

4 套强筋小麦 HMW-GS 多重 PCR 体系的构建

尉倩¹ 王亮^{2,3} 王晓龙¹ 张晓科^{1,3} 穆培源^{2,3} 范锋贵¹ 任万杰¹ 梁强¹ 李威¹

(1. 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;

2. 新疆农垦科学院 作物研究所 新疆 石河子 832000; 3. 谷物品质与遗传改良兵团重点实验室 新疆 石河子 832000)

摘要: 小麦高分子量麦谷蛋白亚基(HMW-GS)组成与其加工品质密切相关,建立其相关简便有效的遴选体系对小麦品质评价和优质品种选育具有重要意义。本研究选用对小麦品质有重要影响的 HMW-GS 基因的特异性分子标记,基于 26 份已知 HMW-GS 组成的小麦品种(系)检测验证基础上,建立强筋小麦 HMW-GS 基因的多重 PCR 检测体系。已建立了 4 套多重 PCR 体系:体系 I 同时检测 *Axnull* 与 *By8* 基因,体系 II 检测 *By8* 与 *Dx5* 基因,体系 III 同时检测 *Axnull*、*By8* 与 *Dx5* 基因,体系 IV 同时检测 *Axnull*、*Bx14* 与 *Dx5* 基因。利用每个体系对 26 份品种(系)进行检测,其结果与已知结果一致,说明创建的 4 套多重 PCR 体系稳定结果可靠,可用于强筋小麦品种的分子辅助选择和品质评价。

关键词: 小麦;高分子量麦谷蛋白亚基;多重 PCR

中图分类号: S512.03 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2011)04-0207-06

Establishment of Four Multiplex PCR Systems for HMW-GS with Strong Glutenin Properties in Common Wheat

WEI Qian¹, WANG Liang^{2,3}, WANG Xiao-long¹, ZHANG Xiao-ke^{1,3}, MU Pei-yuan^{2,3},
FAN Feng-gui¹, REN Wan-jie¹, LIANG Qiang¹, LI Wei¹

(1. College of Agronomy, Northwest Agricultural and Forestry University, Yangling Sub-Center of National Wheat Improvement Center, Yangling 712100, China; 2. Institute of Crop Science, Xinjiang Academy of Agri-Reclamation Sciences, Shihezi 832000, China; 3. Key Lab of Xinjiang Production and Construction Corps for Cereal Quality Research and Genetic Improvement, Shihezi 832000, China)

Abstract: High-molecular-weight glutenin subunits (HMW-GS) are closely correlated with the processing quality of common wheat. Establishment related select systems which are simple and convenient is very important to evaluate wheat quality and select new wheat cultivars with good qualities. According to the molecular markers for genes controlling important qualities, four types of multiplex PCR detection systems for strong-gluten wheat were developed and validated using 26 Chinese wheat cultivars and advanced lines with known HMW-GS (genes). The first multiplex PCR was used to simultaneously detect genes *Axnull* and *By8*, the second one was to detect the genes *By8* and *Dx5*, the third multiplex PCR included three genes *Axnull*, *By8* and *Dx5*, the fourth one was to detect the genes *Axnull*, *Bx14* and *Dx5*. After the 26 Chinese wheat cultivars were detected using the four types of multiplex PCRs, respectively, their results were consistent with those of the known. The results indicated that the four multiplex PCRs established in the present study were stable and reliable. The multiplex PCRs would be effectively used to evaluate and select wheat quality properties in wheat breeding programs.

Key words: Wheat; High-molecular-weight glutenin subunit; Multiplex PCR

小麦胚乳中的麦谷蛋白和醇溶蛋白占籽粒总蛋白的 85% 左右,是面筋的主要成分,其含量和组成

收稿日期: 2011-02-02

基金项目: 新疆兵团科技支疆计划(2008ZJ10); 引进国际先进农业科学技术计划(“948”计划)项目(2006-G2); 西北农林科技大学唐仲英育种基金资助

作者简介: 尉倩(1987-),女,陕西凤翔人,硕士研究生,主要从事小麦遗传育种研究。

通讯作者: 张晓科(1965-),男,陕西岐山人,教授,博士,博士生导师,主要从事小麦品质和适应性研究。

穆培源(1968-),男,新疆兵团人,副研究员,硕士,主要从事小麦育种和品质研究。

比例决定小麦加工品质的优劣^[1],尤其是麦谷蛋白对小麦深加工品质起着决定性的作用。按照在 SDS-PAGE 电泳上迁移率的不同,麦谷蛋白分为高分子量谷蛋白亚基(HMW-GS)和低分子量谷蛋白亚基(LMW-GS)。HMW-GS 对小麦品质的重要贡献已得到公认,不同 HMW-GS 对品质效应大小不同。比如 *Glu-A1* 位点编码的 2* 和 1 亚基,*Glu-B1* 位点的 7+8、14+15 和 17+18 等亚基(对),*Glu-D1* 位点的 5+10 亚基(对),均与面筋强度密切正相关^[2]。近年来,品质改良已成为我国小麦育种的重要目标,也已取得了一定进展。但与发达国家相比,国内优质小麦品种,特别是强筋小麦的数量和质量仍有较大差距,造成这种现状的一个重要原因就是缺乏适合育种早代的微量、快速、有效的品质评选技术和方法。

SDS-PAGE 是分离和鉴定 HMW-GS 的传统方法,但因其对分子量相近而功能不同的亚基不能准确区分,往往导致结果读取错误,如 14+15 与 20、2 与 2* 等。此外,该方法操作过程费时费力,影响检测效率。随着 HMW-GS 相关基因分子标记的不断开发,利用 PCR 技术对 HMW-GS 的鉴定成为了一种快速有效的方法。而与单一基因分子标记的 PCR 相比,含多对引物的多重 PCR 一次就能鉴定两个或两个以上基因,工作效率显著提高,检测成本明显降低^[3]。建立稳定优质亚基检测的多重 PCR 体系,可提高我国小麦品质评价和育种选育效率。

到目前为止,国内外已报道了数套优质 HMW-GS 基因的多重 PCR 体系^[3-5]。Ma 等^[3]建立了检测基因 *Ax2**、*Bx17* 和 *Dx5* 的多重 PCR 体系,但由于

引物间的错配,在含有 *Ax2** 的材料中未能扩增出目的条带。张晓科等^[4]建立了结果稳定可靠的检测 *Ax2**、*Bx17* 和 *Dx5* 基因的多重 PCR 体系。郑寒等^[5]开发了一个能检测 *Axnull*、*Bx7^{OE}* 和 *Dx5* 基因的多重 PCR 体系。建立 HMW-GS 基因多重 PCR 检测体系已成为国内外小麦品质研究的一个热点。但从国内外报道来看,构建的多重 PCR 体系在 *Glu-B1* 位点的亚基选择上主要集中在 17 和 7^{OE} 上,而 HMW-GS 在 *Glu-B1* 位点的变异类型最多,与品质密切相关亚基(对)还有很多,如 7+8 和 14+15 等,这些亚基是我国小麦育种中常选择的优质亚基。为此,本研究利用已开发相关亚基的特异性分子标记,基于对已知 HMW-GS 组成的品种(系)检测验证基础上,构建 4 套强筋小麦多重 PCR 体系,使 HMW-GS 基因多重 PCR 检测的体系更加多样性,检测亚基基因的数目更多,更适合我国小麦育种的应用,提高我国优质强筋小麦新品种的选育效率,丰富品种品质鉴定和预测的手段。

1 材料和方法

1.1 试验材料

选用 26 份小麦品种(系)作为试验材料(表 1),这些材料已由刘丽^[6]和王亮等^[7]采用 SDS-PAGE 方法进行了分析,其 HMW-GS 组成已知。所选品种(系)涉及了 3 个 HMW-GS 位点常见的各种变异类型,适合 HMW-GS 多重 PCR 体系的构建和验证。

1.2 DNA 提取

每份材料取黄化苗叶片,采用 CTAB 法^[8]提取基因组 DNA。

表 1 构建 4 套多重 PCR 体系所用的品种(系)及其 HMW-GS 组成

Tab. 1 Wheat varieties (lines) used to develop four types of multiplex PCR and compositions of their HMW-GS

| 品种(系) Cultivar (line) | <i>Glu-A1</i> | <i>Glu-B1</i> | <i>Glu-D1</i> | 品种(系) Cultivar (line) | <i>Glu-A1</i> | <i>Glu-B1</i> | <i>Glu-D1</i> |
|--------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------------------|---------------|---------------|---------------|
| 中国春 Chinese Spring | N | 7+8 | 2+12 | 济麦 19 Jimai19 | 0 | 7+8 | 5+10 |
| 中优 9701 Zhongyou 9701 | N | 7+8 | 5+10 | 济麦 20 Jimai20 | 1 | 13+16 | 4+12 |
| 中麦 16 Zhongmai16 | N | 7+9 | 4+12 | 鲁麦 21 Lumai21 | 1 | 7+8 | 4+12 |
| 农大 3291 Nongda3291 | N | 6+8* | 3+12 | 陕 229 Shaan229 | 1 | 14+15 | 5+10 |
| 农大 99-5009 Nongda99-5009 | N | 7*+8 | 2+12 | 陕 253 Shaan253 | N | 14+15 | 5+10 |
| 小偃 54 Xiaoyan54 | 1 | 14+15 | 2+12 | 西农 8925-13 Xinong 8925-13 | 2* | 14+15 | 2+12 |
| 晋麦 61 Jinmai61 | 1 | 7+8 | 4+12 | 小偃 6 号 Xiaoyan6 | 1 | 20 | 2+12 |
| 冀 5066 Ji5066 | 1 | 17+18 | 2+12 | 小偃 22 Xiaoyan22 | N | 7+9 | 2+12 |
| 冀优 8901 Gaoyou8901 | 1 | 7+8 | 5+10 | N9209-3 | 1 | 7 | 2+12 |
| 沧核 030 Canghe030 | N | 20 | 5+10 | 皖麦 33 Wanmai33 | 1 | 20 | 5+10 |
| 郑 9023 Zheng9023 | N | 7+8 | 2+12 | 鄂 91727 E91727 | 1 | 14+15 | 2+12 |
| 郑麦 992 Zhengmai992 | N | 17+18 | 2+12 | 绵阳 98-17 Mianyang98-17 | N | 17+18 | 5+10 |
| 豫麦 34 Yumai34 | 1 | 7+8 | 5+10 | 新冬 22 Xindong22 | 2* | 7+8 | 5+10 |

注:亚基组成资料来自刘丽^[6]和王亮等^[7]。

Note: Data for allelic variations was from Liu^[6] and Wang *et al.* ^[7]

1.3 多重 PCR 扩增和电泳

本研究共构建 4 套 HMW-GS 多重 PCR 检测体系 相应的标记及引物序列(上海生工生物技术有限公司)列于表 2。体系 I 同时检测基因 *Axnull* 与 *By8* ,体系 II 检测基因 *By8* 与 *Dx5* ,体系 III 检测基因 *Axnull*、*By8* 与 *Dx5* ,体系 IV 检测基因 *Axnull*、*Bx14* 与 *Dx5*。所有 PCR 反应总体系均为 20 μ L ,其中包括

混合酶(Mastermix)(北京康为世纪生物科技有限公司)10 μ L ,模板 DNA 浓度为 50 ~ 100 ng。PCR 扩增反应在 PTC-200 型 PCR 扩增仪上进行 ,用 1 \times TAE 溶液的琼脂糖凝胶进行电泳 ,EB 染色后观察并照相。每个体系具体的 PCR 反应体系、扩增程序和电泳条件 列于表 3。

表 2 标记的引物序列及其预期扩增片段大小

| Tab.2 Sequences and expected amplification fragment sizes of the targeted genes | | | |
|---|---|------------------------------|-----------------------------|
| 基因 Gene | 引物序列 Sequences of primers | 扩增片段大小/bp Size of product | 参考文献 Reference |
| <i>Axnull</i> | F:ACGTTCCTTACAGTACTA R:ATCACTGGCTAGCCGACAA | 920 | Lafiandra <i>et al.</i> [9] |
| <i>By8</i> | F:TTAGCGCTAAGTCCCGTCT R:TTGTCTATTGCTGCCCTT | 527 | Lei <i>et al.</i> [10] |
| <i>Bx14</i> | F:TAAGCGCTGCTCCTCTTTGCCG R:CTTGTTGTGCTTGTCGGAT | 1 256 | Li <i>et al.</i> [11] |
| <i>Dx5</i> | F:GCCTAGCAACCTTCACAATC R:GAAACCTGCTGCGGACAAG | 450 | Anderson <i>et al.</i> [12] |

表 3 4 套体系多重 PCR 反应和电泳条件

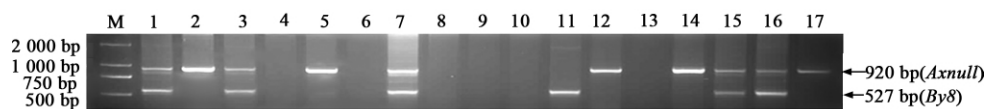
| Tab. 3 Conditions for four multiplex PCR programs | | | | | | | | | | | |
|---|--|----------------------------|------------|----------------------------|------------|----------------------------|------------|------------|----------------------------|-------------|------------|
| 多重 PCR 体系 Multiplex PCR | | I | | II | | III | | | IV | | |
| 基因 Gene | | <i>Axnull</i> | <i>By8</i> | <i>By8</i> | <i>Dx5</i> | <i>Axnull</i> | <i>By8</i> | <i>Dx5</i> | <i>Axnull</i> | <i>Bx14</i> | <i>Dx5</i> |
| PCR 反应液组分 PCR reaction components | | | | | | | | | | | |
| 混合酶/ μ L MasterMix | | 10 | | 10 | | 10 | | | 10 | | |
| 每个 dNTP 用量/(μ mol/L) Each of dNTP | | 200 | | 200 | | 200 | | | 200 | | |
| 引物浓度/(μ mol/L) | | 0.6/0.6 | | 0.6/0.6 | | 0.6/0.6/0.5 | | | 0.5/0.5/0.5 | | |
| Concentration of PCR primers for each gene | | | | | | | | | | | |
| PCR 扩增程序 PCR amplification conditions | | | | | | | | | | | |
| 预变性 Predenature | | 95 $^{\circ}$ C 5 min | | 94 $^{\circ}$ C 10 min | | 95 $^{\circ}$ C 5 min | | | 95 $^{\circ}$ C 5 min | | |
| 变性 Denature | | 94 $^{\circ}$ C 30 s | | 94 $^{\circ}$ C 1 min | | 94 $^{\circ}$ C 30 s | | | 94 $^{\circ}$ C 30 s | | |
| 退火 Annealing | | 62 $^{\circ}$ C 30 s | | 62 $^{\circ}$ C 45 s | | 62 $^{\circ}$ C 30 s | | | 62 $^{\circ}$ C 30 s | | |
| 延伸 Extension | | 72 $^{\circ}$ C 1 min 30 s | | 72 $^{\circ}$ C 1 min 50 s | | 72 $^{\circ}$ C 1 min 30 s | | | 72 $^{\circ}$ C 1 min 45 s | | |
| 循环数/次 No. of cycles | | 35 | | 35 | | 35 | | | 35 | | |
| 最后延伸 Final extension | | 72 $^{\circ}$ C 10 min | | 72 $^{\circ}$ C 10 min | | 72 $^{\circ}$ C 10 min | | | 72 $^{\circ}$ C 10 min | | |
| 凝胶电泳 Gel electrophoresis | | | | | | | | | | | |
| 琼脂糖/% Agarose | | 2 | | 2 | | 2 | | | 2 | | |
| 电压/V Voltage | | 150 | | 150 | | 130 | | | 130 | | |
| 时间/h Time | | 1 | | 1 | | 1 | | | 1 | | |

2 结果与分析

2.1 *Axnull* 和 *By8* 的多重 PCR 体系

Axnull 标记是用来检测编码 *Glu-A1* 位点亚基缺失的基因 ,仅在该位点不表达 1 和 2* 亚基的材料中才扩增出 920 bp 的特异条带[9];*By8* 标记仅在 *Glu-B1* 位点表达 8 亚基的材料中扩增出 527 bp 的特异条带[9]。图 1 是利用体系 I 检测 17 份已知亚基组成材料 *Axnull* 和 *By8* 基因的结果。中国春等 5 份材料同时扩增出 920 527 bp 2 条特异条带 ,说明这些材料在 *Glu-A1* 位点含 *Axnull* 基因 ,此位点无亚基表达;在 *Glu-B1* 位点含 *By8* 基因 ,表达 8 亚基。中优

9701 等 5 份材料仅扩增出 1 条 920 bp 的条带 ,说明在 *Glu-A1* 位点含 *Axnull* 基因 ,此位点无亚基表达;*Glu-B1* 位点不含 *By8* 基因 ,无相应亚基表达。鲁麦 21 仅扩增出 1 条 527 bp 的条带 ,说明其含 *By8* 而无 *Axnull* 基因 ,表达相应亚基 8 和 1 或 2*。小偃 54 等 6 份材料未扩增出特异条带 ,说明这些材料在检测位点不含 *By8* 和 *Axnull* 基因 ,即 *Glu-A1* 位点为 1 或 2* 亚基 ,*Glu-B1* 位点无 8 亚基。利用多重 PCR 体系 I 检测表 1 内其余 9 份材料 ,由检测基因推断出的亚基结果同上述 17 份材料一样 ,均与刘丽[6]和王亮等[7]利用 SDS-PAGE 的鉴定结果完全一致。



M. 标准分子量 DL2000; 1. 中国春; 2. 中麦 16; 3. 中优 9701; 4. 小偃 54; 5. 农大 3291; 6. 冀 5066; 7. 农大 99-5009; 8. 小偃 6 号; 9. N9209-3; 10. 西农 8925-43; 11. 鲁麦 21; 12. 郑麦 992; 13. 鄂 91727; 14. 陕 253; 15. 郑 9023; 16. 济麦 19; 17. 沧核 030。

M. Marker DL2000; 1. Chinese Spring; 2. Zhongmai 16; 3. Zhongyou 9701; 4. Xiaoyan 54; 5. Nongda 3291; 6. Ji 5066; 7. Nongda 99-5009; 8. Xiaoyan 6; 9. N9209-3; 10. Xinong 8925-43; 11. Lumai 21; 12. Zhengmai 992; 13. E 91727; 14. Shaan 253; 15. Zheng 9023; 16. Jimai 19; 17. Canghe 030.

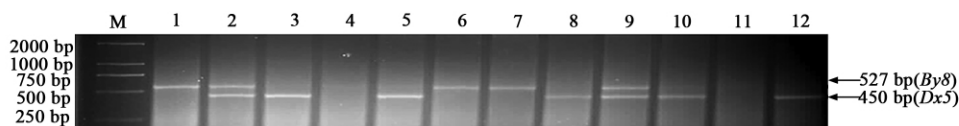
图1 *Axnull* 与 *By8* 基因标记的多重 PCR 琼脂糖凝胶电泳图谱

Fig. 1 Electrophoresis of amplified fragments with specific primers for genes *Axnull* and *By8* in a single PCR reaction

2.2 *By8* 和 *Dx5* 的多重 PCR 体系

在 *Glu-D1* 位点仅表达 5 (+10) 亚基的材料中, *Dx5* 标记才能扩增出 450 bp 的特异条带^[12]。图 2 是用体系 II 对已知亚基组成的 12 份材料的 *By8* 和 *Dx5* 基因的检测结果。从图 2 可看出, 中优 9701 和豫麦 34 同时扩增出 527/450 bp 2 条特异条带, 说明其含有 *By8* 和 *Dx5* 基因, 表达 8 亚基和 5 (+10) 亚基。中国春等 3 份材料仅扩增出 1 条 527 bp 的特

异条带, 说明含有 *By8* 无 *Dx5* 基因, 即表达 8 亚基。绵阳 98-47 等 5 份材料扩增出了 1 条 450 bp 的特异条带, 说明含有 *Dx5* 无 *By8* 基因, 表达 5 (+10) 亚基。小偃 54 和济麦 20 没有扩增出上述特异条带, 说明这两份材料不含 *By8* 和 *Dx5* 基因, 没有相应亚基表达。上述结果及表 1 中其余 14 份材料多重 PCR 体系 II 检测推断的亚基结果, 也与刘丽^[6]和王亮等^[7] SDS-PAGE 检测结果完全一致。



M. 标准分子量 DL2000; 1. 中国春; 2. 中优 9701; 3. 绵阳 98-47; 4. 小偃 54; 5. 皖麦 33; 6. 农大 99-5009; 7. 晋麦 61; 8. 陕 229; 9. 豫麦 34; 10. 沧核 030; 11. 济麦 20; 12. 陕 253。

M. Marker DL2000; 1. Chinese Spring; 2. Zhongyou 9701; 3. Mianyang 98-47; 4. Xiaoyan 54; 5. Wanmai 33; 6. Nongda 99-5009; 7. Jinmai 61; 8. Shaan 229; 9. Yumai 34; 10. Canghe 030; 11. Jimai 20; 12. Shaan 253.

图2 *By8* 与 *Dx5* 基因标记的多重 PCR 琼脂糖凝胶电泳图谱

Fig. 2 Electrophoresis of amplified fragments with specific primers for genes *By8* and *Dx5* in a single PCR reaction

2.3 *Axnull*、*By8* 和 *Dx5* 三个基因标记的多重 PCR 体系

图 3 是利用多重 PCR 体系 III 对 14 份已知材料 *Axnull*、*By8* 和 *Dx5* 基因的检测结果。从图 3 可看出, 中优 9701 同时扩增出 920/527/450 bp 3 条特异条带, 说明其在 *Glu-A1* 位点含 *Axnull* 基因, 此位点没有亚基表达; 在 *Glu-B1* 和 *Glu-D1* 位点分别含有 *By8* 和 *Dx5* 基因, 表达 8 和 5 (+10) 亚基。中国春扩增出 920 bp 和 527 bp 大小的 2 条片段, 说明中国春在 *Glu-A1* 位点含 *Axnull* 基因, 此位点亚基缺失; 在 *Glu-B1* 位点含 *By8* 基因, 表达 8 亚基。绵阳 98-17 和陕 253 均扩增出了 920/450 bp 2 条特异条带, 说明其在 *Glu-A1* 位点含 *Axnull* 基因, 此位点无亚基表达; 在 *Glu-D1* 位点含 *Dx5* 基因, 表达相应 5 (+10) 亚基; 豫麦 34 和冀优 9701 均扩增出了 527/450 bp 2 条特异条带, 说明其含有 *By8* 和 *Dx5* 基因无 *Axnull* 基因, 表达相应亚基 8、5 (+10) 和 1 或 2^{*}; 中麦 16 和郑麦 992, 仅扩增出了 920 bp 的 1 条特异条带, 说明其在 *Glu-A1* 位点含 *Axnull* 基因, 此位点无亚基表达; 晋麦 61 和鲁麦 21 仅扩增出了 527 bp 的 1 条带, 说明其在 *Glu-B1* 位点含有 *By8* 基因, 表达 8

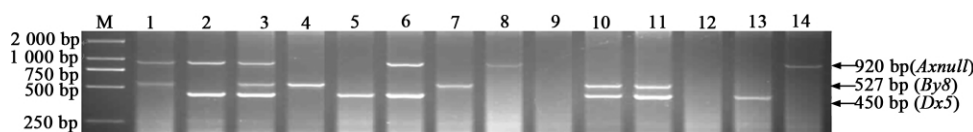
和 1 或 2^{*} 亚基; 陕 229 和皖麦 33 扩增出了 450 bp 的 1 条特异条带, 说明其在 *Glu-D1* 位点含有 *Dx5* 基因, 表达 5 (+10) 和 1 或 2^{*} 亚基; 小偃 54 和鄂 91727 未扩增出上述条带, 说明在检测位点不含 *Axnull*、*By8* 和 *Dx5* 基因, 即 *Glu-A1* 位点表达 1 或 2^{*} 亚基, *Glu-B1* 和 *Glu-D1* 位点不含相应亚基。上述结果和表 1 其余 12 份材料, 由该多重 PCR 体系检测基因推断的亚基结果一致, 也与刘丽^[6]和王亮等^[7] SDS-PAGE 检测的亚基结果一致。

2.4 *Axnull*、*Bx14* 和 *Dx5* 三个基因标记的多重 PCR 体系

在 *Glu-B1* 位点仅表达 14 (+15) 亚基的材料中, *Bx14* 标记才能扩增出 1 条 1256 bp 的特异条带^[11]。图 4 是利用多重 PCR 体系 IV 对 12 份已知亚基组成材料 *Axnull*、*Bx14* 和 *Dx5* 3 个位点基因的检测结果。从图 4 可看出, 陕 253 同时扩增出 920/1256/450 bp 3 条特异条带, 说明其在 *Glu-A1* 位点含 *Axnull* 基因, 此位点无亚基表达; 在 *Glu-B1* 位点含有 *Bx14* 基因, 表达 14 (+15) 亚基; 在 *Glu-D1* 位点含有 *Dx5* 基因, 表达相应的 5 (+10) 亚基。中优 9701 和绵阳 98-47 扩增出 920/450 bp 的 2 条特异

条带,说明这两份材料含有 *Axnull* 和 *Dx5* 基因无 *Bx14* 基因,在 *Glu-A1* 位点无亚基表达,在 *Glu-D1* 位点表达相应的 5(+10) 亚基。陕 229 同时扩增出 1 256 450 bp 2 条特异条带,说明其含有 *Bx14* 和 *Dx5* 基因而无 *Axnull* 基因,表达相应的 14(+15)、5(+10) 和 1 或 2* 亚基。小偃 54 和鄂 91727 仅扩增出了 1 256 bp 的 1 条特异条带,说明其含 *Bx14* 基因而无 *Axnull* 和 *Dx5* 基因,表达相应的 14(+15) 和 1 或

2* 亚基。农大 3291 等 4 份材料仅扩增出了 920 bp 的 1 条特异条带,说明其在 *Glu-A1* 位点含 *Axnull* 基因,无亚基表达。皖麦 33 和陕 229 两份材料仅扩增出 1 条 450 bp 的特异条带,说明其在 *Glu-D1* 位点含 *Dx5* 基因,表达 5(+10) 和 1 或 2* 亚基。表 1 其余 14 份材料运用此多重 PCR 体系的检测结果,也均与刘丽^[6]和王亮等^[7]研究的结果完全一致。

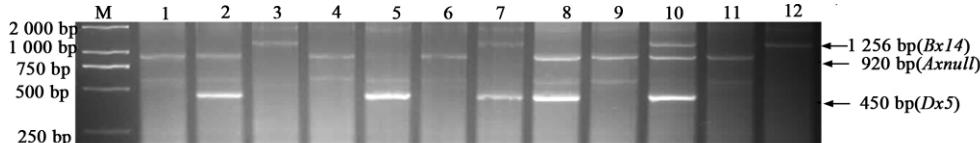


M. 标准分子量 DL2000; 1. 中国春; 2. 绵阳 98-47; 3. 中优 9701; 4. 晋麦 61; 5. 陕 229; 6. 陕 253; 7. 鲁麦 21; 8. 中麦 16; 9. 小偃 54; 10. 豫麦 34; 11. 冀优 8901; 12. 鄂 91727; 13. 皖麦 33; 14. 郑麦 992。

M. Marker DL2000; 1. Chinese Spring; 2. Mianyang 98-47; 3. Zhongyou 9701; 4. Jinmai 61; 5. Shaan 229; 6. Shaan 253; 7. Lumai 21; 8. Zhongmai 16; 9. Xiaoyan 54; 10. Yumai 34; 11. Gaoyou 8901; 12. E 91727 13. Wanmai 33; 14. Zhengmai 992.

图 3 *Axnull*、*By8* 和 *Dx5* 三个基因标记的多重 PCR 琼脂糖凝胶电泳图谱

Fig. 3 Electrophoresis of amplified fragments with specific primers for genes *Axnull* *By8* and *Dx5* in a single PCR reaction



M. 标准分子量 DL2000; 1. 中国春; 2. 中优 9701; 3. 小偃 54; 4. 农大 3291; 5. 皖麦 33; 6. 郑麦 992; 7. 陕 229; 8. 绵阳 98-47; 9. 小偃 22; 10. 陕 253; 11. 中麦 16; 12. 鄂 91727。

M. Marker DL2000; 1. Chinese Spring; 2. Zhongyou 9701; 3. Xiaoyan 54; 4. Nongda 3291; 5. Wanmai 33; 6. Zhengmai 992; 7. Shaan 229; 8. Mianyang 98-47; 9. Xiaoyan 22; 10. Shaan 253; 11. Zhongmai 16; 12. E 91727.

图 4 *Axnull*、*Bx14* 和 *Dx5* 三个基因标记的多重 PCR 琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 4 Electrophoresis of amplified fragments with specific primers for genes *Axnull* *Bx14* and *Dx5* in a single PCR reaction

3 讨论

Payne 等^[13,14]研究表明, HMW-GS 是决定小麦品质优劣的重要因素,其等位变异可解释品质差异的 30%~79%。因此,开发一种微量、快速、有效且不受生长环境条件、季节和样品种类影响或限制、能在小麦育种早代田间生长期鉴定 HMW-GS 组成的方法,就可以开展育种早代的品质评选工作。传统的 SDS-PAGE 方法检测 HMW-GS,首先要从收获的籽粒样品中提取蛋白,然后在凝胶中需要低温低电流长时间电泳分离,随后还需要经过固定、染色、褪色等一系列环节,程序繁琐复杂;同时,在结果读取过程中,对于分子量相近的亚基常常出现偏差等^[15,16]。分子标记辅助选择克服了以上缺点,是一种高效、可靠的检测方法。而与单一 PCR 相比,多重 PCR 一次可检测多对基因,操作过程只涉及 DNA 提取、PCR 扩增和电泳,环节少周期短;结果不受栽培环境影响,样品用量极少,且样品类型不受限制。因此,将分子标记辅助选择与常规育种结合,可提高小麦品质育种的效率,加快我国分子育种的实用化进程。

本研究通过体系不断优化,最终构建了 4 套用于检测强筋小麦优质 HMW-GS 组成的多重 PCR 体系。体系 I 直接检测 *Axnull* 和 *By8* 基因,可达到同时鉴定 *Glu-A1* 位点优质亚基基因 *Ax2** 或 *Ax1* 的目的;而体系 II 同时检测 *By8* 和 *Dx5* 基因,可确定待测材料是否携带对小麦品质贡献最大的 5(+10) 亚基。为了更快捷的检测,将体系 I 和体系 II 引物组合构建了体系 III,经过对引物比例和扩增程序的不断调试,构建了能同时检测 *Axnull*、*By8* 和 *Dx5* 3 个基因的体系 III;中优 9701 在 *Glu-A1* 位点没有亚基表达,在 *Glu-B1* 和 *Glu-D1* 位点分别表达 7+8 和 5+10 亚基,携带体系 III 所能检测的所有目标基因,PCR 扩增后在电泳图谱上也出现了所有基因的扩增条带,说明体系 III 内 6 条引物之间不存在相互错配和抑制作用。运用此体系可同时检测 *Glu-A1* 位点优质亚基基因 *Ax2** 或 *Ax1*, *Glu-D1* 位点基因 *Dx5* 和 *Glu-B1* 位点常见的亚基基因 *By8*。体系 IV 可同时直接检测 *Axnull*、*Bx14* 和 *Dx5* 3 个基因,陕 253 含 *Axnull*、*Bx14* 和 *Dx5* 基因,3 个目的基因通过该体系在陕 253 中均被检测出来,说明此体系内引物之间不存在相互抑制作用、体系配制比较合理。体系 IV

可达到同时鉴定 *Glu-A1* 位点优质亚基基因 *Ax2*^{*} 或 *Ax1*、*Glu-B1* 位点的优质亚基基因 *Bx14* 和 *Glu-D1* 位点与品质密切相关的亚基基因 *Dx5* 等 3 个位点 4 个基因的目的。本研究构建的包括检测 *Ax1* 或 *Ax2*^{*}、*By8*、*Bx14* 和 *Dx5* 等优质亚基基因的 4 套多重 PCR 体系,分别用已知亚基组成的材料进行验证,体系稳定结果可靠,丰富了 HMW-GS 多重 PCR 检测体系;与郑寒等^[5]已经建立的一套体系相比,本研究建立的体系涉及的亚基基因数目更多,检测效率更高。

多重 PCR 以其较高的扩增效率,较低的试验成本已逐渐成为小麦品质分子辅助选择和品质评价的又一重要鉴定手段,但多重 PCR 对于试验的条件要求比较严格,构建稳定和可靠的多重 PCR 体系是其能否大规模应用于育种中的关键。根据实践经验,在构建多重 PCR 体系时,可按以下步骤进行。首先,以 HMW-GS 组成已知小麦品种(系)的 DNA 为模板,对单个功能标记的引物对分别做退火温度的梯度 PCR,明确每对引物 PCR 出现清晰特异扩增条带的退火温度范围;然后,筛选出退火温度范围相近且扩增条带差异较大的引物对,合并成多重 PCR 扩增的引物组合,进行下步已知 HMW-GS 组成材料的多重 PCR 检测;最后,对组合的引物对不断进行 PCR 扩增和电泳分析,调试其引物对间的浓度配比(增加特异带扩增较弱的引物量,减少特异带扩增较强的引物量)、退火温度(没有出现特异条带时,可降低退火温度;出现杂带时,可适当升高退火温度)、延伸时间(特异条带较弱时,可适当延长延伸时间)等,最终建立稳定可靠的多重 PCR 体系。

4 结论

为了提高小麦品质改良的效率,建立了可检测 *Axnull*(*Ax2*^{*} 或 *Ax1*)、*By8*、*Bx14* 和 *Dx5* 等多个基因的 4 套多重 PCR 体系,用已知亚基组成的 26 份材料对所构建体系进行验证表明,4 套强筋小麦多重 PCR 体系稳定结果可靠,为小麦育种亲本评价和杂交代优质基因聚合的分子标记辅助选择提供了有效的技术和方法。

参考文献:

[1] He Z H, Pena R J, Rajaram S. Quality characteristics of Chinese spring wheats [C]//Li Z S, Xin Z Y. Proc 8th Interm Genet Symp. Beijing China, 1993, 4: 43 - 45.
[2] Payne P I, Law C N, Mudd E E, et al. Control by homologous group 1 chromosomes of the high-molecular-weight subunits of glutenin, a major protein of wheat endosperm [J]. Theor Appl Genet, 1980, 58: 113 -

120.
[3] Ma W, Zhang W, Gale K R, et al. Multiple PCR typing of high molecular weight glutenin alleles in wheat [J]. Euphytica, 2003, 134: 51 - 60.
[4] 张晓科, 夏先春, 王忠伟, 等. 小麦品质性状分子标记多重 PCR 体系的建立 [J]. 作物学报, 2007, 33(10): 1703 - 1710.
[5] 郑寒, 陈静, 任妍, 等. 小麦优质谷蛋白亚基分子标记多重 PCR 体系的建立与应用 [J]. 作物学报, 2009, 35(10): 1831 - 1835.
[6] 刘丽. 高低分子量麦谷蛋白亚基等位变异和 1B/1R 易位与小麦加工品质关系的研究 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2004.
[7] 王亮, 穆培源, 徐红军, 等. 新疆小麦品种高分子量麦谷蛋白亚基组成分析 [J]. 麦类作物学报, 2008, 28(3): 430 - 435.
[8] Jr Stewart C N, Via L E. A rapid CTAB DNA isolation technique useful for RAPD fingerprinting and other PCR applications [J]. Biotechniques, 1993, 14(5): 748 - 749.
[9] Lafiandra, Tucci G F, Pavoni A, et al. PCR analysis of x- and y-type genes present at the complex Glu-A1 locus in durum and bread wheat [J]. Theor Appl Genet, 1997, 94: 235 - 240.
[10] Lei Z S, Gale K R, He Z H, 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]. J Cereal Sci, 2006, 43: 94 - 101.
[11] Li W F, Wan Y F, Liu Z J. Molecular characterization of HMW glutenin subunit allele 1Bx14: further insights into the evolution of Glu-B1-4 alleles in wheat and related species [J]. Theor Appl Genet, 2004, 109: 1093 - 1104.
[12] Anderson D D, Greene F C. The characterization and comparative analysis of high-molecular-weight glutenin genes from genomes A and B of a hexaploid bread-wheat [J]. Theor Appl Genet, 1989, 77: 689 - 700.
[13] Payne P I, Corfield K G. Subunit composition of wheat glutenin protein, isolated by gel filtration in a dissociation Medium [J]. Planta, 1979, 145: 83 - 88.
[14] Payne P I, Rogers W J, Harinder K. The HMW glutenin subunit and gliadin composition of German grown wheat varieties and their relationship with bread-making quality [J]. Plant Breed, 1989, 103: 89 - 100.
[15] 温之雨, 张艳敏, 李辉, 等. 河北省小麦品种高分子量麦谷蛋白亚基遗传变异分析 [J]. 华北农学报, 2002, 17(51): 100 - 104.
[16] 杨学举, 陈荣敏, 郎明林, 等. 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(51): 13 - 16.