种刚刚起步,应用分子标记辅助选择育种仅为个例^[30-31]。本研究收集不同生态类型的糜子种质资源,测定籽粒胚乳直链淀粉与支链淀粉含量,采用分子标记与酶切技术对糜子种质进行基因分型,从直链淀粉含量与分布比例方面分析糜子粳糯性与杂交育种选择的关联性,以期对糜子遗传改良提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料由不同来源地有代表性的糜子种质资源组成,共计 100 份,包括地方品种 58 份,育成品种 24 份,国外引进材料 18 份。试验材料(植株叶片及成熟籽粒)由甘肃省农业科学院作物研究所杂粮课题组提供,2021 年种植在甘肃省农业科学院会宁试验站。

1.2 直链淀粉与支链淀粉含量测定

试验材料使用砵谷机将籽粒脱壳,取脱壳糜子籽粒置于球磨仪(Retsch MM400)中研磨,粉末过 100 目筛,筛下粉末为测定直链/支链淀粉样品。直链/支链淀粉含量测定采用双波长微量分析法(BioTek Synergy HTX),方法步骤按照北京盒子生

工科技有限公司试剂盒(Boxbio-AKSU016C/AKSU017C)说明书进行,直链淀粉含量测定主波长为 550 nm,参比波长为 485 nm;支链淀粉含量测定主波长为 530 nm,参比波长为 755 nm。每个样品重复测定 3 次,取平均值计算直/支比(直链淀粉含量与支链淀粉含量比值)。

1.3 分子标记检测

1.3.1 样品 DNA 提取 糜子样品叶片在液氮中研磨成粉末, DNA 提取使用 BIOMIGA CP Plant gDNA Isolation Kit(型号:BW-GD2621,杭州倍沃医学科技有限公司),方法参考试剂盒说明书;采用 NanoDrop One 超微量紫外分光光度计检测 DNA 浓度和纯度,以 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的完整性。

1.3.2 PCR 反应体系与扩增程序 PCR 引物序列来源于 Hunt 等^[24-32](表 1),其中 int5Lf/R3、M12/R12 分别扩增 *GBSS I-L* 基因的 intron5-exon7 区段和 intron8-intron9 区段, M5/R11 扩增 *GBSS I-S* 基因 exon9-intron 10 区段,引物由北京赛百盛生物技术有限公司合成。PCR 反应体系为 15 μ L:模板 DNA 1 μ L (25 ng), 2 \times Taq PCR MasterMix 7.5 μ L, 上下游引物各 1 μ L (10 μ mol/L), ddH₂O 4.5 μ L。PCR 反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 54~58 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 40 s, 34 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 8 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。PCR 反应在 BIO-RAD T100™ 扩增仪中进行,扩增产物经 2.5% 的琼脂糖凝胶和 8% 非变性聚丙烯酰胺电泳检测, BIO-RAD ChemiDoc XRS+ 凝胶成像系统观察拍照。

表 1 PCR 扩增引物及扩增区段

Table 1 PCR amplification primers and amplification segments

| 标记 Markers | 测序引物 Sequencing primer | 引物序列(5'-3') Primer sequence(5'-3') | 退火温度($^{\circ}$ C) Annealing temperature | 扩增区段 Amplification segments | 参考文献 Reference |
|---------------|------------------------------|--|---|--------------------------------|-------------------|
| int5Lf R3 | int5Lf | ATGTTTGAATGAATGCTCC TGGTAGTTGCTCTTGAGGTA | 54 | L gene, intron5-exon 7 | [24] [32] |
| M12 R12 | M12 | CGTGACCATCTCTCCTGTA CGACGACGAACTCTCAACAC | 58 | L gene, intron8-intron 9 | [24] [24] |
| M5 R11 | M5 | GGACGTCAGCGAGTGGGACC CAGGCACACTGCTCCCAATG | 58 | S gene, exon9-intron 10 | [32] [24] |

1.4 基因测序与酶切体系建立

1.4.1 PCR 产物测序与序列比对 选取糜子不同直链淀粉含量代表性材料 16 份(包括糯质材料 5 份,中、低直链淀粉含量材料各 4 份、高直链淀粉含量材料 3 份),采用高保真 DNA 酶 Prime STAR GXL

DNA Taq polymerase(Takara)和标记引物 int5Lf/R3、M12/R12、M5/R11 对基因组 DNA 进行 PCR 扩增(反应体系和扩增程序同 1.3.2),扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测,选取目标片段条带单一、亮度强的 PCR 原液委托上海派森诺生物科技公司纯化测序,

方法为 Sanger 测序。采用生物信息学软件进行序列比对,引物 int5Lf/R3 和 M12/R12 扩增序列的参考基因组 ID 为 GU199253,引物 M5/R11 扩增序列的参考基因组 ID 为 GU199261。

1.4.2 酶切体系与反应条件 限制性内切酶的选择参考丁敏等^[26]研究,内切酶 *ACC I* 和 *EcoN I* 购自 NEB (New England Biolabs (Beijing) LTD.)。酶切总反应体系为 40 μ L,其中无酶水 19.5 μ L、PCR 产物 15 μ L、10 \times rCutSmart Buffer 4 μ L、*ACC I* 或 *EcoN I* 1.5 μ L (10 units/ μ L),37 $^{\circ}$ C 恒温孵育 3 h,80 $^{\circ}$ C/65 $^{\circ}$ C 热失活 20 min。酶切产物用 2.0%~3.0% 的琼脂糖凝胶检测,恒压 100 V 电泳 50 min。*GBSSI-L* 基因若 exon7 中发生了碱基 A 替换 G (L_V),则可被内切酶 *ACC I* (识别位点 5'...GT▼MKAC...3') 消化,产生 171 bp 和 52 bp 的 DNA 片段;若 exon9 中存在碱基 A 插入导致移码突变 (L_F),可被 *EcoN I* (识别位点 5'...CCTNN▼NNNAGG...3') 消化,产生 359 bp 和 286 bp 的 DNA 片段。

1.4.3 基因分型 采用标记引物 M5/R11 对 *GBSSI-S* 基因 exon9- intron10 区段扩增,根据扩增产物片段大小(存在 15 bp 碱基缺失与否)和电泳谱带确定基因型 S_0 、 S_{-15} 和 S_0S_{-15} (双带);采用内切酶 *ACC I* 和

EcoN I 对 *GBSSI-L* 基因的靶标位点进行消化,根据酶切产物片段大小识别 L_V 、 L_F 、 L_C 基因型。

1.5 数据统计与分析

使用 DPS V18.10 数据处理系统分析淀粉含量相关数据,测序数据使用 Geneious v 8.0.2 生物信息学软件进行多序列比对分析。

2 结果与分析

2.1 糜子种质资源淀粉含量与直/支比

对 100 份糜子种质资源直链淀粉含量、支链淀粉含量、直/支比数据进行统计,由表 2 可见直链淀粉含量变化幅度为 0~22.78%,平均 6.07%。按照 Nakayama 等^[17]对谷类的划分标准,供试材料糯质、低直链淀粉含量和非糯类型分别占 36%、59% 和 5%,低直链淀粉含量类型最多,其次是糯质类型,糯性糜子中完全糯性材料占比 24%。按照材料来源,58 份地方品种、24 份育成品种和 18 份国外引进材料的直链淀粉含量平均值分别为 4.45%、4.99%、10.92%,地方品种和育成品种直链淀粉含量平均值偏低,可能与地方品种和育成品种中完全糯性材料占比很高有关,分别为 16% 和 8%,国外引进材料均为非糯类型。

表 2 100 份糜子来源、淀粉含量及其 *Waxy* 基因分型

Table 2 The source, starch content and *Waxy* genotyping of 100 broomcorn millet

| 序号 Number | 名称 Variety | 来源 Origin | 直链淀粉含量(%) Amylose content | 支链淀粉含量(%) Amylopectin content | 直/支比 Ratio of amylose to amylopectin | S gene exon9- intron10 | L gene intron5-exon7, intron8-intron9 | | |
|--------------|---------------|--------------|------------------------------|----------------------------------|---|------------------------------|---|-------|-------|
| | | | | | | | L_V | L_F | L_C |
| 1 | 黄黍子 | 中国北京 | 0 | 34.33±0.15 | 0 | S_{-15} | √ | | |
| 2 | 甘谷黑蝉背 | 中国甘肃 | 18.70±0.48 | 14.04±0.22 | 1.33 | S_0 | | | √ |
| 3 | 会宁保安红 | 中国甘肃 | 17.22±0.21 | 17.15±0.34 | 1.00 | S_0 | | | √ |
| 4 | 庆阳饿死牛 | 中国甘肃 | 9.21±0.82 | 44.74±2.64 | 0.21 | S_0 | | √ | |
| 5 | 古浪半个红 | 中国甘肃 | 10.51±1.17 | 21.86±0.28 | 0.48 | S_0 | √ | | |
| 6 | S02036 | 中国海南 | 4.63±0.44 | 42.85±1.14 | 0.11 | S_0 | | √ | |
| 7 | 小黍子 | 中国河北 | 12.78±0.98 | 12.18±0.40 | 1.05 | S_0 | | | √ |
| 8 | 粘黍子 | 中国河北 | 0 | 18.69±0.12 | 0 | S_{-15} | | √ | |
| 9 | 河间白黍子 | 中国河北 | 0 | 20.32±0.86 | 0 | S_{-15} | | √ | |
| 10 | 红鹤鹑尾 | 中国黑龙江 | 0 | 27.12±1.16 | 0 | S_{-15} | | √ | |
| 11 | 小麦糜子 | 中国黑龙江 | 13.71±0.41 | 14.68±0.37 | 0.93 | S_0 | | | √ |
| 12 | 葡萄青 | 中国黑龙江 | 5.65±1.55 | 15.16±0.03 | 0.37 | S_0 | | | √ |
| 13 | 嫩黍 23 | 中国黑龙江 | 0 | 34.36±0.81 | 0 | S_{-15} | | √ | |
| 14 | 单尾巴糯 | 中国湖北 | 1.06±0.57 | 19.84±0.25 | 0.05 | S_{-15} | √ | | |
| 15 | 黑糜子 | 中国吉林 | 4.72±0.21 | 26.41±1.30 | 0.18 | S_{-15} | | √ | |

表2(续)

| 序号 Number | 名称 Variety | 来源 Origin | 直链淀粉含量(%) Amylose content | 支链淀粉 含量(%) Amylopectin content | 直/支比 Ratio of amylose to amylopectin | S gene exon9- intron10 | L gene intron5-exon7, intron8-intron9 | | |
|--------------|---------------|--------------|------------------------------|---|---|---------------------------------|---|----------------|----------------|
| | | | | | | | L _Y | L _F | L _C |
| 16 | 千沟黄糜子 | 中国吉林 | 2.09±0.42 | 25.03±0.75 | 0.08 | S ₋₁₅ | | √ | |
| 17 | 散尾儿 | 中国江苏 | 3.24±0.17 | 28.72±0.18 | 0.11 | S ₋₁₅ | √ | | |
| 18 | 康平散穗 | 中国辽宁 | 0 | 33.82±0.22 | 0 | S ₋₁₅ | | √ | |
| 19 | 呼盟黑粘糜 | 中国内蒙古 | 0 | 32.69±0.48 | 0 | S ₋₁₅ | | √ | |
| 20 | 临河双粒黍 | 中国内蒙古 | 0 | 26.57±1.00 | 0 | S ₋₁₅ | | √ | |
| 21 | 准旗酱黄黍 | 中国内蒙古 | 1.39±0.29 | 19.81±0.42 | 0.07 | S ₋₁₅ | √ | | |
| 22 | 红糜子 | 中国内蒙古 | 13.70±1.12 | 26.19±0.48 | 0.52 | S ₀ | √ | | |
| 23 | 内黍一点红 | 中国内蒙古 | 14.17±0.98 | 16.99±0.31 | 0.83 | S ₀ | | √ | |
| 24 | 惠农黄粘黍 | 中国宁夏 | 3.84±0.79 | 32.88±0.33 | 0.12 | S ₋₁₅ | | | √ |
| 25 | 池白糜子 | 中国宁夏 | 3.84±0.66 | 33.20±0.92 | 0.12 | S ₀ | | | √ |
| 26 | 丰双-4 | 中国宁夏 | 1.11±1.21 | 17.18±2.30 | 0.06 | S ₋₁₅ | √ | | |
| 27 | 大黄糜 | 中国青海 | 9.44±0.08 | 17.79±0.67 | 0.53 | S ₀ | | √ | |
| 28 | 六十糜 | 中国青海 | 10.05±0.80 | 22.18±0.32 | 0.45 | S ₀ | | | √ |
| 29 | 灰糜子 | 中国青海 | 3.75±0.97 | 12.98±0.53 | 0.29 | S ₀ | | | √ |
| 30 | 黄粒糜 | 中国青海 | 5.18±0.26 | 7.63±0.28 | 0.68 | S ₀ | √ | | |
| 31 | 黄黍子 | 中国山东 | 0 | 7.60±1.05 | 0 | S ₋₁₅ | | √ | |
| 32 | A85-45 | 中国山东 | 0 | 5.93±0.40 | 0 | S ₋₁₅ | | √ | |
| 33 | 小白黍 | 中国山西 | 6.57±0.26 | 15.13±0.42 | 0.43 | S ₀ | √ | | |
| 34 | 灰脸蛋黍 | 中国山西 | 0 | 6.79±0.06 | 0 | S ₋₁₅ | | √ | |
| 35 | 大红糜子 | 中国山西 | 0 | 6.25±0.36 | 0 | S ₋₁₅ | | √ | |
| 36 | 软糜子 | 中国山西 | 7.59±0.65 | 9.74±0.58 | 0.78 | S ₀ | | √ | |
| 37 | 软黍谷 | 中国山西 | 0.37±0.21 | 11.44±1.33 | 0.03 | S ₋₁₅ | | √ | |
| 38 | 紫秆白黍 | 中国山西 | 0 | 4.55±0.19 | 0 | S ₋₁₅ | | √ | |
| 39 | 老树皮黍子 | 中国未知 | 0 | 5.77±0.33 | 0 | S ₋₁₅ | | √ | |
| 40 | 灰软糜 | 中国未知 | 7.78±0.14 | 6.92±0.05 | 1.12 | S ₀ | | | √ |
| 41 | 圪堵穗红软糜 | 中国未知 | 9.91±0.05 | 8.11±0.39 | 1.22 | S ₀ | | √ | |
| 42 | 焦顶软糜 | 中国未知 | 0 | 8.65±0.72 | 0 | S ₋₁₅ | | √ | |
| 43 | 洼黑红软糜 | 中国陕西 | 0 | 7.37±0.23 | 0 | S ₋₁₅ | | √ | |
| 44 | 灰麻糜 | 中国陕西 | 12.17±0.80 | 17.85±0.64 | 0.68 | S ₀ | | | √ |
| 45 | 红软糜(黍) | 中国陕西 | 4.91±0.20 | 13.97±0.78 | 0.35 | S ₀ | | √ | |
| 46 | 灰糜子 | 中国陕西 | 7.92±0.32 | 9.42±0.44 | 0.84 | S ₀ | | | √ |
| 47 | 黑糜子 | 中国陕西 | 4.95±0.25 | 13.59±0.06 | 0.36 | S ₀ | | √ | |
| 48 | 晋黍9号 | 中国山西 | 6.85±0.27 | 56.73±0.09 | 0.14 | S ₀ S ₋₁₅ | √ | √ | |
| 49 | 札达糜 | 中国西藏 | 1.16±0.17 | 10.00±0.42 | 0.12 | S ₀ S ₋₁₅ | | √ | |
| 50 | 额敏红糜 | 中国新疆 | 5.23±0.54 | 12.63±0.42 | 0.41 | S ₀ | | √ | |
| 51 | 糜子 | 中国新疆 | 6.25±0.72 | 8.91±0.50 | 0.70 | S ₀ | | | √ |
| 52 | 红糜 | 中国新疆 | 4.77±0.72 | 8.94±0.28 | 0.53 | S ₀ | √ | | |

表 2 (续)

| 序号 Number | 名称 Variety | 来源 Origin | 直链淀粉含量(%) Amylose content | 支链淀粉 含量(%) Amylopectin content | 直/支比 Ratio of amylose to amylopectin | S gene exon9- intron10 | L gene intron5-exon7, intron8-intron9 | | |
|--------------|-------------------------|--------------|------------------------------|---|---|---------------------------------|---|----------------|----------------|
| | | | | | | | L _V | L _F | L _C |
| 53 | 黑糜子 | 中国云南 | 2.83±0.12 | 10.45±2.03 | 0.27 | S ₀ S ₋₁₅ | | √ | |
| 54 | 陇糜 10 号 | 中国甘肃 | 7.36±0.52 | 6.76±0.48 | 1.09 | S ₀ | | | √ |
| 55 | 陇糜 14 | 中国甘肃 | 13.29±0.44 | 9.65±0.14 | 1.38 | S ₀ | | | √ |
| 56 | 陇糜 7 号 | 中国甘肃 | 8.47±0.24 | 6.18±0.14 | 1.37 | S ₀ | | | √ |
| 57 | 陇糜 11 号 | 中国甘肃 | 22.78±0.34 | 19.62±0.11 | 1.16 | S ₀ | | | √ |
| 58 | 陇糜 4 号 | 中国甘肃 | 8.38±0.65 | 9.17±0.12 | 0.91 | S ₀ | | | √ |
| 59 | 龙黍 23 号 | 中国黑龙江 | 0 | 5.87±0.44 | 0 | S ₋₁₅ | | √ | |
| 60 | 齐黍 1 号 | 中国黑龙江 | 0 | 5.16±0.70 | 0 | S ₋₁₅ | √ | | |
| 61 | 粘丰 7 号 | 中国黑龙江 | 0 | 12.34±0.53 | 0 | S ₋₁₅ | | √ | |
| 62 | 九黍 1 号 | 中国吉林 | 0 | 10.86±1.25 | 0 | S ₋₁₅ | | √ | |
| 63 | 辽糜 56 | 中国辽宁 | 1.06±0.12 | 11.63±1.05 | 0.09 | S ₋₁₅ | √ | | |
| 64 | 赤糜 2 号 | 中国内蒙古 | 1.76±0.17 | 12.57±0.86 | 0.14 | S ₀ S ₋₁₅ | √ | √ | |
| 65 | 伊选黄糜 | 中国内蒙古 | 0.23±0.06 | 12.79±0.86 | 0.01 | S ₋₁₅ | | √ | |
| 66 | 固糜 21 号 | 中国宁夏 | 4.77±1.61 | 11.38±0.78 | 0.42 | S ₀ | | √ | |
| 67 | 宁糜 13 号 | 中国宁夏 | 6.94±0.96 | 13.33±0.32 | 0.52 | S ₀ | | √ | |
| 68 | 宁糜 15 号 | 中国宁夏 | 0 | 8.69±0.62 | 0 | S ₋₁₅ | | √ | |
| 69 | 晋黍 4 号 | 中国山西 | 0 | 7.08±0.12 | 0 | S ₋₁₅ | √ | | |
| 70 | 晋黍 8 号 | 中国山西 | 0 | 10.23±0.94 | 0 | S ₋₁₅ | √ | | |
| 71 | 榆糜 2 号 | 中国陕西 | 22.50±0.26 | 22.89±0.39 | 0.99 | S ₀ | | √ | |
| 72 | 榆糜 3 号 | 中国陕西 | 4.12±0.09 | 14.36±0.56 | 0.29 | S ₀ | | √ | |
| 73 | 冀黍 3 号 | 中国河北 | 0.23±0.10 | 7.69±0.17 | 0.03 | S ₋₁₅ | | √ | |
| 74 | 会宁野糜子 | 中国甘肃 | 5.46±0.97 | 14.42±0.64 | 0.38 | S ₀ | | | √ |
| 75 | 泥河湾野黍子 | 中国河北 | 0.79±0.20 | 16.57±0.17 | 0.05 | S ₀ S ₋₁₅ | | | √ |
| 76 | 承德-7 | 中国河北 | 3.84±0.41 | 11.92±0.39 | 0.32 | S ₀ | | | √ |
| 77 | 吉林 3 | 中国吉林 | 5.09±0.26 | 14.74±0.08 | 0.35 | S ₀ | | | √ |
| 78 | 榆糜 3 号 | 中国陕西 | 5.74±0.73 | 23.62±0.97 | 0.24 | S ₀ | | √ | |
| 79 | 赤黍 1 号 | 中国内蒙古 | 0 | 30.05±0.21 | 0 | S ₋₁₅ | √ | | |
| 80 | 野生黄黍子 | 中国山西 | 6.94±0 | 11.70±0.16 | 0.59 | S ₀ | √ | | |
| 81 | 野糜子 | 中国山西 | 6.53±0.48 | 14.49±0.36 | 0.45 | S ₀ S ₋₁₅ | | | √ |
| 82 | 野糜子 | 中国新疆 | 12.78±0.72 | 10.48±0.50 | 1.22 | S ₀ | | √ | |
| 83 | IPM 1044 | 阿富汗 | 11.53±0.88 | 14.23±0.06 | 0.81 | S ₀ | | | √ |
| 84 | WHITE FRENCH COMMERCIAL | 澳大利亚 | 11.67±0.37 | 8.88±0.28 | 1.31 | S ₀ | √ | | |
| 85 | IPM 1116 | 巴基斯坦 | 13.24±1.00 | 12.02±1.11 | 1.10 | S ₀ | | | √ |
| 86 | IPM 1037 | 阿根廷 | 10.23±0.44 | 10.35±0.28 | 0.99 | S ₀ | | | √ |
| 87 | 德国 | 德国 | 11.99±0.68 | 8.75±0.83 | 1.37 | S ₀ | | | √ |
| 88 | GE.2013-28 | 格鲁吉亚 | 9.82±1.08 | 8.11±0.40 | 1.21 | S ₀ | | | √ |
| 89 | Teisengun Suizanmensan | 韩国 | 10.51±0.76 | 14.90±0.33 | 0.71 | S ₀ | | | √ |

表2(续)

| 序号 Number | 名称 Variety | 来源 Origin | 直链淀粉含量(%) Amylose content | 支链淀粉 含量(%) Amylopectin content | 直/支比 Ratio of amylose to amylopectin | S gene exon9- intron10 | L gene intron5-exon7, intron8-intron9 | | |
|--------------|-----------------------|--------------|------------------------------|---|---|------------------------------|---|----------------|----------------|
| | | | | | | | L _Y | L _F | L _C |
| 90 | DOMACE BIELE | 捷克斯洛伐克 | 9.12±0.09 | 7.79±0.39 | 1.17 | S ₀ | | | √ |
| 91 | 罗马尼亚 | 罗马尼亚 | 11.34±0.09 | 9.17±0.86 | 1.24 | S ₀ | | | √ |
| 92 | SNOBIRD | 美国 | 10.47±0.05 | 12.37±0.67 | 0.85 | S ₀ | | | √ |
| 93 | PI 427250 | 尼泊尔 | 8.89±0.14 | 8.39±0.38 | 1.06 | S ₀ | | √ | |
| 94 | 墨西哥 | 墨西哥 | 14.03±1.08 | 7.95±0.39 | 1.77 | S ₀ | | | √ |
| 95 | 尼泊尔 | 尼泊尔 | 7.64±0.21 | 8.72±0.34 | 0.88 | S ₀ | | √ | |
| 96 | 塔吉克斯坦 | 塔吉克斯坦 | 7.73±0.09 | 9.81±1.05 | 0.79 | S ₀ | | | √ |
| 97 | Veselopodoljanskoe 38 | 乌克兰 | 17.59±0.97 | 15.54±0.13 | 1.14 | S ₀ | | | √ |
| 98 | LOVASZPATONAI PIROS | 匈牙利 | 8.75±0.44 | 8.24±0.20 | 1.06 | S ₀ | √ | | |
| 99 | 意大利 | 意大利 | 10.83±0.53 | 7.02±0.06 | 1.54 | S ₀ | | | √ |
| 100 | 科瓦尔杰特 | 俄罗斯 | 11.2±0.05 | 7.79±0.42 | 1.44 | S ₀ | √ | | |
| | 均值 | / | 6.07 | 15.30 | 0.44 | | | | |

S₀:代表GBSSI-S基因 exon9-intron10 区段无碱基缺失;S₁₅:代表该区段有15 bp 碱基缺失,S₀S₁₅代表杂合基因型;L_Y:代表GBSSI-L基因 intron5-exon7 区段存在A 碱基替换G;L_F:代表intron8-intron 9 区段有碱基A 插入;L_C:代表这两个区段无A 碱基替换G、无碱基A 插入;√表示存在相应的基因位点

S₀: Indicate without 15 bp deletion at exon9-intron10 of GBSSI-S gene; S₁₅: With 15bp deletion at the region; S₀S₁₅: Indicate heterozygous genotype ; L_Y: A nucleotide base A substitution for G at intron5-exon7 of GBSSI-L gene; L_F: A nucleotide base A insertion at intron8-intron 9 region; L_C: No nucleotide base A substitution for G and no nucleotide base A insertion at the regions; √ indicates the presence of corresponding gene loci

100份糜子种质资源支链淀粉含量变化幅度为4.55%~56.73%,平均15.30%,地方品种、育成品种和国外引进材料支链淀粉含量平均值分别为16.52%、13.82%、9.96%。育成品种晋黍9号(序号48)和地方品种庆阳饿死牛(序号4)、S02036(序号6)支链淀粉等含量较高,分别为56.73%和44.74%、42.85%;地方品种紫秆白黍(序号38)和育成品种齐黍1号(序号60)支链淀粉含量较低,分别为4.55%、5.16%。淀粉直/支比是影响含淀粉食品加工工艺参数的重要因素^[33],本研究淀粉直/支比变化幅度为0~1.77,平均为0.44。Bienvenido^[34]依据淀粉直/支比将稻米划分为低(<0.05)、较低(0.06~0.14)、中等(0.15~0.25)、较高(0.26~0.33)、高直/支比(>0.33)5个类别。依据该标准,100份糜子材料淀粉直/支比低、较低、中等、较高、高的数量依次为29、10、3、5、53,直/支比<0.05的材料基本为糯性材料,直/支比>0.33的材料占53%,高直/支比数量居多。

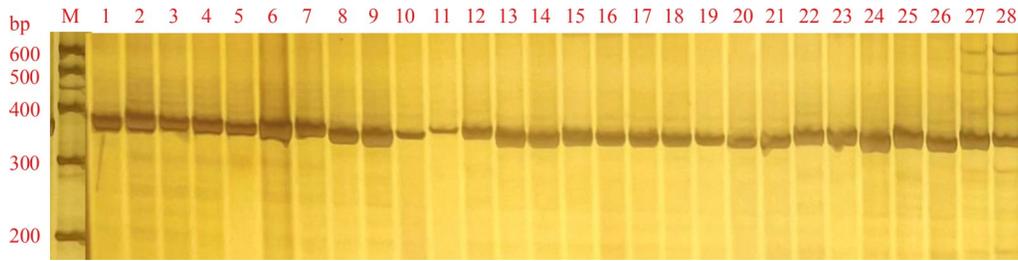
2.2 糜子种质资源分子标记检测

3对引物 int5Lf/R3、M12/R12、M5/R11 特异性和稳定性好,对100份糜子DNA进行PCR均能扩增

出清晰的目标条带。引物M5/R11扩增GBSSI-S基因 exon9-intron10 区段,扩增产物采用8%聚丙烯酰胺凝胶电泳能有效区分S₀、S₁₅基因型及S₀S₁₅杂合型(图1),3种基因型检出数量分别为59个、35个、6个(表2)。引物int5Lf/R3、M12/R12扩增GBSSI-L基因的 intron5-exon 7 区段和 intron8-intron 9 区段,在所有材料中分别扩增出223 bp和645 bp的特异片段,电泳条带清晰亮度强,为下一步的酶切提供了充足的底物。

2.3 糜子种质资源 Waxy 基因分型

采用int5Lf/R3、M12/R12引物对GBSSI-L基因进行PCR扩增,扩增产物采用限制性内切酶ACC I和EcoN I消化,通过优化酶切条件达到了预期的酶切效果(图2,图3)。酶切结果显示,100份研究材料中,在 intron5-exon 7 区段和 intron8-intron 9 区段能被内切酶ACC I消化即存在碱基A 替换G的L_Y型有18份,被内切酶EcoN I消化有碱基A 插入的L_F型44份,可以被两种内切酶同时消化即既有碱基A 替换G、又有碱基A 插入的L_Y/L_F型为2份,既无A 碱基替换G、又无碱基A 插入的L_C基因型有36份(表2)。

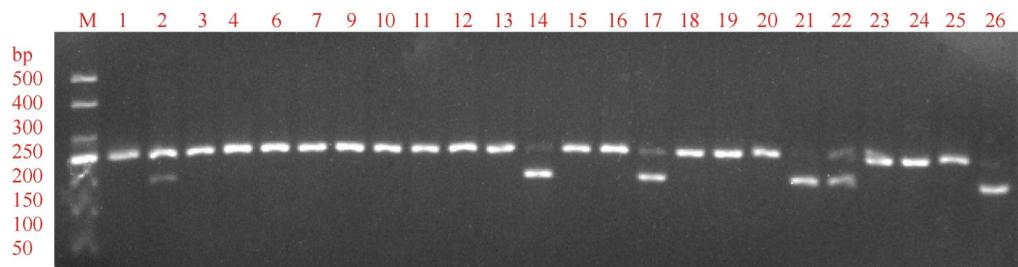


M: Marker I; 1-22: 序号同表 2

1-22: Serial numbers are the same as in table 2

图 1 引物 M5/R11 对部分糜子样品 *GBSSI-S* 位点 PCR 扩增电泳图

Fig. 1 Electrophoretic PCR products of some broomcorn millet samples with primers M5/R11

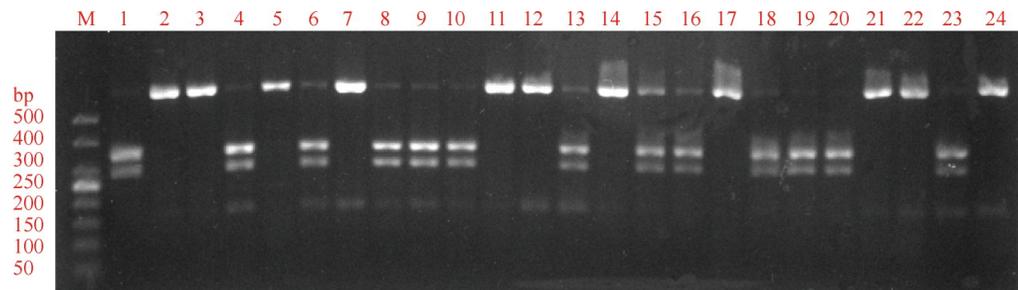


M: 500 bp plus marker; 序号同表 2

Sample numbers are the same as in table 2

图 2 部分糜子样品 *ACC I* 酶切电泳图

Fig. 2 Electrophoretic enzyme digestion products of some broomcorn millet samples with *ACC I*



M: 500 bp plus marker; 1-24: 序号同表 2

1-24: Sample numbers are the same as in table 2

图 3 部分糜子样品 *EcoN I* 酶切电泳图

Fig. 3 Electrophoretic enzyme digestion products of some broomcorn millet samples with *EcoN I*

基于 M5/R11 标记检测及两种酶切结果对 100 份糜子材料进行基因分型,共发现 9 种基因型(表 3)。在全部材料中, S_0/L_C 基因型数量最多,共 33 份,其次是 S_{-15}/L_F 有 25 份, S_0/L_F 有 17 份; S_0/L_Y 与 S_{-15}/L_Y 各有 9 份, S_0S_{-15}/L_F 、 S_0S_{-15}/L_C 、 S_0S_{-15}/L_YL_F 各有 2 份;发现 1 例 S_{-15}/L_C 基因型;所有材料中不存在 S_0/L_YL_F 、 S_0S_{-15}/L_Y 、 S_{-15}/L_YL_F 三种类型。综上, S_0/L_C 和 S_{-15}/L_F 是本研究材料中粳、糯糜子的主要基因型。

2.4 糜子种质资源 *Waxy* 基因型与直链淀粉含量的关系

本研究对各基因型直链淀粉含量均值进行多

重比较(表 3),发现 *GBSS I-S* 基因野生型 S_0 无论与 *GBSS I-L* 哪种基因型组合,直链淀粉含量都明显高于突变型 S_{-15} 。在检测到的 9 种基因型中纯合野生型 S_0/L_C 直链淀粉含量最高,变异区间为 3.75%~22.78%,变异系数为 42.92%;突变型 S_{-15} 与 L_Y 、 L_F 任何一种结合,直链淀粉含量均较低,变异区间为 0~4.72%,最大变异系数为 330.98%;杂合基因型 S_0S_{-15}/L_F 、 S_0S_{-15}/L_C 、 S_0S_{-15}/L_YL_F 直链淀粉含量介于野生型和突变型之间,变异区间为 0.79%~6.85%,最大变异系数为 110.90%。对糜子基因型和直链淀粉含量进行显著性分析,结果显示不同基因型间差异性显著($P < 0.05$)。

表3 不同基因型糜子直链淀粉含量

Table3 Amylose content in different genotypes of broomcorn millet germplasm

| 基因型 Genotype | 数量 Number | 直链淀粉含量(%) Amylose content | 标准误 Standard deviation | 变异区间(%) Range of variation | 变异系数(%) Coefficient of variation |
|--|--------------|------------------------------|---------------------------|-------------------------------|-------------------------------------|
| S ₀ /L _Y | 9 | 8.81±3.14 ab | 1.05 | 4.77~13.70 | 35.60 |
| S ₀ /L _F | 17 | 8.44±4.65 ab | 1.13 | 4.12~22.50 | 55.11 |
| S ₀ /L _C | 33 | 10.39±4.46 a | 0.78 | 3.75~22.78 | 42.92 |
| S ₋₁₅ /L _Y | 9 | 0.87±1.06 c | 0.35 | 0~3.24 | 121.75 |
| S ₋₁₅ /L _F | 25 | 0.31±1.01 c | 0.20 | 0~4.72 | 330.98 |
| S ₀ S ₋₁₅ /L _F | 2 | 2.00±1.18 c | 0.84 | 1.16~2.83 | 59.19 |
| S ₀ S ₋₁₅ /L _C | 2 | 3.66±4.06 bc | 2.87 | 0.79~6.53 | 110.90 |
| S ₀ S ₋₁₅ /L _Y L _F | 2 | 4.31±3.60 bc | 2.55 | 1.76~6.85 | 83.60 |
| S ₋₁₅ /L _C | 1 | 3.84 | / | / | / |

小写字母表示差异显著性(P<0.05)

Different letters indicate the significance of difference at P<0.05

2.5 糜子种质资源 Waxy基因序列多态性分析

采用 Geneious v 8.0.2 对 16 个糜子代表性材料的 PCR 产物 DNA 序列进行比对,结果分 3 种情况:引物 int5Lf/R3 扩增序列与参考基因组 (ID: GU199253) 比对 (图 4), 发现散尾儿 (序号 17)、黄粒糜 (序号 30)、科瓦尔杰特 (序号 100) 3 个样品在扩增

区段第 283 位点发生了单碱基 A 替换 G, 其他 13 个样品不存在碱基替换。16 个样品序列比对结果存在碱基替换与否, 与内切酶 ACC I 酶切鉴定结果完全一致, 证明采用内切酶 ACC I 可准确鉴定 GBSS I-L 基因 intron5-exon 7 区段单碱基 A 替换 G。

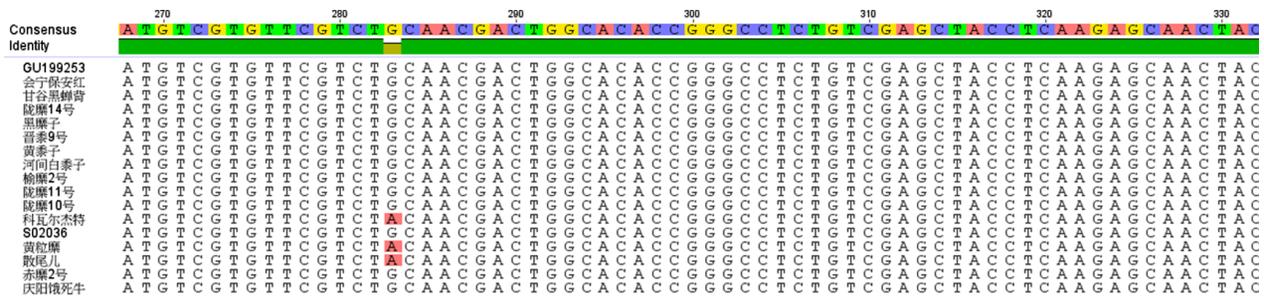


图4 引物 int5Lf/R3 扩增序列与糜子参考基因组比对

Fig. 4 Alignment of sequences generated from millet germplasm by primers int5Lf/R3

引物 M12/R12 扩增序列与参考基因组 (ID: GU199253) 序列比对 (图 5), 发现黄黍子 (序号 1)、河间白黍子 (序号 9)、赤糜 2 号 (序号 64)、陇糜 11 号 (序号 57) 等 9 个品种在 exon 9 第 314 位点后插入 1 个腺嘌呤残基 A, 这与内切酶 EcoN I 酶切鉴定结果一致。同时发现晋黍 9 号 (序号 48) 有 5 个 SNP 位点, 其中碱基替换 4 处, 分别为第 325、392、425、556 位点 (均是 A 替换为 G); 颠换 1 处, 为第 571 位点 (T 颠换为 A)。赤糜 2 号 (序号 64) 有 45 个 SNP 位点, 包括碱基插入 1 个 (第 519 位点插入 C), 碱基替换 30 个, 颠换 14 个, 变异位点与变异类型丰富。其他 7 个品种未发现变异位点, 基因序列与参考基因组一致。

引物 M5/R11 扩增序列与参考基因组 (ID:

GU199261) 序列比对 (图 6), 发现散尾儿 (序号 17)、河间白黍子 (序号 9)、黄黍子 (序号 1)、晋黍 9 号 (序号 48)、黑糜子 (序号 53) 5 个品种, 在 exon10 第 14~28 碱基对之间有一段 15 bp 的碱基缺失, 缺失序列为 5'-AGGCGCTGAACAAGG-3'。exon10 中 15 bp 的碱基缺失导致糜子淀粉由粳性变为糯性, 这 5 份糜子的直链淀粉含量均小于 3.7%, 基因型检测与表型鉴定结果完全吻合。其他 11 个品种不存在 15 bp 的碱基缺失, 但从中发现了大量 SNP 位点, 其中甘谷黑蝉背 (序号 2) 有 1 个碱基插入 (第 552 位点插入 G); 庆阳饿死牛 (序号 4) 有 2 个碱基替换 (第 550 位点 A 替换为 C, 第 551 位点 G 替换为 A); 甘谷黑蝉背 (序号 2)、会宁保安红 (序号 3)、科瓦尔杰特 (序号 100) 存在 1 个碱基替换 (均为第 561 位点 A 替换为

G);晋糜9号(序号48)有1个碱基替换(第426位点G替换为A)和3个颠换(第401和476位点C颠换为G,第502位点A颠换为T);黑糜子(序号53)和赤糜

2号(序号64)各发现30个SNP位点,黑糜子有14个碱基替换和16个颠换;赤糜2号有1个碱基插入(第260位点插入G)、14个碱基替换和15个颠换。

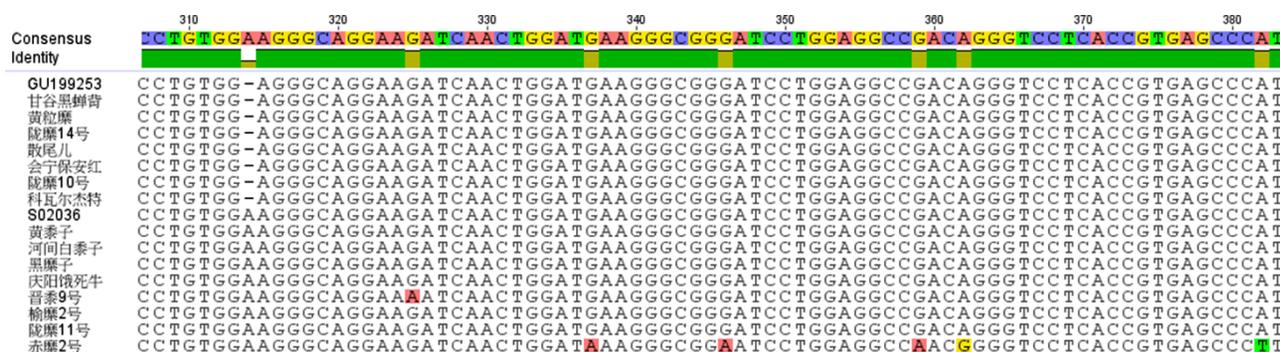


图5 引物M12/R12对糜子扩增产物序列与参考基因组比对

Fig. 5 Alignment of sequences generated from millet germplasm by primers M12/R12

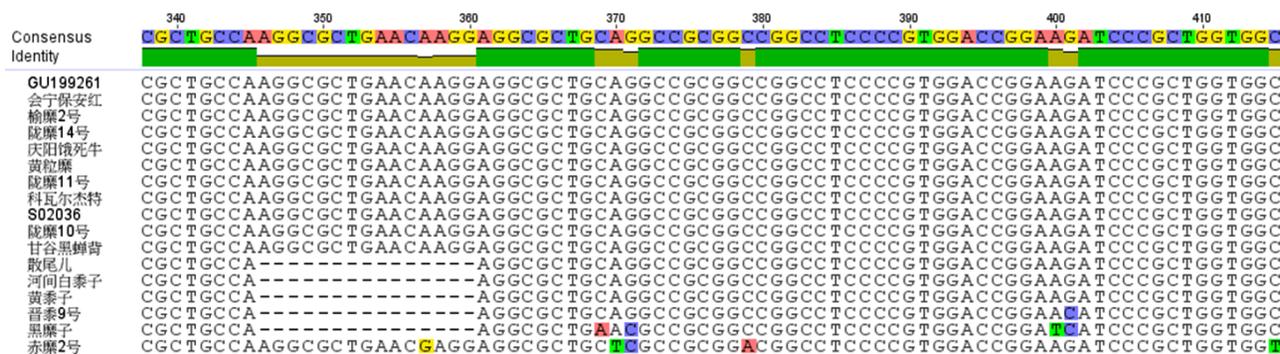


图6 引物M5/R11对糜子扩增产物序列与参考基因组比对

Fig. 6 Alignment of sequences generated from millet germplasm by primers M5/R11

3 讨论

直链淀粉/支链淀粉的含量及其比例与谷类作物的食味品质和加工品质密切相关。快速准确测定直链淀粉含量对于粮食品质评价、指导农产品加工和淀粉合理利用具有重要的意义。目前,谷物中直链淀粉含量测定常用方法有 I_2 -KI比色法、双波长法及近红外光谱分析法等,不同方法各有其优缺点^[35],其中双波长法检测原理是基于直链和支链淀粉与碘离子形成的络合物有不同的吸收波长,且不同波长下的吸光度差值与直链淀粉含量成正比^[36],该方法具有准确度高、重复性好、简便高效等优点。本研究采用双波长微量分析法测定100份糜子直链淀粉/支链淀粉含量,结果显示直链淀粉含量变化幅度为0~22.78%,平均为6.07%,总淀粉含量变幅为45.50%~63.58%,与邵欢欢等^[15]和田翔等^[16]对糜子淀粉含量检测结果(总淀粉含量变幅分别为58.43%~75.45%和67.60%~75.10%)相比较低,这可能与供试材料的遗传机制以及来源地气候环境、土

壤水肥和栽培措施等因素^[37-39]有关。作物在灌浆结实阶段遇到高温、极端干旱条件,会引起种子组织加速老化,生理机能降低,同时酶的活性也提早丧失,不利于贮藏物质的积累和转化^[40-41]。直链淀粉含量是决定谷物适口性和消化特性的重要因素,糯质和低直链淀粉类型更受消费者欢迎^[9]。本研究地方品种和育成品种中的直链淀粉含量平均值偏低,分别为4.45%和4.99%,原因是糯性材料占比很高,而国外引进材料中无完全糯性和糯性品种。不同来源地糜子直链淀粉含量的差异,间接地反映了育种家的选择方向和当地消费者的饮食偏好。

分子标记辅助选择可对基因型直接进行快速、准确选择,本研究采用标记M5/R11对100份糜子资源进行检测,能鉴定出*GBSSI-S*基因 exon9-intron10 区段的 S_0 、 S_{15} 、 S_0S_{15} 类型。标记int5Lr/R3和M12/R12的PCR产物采用内切酶*ACC I*和*EcoN I*消化剪切,可准确鉴定出*GBSS I-L*基因 intron5-exon7 区段和 intron8-intron9 区段的 L_V 、 L_F 、 L_C 位点,结合M5/R11标记检测结果,对糜子 *Waxy* 基因进行了基因分型。在

100份糜子资源中共发现9种基因型,野生型 S_0/L_c 数量最多,占33%,突变型 S_{15}/L_F 、 S_{15}/L_Y 分别占25%和9%,中间类型 S_0S_{15}/L_F 、 S_0S_{15}/L_C 、 S_0S_{15}/L_YL_F 各占2%。其中基因型检测与表型直链淀粉含量对应的材料有97份,二者相关性达97%,直链淀粉含量均值最高的基因型为 S_0/L_c (10.32%),最低的基因型为 S_{15}/L_F (0.31%),可见 $GBSSI-S$ 基因的等位变异对直链淀粉含量的影响起决定性作用。Araki等^[42]对源于欧洲和亚洲的178份糜子材料进行基因分型研究,发现日本和韩国的完全糯性表型多数是由基因型 S_{15}/L_Y 引起的(95.7%),而本研究材料的完全糯性大多由基因型 S_{15}/L_F 产生(25.0%),这与刘晓欢^[25]对241份中国糜子的研究结果一致。国内外学者^[24-26, 29]对糜子种质资源的研究未发现 S_{15}/L_C 基因型,而本研究中的24号材料地方品种惠农黄粘黍,反复检测其直链淀粉含量为3.84%,基因分型为 S_{15} 和 L_c ,是唯一检测到的 S_{15}/L_C 类型,该基因型可能是确实存在的新类型,也可能由试验材料不纯引起,后期需要重新采集样品进一步测试,以确定是否为新的变异类型。基于功能分子标记与限制性内切酶酶切技术,即可对四倍体糜子 $Waxy$ 基因进行准确分型,与传统基因测序法相比,具有操作简便、重复性好、高效低成本等优点,可用于糜子育种研究工作。

$Waxy$ 基因在禾谷类作物水稻、高粱、玉米、小麦、谷子和糜子中广泛存在,变异位点和变异类型非常丰富。迄今为止发现 $Waxy$ 等位基因的突变位点50多个,大多由转座子或反转录转座子插入到 $Waxy$ 基因的外显子、内含子或侧翼区域,引起 $Waxy$ 基因功能不表达^[43]。本研究通过对糜子 $Waxy$ 基因测序,部分样品除了有前人研究发现的 $GBSSI-L$ 基因intron5-exon7区段存在碱基A替换为G、intron8-intron9区段存在腺嘌呤残基A插入和 $GBSSI-S$ 基因exon9-intron10区段存在15 bp的碱基缺失之外^[24],还从地方品种甘谷黑蝉背(序号2)、黑糜子(序号53)和育成品种赤糜2号(序号64)等材料中发现了大量新的SNP位点,如在intron8-intron9区段,赤糜2号有45个SNP位点,包括1个碱基插入、30个碱基替换、14个颠换;在 $GBSSI-S$ 基因exon9-intron10区段,黑糜子有14个碱基替换和16个颠换;赤糜2号有1个碱基插入、14个碱基替换和15个颠换,变异类型非常丰富。这些新发现的SNP位点对糜子淀粉组成与含量的影响如何,还需进一步的实验研究来解析。

参考文献

- [1] 何继红, 刘天鹏, 董孔军, 刘敏轩, 陆平, 任瑞玉, 张磊, 杨天育. 糜子育成品种成株期抗旱性鉴定与评价. 植物遗传资源学报, 2016, 17(1): 45-52
He J H, Liu T P, Dong K J, Liu M X, Lu P, Ren R Y, Zhang L, Yang T Y. Evaluation and identification on the drought resistance of broomcorn millet bred cultivars at adult stage. Journal of Plant Genetic Resources, 2016, 17(1): 45-52
- [2] Yue H, Wang M, Liu S Y, Du X H, Song W N, Nie X J. Transcriptome-wide identification and expression profiles of the WRKY transcription factor family in Broomcorn millet (*Panicum miliaceum* L.). BMC Genomics, 2016, 17: 343
- [3] 柴岩. 糜子. 北京: 中国农业出版社, 1999: 162
Chai Y. Common millet. Beijing: China Agriculture Press, 1999: 162
- [4] 王纶, 王星玉, 王海岗, 陈凌, 王君杰, 曹晓宁, 刘思辰, 康国帅. 山西重要黍稷种质资源品质性状的初步鉴定与评价. 植物遗传资源学报, 2017, 18(1): 61-69
Wang L, Wang X Y, Wang H G, Chen L, Wang J J, Cao X N, Liu S C, Kang G S. Preliminary appraisal of important proso mille germplasm resources quality traits in Shanxi province. Journal of Plant Genetic Resources, 2017, 18(1): 61-69
- [5] Saleh Ahmed S M, Zhang Q, Chen J, Shen Q. Millet grains: Nutritional quality, processing, and potential health benefits. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2013, 12(3): 281-295
- [6] 杜春微, 高梦晗, 刘庆, 吕璇, 杜双奎. 黄米品质特性研究. 食品工业, 2018, 39(2): 83-87
Du C W, Gao M H, Liu Q, Lv X, Du S K. Quality characteristics of proso millet. Food Industry, 2018, 39(2): 83-87
- [7] 柴岩, 冯佰利, 王宏岩. 中国黄米食品. 杨陵: 西北农林科技大学出版社, 2012: 85-89
Chai Y, Feng B L, Wang H Y. Chinese millet food. Yangling: Northwest A&F University Press, 2012: 85-89
- [8] 马清兰, 吴茂江. 糜子黄酒的制取. 现代农业, 2001(11): 30
Ma Q L, Wu M J. The preparation of glutinous millet wine. Modern Agriculture, 2001(11): 30
- [9] 杨清华, 王洪露, 冯佰利. 糜子品质研究进展与展望. 植物学报, 2023, 58(1): 22-33
Yang Q H, Wang H L, Feng B L. Progress and prospect of research on the quality of broomcorn millet. Bulletin of Botany, 2023, 58(1): 22-33
- [10] 刘芸, 王小平. 大米直链淀粉含量测定法的应用与分析. 粮食加工, 2018, 43(3): 28-30
Liu Y, Wang X P. Application and analysis of amylose content determination in rice. Grain Processing, 2018, 43(3): 28-30
- [11] 张丽珍, 冀佩双, 罗旭泉, 穆虹彰, 秦雁鹏, 牛宇, 乔志军. 糜黍淀粉理化性质及消化特性. 食品科学, 2016, 37(19): 76-81
Zhang L Z, Ji P S, Luo X X, Mu H Z, Qin Y P, Niu Y, Qiao

- Z J. Physicochemical properties and digestibility of proso millet starch. *Food Science*, 2016, 37 (19): 76-81
- [12] Nakayama H, Afzal M, Okuno K. Intraspecific differentiation and geographical distribution of *Wx* alleles for low amylase content in endosperm of millet, *Setaria italic* (L.) Beauv. *Euphytica*, 1998, 102(3): 289-293
- [13] 罗志祥, 苏泽胜, 施伏芝, 阮新明. 米饭质地与直链淀粉含量及食味品质的关系. *中国农学通报*, 2002, 18(6): 18-21
Luo Z X, Su Z S, Shi F Z, Ruan X M. The relationship between rice texture, amylose content, and taste quality. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2002, 18(6): 18-21
- [14] 杨清华, 邱军, 李海, 杨天育, 程炳文, 赵敏, 刘国庆, 高小丽, 冯佰利. 糜子育成品种农艺、产量及品质性状综合鉴定与评价. *中国农业科学*, 2017, 50 (23): 4530-4547
Yang Q H, Qiu J, Li H, Yang T Y, Cheng B W, Zhao M, Liu G Q, Gao X L, Feng B L. Comprehensive evaluation of agronomic, yield and quality traits of broomcorn millet (*Panicum miliaceum* L.) cultivars. *Scientia Agricultura Sinica*, 2017, 50:4530-4544
- [15] 邵欢欢, 石甜甜, 何杰丽, 冯颖, 陈凌, 王海岗, 王瑞云, 乔治军. 40 份糜子资源淀粉组成及含量分析. *山西农业科学*, 2019, 47(8):1316-1320
Shao H H, Shi T T, He J L, Feng Y, Chen L, Wang H G, Wang R Y, Qiao Z J. Composition and content of starch from 40 common millet resources. *Journal of Shanxi Agricultural Sciences*, 2019, 47(8): 1316-1320
- [16] 田翔, 乔治军, 陈艳霞. 双波长比色法测定糜子中直链/支链淀粉含量. *中国农学通报*, 2015, 31(32):76-80
Tian X, Qiao Z J, Chen Y X. Determination of amylose/ amylopectin in *Panicum miliaceum* L. by dual-wavelength colorimetric method. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2015, 31(32):76-80
- [17] Nakamura T, Yamamori M, Hirano H, Hidaka S. Decrease of Waxy (Wx) protein in two common wheat cultivars with low amylose content. *Plant Breeding*, 1993, 111: 99-105
- [18] Zeeman S C, Kossmann J, Smith A M. Starch: Its metabolism, evolution, and biotechnological modification in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 2010, 61: 209-234
- [19] Zhou H, Xia D, Zhao D, Li Y H, Li P B, Wu B, Gao G J, Zhang Q L, Wang G W, Xiao J H, Li X H, Yu S B, Lian X M, He Y Q. The origin of *Wx^{da}* provides new insights into the improvement of grain quality in rice. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2021, 63(5):878-888
- [20] 田孟良, 黄碧玉, 谭功燮, 刘永建, 荣廷昭. 西南糯玉米地方品种 *Waxy* 基因序列多态性分析. *作物学报*, 2008, 34(5): 729-736
Tian M L, Huang B Y, Tan G X, Liu Y J, Rong T Z. Sequence polymorphism of *Waxy* genes in landraces of waxy maize from southwest China. *Acta Agronomica Sinica*, 2008, 34(5): 729-736
- [21] 陈晓敏. 谷子农艺性状和蒸煮品质与 *GBSSI* 基因等位变异分析. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2013
- Chen X M. Analysis on agronomic traits and cooking qualities associated with allelic variations of *GBSS I* in foxtail millets. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2013
- [22] Hunt H V, Denyer K, Packman L C, Jones M K, Howe C J. Molecular basis of the waxy endosperm starch phenotype in broomcorn millet. *Molecular Biology and Evolution*, 2010, 27: 1478-1494
- [23] 王倩, 孙文静, 包颖. 植物颗粒结合淀粉合酶 *GBSS* 基因家族的进化. *植物学报*, 2017, 52(2):179-187
Wang Q, Sun W J, Bao Y. Evolutionary pattern of the *GBSS* gene family in plants. *Chinese Bulletin of Botany*, 2017, 52 (2):179-187
- [24] Hunt H V, Moots H M, Graybosch R A, Jones H, Parker M, Romanova O, Jones M K, Howe C J, Trafford K. Waxy phenotype evolution in the allotetraploid cereal broomcorn millet: Mutations at the *GBSSI* locus in their functional and phylogenetic context. *Molecular Biology and Evolution*, 2013, 30: 109-122
- [25] 刘晓欢. 中国糜子资源的农艺性状及 *Waxy* 基因的多态性研究. 太谷: 山西农业大学, 2015
Liu X H. Agronomic traits and polymorphism research of *Waxy* gene in proso millet (*Panicum miliaceum* L.) of China. Taigu: Shanxi Agricultural University, 2015
- [26] 丁敏, 段政勇, 王宇卓, 薛亚鹏, 王海岗, 陈凌, 王瑞云, 乔治军. 糜子 *GBSSI* 基因功能标记的开发与验证. *作物学报*, 2023, 49(3):703-718
Ding M, Duan Z Y, Wang Y Z, Xue Y P, Wang H G, Chen L, Wang R Y, Qiao Z J. Development and validation of functional markers of *GBSSI* gene in proso millet. *Acta Agronomica Sinica*, 2023, 49(3):703-718
- [27] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 15683-2008 大米直链淀粉含量的测定. 北京: 中国标准出版社, 2008
General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China, Standardization Administration of China. GB/T 15683-2008 Determination of amylose content in rice. Beijing: Standards Press of China, 2008
- [28] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 19503-2008 地理标志产品 沁州黄小米. 北京: 中国标准出版社, 2008
General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China, Standardization Administration of China. GB/T 19503-2008 Product of geographical indication-Qinzhouhuang foxtail-millet. Beijing: Standards Press of China, 2008
- [29] Wang R Y, Wang H G, Liu X H, Ji X, Chen L, Lu P, Liu M X, Teng B, Qiao Z J. Waxy allelic diversity in common millet (*Panicum miliaceum* L.) in China. *The Crop Journal*, 2018, 6 (4): 377-385
- [30] 盘婉向, 刘天鹏, 何继红, 董孔军, 任瑞玉, 张磊, 杨天育. 糜子 (*Panicum miliaceum* L.) 全基因组 YABBY 基因家族鉴定与

- 高渗溶液胁迫下表达特征. 基因组学与应用生物学, 2022, 41(5): 1067-1078
- Pan W X, Liu T P, He J H, Dong K J, Ren R Y, Zhang L, Yang T Y. Genome-wide identification and expression characteristics of the YABBY gene family under hypertonic solution stress in broomcorn millet (*Panicum miliaceum* L.). *Genomics and Applied Biology*, 2022, 41(5): 1067-1078
- [31] 杨天育. 糜子分子遗传研究进展与展望. 寒旱农业科学, 2022, 1(10): 32-36
- Yang T Y. Research progress and prospect on molecular. *Journal of Cold-Arid Agricultural Sciences*, 2022, 1(10): 32-36
- [32] Umeda M, Ohtsubo H, Ohtsubo E. Diversification of the rice *Waxy* gene by insertion of mobile DNA elements into introns. *The Japanese Journal of Genetics*, 1991, 66(5): 569-586
- [33] 高源远, Mamu Yasmeeen, 刘羽嘉, 彭星云. 淀粉直支比定量技术及其在食品领域中的应用. 食品工业科技, 2022, 43(18): 456-464
- Gao Y Y, Mamu Y, Liu Y J, Peng X Y. Quantification technologies for the determination of amylose/amylopectin ratio in starch and their applications in food research and processing. *Science and Technology of Food Industry*, 2022, 43(18): 456-464
- [34] Bienvenido O J. Structure, chemistry, and function of the rice grain and its fractions. *Cereal Foods World*, 1992, 37(10): 772-779
- [35] 丁振, 冯朵, 曹盼盼, 李恩鹏, 李松南. 淀粉中直链淀粉含量检测技术的研究进展. 美食研究, 2022, 39(1): 87-94
- Ding Z, Feng D, Cao P P, Li E P, Li S N. Research progress of amylose determination technology in starch. *Journal of Researches on Dietetic Science and Culture*, 2022, 39(1): 87-94
- [36] 李晓娟, 李柱刚, 王珣, 韩俊岩, 赵伟, 赵日, 陆杰. 双波长法测定南瓜中直链与支链淀粉含量. 食品工业科技, 2018, 39(8): 232-235, 244
- Li X J, Li Z G, Wang X, Han J Y, Zhao W, Zhao R, Lu J. Determination of amylose and amylopectin in pumpkin with dual-wavelength colorimetric method. *Science and Technology of Food Industry*, 2018, 39(8): 232-235, 244
- [37] 包劲松, 夏英武. 稻米淀粉 RVA 谱的基因型×环境互作效应分析. 中国农业科学, 2001, 34(2): 123-127
- Bao J S, Xia Y W. Genetic effects and genotype×environment inter actions for the starch RVA profiles in indica rice. *Scientia Agricultura Sinica*, 2001, 34(2): 123-127
- [38] 刘蓓蓓. 氮肥配施有机肥及生物炭对糜子品质和淀粉理化性质的影响. 杨陵: 西北农林科技大学, 2023
- Liu B B. Effects of nitrogen fertilizer combined with organic fertilizer and biochar on quality and starch physicochemical properties of broomcorn millet. Yangling: Northwest Agriculture and Forestry University, 2023
- [39] 岳海. 不同生态环境和不同栽培管理措施对谷子品质影响研究. 太谷: 山西农业大学, 2005
- Yue H. Study on effect of quality of millet in different ecological environments and different culture control measures. Taigu: Shanxi Agricultural University, 2005
- [40] 高焕晔, 王三根, 宗学凤, 腾中华, 赵芳明, 刘照. 灌浆结实期高温干旱复合胁迫对稻米直链淀粉及蛋白质含量的影响. 中国生态农业学报, 2012, 20(1): 40-47
- Gao H Y, Wang S G, Zong X F, Teng Z H, Zhao F M, Liu Z. Effects of combined high temperature and drought stress on amylose and protein contents at rice grain-filling stage. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*, 2012, 20(1): 40-47
- [41] 王晨阳. 花后高温和干旱对小麦籽粒淀粉合成、加工品质及产量的影响. 郑州: 河南农业大学, 2005
- Wang C Y. Effects of high temperature and drought on starch synthesis in grains, peocessing quality and yield in winter wheat (*Triticum aestivum* L.). Zhengzhou: Henan agricultural university, 2005
- [42] Araki M, Numaoka A, Kawase M, Fukunaga K. Origin of waxy common millet, *Panicum miliaceum* L. in Japan. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 2011, 59(7): 1303-1308
- [43] Okagaki R J, Neuffert M G, Wessler S R. A deletion common to two independently derived waxy mutations of maize. *Genetics*, 1991, 128(6): 425-431