

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2011.01942

强筋小麦分子标记多重 PCR 体系的构建与应用

梁 强 张晓科* 尉 倩 王晓龙 张 晶 孙道杰 付晓洁

西北农林科技大学农学院 / 国家小麦改良中心杨凌分中心, 陕西杨凌 712100

摘 要: 面筋强度与小麦高低分子量谷蛋白亚基种类(组合)密切相关。以 12 个已知亚基基因组成的品种为对照, 选用基因(位点) *Axnull*、*Bx7^{OE}*、*Dx5*、*Glu-A3d*、*Glu-B3i* 和 *Glu-B3* 的标记, 构建多重 PCR 体系。以该体系检测对照的结果与已知基因型完全一致, 一次 PCR 可同时间接检测 7 个与强筋有关基因(位点) *Ax1/Ax2**、*Bx7^{OE}*、*Dx5*、*Glu-A3d*、*Glu-B3i* 和 *Glu-B3*。对 62 个陕西小麦品种的检测结果表明, 优质强筋亚基基因(位点) *Ax1/Ax2**、*Dx5*、*Glu-A3d*、*Glu-B3i* 和 *Glu-B3* 的比例依次为 56.5%、9.6%、33.9%、1.6% 和 64.4%, 所有品种均不含 *Bx7^{OE}*, 携带 0、1、2 和 3 个及以上基因(位点)的品种分别占 6.5%、33.9%、48.3% 和 11.3%。说明聚合多个强筋亚基基因(位点)的品种频率较低, 通过优质亚基基因的聚合育种, 可望改善陕西小麦品种的面筋品质。本研究所构建的强筋小麦分子标记检测的多重 PCR 体系检测结果稳定且可靠, 可用于小麦种质资源的快速评价和强筋小麦分子辅助选育。

关键词: 陕西省小麦品种; 分子标记; 多重 PCR 体系

Establishment and Application of Multiplex PCR System Based on Molecular Markers of Glutenin Subunit Genes (Loci) Related to Strong-gluten in Wheat

LIANG Qiang, ZHANG Xiao-Ke*, WEI Qian, WANG Xiao-Long, ZHANG Jing, SUN Dao-Jie, and FU Xiao-Jie

College of Agronomy, Northwest A&F University / Yangling Sub-center of National Wheat Improvement Center, Yangling, Shaanxi 712100, China

Abstract: Wheat strong-gluten quality is closely correlated with combinations of high-molecular-weight glutenin subunits (HMW-GS) and low-molecular-weight glutenin subunits (LMW-GS). The multiplex PCR system is a rapid and efficient approach to evaluate wheat germplasm and its quality in wheat. In this study, we developed a multiplex PCR system conferring molecular markers on *Ax1/Ax2**, *Bx7^{OE}*, *Dx5*, *Glu-A3d*, *Glu-B3i* genes, and *Glu-B3* locus and validated it with 12 cultivars with known subunit at each locus. This multiplex PCR system was proved to be effective and stable to amplify target bands for these genes (locus), and used to evaluate the glutenin subunit genes (locus) associated with strong-gluten in 62 major cultivars in wheat production in Shaanxi province, China. The results showed that the frequencies of genes *Ax1/Ax2**, *Dx5*, *Glu-A3d*, *Glu-B3i*, and locus *Glu-B3* in the 62 cultivars were 56.5%, 9.6%, 33.9%, 1.6%, and 64.4%, respectively, whereas gene *Bx7^{OE}* was not found. Most of the cultivars carried two-gene (locus) combinations with the frequency of 48.3%, a few cultivars carried a single gene or locus (33.9%). The frequency of cultivars carrying three or four-gene (locus) combinations was 11.3%. The remaining cultivars (6.5%) were free of above elite gene (locus). Therefore, the frequency of combination of multiple strong-gluten subunits gene (locus) was low in cultivars from Shaanxi Province, which could be promoted through germplasm introduction and traditional breeding aided by molecular marker selection. The multiplex PCR system developed in this study may serve as a rapid and efficient method to select materials pyrimiding multiple genes (loci) associated with strong-gluten in wheat breeding for quality.

Keywords: Common wheat cultivars from Shaanxi province; Molecular marker; Multiplex PCR system

面筋强度是小麦面粉品质评价的重要内容, 也是我国小麦品质育种改良的主要目标之一。麦谷蛋

本研究由引进国际先进农业技术计划(948 计划)项目(2006-G2), 财政部农业部现代农业小麦产业技术体系建设专项(nycytx-03)和西北农林科技大学唐仲英育种基金资助。

* 通讯作者(Corresponding author): 张晓科, E-mail: zhangxiaoke66@126.com

第一作者联系方式: E-mail: liangqiang06@126.com

Received(收稿日期): 2011-04-27; Accepted(接受日期): 2011-07-15; Published online(网络出版日期): 2011-09-06.

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20110906.1103.010.html>

白和醇溶蛋白是小麦面筋主要成分, 其含量和组成比例决定小麦加工品质的优劣, 尤其是麦谷蛋白亚基的种类和组成, 与小麦面筋的强弱密切相关, 决定面食的品质特性^[1]。因此, 研究和利用快速检测与强筋品质相关的谷蛋白亚基基因组成的技术体系, 对评价和选育强筋小麦品种具有重要的现实意义。

麦谷蛋白由高分子量谷蛋白亚基(HMW-GS)和低分子量谷蛋白亚基(LMW-GS)组成, 两者分别由位于 1A、1B、1D 染色体长臂和短臂上的 *Glu-A1*、*Glu-B1*、*Glu-D1*(统称 *Glu-1*)位点和 *Glu-A3*、*Glu-B3*、*Glu-D3*(统称 *Glu-3*)位点基因编码^[2]。每个位点等位基因编码不同亚基, 不同亚基对品质效应的大小不同。如 *Glu-A1* 位点上的 *Ax1* 和 *Ax2*^{*}基因编码的 1 和 2^{*}亚基, 对面筋强度、沉降值和面包评分优于 Null; *Glu-B1* 位点等位基因 *Bx7*^{OE} 编码的超表达 7 亚基(7^{OE}), 能显著提高面筋强度^[3]; *Glu-D1* 位点等位基因 *Dx5*+*Dy10* 编码的 5+10 亚基, 对面包品质的贡献优于其他亚基; *Glu-A3* 位点 *Glu-A3d* 基因编码的 LMW-GS, 其面筋强度优于该位点其他等位基因编码的 LMW-GS, 并对面条品质也有一定正向效应^[4]。1B·1R 易位品种, 因缺失 *Glu-B3* 和 *Gli-B1* 位点而不能表达相应的 LMW-GS 和醇溶蛋白或因引入 *ω-secalin* 基因表达了黑麦碱, 导致面团黏性增大和面筋强度减弱, 引起其加工品质变劣^[5]; 在非 1B·1R 易位或含 *Glu-B3* 位点的品种中, *Glu-B3i* 基因编码的 LMW-GS, 其对面筋强度的贡献明显优于该位点其他 LMW-GS^[4]。

发展和利用优质 HMW-GS 和 LMW-GS 基因的分子标记, 是小麦品质分子研究的重要内容之一。迄今, 已相继建立了 *Dx5*、*Axnull*、*Glu-B3*、*Bx7*^{OE}、*Glu-A3d* 和 *Glu-B3i* 等优质亚基基因的分子标记^[6-11], 可用于小麦品种或育种后代亚基基因的鉴定或标记辅助选择。与单一 PCR 标记技术相比, 多重 PCR 在一次反应体系内可鉴定 2 个或 2 个以上目标基因, 具有低成本、高效率等优点, 构建多重 PCR 体系已成为国内外基因分子标记研究的热点。Ahmad^[12]开发了同时检测 *Glu-D1* 位点上 *Dx5*、*Dy10* 和 *Dy12* 基因的多重 PCR 体系, 在小麦育种中实用性不大, 因为 *Dx5* 与 *Dy10* 基因一般紧密连锁, 在小麦品种内伴随出现, *Dy10* 与 *Dy12* 又互为等位基因, 从这 3 个基因中任意检测出 1 个就可以对育种后代决选; Ma 等^[13]建立了 *Ax2*^{*}、*Bx17* 和 *Dx5* 基因的多重 PCR 体系, 但

因引物的错配, *Ax2*^{*}基因标记未能扩增出预期大小的特异带; Moczulski 等^[14]建立了多套检测编码 HMW-GS 基因的多重 PCR 体系, 每个体系涉及 2 个或 3 个位点基因的检测, 以上体系仅涉及编码 HMW-GS 基因的检测, 没有涉及编码 LMW-GS 基因的检测。Zhang 等^[15]构建了 *By8*、*Dx5*、*Glu-A3d*、*Glu-B3* (非 1B·1R 易位系)、*ω-secalin* (1B·1R 易位系) 和 *Pinb-D1b* 基因检测的多重 PCR 体系, 但缺乏对 *Glu-A1* 位点优质亚基基因的检测。

迄今为止, 虽然已构建了一些小麦品质相关性基因检测的多重 PCR 体系^[10,12-19], 但很少涉及 LMW-GS 基因的检测, 尤其对同时检测编码高低分子量谷蛋白 5 个位点上强筋亚基基因的多重 PCR 体系还未见报道。小麦是陕西省重要的粮食作物, 该地区育成的小麦品种在我国小麦生产和育种中起重要作用。为此, 本研究选取 6 个与面筋强度正相关基因(位点)的分子标记构建多重 PCR 体系, 用 12 份已知基因型的材料验证, 鉴定陕西小麦品种相关基因(位点), 为小麦种质资源评价和品质分子聚合育种提供高效的选择方法, 为小麦品质遗传改良提供依据。

1 材料与方法

1.1 小麦品种

选用 *Glu-A1*、*Glu-B1*、*Glu-D1*、*Glu-A3*、*Glu-B3* 位点及 1B·1R 易位上包含各种等位变异类型的材料 12 份(表 1), 用于多重 PCR 体系的开发和验证。以 62 个陕西历史上和目前推广的小麦品种为待测材料, 它们基本上反映了陕西小麦育种和生产的品种现状。

1.2 PCR 引物序列及扩增条件

以已知对照材料目标基因组成与标记引物扩增特异条带大小为依据, 采用标准的 PCR 反应体系^[21], 对构建多重 PCR 体系所涉及 *Axnull*、*Bx7*^{OE}、*Dx5*、*Glu-B3i*、*Glu-A3d* 和 *Glu-B3* 基因(位点)的标记, 进行退火温度的梯度 PCR, 确定每个标记引物适宜的退火温度区间(表 2)。

多重 PCR 反应体系为 20 μL, 包括 1×PCR buffer (1.5 mmol L⁻¹ MgCl₂)、200 μmol L⁻¹ dNTP、1.25 U *Taq* DNA 聚合酶(北京全式金生物技术有限公司)、100~150 ng 模板 DNA 和适量引物(表 2)。PCR 反应在 PTC-200 型扩增仪中完成, 程序为 95 预变性 5 min; 94 变性 35 s, 63 退火 35 s, 72 延伸 40 s,

表 1 构建多重 PCR 体系所用的品种及其等位变异组成
Table 1 Wheat cultivars used in developing multiplex PCR system and their genotypes of glutenin protein

品种 Cultivar	<i>Glu-A1</i>	<i>Glu-B1</i>	<i>Glu-D1</i>	<i>Glu-A3</i>	<i>Glu-B3</i>
中国春 Chinese Spring	<i>Axnull</i>	<i>Bx7+By8</i>	<i>Dx2+Dy12</i>	<i>Glu-A3a</i>	<i>Glu-B3a</i>
Ruso	<i>Ax2*</i>	<i>Bx6+By8</i>	<i>Dx5+Dy10</i>	<i>Glu-A3c</i>	<i>Glu-B3i</i>
川 96003 Chuan 96003	<i>Axnull</i>	<i>Bx7+By9</i>	<i>Dx3+Dy12</i>	<i>Glu-A3c</i>	<i>Glu-B3f</i>
Orca	<i>Axnull</i>	<i>Bx7</i>	<i>Dx2+Dy12</i>	<i>Glu-A3d</i>	<i>Glu-B3d</i>
扬麦 9 号 Yangmai 9	<i>Axnull</i>	<i>Bx7+By9</i>	<i>Dx5+Dy10</i>	<i>Glu-A3a</i>	<i>Glu-B3g</i>
农大 99-5009 Nongda 99-5009	<i>Axnull</i>	<i>Bx7*+By8</i>	<i>Dx2+Dy12</i>	<i>Glu-A3d</i>	<i>Glu-B3d</i>
西农 8925-13 Xinong 8925-13	<i>Ax2*</i>	<i>Bx14+By15</i>	<i>Dx2+Dy12</i>	<i>Glu-A3d</i>	<i>Glu-B3d</i>
济麦 20 Jimai 20	<i>Ax1</i>	<i>Bx13+By16</i>	<i>Dx4+Dy12</i>	<i>Glu-A3d</i>	<i>Glu-B3b</i>
皖麦 33 Wanmai 33	<i>Ax1</i>	<i>Bx20</i>	<i>Dx5+Dy10</i>	<i>Glu-A3d</i>	<i>Glu-B3g</i>
德麦 3 号 Demai 3	<i>Ax1</i>	<i>Bx7^{OE}+By8</i>	<i>Dx2+Dy12</i>	<i>Glu-A3a</i>	<i>Glu-B3d</i>
德麦 4 号 Demai 4	<i>Ax1</i>	<i>Bx7+By8</i>	<i>Dx5+Dy10</i>	<i>Glu-A3d</i>	<i>Glu-B3j</i>
CA9550	<i>Ax2*</i>	<i>Bx7+By8</i>	<i>Dx2+Dy12</i>	<i>Glu-A3c</i>	<i>Glu-B3h</i>

资料来自刘丽^[20]和 Wang 等^[10-11]。仅德麦 4 号为 1B·1R 易位系。
Data are from Liu^[20] and Wang et al.^[10-11]. Demai 4 is the unique cultivar of 1B·1R translocation.

表 2 标记的引物序列及其预期扩增片段大小
Table 2 Sequences and expected amplification fragment sizes of the targeted genes (locus)

位点 Locus	引物用量 Concentration of primer ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	引物序列 Primer sequence (5'-3')	片段大小 Product size (bp)	退火温度 Annealing temperature ($^{\circ}\text{C}$)	参考文献 Reference
<i>Axnull</i>	0.150	F: ACGTTCCCCTACAGGTACTA	920	59.8–63.3	Lafiandra et al. ^[7]
	0.150	R: TATCACTGGCTAGCCGACAA			
<i>Bx7^{OE}</i>	0.125	F: CCACTTCCAAGGTGGGACTA	844	57.1–63.3	Ragupathy et al. ^[9]
	0.125	R: TGCCAACACAAAAGAAGCTG			
<i>Dx5</i>	0.125	F: GCCTAGCAACCTTCACAATC	450	58.4–63.3	D'Ovidio & Anderson ^[6]
	0.125	R: GAAACCTGCTGCGGACAAG			
<i>Glu-B3</i>	0.100	F: GGTACCAACAACAACAACCC	636	61.1–63.3	van Campenhout et al. ^[8]
	0.100	R: GTTGCTGCTGAGGTTGGTTC			
<i>Glu-A3d</i>	0.250	F: TTCAGATGCAGCCAAACAA	967	59.8–63.3	Wang et al. ^[10]
	0.250	R: TGGGGTTGGGAGACACATA			
<i>Glu-B3i</i>	0.200	F: TATAGCTAGTGCAACCTACCAT	621	58.4–63.3	Wang et al. ^[11]
	0.200	R: TGGTTGTTGCGGTATAATTT			

37 个循环; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 8 min。采用 3.0%琼脂糖凝胶, 于 150 V 下电泳 2 h, 缓冲液体系为 1 \times TAE 溶液。电泳结束后用溴化乙锭对胶片染色、凝胶成像系统照相观察。

2 结果与分析

2.1 多重 PCR 体系的建立

明确构建体系所涉及的 6 对引物相同的退火温度后, 按照原有引物、dNTP、DNA 聚合酶等用量配制多重 PCR 体系, 进行 PCR 扩增和电泳检测。然后结合对照材料扩增的结果, 主要从引物用量、退火温度、延伸时间和循环数等方面对体系进行调试优

化。针对 *Glu-A3d* 和 *Glu-B3i* 基因标记扩增产物量极少而 *Glu-B3* 位点标记扩增产物量过大的问题, 在增加 *Glu-A3d* 和 *Glu-B3i* 标记的引物用量同时, 减少 *Glu-B3* 位点标记的引物用量; 出现多数基因标记引物扩增产物量较少的问题时, 增加反应循环数; 出现较多杂带时, 逐步提高退火温度并减少反应体系的延伸时间。最终, 在多重 PCR 体系中, 使每个标记引物在含目标基因(位点)的已知对照材料中扩增出清晰的特异条带, 而在不含目标基因(位点)的已知对照材料中无特异条带出现。

通过不断调试, 最终构建了同时检测 6 个目标基因的多重 PCR 体系。在 12 份已知基因组成的对

照材料中, 德麦 4 号和皖麦 33 等 6 份材料扩增出了 967 bp 条带; 中国春和扬麦 9 号等 5 份材料产生 920 bp 扩增带; 仅德麦 3 号扩增出 844 bp 条带; 中国春、Ruso、德麦 3 号、CA9550、皖麦 33 和扬麦 9 号等 11 份材料产生 636 bp 的扩增带, 说明它们属非 1B·1R 易位系, 仅德麦 4 号未扩增出该条带, 是 1B·1R 易位系; Ruso 产生 621 bp 条带; Ruso、德麦 4 号、皖麦 33 和扬麦 9 号扩增出 450 bp 条带, 而其他 8 份材料未扩增出该条带(图 1 和表 1)。可以看出, 利用构建的多重 PCR 体系检测对照材料, 目标基因的检测结果与对照材料的已知结果完全一致。

2.2 小麦品种谷蛋白亚基位点的多重 PCR 鉴定

在 62 个品种中, 小偃 597 等 21 个品种扩增出 967 bp 的条带, 说明这些品种在 *Glu-A3* 位点携带 *Glu-A3d* 基因。西农 1376 等 27 份品种中扩增出 920 bp 条带, 表明它们在 *Glu-A1* 位点含 *Axnull* 基因, 而

其余 35 份品种含 *Ax1* 或 *Ax2*^{*}基因。西农 979 等 40 份品种中扩增出 636 bp 条带, 陕 229 等 22 份品种未扩增出该条带, 说明西农 979 等 40 份品种为非 1B·1R 易位系; 矮丰 1 号品种扩增出 621 bp 条带, 说明该品种在 *Glu-B3* 位点存在 *Glu-B3i* 基因。陕麦 159 等 6 份品种扩增出 450 bp 特异条带, 即它们在 *Glu-D1* 位点存在 *Dx5* 基因。所有参试品种未扩增出 844 bp 的条带, 即在 *Glu-B1* 位点不存在 *Bx7*^{OE} 基因(图 2 和表 3)。

2.3 陕西省小麦优质位点组成与分布

62 个陕西品种中共发现 13 种目标基因(位点)组合类型, 其频率为 1.6%~25.8%。其中, 不含优质目标亚基基因(位点)的品种占 6.5%。含 1、2、3 和 4 个目标基因(位点)的组合类型分别有 4、4、3 和 1 种, 依次占参试品种的 33.9%、48.3%、9.7%和 1.6%。在含 1 个优质目标基因(位点)的品种中, 以携带

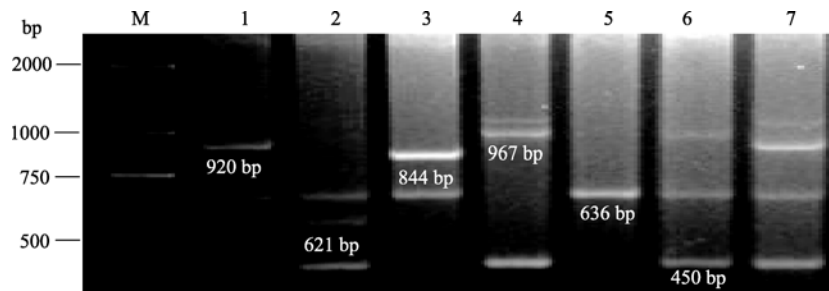


图 1 *Axnull*、*Bx7*^{OE}、*Dx5*、*Glu-B3*、*Glu-A3d* 和 *Glu-B3i* 位点标记的多重 PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳图谱

Fig. 1 Electrophoresis of amplified fragments with primers specific for genes (locus) *Axnull*, *Bx7*^{OE}, *Dx5*, *Glu-B3*, *Glu-A3d*, and *Glu-B3i* in a single PCR reaction

M: DNA 分子量标准 D2000; 1: 中国春; 2: Ruso; 3: 德麦 3 号; 4: 德麦 4 号; 5: CA9550; 6: 皖麦 33; 7: 扬麦 9 号。目标条带的分子量为 450 bp (*Dx5*)、621 bp (*Glu-B3i*)、636 bp (*Glu-B3*)、844 bp (*Bx7*^{OE})、920 bp (*Axnull*)和 967 bp (*Glu-A3d*)。

M: DNA maker D2000; 1: Chinese Spring; 2: Ruso; 3: Demai 3; 4: Demai 4; 5: CA9550; 6: Wanmai 33; 7: Yangmai 9. The sizes of target bands are 450 (*Dx5*), 621 (*Glu-B3i*), 636 (*Glu-B3*), 844 (*Bx7*^{OE}), 920 (*Axnull*), and 967 bp (*Glu-A3d*).

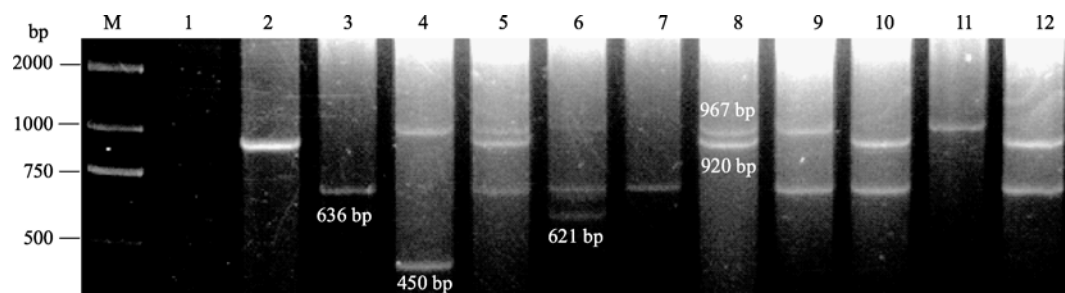


图 2 部分陕西小麦品种 *Axnull*、*Bx7*^{OE}、*Dx5*、*Glu-B3*、*Glu-A3d*、*Glu-B3i* 位点的多重 PCR 检测结果

Fig. 2 Results of multiplex PCR detection of genes (locus) *Axnull*, *Bx7*^{OE}, *Dx5*, *Glu-B3*, *Glu-A3d*, and *Glu-B3i* in partial wheat cultivars from Shaanxi province

M: DNA 分子量标准 D2000; 1: 陕 229; 2: 西农 1376; 3: 西农 979; 4: 陕麦 159; 5: 丰产 3 号; 6: 矮丰 1 号; 7: 陕 253; 8: 小偃 597; 9: 小偃 6 号; 10: 小偃 22; 11: 阎麦 8911; 12: 蚰子麦。扩增带的分子量依次为 450 (*Dx5*)、621 (*Glu-B3i*)、636 (*Glu-B3*)、920 (*Axnull*)和 967 bp (*Glu-A3d*)。

M: DNA maker D2000; 1: Shaan 229; 2: Xinong 1376; 3: Xinong 979; 4: Shaanmai 159; 5: Fengchan 3; 6: Aifeng 1; 7: Shaan 253; 8: Xiaoyan 597; 9: Xiaoyan 6; 10: Xiaoyan 22; 11: Yanmai 8911; 12: Youzimai. The sizes of amplified bands are 450 (*Dx5*), 621 (*Glu-B3i*), 636 (*Glu-B3*), 920 (*Axnull*), and 967 bp (*Glu-A3d*).

表 3 陕西小麦品种优质位点组合类型与分布
Table 3 Combinations and distribution of high quality loci in Shaanxi wheat cultivars

位点组合 Combination of loci	品种 Cultivar	频率 Frequency (%)
None	西农 1376, 陕农 7859, 秦麦 1 号, 秦麦 9 号	6.5
<i>Ax1</i> or <i>Ax2</i> *	陕 229, 陕 354, 陕农 138, 西农 2208, 西农 8727, 西农 9871, 小偃 216, 新洛 11	12.9
Non-1B/1R	小偃 22, 宝麦 1 号, 高优 503, 西农 3517, 长武 521, 铜麦 4 号, 蚰子麦, 碧蚂 1 号	12.9
<i>Glu-A3d</i>	小偃 128, 小偃 597, 阎麦 9710, 陕 8007	6.5
<i>Dx5</i>	运 9805	1.6
<i>Ax1</i> or <i>Ax2</i> */Non-1B·1R	陕 253, 陕麦 139, 陕麦 150, 西农 383, 西农 881, 西农 979, 西农 2611, 西农 9718, 远丰 175, 新麦 10 号, 小偃 107, 长武 134, 长旱 58, 咸农 151, 宝麦 6 号, 晋麦 54	25.8
<i>Glu-A3d</i> /Non-1B·1R	小偃 54, 小偃 168, 丰产 3 号, 碧蚂 4 号, 秦农 142, 豫麦 34, 豫麦 47	11.2
<i>Dx5</i> /Non-1B·1R	登峰 168, 晋太 170, 长 6359	4.8
<i>Ax1</i> or <i>Ax2</i> */ <i>Glu-A3d</i>	阎麦 8911, 陕农 78, 武农 148, 武农 986	6.5
<i>Ax1</i> or <i>Ax2</i> */ <i>Glu-A3d</i> /Non-1B·1R	小偃 6 号, 矮丰 3 号, 陕优 225, 商麦 9215	6.5
<i>Ax1</i> or <i>Ax2</i> */ <i>Dx5</i> / <i>Glu-A3d</i>	陕麦 159	1.6
<i>Ax1</i> or <i>Ax2</i> */ <i>Dx5</i> /Non-1B·1R	陕 512	1.6
<i>Ax1</i> or <i>Ax2</i> */ <i>Glu-A3d</i> / <i>Glu-B3i</i> /Non-1B·1R	矮丰 1 号	1.6

Ax1/*Ax2**基因或 *Glu-B3* 位点的品种为主; 在含 2 个目标基因(位点)的品种中, 以 *Ax1*/*Ax2**和 *Glu-B3* 组合类型为主; 含 3 个目标位点的品种中, *Ax1*/*Ax2**、*Glu-A3d* 和 *Glu-B3* 组合类型为主; 没有发现同时含 5 或 5 以上目标优质亚基基因(位点)组合的品种(表 3)。从以上分析可以看出, 陕西小麦聚合多个强筋亚基基因品种的比例较少。

3 讨论

面筋强度主要受 HMW-GS 和 LMW-GS 组成及其表达量和 1B·1R 易位等因素的影响^[22]。开发一种高效且不受季节和样品种类限制、能在小麦生长发育早期即可检测其 HMW-GS 和 LMW-GS 组成的方法, 有助于加快小麦品质遗传改良的进度。传统的 SDS-PAGE 方法需要以小麦籽粒或面粉作为样品, 检测过程比较耗时, 且不易或很难分辨迁移率接近或相同的亚基^[23], 影响检测结果的可靠性。分子标记检测样品可以是植株任何部位的组织, 取样不受小麦生长季节和样品种类限制, 操作过程比较简单; 而与单一 PCR 方法相比, 多重 PCR 一次可以同时检测多个目标基因, 具有低成本、易操作、高效率等优点, 适合目标位点的分子辅助选择聚合育种。

在 *Glu-A1* 位点, 普通小麦一般表达 3 种亚基, 即 Null、1 和 2*类型^[24]。通过鉴定 *Axnull* 基因可间接检测该位点是否存在优质亚基。1B·1R 易位系缺

失 *Glu-B3* 位点, 因此携带 *Glu-B3* 位点可判定为非 1B·1R 易位系。本研究构建的多重 PCR 检测体系, 涉及 *Glu-A1*、*Glu-B1*、*Glu-D1*、*Glu-A3* 和 *Glu-B3* 共 5 个位点, 直接检测 *Axnull*、*Bx7^{OE}*、*Dx5*、*Glu-A3d*、*Glu-B3i* 和 *Glu-B3* 基因(位点), 可最终检测 *Ax1* 或 *Ax2**、*Bx7^{OE}*、*Dx5*(+*Dy10*)、*Glu-A3d* 和 *Glu-B3i* 基因, 以及判定是否为 1B·1R 易位系。与前人建立的多重 PCR 体系^[12-19]相比, 我们建立的多重 PCR 体系涉及更多位点, 检测效率更高, 更适合用于小麦品质分子聚合育种。

从本文检测的结果来看, 在 *Glu-A1* 位点, 优质亚基基因 *Ax1* 或 *Ax2**在陕西小麦品种中的频率(56.5%), 高于国内其他地区育成品种的频率(30.6%~42.6%); 但在 *Glu-D1* 位点对品质贡献最大亚基基因 *Dx5*(+*Dy10*)在供试品种中的频率仅 9.6%, 低于国内其他地区育成品种的频率(15.7%~18.6%)^[25]; 在 *Glu-B1* 位点, 未发现携带 *Bx7^{OE}* 基因的品种; 而在 *Glu-A3* 位点, 具有较好面筋强度亚基的 *Glu-A3d* 基因的频率为 33.9%, 明显高于我国东北春麦区(7.9%)和西北春麦区(19.8%)^[26]; 在 *Glu-B3* 位点, 含有对面筋强度有正向效应亚基 *Glu-B3i* 基因的频率仅 1.6%, 低于 CIMMYT 小麦品种(系)的频率(9.2%)^[11]。陕西小麦 1B·1R 易位品种的频率, 与黄淮麦区品种的检测频率^[17]基本一致。

本研究表明, 陕西小麦品种以携带单个或 2 个

目标基因(位点)组合类型的品种为主, 含 3 个或 4 个优质亚基基因(位点)组合的品种很少, 不存在 5 个及以上基因(组合)类型的品种(表 3)。Shewry 和 Tatham^[27]研究表明, HMW-GS 基因的表达数目与二硫键(与面筋强度有关)总量间存在剂量关系。赵会贤等^[28]在 Suneca×Cook 杂交组合的 F₄ 代群体中发现, *Glu-1* 和 *Glu-3* 位点优质基因的数量对面团的强度具有累加效应。Barro 等^[29]将优质亚基基因 *Ax1* 和 *Dx5* 导入小麦品系后, 面筋强度随着表达优质亚基数目的增多而增强, 说明增加与面筋强度有正向效应的优质亚基的数目可提高小麦面筋强度。然而, 随着蛋白质含量和面筋强度的增加, 面条质地的强度随之增加, 口感变硬, 色泽外观有变劣趋势; 面筋强度过高, 加工的面条回缩, 变厚增粗, 煮面时间增长, 面条表面结构受到破坏, 发黏, 色泽差, 进而总体品质变劣^[30]。刘爱华等^[31]认为, 随着蛋白质含量和面筋强度的增加, 馒头体积变大, 但外观有变劣趋势, 如出现烫斑、气泡、塌坑等现象。He 等^[32]提出, 中弱筋品种适合加工手工馒头, 中强筋的品种适合做面条, 而强筋品种适合加工面包。面条和馒头是陕西地区小麦加工的主要传统食品种类, 因此陕西省小麦品种中目标基因(位点)的分布特点与当地居民的饮食习惯和加工食品类型有关。

由于陕西省缺乏强筋小麦品种, 所以应重视引入国内外含优质基因 *Bx7^{OE}*、*Dx5*+(*Dy10*)和 *Glu-B3i* 等的种质资源, 并与当地广适性和高产的品种杂交, 利用本研究构建的多重 PCR 体系进行品质相关位点基因的检测, 利用分子标记辅助选择聚合有利基因, 从而加快育种和品质改良。

4 结论

构建了涉及 *Axnull*、*Bx7^{OE}*、*Dx5*、*Glu-B3i*、*Glu-A3d* 基因和 *Glu-B3* 位点的分子标记多重 PCR 体系, 其鉴定结果可靠, 实验成本低, 可用于小麦育种亲本评价和杂交后代强筋谷蛋白亚基位点聚合的分子标记辅助选择。利用该体系检测的 62 份陕西小麦品种中, 含 1 或 2 个目标优质亚基基因(位点)的品种较多, 含 3 个目标基因(位点)的较少, 含 4 个的更少, 没有含 5 个或 5 个以上目标基因(位点)的品种。

References

- [1] Kasarda D D. Glutenin polymers: the in vitro to in vivo transition. *Cereal Foods World*, 1999, 44: 566–571
- [2] Gupta R B, Shepherd K W. Two-step one-dimensional SDS-

- PAGE analysis of LMW subunits of glutenin: 1. Variation and genetic control of the subunits in hexaploid wheats. *Theor Appl Genet*, 1990, 80: 65–74
- [3] Radovanovic N, Cloutier S. Gene-assisted selection for high molecular weight glutenin subunits in wheat doubled haploid breeding programs. *Mol Breed*, 2003, 12: 51–59
- [4] Gupta R B, Bekes F, Wrigley C W. Prediction of physical dough properties from glutenin subunit composition in bread wheats. *Cereal Chem*, 1991, 68: 328–333
- [5] Liu L, He Z H, Yan J, Zhang Y, Xia X C, Peña R J. Allelic variation at the *Glu-1* and *Glu-3* loci, presence of the 1B·1R translocation, and their effects on mixographic properties in Chinese bread wheats. *Euphytica*, 2005, 142: 197–204
- [6] D'Ovidio R, Anderson O D. PCR analysis to distinguish between alleles of a member of a multigene family correlated with wheat bread-making quality. *Theor Appl Genet*, 1994, 88: 759–763
- [7] Lafandra D, Tucci G F, Pavoni A, Turchetta T, Margiotta B. PCR analysis of x- and y-type genes present at the complex *Glu-A1* locus in durum and bread wheat. *Theor Appl Genet*, 1997, 94: 235–240
- [8] van Campenhout S, Stappen J, Sagi L, Volckaert G. Locus-specific primers for LMW glutenin genes on each of the group 1 chromosomes of hexaploid wheat. *Theor Appl Genet*, 1995, 91: 313–319
- [9] Ragupathy R, Naeem H A, Reimer E, Lukow O M, Sapirstein H D, Cloutier S. Evolutionary origin of the segmental duplication encompassing the wheat *GLU-B1* locus encoding the over-expressed Bx7 (*Bx7^{OE}*) high molecular weight glutenin subunit. *Theor Appl Genet*, 2008, 116: 283–296
- [10] Wang L H, Li G Y, Peña R J, Xia X C, He Z H. Development of STS markers and establishment of multiplex PCR for *Glu-A3* alleles in common wheat (*Triticum aestivum* L.). *J Cereal Sci*, 2010, 51: 305–312
- [11] Wang L H, Zhao X L, He Z H, Ma W, Appels R, Peña R J, Xia X C. Characterization of low molecular weight glutenin subunit *Glu-B3* genes and development of STS markers in common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor Appl Genet*, 2009, 118: 525–539
- [12] Ahmad M. Molecular marker-assisted selection of HMW glutenin alleles related to wheat bread quality by PCR-generated DNA markers. *Theor Appl Genet*, 2000, 101: 892–896
- [13] Ma W, Zhang W, Gale K R. Multiplex-PCR typing of high molecular weight glutenin alleles in wheat. *Euphytica*, 2003, 134: 51–60
- [14] Moczulski M, Salmanowicz B P. Multiplex PCR identification of

- wheat HMW glutenin subunit genes by allele-specific markers. *J Appl Genet*, 2003, 44: 459–471
- [15] Zhang X K, Liu L, He Z H, Sun D J, He X Y, Xu Z H, Zhang P P, Chen F, Xia X C. Development of two multiplex PCR assays targeting improvement of bread-making and noodle qualities in common wheat. *Plant Breed*, 2008, 127: 109–115
- [16] Zhang X-K(张晓科), Xia X-C(夏先春), Wang Z-W(王忠伟), Wan Y-X(万映秀), Zhang P-Z(张平治), He X-Y(何心尧), Yang Y(杨燕), He Z-H(何中虎). Establishment of multiplex-PCR for quality traits in common wheat. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2007, 33(10): 1703–1710 (in Chinese with English abstract)
- [17] Wan Y-X(万映秀), Zhang X-K(张晓科), Xia X-C(夏先春), Zhang P-Z(张平治), He Z-H(何中虎). Development of multiplex PCR and identification of major quality genes in cultivars from Yellow and Huai River valley wheat region. *Sci Agric Sin* (中国农业科学), 2008, 41(3): 643–653 (in Chinese with English abstract)
- [18] Zheng H(郑寒), Chen J(陈静), Ren Y(任妍), Yu M-Q(余懋群), Fu T-H(付体华). Establishment and application of multiplex-PCR for wheat glutenin subunits relative to superior end-use quality. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2009, 35(10): 1831–1835 (in Chinese with English abstract)
- [19] Sui X X, Wang L H, Xia X C, Wang Z L, He Z H. Development of an allele-specific marker for *Glu-B3* alleles in common wheat and establishment of a multiplex PCR assay. *Crop & Pasture Sci*, 2010, 61: 978–987
- [20] Liu L(刘丽). Identification of Glutenin Composition in Common wheat by Proteomics Technology. PhD Dissertation of Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2008 (in Chinese with English abstract)
- [21] Sambrook J, Russell D W. Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 3rd Edn. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001
- [22] Liu L(刘丽), Zhou Y(周阳), Liu J-J(刘建军), He Z-H(何中虎), Yang J(杨金). Effect of allelic variation at the *Glu-1* and *Glu-3* loci and presence of 1BL/1RS translocation on pan bread and dry white Chinese noodle quality. *Sci Agric Sin* (中国农业科学), 2004, 37(9): 1265–1273 (in Chinese with English abstract)
- [23] Shewry P R, Halford N G, Tatham A S. High-molecular weight subunits of wheat glutenin. *J Cereal Sci*, 1992, 15: 105–120
- [24] Payne P I, Holt L M, Law C N. Structural and genetical studies on the high-molecular-weight subunits of wheat glutenin: Part 1: allelic variation in subunits amongst varieties of wheat (*Triticum aestivum*). *Theor Appl Genet*, 1981, 60: 229–236
- [25] Zhang X-Y(张学勇), Pang B-S(庞斌双), You G-X(游光霞), Wang L-F(王兰芬), Jia J-Z(贾继增), Dong Y-C(董玉琛). Allelic variation and genetic diversity at *Glu-1* loci in Chinese wheat (*Triticum aestivum* L.) germplasms. *Sci Agric Sin* (中国农业科学), 2002, 35(11): 1302–1310 (in Chinese with English abstract)
- [26] Chen D-S(陈东升), Liu L(刘丽), Dong J-L(董建力), He Z-H(何中虎), Zhang Y(张艳), Liu J-J(刘建军), Wang D-S(王德森). Effect of HMW and LMW glutenin subunits and presence of 1BL/1RS translocation on quality traits in spring wheat. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2005, 31(4): 414–419 (in Chinese with English abstract)
- [27] Shewry P R, Tatham A S. Disulphide bonds in wheat gluten proteins. *J Cereal Sci*, 1997, 25: 207–227
- [28] Zhao H-X(赵会贤), Hu S-W(胡胜武), Ji W-Q(吉万全), Mares D. The effects of allelic variation at gluten subunit loci *Glu-1* and *Glu-3* on the size distribution of polymeric protein. *Sci Agric Sin* (中国农业科学), 1998, 31(1): 69–75 (in Chinese with English abstract)
- [29] Barro F, Rooke L, Békés F, Gras P, Tatham A S, Fido R, Lazzeri P A, Shewry P R, Barceló P. Transformation of wheat with high molecular weight subunit genes results in improved functional properties. *Nat Biotechnol*, 1997, 15: 1295–1299
- [30] Yang J(杨金), Zhang Y(张艳), He Z-H(何中虎), Yan J(阎俊), Wang D-S(王德森), Liu J-J(刘建军), Wang M-F(王美芳). Association between wheat quality traits and performance of pan bread and dry white Chinese noodle. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2004, 30(8): 739–744 (in Chinese with English abstract)
- [31] Liu A-H(刘爱华), He Z-H(何中虎), Wang G-R(王光瑞), Wang D-S(王德森), Zhang Y(张艳), Zhou G-Y(周桂英). Investigation of wheat flour quality for northern style Chinese steamed bread. *J Chin Cereal Oils Assoc* (中国粮油学报), 2000, 15(2): 10–15 (in Chinese with English abstract)
- [32] He Z H, Yang J, Zhang Y, Quail K J, Peña R J. Pan bread and dry white Chinese noodle quality in Chinese winter wheats. *Euphytica*, 2004, 139: 257–267