

高粱淀粉粳糯特性的快速鉴定方法与应用

李桂英¹, 王 智¹, 张 骥¹, 顿宝庆¹, 朱 莉², 孟凡华¹, 游光霞¹, 韩粉霞¹

(¹ 中国农业科学院作物科学研究所 / 作物分子育种国家工程实验室, 北京 100081; ² 中国农业科学院生物技术研究所, 北京 100081)

摘要: 高粱籽粒有粳(非糯)、糯之分,我国传统名酒如茅台、五粮液等,均以糯高粱为主要原料,快速鉴别高粱的粳糯对种质鉴定、糯高粱育种和原料采购均具有重要意义。现有高粱粳糯的鉴定方法主要有染色法和蒸煮法等,但均存在鉴定效率不高的问题,影响糯高粱育种进程。本研究在前人基础上,经过反复试验,总结出如下4种适合不同情形的高粱粳糯快速鉴别方法,即刀切法、籽粒捣碎开水糊化法、冷水捣碎染色法和田间花粉染色法。综合利用这4种方法,可使鉴定效率大大提高;同时,还讨论了4种鉴定方法在育种中的应用前景,探讨了4种鉴定方法的适用性和鉴定效率。

关键词: 粳高粱; 糯高粱; 碘染色; 快速鉴定

A Package of Improved Methods for Rapid Identification of Waxy Phenotype in Sorghum

LI Gui-ying¹, WANG Zhi¹, ZHANG Ji¹, DUN Bao-qing¹, ZHU Li²,
MENG Fan-hua¹, YOU Guang-xia¹, HAN Fen-xia¹

(¹ Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences/National Engineering Laboratory for Crop Molecular Breeding, Beijing 100081; ² Biotechnology Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081)

Abstract: The endosperm of the sorghum grain is either waxy or non-waxy. Traditional Chinese liquors such as ‘Moutai’ and ‘Wuliangye’ are brewed with waxy sorghum as main feedstock. It is of great significance to clarify the waxy phenotype with efficient approaches in breeding and marketing. There are several methods such as staining and cooking, available for clarifying the waxy sorghum and non-waxy sorghum. However, these methods due to the limitation of efficiency might restrict the breeding for elite waxy sorghum varieties. In this study, four improved or newly-developed methods including cutting, hot water gelatinization staining, cold water smashing-staining as well as field-applicable pollen staining are suggested. We believed that deployment of these four methods is able to improve the efficiency on identification. The application of the four methods in waxy sorghum breeding program and their applicability are further discussed.

Key words: waxy sorghum; non-waxy sorghum; iodine staining; rapid identification

高粱是我国酿造高档白酒不可或缺的原料,高粱籽粒有粳(非糯)和糯之分,高粱糯性对白酒品质有重要影响^[1-2],传统名酒如茅台、五粮液等以糯高粱为主要原料,汾酒和二锅头等以粳高粱为主要原

料。糯高粱富含支链淀粉粒,具有淀粉消化率高、乙醇转化率高等特点,在食品、酿酒和生物能源工业中具有较高的经济价值^[3-6]。

关于糯性表型的遗传机制研究得已经比较清

收稿日期: 2020-12-29 修回日期: 2021-01-26 网络出版日期: 2021-02-22

URL: <http://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20201229006>

第一作者研究方向为酿酒高粱育种, E-mail: liguiying@caas.cn; 王智为共同第一作者

通信作者: 韩粉霞, 研究方向为作物遗传育种, E-mail: hanfenxia@caas.cn

基金项目: 国家重点研发计划(2019YFD1001700, 2018YFD1000702); 中国农业科学院创新工程; 国际原子能协调研究项目(D23031)

Foundation projects: National Key Research and Development Program (2019YFD1001700, 2018YFD1000702), Science and Technology Innovation Project of Chinese Academy of Agricultural Sciences, International Atomic Energy Agency Project (D23031)

楚,为单基因控制,是颗粒结合淀粉合成酶(GBSS)基因的突变导致直链淀粉合成停止,迄今已经鉴定出至少4种糯性基因的等位变异,即 wx^a 、 wx^b 、 wx^c 、 wx^d ,并开发了分子标记^[7-9]。由于糯性高粱和粳高粱在胚乳结构和碘染色方面具有比较明显的差异,在实践中,常常不用分子标记,而用直观观察或碘染色的方法进行糯性鉴定。通常通过目测胚乳断面即可区分糯性和非糯性高粱,但这种方法往往会因遗传背景、籽粒成熟度、环境、或者操作者经验的不同导致判别上的差异^[10]。一般谷物糯和非糯很容易通过碘染色的方法进行区分,非糯籽粒通常染色后呈深兰色,而糯性籽粒因为支链淀粉的存在通常染成棕红色到紫色^[11]。但在高粱中,由于胚乳角质化程度高,导致碘束缚力减弱,利用碘染色的方法区分糯性和非糯性的效果不是很好^[12]。然而,高粱淀粉可通过糊化,使之更易于碘染色^[10]。

曾有报道可用下列染色方法进行高粱籽粒的糯性鉴定。(1)高粱米碘酒水溶液染色法、结晶碘染色法^[13]:将高粱脱壳成高粱米,放入结晶碘水溶液中,如自色不变为糯性高粱;若变为兰色就是粳性高粱。(2)高粱粉结晶碘、碘化钾定性法^[13]:将高粱分样后,磨成粉,取高粱粉4 g,加入蒸馏水10 mL,一起倒入三角烧瓶内,在水浴锅内加热20 min至沸腾,冷却后过滤,取该溶液20~30 mL放入另一只三角瓶中,并加入3~4滴结晶碘与碘化钾溶液,呈淡兰色即为粳性高粱,乳白色仍为糯性高粱。

Pedersen等^[10]发明了快速染色鉴定糯性和非糯的方法。该方法首先将种子放入48孔细胞培养板,利用专用种子粉碎仪,将种子粉碎,加少量水,在烘箱中95℃糊化1 h,然后碘染色。该方法得到广泛应用。但和其他作物的糯性检验方法相比,明显存在着时间长(至少1 h以上),过分依赖设备(粉碎仪、烘箱),导致鉴定成本高,不适宜高粱购销企业以及条件比较有限的科研单位对高粱糯性的快速鉴定。

唐玉明等^[14]总结出蒸煮法快速鉴定高粱籽粒粳糯类型的方法。方法是将高粱样品取样后挑选若干个饱满的高粱籽粒装入网袋,将网袋封口后放入盛有沸水的蒸锅内蒸煮17~25 min,根据籽粒裂口率判定糯或非糯。该方法为经验总结,耗时较长,是否具有广适性,也值得探讨。

利用花粉染色法也可以鉴别高粱的糯性^[10,15]。方法是将开花期花药捣碎,碘液颜色后,通过比色或显微镜观察进行判定,染成蓝色为非糯,染成浅黄至棕色者为糯。

本研究在前人基础上,经过反复试验,总结了4种适合不同情形的高粱粳糯快速鉴别方法,对育种和原料贸易均具有重要参考价值。

1 材料与方法

1.1 试验材料

糯高粱品种为红缨子、兴湘梁2号、辽粘3号;非糯高粱品种为晋梁5号、沈杂5号、吉杂127;分离群体为晋梁5号(非糯)/G76(糯)杂种 F_2 群体。

1.2 高粱粳糯鉴别方法

1.2.1 籽粒横切观察法(简称刀切法)(1)刀切:利用锋利刀片或手术刀,将种子切开,如果要保留种子活力,在远胚一端横切;(2)观察:可用肉眼观察或借助实体显微镜(或数码显微镜)观察;(3)判定:色泽较为均匀,色白如蜡,为糯高粱;色泽不均,中心粉白色,周边角质色明显,为粳高粱。

1.2.2 籽粒捣碎热水糊化染色法(简称捣碎热水糊化染色法)(1)将24孔细胞培养板放在坚固的水平台面上;(2)随机选取少量高粱种子样品,每孔放1粒种子;(3)用钢杵将种子捣碎;(4)用玻璃滴管向每孔加入0.3~0.5 mL开水;(5)冷却5~10 min,或手摸板底接近室温;(6)向每一小孔内加1滴(约50 μ L)碘染色液(配方参照文献^[10],10 g碘化钾、1.0 g碘,溶于500 mL水中);(7)染色后的颜色判读:将24孔细胞培养板放在白纸上观察,兰黑色为粳高粱,非蓝色(棕红色、橙色或者浅黄色)为糯高粱。

1.2.3 籽粒凉水捣碎染色法(简称凉水捣碎染色法)(1)用玻璃滴管向每孔加入2滴常温纯净水或自来水;(2)将种子直接放入24孔细胞培养板槽内,用专用微型钢杵将种子捣碎,直到水变混浊;(3)向每槽/孔内滴1滴(约50 μ L)碘染色液(配方同上);(4)染色后的颜色判读:兰黑色为非糯性高粱,棕红色、橙色或者浅黄色为糯性高粱。

1.2.4 田间花粉染色法(1)取将近散粉的花药,放在载玻片上,滴1滴碘液;(2)用镊子轻轻捣碎,去掉药壁等大块组织;(3)用事先安好的手机显微镜(Tipscope)观察;(4)如花粉粒呈蓝色,即为非糯;呈棕色或浅黄色,即为糯;呈蓝、棕2种颜色,即为糯/非糯杂合。

2 结果与分析

2.1 糯高粱和粳高粱籽粒横切面及碘染色的表型差异

用锋利刀片将高粱籽粒切开后,利用数码显微

镜观察,切面如图 1 所示。图 1A 为 6 个品种的籽粒横切面,品种分别是红缨子、兴湘梁 2 号、辽粘 3 号、凤杂 4 号、辽杂 37 和龙杂 20,每个品种 3 粒。图 1B 为典型横切面,左边为糯高粱,色泽较为均匀,色白如蜡,可见将糯高粱命名为蜡质(waxy)高粱,十分直观准确。右侧为粳高粱,色泽不均,中心白色,周边角质色。可见,2 种高粱籽粒横切面区别

明显。但在具体操作时,由于收获不及时,或者灌浆不充分,会导致有的籽粒剖面不够典型(如图 1C,左 2、3)。

高粱籽粒横切后,用碘直接染色(图 2),糯高粱呈棕色,非糯高粱呈深蓝色。这种染色差异可作为鉴别依据,但易受品种和观察环境(光线)影响,不如水稻等其他作物容易鉴别。



A: 6 个品种籽粒横切面(由左至右为红缨子、兴湘梁 2 号、辽粘 3 号、凤杂 4 号、辽杂 37 和龙杂 20);

B: 糯高粱(左)和粳高粱(右)典型横切面; C: 不同发育程度或粉质化的籽粒横切面

A: Cross section of six varieties (left to right: Hongyingzi, Xingxiang2, Liaonian3, Fengza4, Liaozha37 and Longza20),

B: Example of waxy sorghum (left) and non-waxy sorghum (right),

C: Cross section of seeds with different degrees of filling or powderization

图 1 高粱籽粒横切面

Fig.1 Cross section of sorghum grains



由左至右为糯高粱、粳高粱、糯米、大米
From left to right: waxy sorghum, non-waxy sorghum, waxy rice, non-waxy rice

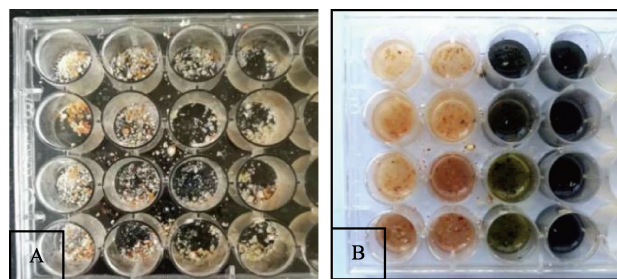
图 2 高粱籽粒横切后直接染色

Fig.2 Staining of sorghum grains after cross cutting

2.2 粳高粱和糯高粱籽粒捣碎热水糊化染色差异

将高粱籽粒在 24 孔板中直接捣碎(图 3A),加开水糊化后冷却至室温后,用碘液染色,结果如图 3B 所示。左侧两列为糯高粱红缨子,右侧两列为粳高粱品种晋梁 5 号,可见,2 种高粱染色差异非常明

显,糯高粱染成浅黄至棕色,粳高粱碘染色后呈蓝黑色。



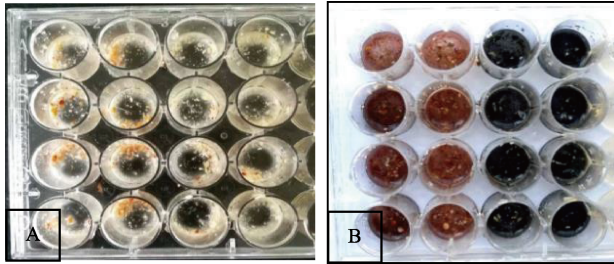
A: 捣碎的籽粒; B: 开水糊化后染色,左 1~2 为红缨子,左 3~4 为晋梁 5 号

A: Crushed sorghum grains, B: Staining after gelatinization, left 1-2 is Hongyingzi, left 3-4 is Jinliang 5

图 3 粳高粱和糯高粱籽粒捣碎热水糊化染色结果
Fig.3 Gelatinization with hot water and staining of non-waxy sorghum and waxy sorghum grains

2.3 粳高粱和糯高粱籽粒凉水捣碎染色结果

将高粱籽粒在凉水中直接捣碎直到浑浊(图4A),无需糊化,直接用碘液染色,结果如图4B所示。左侧两列为红缨子,右侧两列为晋梁5号,可见,鉴别效果和籽粒捣碎热水糊化染色的鉴别方法一样可靠。



A: 冷水中捣碎; B: 碘染色, 左 1~2 为红缨子, 左 3~4 为晋梁 5 号
A: crushed in cold water, B: iodine staining, left 1-2 is Hongyingzi, left 3-4 is Jinliang 5

图 4 粳高粱和糯高粱籽粒凉水捣碎染色结果
Fig.4 Crushing in cold water and staining of non-waxy sorghum and waxy sorghum grains

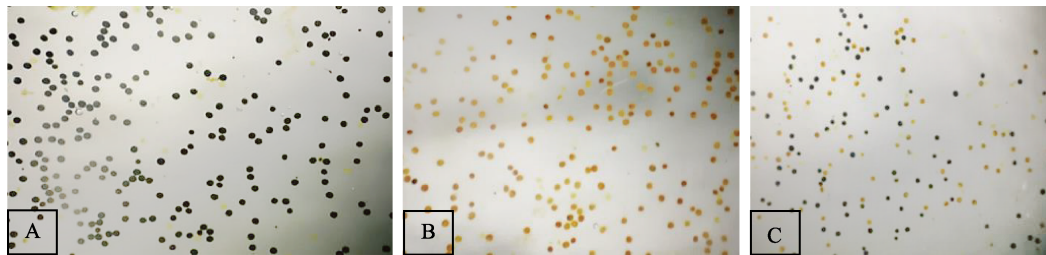
2.4 粳高粱和糯高粱及其杂交后代田间花粉染色差异

如图 5 所示,粳高粱花粉碘染色后,花粉粒呈蓝黑色,糯高粱花粉染色后呈黄褐色至棕色,染色差异非常明显。杂合状态下,花粉粒碘染色呈现蓝黑、黄褐色至棕色 2 种颜色,比例是 1:1。凡是花粉染色后呈现 1:1 分离的单株,说明携带糯性基因,用该株花粉转育糯性,糯性基因不会丢失。

2.5 4 种鉴定方法在育种中的应用

以改良高秆粳高粱恢复系为矮秆糯高粱恢复系、粳高粱保持系转育为同质糯高粱 2 个育种程序为例,说明上述 4 种方法的应用。

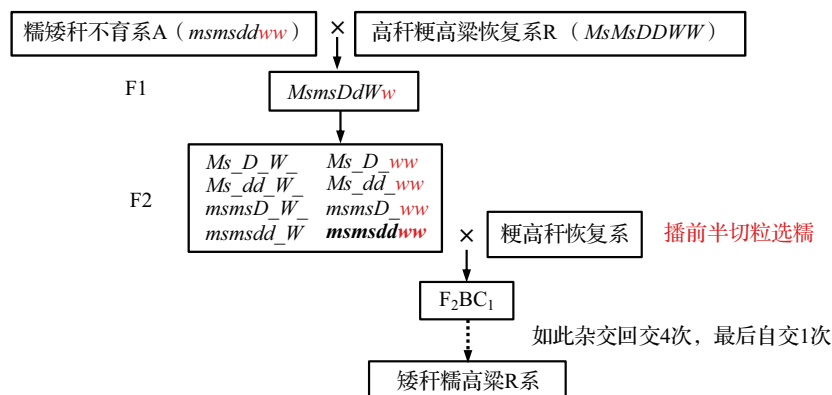
如图 6 所示,如果现有粳高粱恢复系具有很好的配合力,但株高偏高,现欲将其改造成矮秆糯高粱恢复系,可利用现有不育系矮源和糯性基因,通过杂交,在分离群体选择矮秆糯性不育单株与待改良恢复系回交,如此往复,即可育成与原有恢复系基本一致、但株高变矮的糯高粱恢复系。常规方法



A: 晋梁 5 号(粳高粱); B: G76(糯高粱); C: F₂(晋梁 5 号 / G76)糯性杂合单株
A: Jinliang 5 (non-waxy), B: G76 (waxy), C: F₂ (Jinliang 5 / G76, non-waxy/waxy type)

图 5 粳高粱和糯高粱及其杂交后代花粉碘染色结果

Fig.5 Iodine staining of pollens of non-waxy sorghum, waxy sorghum and their hybrids



Ms/ms 表示育性基因, *Ms* 可育, *ms* 不育; *D/d* 表示株高基因, *D* 高秆, *d* 矮秆; *W/w* 表示糯性基因, *W* 非糯, *w* 糯。下同

Ms/ms mean fertility gene, *Ms*- fertile, *ms*- sterile. *D/d* mean plant height gene, *D*- tall, *d*-dwarf.

W/w mean waxy gene, *W*-non-waxy, *w*-waxy. The same as below

图 6 矮秆糯高粱恢复系快速选育流程

Fig.6 Rapid breeding procedure of dwarf waxy sorghum restorer line from a tall non-waxy sorghum restorer line

是在 F_2 成熟时选择矮秆单株, 平均概率为 $1/16$ 。但如果对 F_1 植株所结种子进行刀切或半粒捣碎染色, 可使 F_2 群体减少 $3/4$ 。只需选择矮秆不育单株进行回交即可, 这样, 即减少了盲目性, 每轮还节省一年时间。

如图 7 所示, 已知粳高粱不育系 A1, 综合性状优良、配合力高, 拟将其改良成糯性不育系, 其他性状保持不变。可分 2 步完成, 第 1 步是选育糯性保持系, 选同一胞质糯性保持系 B2 与 A1 的保持系 B1 杂交, 然后, 利用 B1 为轮回亲本 (母本), 在后代中, 通过花粉染色, 选择杂合状态的单株作父本, 进行 4 次回交, 然后自交 1 次。第 2 步是用 A1 型糯性保持系 B1w 与 A 回交 2 次即可获得糯性 A1。

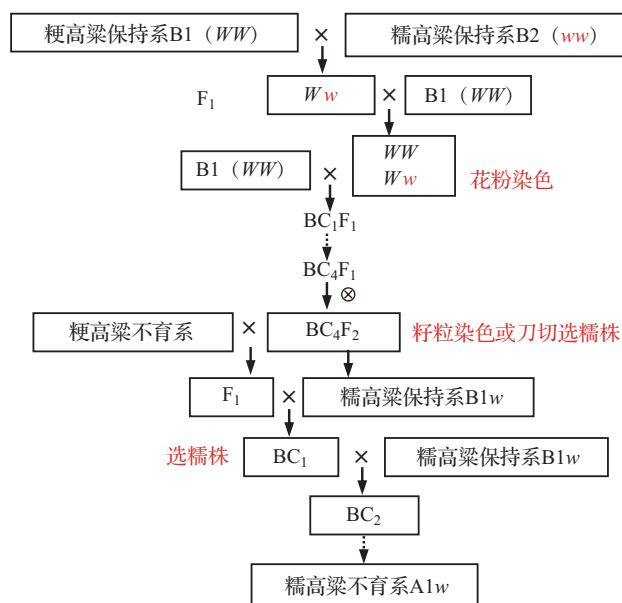


图 7 粳高粱不育系快速转糯的育种程序

Fig.7 Breeding procedure for rapid waxy transfer of non-waxy sorghum male sterile line to waxy one

3 讨论

3.1 不同鉴别方法的适用性

本研究所涉及的 4 种糯性鉴定方法, 各有特色, 适于不同情形下使用。刀切法, 可用于 F_2 分离群体中的糯性单株筛选, F_2 糯性单粒筛选, 可加速糯高粱育种进程。具体操作时应注意选择正常成熟, 干透的种子, 不适于过晚收获、导致“粉种”的种子, 如果切开的籽粒需要继续种植, 应尽可能在远离种胚一端少切。捣碎热水糊化染色法和凉水捣碎染色法均可用于商品糯高粱纯度鉴定, F_2 糯性单株筛选。但后者用水量应严格控制, 不宜过

多。田间花粉染色法适用于 F_2 分离群体糯性单株筛选, 特别适用于杂合状态的糯性鉴定, 可加速糯性转育。

4 种鉴定方法各有所长, 在不同情形下, 可综合应用。如当种子收获不及时造成部分籽粒粉种时, 可在刀切观察的基础上, 进行染色验证。

3.2 不同鉴别方法的效率

刀切法鉴定简单易行, 但对新手存在容易判别不准的问题。每人每小时可切几百粒种子, 可由有经验的人再核验一遍, 准确率可达 95% 以上, 完全可以满足育种需要。凉水捣碎染色法, 从程序上略微复杂, 但鉴定准确, 平均每分钟可鉴定 1 粒种子, 适合对大量材料的鉴定。对于 F_2 建议每穗至少鉴定 4 粒, 全部为糯性, 才判断为纯合糯高粱单株。对于花期花粉鉴定, 可取样带回实验室鉴定, 也可在田间借助手机显微镜现场鉴定。如果技术熟练, 鉴定效率应高于其他鉴定方法, 但时间性强。

参考文献

- [1] 宋高友, 苏益民, 陆伟. 酒用高粱育种方向的探讨. 核农学通报, 1996 (4): 165-168
Song G Y, Su Y M, Lu W. Discussion on breeding direction of brewery sorghum. Bulletin of Nuclear Agriculture, 1996 (4): 165-168
- [2] 丁延庆, 周梭波, 汪灿, 曹宁, 程斌, 高旭, 彭秋, 邵明波, 张立异. 酱香型酒用糯高粱研究进展. 生物技术通报, 2019, 35 (5): 28-34
Ding Y Q, Zhou L B, Wang C, Cao N, Cheng B, Gao X, Peng Q, Shao M B, Zhang L Y. Research progress of glutinous sorghum for Maotai flavor liquor. Biotechnology Bulletin, 2019, 35 (5): 28-34
- [3] Sang Y, Bean S, Seib P A, Pedersen J, Shi Y C. Structure and functional properties of sorghum starches differing in amylose content. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, (56): 6680-6685
- [4] Yan S, Wu X, Bean S R, Pedersen J F, Tesso T, Chen Y R, Wang D. Evaluation of waxy grain sorghum for ethanol production. Cereal Chem, 2011, 88 (6): 589-595
- [5] Lu Y, Zhao G, Yan L, Jing F, Ding G, Zhao J, Ni X, Xu Y, Wang W. Identification of two novel waxy alleles and development of their molecular markers in sorghum. Genome, 2013, 56 (5): 283-288
- [6] Mohammed S M, Elhassan M. Emmambux N, Hays D B, Peterson G C, Taylor J R N. Novel biofortified sorghum lines with combined waxy (high amylopectin) starch and high protein digestibility traits: Effects on endosperm and flour properties. Journal of Cereal Science, 2015, 65: 132-139
- [7] Pedersen J F, Bean S R, Graybosch R A, Park S H, Tilley M. Characterization of waxy grain sorghum lines in relation to granule-bound starch synthase. Euphytica, 2005, 144 (1): 151-156

- [8] Kawahigashi H, Oshima M, Nishikawa T, Okuizumi H, Kasuga S, Yonemaru J. A novel *waxy* allele in sorghum landraces in East Asia. *Plant Breeding*, 2013, 132: 305-310
- [9] 李祥栋, 张明生, 王洋, 任明见, 高翔. 贵州优质酒用高粱 *Waxy* 基因的鉴定分析. *江苏农业科学*, 2014, 42 (5): 39-42
Li X D, Zhang M S, Wang Y, Ren M J, Gao X. Identification and analysis of *Waxy* gene in Guizhou high quality brewery sorghum. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2014, 42 (5): 39-42
- [10] Pedersen J F, Bean S R, Funnell D L, Graybosch R A. Rapid iodine staining techniques for identifying the waxy phenotype in sorghum grain and waxy genotype in sorghum pollen. *Crop Science*, 2004, 44: 764-767
- [11] Nakamura T, Yamamori M, Hirano H, Hidaka S, Nagamine T. Production of waxy (amylose-free) wheats. *Molecular Genetical Genetics*, 1995, 248: 253-259
- [12] Cagampang G B, Kirleis A W. Properties of starches isolated from sorghum floury and corneous endosperm. *Starch*, 1985, 37: 253-257
- [13] 王正英, 刘若兰. 糯性、粳性高粱的鉴定方法. *粮油仓储科技通讯*, 1987 (4): 39-40
Wang Z Y, Liu R L. Identification methods of waxy and nonwaxy sorghum. *Journal of Grain and Oil Storage Technology*, 1987 (4): 39-40
- [14] 唐玉明, 沈才洪, 田新惠, 刘茂柯, 敖中华, 任道群, 姚万春. 一种快速鉴定高粱籽粒粳糯类型的方法: CN201510605009. X. 2016-05-25
Tang Y M, Shen C H, Tian X H, Liu M K, Ao Z H, Ren D Q, Yao W C. A method for rapid identification of Japonica glutinous type of sorghum grain: CN201510605009. X. 2016-05-25
- [15] 宋高友, 张纯慎, 苏益民, 廖英丹. 采用高粱花粉遇碘呈色反应筛选直链和支链淀粉的方法. *核农学通报*, 1988 (5): 211-213
Song G Y, Zhang C S, Su Y M, Liao Y D. Selection of amylose and amylopectin by color reaction of sorghum pollen with iodine. *Bulletin of Nuclear Agriculture*, 1988 (5): 211-213