

小麦高分子量麦谷蛋白亚基基因 *1By8* 的分子检测和应用

何盛莲,雷振生,吴政卿,赵献林,方保停,杨攀,杨会民,何宁,王美芳,李巍

(河南省农业科学院 小麦研究中心,河南 郑州 450002)

摘要:小麦的加工品质与小麦高分子量麦谷蛋白的组成和含量密切相关,特别是 *Glu-1* 位点编码的高分子量麦谷蛋白亚基(*HMW-GS*)的组成和含量。为此,试验利用 *1By8* 亚基标记对黄淮麦区目前生产利用或曾经利用过的小麦品种及部分育种资源共 150 份进行了检测,其中有 43 份材料扩增出 527 bp 特异片段,表明具有 *1By8* 亚基;107 份材料未扩增出 527 bp 片段,表明不具有 *1By8* 亚基;*1By8* 亚基的出现频率为 28.6%。所用材料的鉴定结果与 SDS-PAGE 电泳的结果基本一致,表明利用特异性 PCR 标记鉴定 *1By8* 亚基是可靠的。与 SDS-PAGE 相比,PCR 标记更加快速、简便和准确。

关键词:小麦;高分子量麦谷蛋白;*1By8* 亚基;分子标记检测;应用

中图分类号:Q78 文献标识码:A 文章编号:1000-7091(2010)04-0035-05

Molecular Marker Detection and Utilization for *HMW-GS 1By8* Gene in Wheat

HE Sheng-lian, LEI Zhen-sheng, WU Zheng-qing, ZHAO Xian-lin,

FANG Bao-ting, YANG Pan, YANG Hui-min, HE Ning, WANG Mei-fang, LI Wei

(Wheat Research Centre, Henan Academy of Agriculture Sciences, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: Wheat processing quality is closely correlated with composition and quantity of glutenin, in particular with the high-molecular weight glutenin subunits(*HMW-GS*) encoded by the *Glu-1* locus. The specific PCR marker of *1By8* was applied to detect the presence of the *HMW-glutenin 1By8* gene in 150 wheat varieties and lines used in Huanghuai Wheat Region. The results showed that the PCR marker could amplify a 527 bp fragment in 43 varieties (lines) and the positive control, Tasman, comprising the *1By8* gene, while other 107 varieties (lines) and the negative control (Kukri) did not show the specific product. The probability of the *1By8* gene was 28.6%. The results corresponding to those by protein SDS-PAGE indicated that this marker was reliable and effective and could identify the presence of the *HMW-glutenin 1By8* gene. Compared with SDS-PAGE detection, PCR is quicker, easier and accurate.

Key words: Wheat; High molecular weight glutenin; *1By8* subunit; Molecular marker detection; Utilization

我国小麦育种长期以来以产量的提高为主要目标,随着经济的发展和人民生活水平的提高以及食品加工对品质的需求不断增加,20 世纪 80 年代以来小麦的品质改良越来越受到重视,已成为我国小麦育种的主要目标之一^[1,2]。小麦高分子量麦谷蛋白亚基(*HMW-GS*)的组成类型和含量直接与小麦的加工品质有关^[3-5],且不同亚基对品质的效应不同,如 *Glu-A1* 位点 *Ax2* * 基因编码的 *HMW-GS* 对面筋

强度和面包评分优于 *Null*, *Glu-B1* 位点 *Bx17* + *By18* 和 *Bx7* + *By8* 优于该位点的其他类型, *Glu-D1* 位点 *Dx5* + *Dy10* 优于其他类型^[6-9]。

优质亚基频率较低是导致我国小麦整体面筋强度较低的主要原因,在我国现有的优质小麦品种中,最缺乏的就是强筋面包小麦品种^[10],选育强筋面包品种成为我国小麦育种改良的一个重要方向^[11,12]。通过杂交育种和分子标记辅助选择的方法相结合,

收稿日期:2010-07-10

基金项目:国家自然科学基金项目(30771339)

作者简介:何盛莲(1972-),女,河南商城人,副研究员,硕士,主要从事小麦遗传育种研究。

通讯作者:雷振生(1962-),男,湖北广水人,研究员,博士,硕士生导师,主要从事小麦遗传育种研究。

可将优质亚基导入我国的小麦品种中,改良我国小麦的加工品质。发展一种高效准确快速的鉴定 *HMW-GS* 的方法对缩短育种年限加快育种进程非常重要。与常规品质分析相比,分子标记检测的直接对象是控制性状的基因,不受季节、环境和样品种类的限制,并且样品用量极少,可进行高通量检测。*1Dx5*、*1Bx7*、*1Dy10*、*1Dy12* 和 *1By8* 等亚基的特异 PCR 标记已先后被确立,国内研究还主要集中在 *5+10* 等亚基上,而 *1By8* 特异 PCR 标记的报道较少。*1By8* 标记能将 SDS-PAGE 方法难以区分的 *By8* 与 *By8** 区别开,对于区分 *Glu-B1b* (*Bx7* + *By8*) 和 *Glu-B1c* (*Bx7* + *By9*),以及 *Glu-Bli* (*Bx17* + *By18*) 和 *Glu-B1b* (*Bx7* + *By8*) 极为有效^[13],此前所报道的标记^[14-16]则无上述全部功能。本研究利用 SNP (Single nucleotide polymorphisms) 分子标记对 150 份小麦种质资源材料进行分子检测,同时对其高分子量麦谷蛋白亚基进行 SDS-PAGE 分析,验证 *1By8* 标记的可靠性,明确含 *1By8* 基因的部分品种资源,以便于今后的品质改良育种研究。

1 材料和方法

1.1 供试材料

试验所用的材料为河南省农科院小麦研究中心丰优育种室于 2007 年秋季种植荥阳试验基地的育种亲本材料圃种子,于 2008 年 6 月份收获。对照材料为 Kukri (不含 *1By8* 亚基) 和 Tasman (含 *1By8* 亚基),来自澳大利亚联邦科学院。每份材料各取 20 粒,置于铺好滤纸的培养皿内,于 20℃ 生化培养箱内培养 10 d,取幼苗提取 DNA。

1.2 SNP 分析

1.2.1 DNA 的提取 采用微量 CTAB 法提取小麦幼苗的基因组 DNA。

1.2.2 *1By8* 亚基的引物序列 引物由 Lei 研究开发^[13],由上海生物工程有限公司合成。序列为: F: TTAGCGCTAAGTGCCGTCT; R: TTGTCCTATTGCTGCCCT。含有 *1By8* 基因的材料经 PCR 可扩增出清晰的 527 bp 的片段。

1.2.3 反应体系和扩增程序 扩增体系为 20 μL,由 1 U 的 *Tag* DNA 聚合酶 (Hotstar)、1 × PCR 缓冲液 (含有 1.5 mmol/L 的 $MgCl_2$)、10 pmol 的引物、200 μmol/L 的 dNTP 混合物以及 50 ng 的模板 DNA 组成。

扩增程序: 95℃ 30 s 1 个循环; 94℃ 30 s、62℃ 30 s 以及 72℃ 90 s 共 38 个循环; 72℃ 10 min, 10℃ 保存。

扩增产物用 1.4% 的琼脂糖凝胶 (含 EB) 电泳,置于紫外灯下检测 DNA 条带。

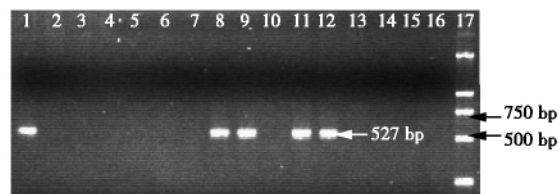
1.3 *HMW-GS* 的 SDS-PAGE 分析鉴定

HMW-GS 的提取和电泳按照 Wan^[17] 的方法进行,亚基命名按 Payne^[18] 命名系统。

2 结果与分析

2.1 *1By8* 亚基基因型的特异 PCR 标记

在 DNA 提取、PCR 扩增、凝胶电泳等步骤中,都增设了阴性对照 (CK1) 和阳性对照 (CK2)。阴性对照为 Kukri, 未含 *1By8* 亚基; 阳性对照为 Tasman, 含 *1By8* 亚基。各供试小麦资源材料基因组 DNA 重复扩增 2 次,结果表明: 150 个小麦品种 (品系) 中有 43 个可扩增出 1 条 527 bp 的 DNA 片段,其他品种 (品系) 未检测到该条带 (表 1),说明这 43 个小麦品种 (品系) 含有 *1By8* 基因。图 1、图 2 为部分品种 (品系) *1By8* 亚基引物扩增结果。

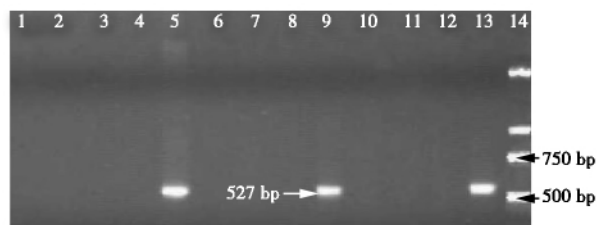


1. Tasman (CK1); 2. Kukri (CK2); 3. 太空 5 号; 4. C883; 5. NSR-5; 6. 新麦 19; 7. 豫麦 21 号; 8. 郑麦 366; 9. 郑麦 98; 10. 周麦 16; 11. 郑麦 8902; 12. 豫麦 13 号; 13. 豫麦 66 号; 14. 00 中 13; 15. 豫麦 55 号; 16. 豫麦 54 号; 17. Marker DL2000。

1. Tasman (CK1); 2. Kukri (CK2); 3. Taikong 5; 4. C 883; 5. NSR-5; 6. Xinmai 19; 7. Yumai 21; 8. Zhengmai 366; 9. Zhengmai 98; 10. Zhoumai 16; 11. Zhengmai 8902; 12. Yumai 13; 13. Yumai 66; 14. 00 zhong 13; 15. Yumai 55; 16. Yumai 54; 17. Marker DL 2000。

图 1 部分品种 (品系) *1By8* 亚基引物扩增结果

Fig. 1 *HMW* glutenin subunits at *Glu-B1* locus of partly wheat varieties (lines) detected by PCR marker



1. 郑麦 9694; 2. 豫农 9901; 3. 皖麦 53 号; 4. 洛旱 3 号; 5. 豫麦 47 号; 6. 烟农 21 号; 7. 国麦 1 号; 8. 内乡 991; 9. 郑优 16; 10. 02 中 46; 11. 中 211; 12. Ku kri (CK2); 13. Tasman (CK1); 14. Marker DL2000。

1. Zhengmai 9694; 2. Yunong 9901; 3. Wanmai 53; 4. Luohan 3; 5. Yumai 47; 6. Yannong 21; 7. Guomai 1; 8. Neixiang 991; 9. Zhengyou 16; 10. 02 Zhong 46; 11. Zhong 211; 12. Kukri (CK2); 13. Tasman (CK1); 14. Marker DL 2000。

图 2 部分品种 (品系) *1By8* 亚基引物扩增结果

Fig. 2 *HMW* glutenin subunits at *Glu-B1* locus of partly wheat varieties (lines) detected by PCR marker

续表 1:

品种(系) Varieties(ines)	By8	Glu-B1	品种(系) Varieties(lines)	By8	Glu-B1	品种(系) Varieties(lines)	By8	Glu-B1
豫麦 21 号 Yumai 21 hao	-	7 + 9	漯麦 5585 Luomai 5585	-	7 + 9	轮选 987 Lunxuan 987	-	14 + 15
周麦 19 Zhoumail 19	-	7 + 9	内乡 991 Neixiang 991	-	7 + 9	苏引 10 号 Suyin 10 hao	-	7 + 9
周麦 13 Zhoumail 13	-	7 + 9	兰考矮早 8 Lankaoaizao 8	-	7 + 9	淮麦 18 Huaimai 18	+	7 + 8
百农 3217 Bainong 3217	-	7 + 9	新源 958 Xinyuan 958	-	14 + 15	淮麦 20 Huaimai 20	+	7 + 8
豫麦 54 号 Yumai 54 hao	-	7 + 9	偃师 9900 Yanshi 9900	-	7 + 9	贵农 17 Guinong 17	-	7 + 9
豫农 9901 Yunong 9901	-	7 + 9	原泛 3 号 Yuanfan 3 hao	+	7 + 8	川农 17 号 Chuannong 17	-	7 + 9
矮抗 58 Aikang 58	+	7 + 8	皖麦 38 号 Wanmai 38 hao	+	7 + 8	03/6131	-	7 + 9
花培 1 号 Huapei 1 hao	-	7 + 9	皖麦 46 号 Wanmai 46 hao	-	7 + 9	03-C14	+	7 + 8
豫麦 66 号 Yumai 66 hao	-	7 + 9	安顺 97-3 Anshun 97-3	-	7 + 9	96G8	-	7 + 9
兰考 4 号 Lankao 4 hao	-	7 + 9	小偃 6 号 Xiaoyan 6 hao	-	14 + 15	HY949	+	7 + 8
新麦 9178 Xinmai 9178	-	20	陕优 225 Shanyou 225	-	14 + 15	82C6-3-1	-	7 + 9
郑资 8204Zhengzi 8204	+	7 + 8	西农 2208 Xinong 2208	-	7 + 9	924122	-	7 + 9
百农 9833Bainong 9833	-	20	烟 1604 Yan 1604	+	7 + 8	97460-6-7-2	-	7 + 9
郑麦 8902 Zhengmai 8902	+	7 + 8	烟优 19 号 Yanyou19 hao	-	22	BYD-4B	-	7 + 9
郑麦 91138Zhengmai 91138	+	7 + 8	烟农 21 号 Yannong 21 hao	-	13 + 16	Tasman	+	7 + 8
郑麦 961 Zhengmai 961	-	7 + 9	烟农 278 Yannong 278	-	7 + 9	HY9676	-	7 + 9
郑麦 831 Zhengmai 831	-	7 + 9	烟农 1668 Yannong 1668	-	7 + 9	KOSUTA	+	7 + 8
郑麦 003 Zhengmai 003	-	7 + 9	烟农 2801 Yannong 2801	-	7 + 9	ZLATKA	-	7 + 9
郑麦 9962 Zhengmai 9962	+	7 + 8	烟农 99-5 Yannong 99-5	-	7 + 9	Kukri	-	7 + 8
郑丰 98411Zhengfeng 98411	-	14 + 15	良星 99 Liangxing 99	+	7 + 8	POBEDA	-	7 + 9
丰优 8 号 Fengyou 8 hao	+	7 + 8	泰山 23 Taishan 23	+	7 + 8	RENESNASA	-	7 + 9
新麦 12 Xinmai 12	-	14 + 15	泰山 21 号 Taishan 21 hao	-	7 + 9	NIZIJA	-	7 + 9
新冬 18 Xindong 18	+	7 + 8	山农 627 Shannong 627	+	7 + 8	SREMICA	-	7 + 9
新麦 9526 Xinmai 9526	-	7 + 9	山农 2013 Shannong 2013	+	7 + 8	NSO. 1080	-	7 + 9
C883	-	7 + 9	山农 664 Shannong 664	+	7 + 8	NSO. 1084	-	7 + 9
99488	-	7 + 9	济麦 20 Jimai 20	-	14 + 15	NSR-5	-	20
9204	-	7 + 9	济麦 975288 Jimai 975288	+	7 + 8	PESMA	-	7 + 9
国麦 1 号 Guomai 1 hao	-	7 + 9	藁城 8901 Gaocheng 8901	+	7 + 8	TARA	-	7
豫麦 55 号 Yumai 55 hao	-	7 + 9	藁优 9407 Gaoyou 9407	+	7 + 8	DICNA	-	7
强筋 2 号 Qiangjin 2 hao	+	7 + 8	藁优 9415 Gaoyou 9415	+	7 + 8	EVROPA90	-	7
豫农 92349Yunong 92349	-	7 + 9	石 4185 Shi 4185	-	7 + 9	KG-56	-	14 + 15
原泛 2 号 Yuanfan 2 hao	+	7 + 8	石家庄 8 号 Shijiazhuang 8 hao	-	7 + 9	BPM14	+	7 + 8
偃展 1 号 Yanzhan 1 hao	-	14 + 15	石 98-6123 Shi 98-6123	-	7 + 9	毕 2001-2 Bi 2001-2	-	7 + 9
洛旱 3 号 Luohan 3 hao	-	7 + 9	石 987136 Shi 987136	-	7 + 9	意大利硬粒 Italian durum	-	6 + 9/20
洛麦 8889 Luomai 8889	-	7 + 9	石 00-7221 Shi 00-7221	-	7 + 9	法国麦 French wheat	+	7 + 8

注：+ 和 - . 分别表示含有 1By8 亚基和不含有 1By8 亚基。
Note: + and - . Indicate the presence and absence of 1By8 subunit respectively.

3 讨论

传统鉴定 *HMW-GS* 的方法是谷蛋白的 SDS-PAGE ,该方法虽然一次就能鉴定某一品种所有 *HMW-GS* 的组成 ,但也存在明显的缺陷 ,如 *HMW-GS* 的迁移率并不总是与其分子量大小呈正相关^[19] ,而且对那些相对迁移率近似的亚基很难进行准确的鉴定 ,例如 ,原先通过 SDS-PAGE 鉴定的 *Glu-B1b*(*Bx7* + *By8*) 现在可进一步区分为 4 个不同的等位基因: *Glu-B1b*(*Bx7* + *By8*) 、*Glu-B1u*(*Bx7** + *By8*) 、*Glu-Blak*(*Bx7** + 8*) 以及 *Glu-Blal*(*Bx7* + *By8**)^[20 21] ;对于不表达的 *HMW-GS* 基因如 *1A_xnull*、*1A_y* 等 , SDS-PAGE 方法无法进行鉴定;高分子量麦谷蛋白亚基基因的表达受环境条件和发育阶段的影响 , SDS-PAGE 方法只能等种子收获之后才能对后代的 *HMW-GS* 组成进行鉴定 ,周期较长。与蛋白质的

SDS-PAGE 标记相比 ,分子标记应用于作物育种研究可显著提高育种的准确性和效率 ,DNA 分子标记有其独特的优越性:可直接对 *HMW-GS* 的基因进行检测 ,适于植物生长的任何阶段 ,结果不受环境变异影响以及快速和分析量大等许多优点^[22]。

本研究结果表明 ,在自然条件下 ,利用 1By8 亚基的特异 PCR 标记鉴定 1By8 的基因型与其生化标记结果一致 ,均能筛选出含有 8 亚基的条带 ,说明利用 1By8 亚基特异 PCR 标记选择携带 1By8 亚基的优质基因型不仅可行 ,而且准确可靠。因此认为 1By8 标记完全可以代替 SDS-PAGE 分析 ,在小麦品质育种中对位于 *Glu-B1* 位点的理想的等位基因进行选择。因此 ,该 1By8 亚基的 PCR 标记可以应用于小麦品质分子育种工作中。

本试验分析的 150 份资源材料中 ,有 43 个品种 (品系) 携带 1By8 基因 ,携带率为 28.6% ,所占比例

较低。因此,要改良我国小麦品种的品质状况,应加强引进和利用优质谷蛋白亚基,提高优质亚基在小麦品种中的频率。

参考文献:

- [1] 林作楫,雷振生,杨攀,等. 中国小麦品质育种进展与问题[J]. 河南农业科学, 2007(2): 5-7.
- [2] 孟超敏,姬俊华,郑跃进,等. 小麦营养品质及其改良的研究进展[J]. 河南农业科学, 2006(11): 9-11.
- [3] Payne P I, Nightingale M A, Krattiger A F *et al.* The relationship between HMW glutenin subunit composition and the bread making quality of British grown wheat varieties[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 1987, 40(1): 51-65.
- [4] 陈喜文,陈德富,李永君. 小麦蛋白质含量分子标记辅助选择的效果分析[J]. 华北农学报, 2007, 22(2): 39-42.
- [5] 叶丛云,焦湔,秦广雍,等. 小麦高分子量谷蛋白亚基与品质性状的关系研究进展[J]. 河南农业科学, 2006(6): 10-13.
- [6] Payne P I, Nightingale M A, Krattiger A F *et al.* The relationship between HMW gluten in subunits composition and the bread making quality of British grown wheat varieties[J]. J Sci Food Agric, 1987, 40: 51-65.
- [7] Branlard G, Dardevet R, Saccomano F *et al.* Genetics diversity of wheat storage proteins and bread wheat quality[J]. Euphytica, 2001, 119: 59-67.
- [8] 张之为,张立平,赵昌平,等. 二系杂交小麦 HMW-GS 组成与品质关系的初步研究[J]. 华北农学报, 2009, 24(1): 149-153.
- [9] 杨学举,陈荣敏,郎明林. 小麦高分子量麦谷蛋白亚基组合与品质性状的关系[J]. 华北农学报, 1999, 14(增刊): 11-14.
- [10] 魏益民. 谷物品质与食品品质 - 小麦籽粒品质与食品品质[M]. 西安: 陕西人民出版社, 2002.
- [11] Liu L, He Z H, Yan J *et al.* Allelic variation at the Glu21 and Glu23 loci, presence of the 1B 1R translocation and their effects on mixographic properties in Chinese bread wheat[J]. Euphytica, 2005, 142: 197-204.
- [12] He Z H, Liu L, Xia X C *et al.* Composition of HMW and LMW glutenin subunits and their effects on dough properties, pan bread, and noodle quality of Chinese bread wheat[J]. Cereal Chem, 2005, 82: 345-350.
- [13] Z S Lei, K R Gale, Z H He *et al.* Y-type gene specific markers for enhanced discrimination of high-molecular weight glutenin alleles at the Glu-B1 locus in hexaploid wheat[J]. Journal of Cereal Science, 2006, 43: 94-101.
- [14] Ahmad M. Molecular marker-assisted selection of HMW glutenin alleles related to wheat bread quality by PCR-generated DNA markers[J]. Theor Appl Genet, 2000, 101: 892-896.
- [15] Radovanovic N, Cloutier S. Gene-assisted selection for high molecular weight glutenin subunits in wheat doubled haploid breeding programs[J]. Molecular Breeding, 2003, 12: 51-59.
- [16] Ma W, Zhang W, Gale K R. Multiplex-PCR typing of high-molecular-weight glutenin subunit alleles in wheat[J]. Euphytica, 2003, 134: 51-60.
- [17] Wan Y F, Wang D W. Isolation and characterization of five novel high molecular weight glutenin subunits from *Triticum timopheevi* and *Aegilops cylindrica*[J]. Theor Appl Genet, 2002, 104: 828-839.
- [18] Payne P I, Phil Trans R, SOC L B. Correlations between the heritance of certain high-molecular-weight subunit of glutenin and bread making quality in progenies of six crosses of bread wheat[J]. Nature-U K, 1983, 304: 359-371.
- [19] Shewry P R, Halford N G, Tatham A S. The high-molecular-weight subunits of wheat glutenin[J]. Journal of Cereal Science, 1992, 15(2): 105-120.
- [20] Butow B J, Ma W J, Gale K R *et al.* Molecular discrimination of Bx7 alleles demonstrates that overexpression has a major impact on wheat flour dough strength[J]. Theor Appl Genet, 2003, 107: 1524-1532.
- [21] Lukow O M, Forsyth S A, Payne P I. Over-production of HMW glutenin subunits coded on chromosome 1B in common wheat, *Triticum aestivum* [J]. J Genet Breed, 1992, 46: 187-192.
- [22] Gupta P K, Varshney R K, Sharma P C *et al.* Molecular markers and their applications in wheat breeding[J]. Plant Breeding, 1999, 118: 369-390.