

# 小麦蛋白质含量分子标记辅助选择的效果分析

陈喜文, 陈德富, 李永君

(南开大学 生命科学学院, 天津 300071)

**摘要:** 对小麦回交后代的蛋白质含量进行了分子标记辅助选择研究。先对 2 个与蛋白质含量相关的 *Xgwm570* 和 *E41M62-168* 标记进行验证, 表明其与蛋白质含量密切相关。再通过表型选择、分子标记辅助选择(MASBC<sub>2</sub>)和不加选择(RNDBC<sub>2</sub>)产生的 BC<sub>2</sub> 中, 蛋白质含量的平均值和群体中蛋白质含量高于 16.5% 的植株比例在 PHEBC<sub>2</sub> 和 MASBC<sub>2</sub> 之间没有显著差异, 但均显著高于 RNDBC<sub>2</sub>。对群体中的植株按两分子标记的类型分为 A (2 个位点)、B (1 个位点) 和 C (无) 3 大类, 蛋白质含量的平均值和植株中蛋白质含量高于 16.5% 的比例从高到低的排列顺序为: A 类植株 > B 类植株 > C 类植株。由此看来, 利用分子标记辅助选择来培育高蛋白质含量小麦是十分有效的方法。

**关键词:** 小麦; 蛋白质含量; 分子标记辅助选择; 数量性状位点 (QTL)

中图分类号: S512.1<sup>+</sup> 1.033 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2007)02-0039-04

## Effect of Marker-assisted Selection on Protein Content in Wheat

CHEN Xi-wen, CHEN De-fu, LI Yong-jun

(College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China)

**Abstract:** Marker-assisted selection for protein content was conducted in backcross population in wheat. Experiments were designed first to confirm the linkage of molecular markers *Xgwm570*, *E41M62-168* with protein content. Comparison with backcross population developed through phenotypic selection (PHEBC<sub>2</sub>), by marker-assisted selection (MASBC<sub>2</sub>) and by random mating where no selection has been applied (RNDBC<sub>2</sub>), there was no significant difference between means of phenotypic and marker-assisted selection (16.2%) for protein content and the percentage of plants which have protein content higher than 16.5%, but significantly higher than RNDBC<sub>2</sub> population. When the backcross-derived plants were divided into A (two loci), B (one locus) and C (null) according to their molecular marker types, their protein content values and the percentage of plants which have protein content higher than 16.5% ranked from high to low is type A > type B > type C. From these we could conclude that marker-assisted selection is an efficient method to breed protein content in wheat.

**Key words:** Wheat; Protein content; Marker-assisted selection; Quantitative trait locus

蛋白质含量及其亚基组成是影响小麦制品的重要因素之一。一般来说, 含高分子量谷蛋白亚基 5 和亚基 10 的小麦面包加工品质好<sup>[1]</sup>, 但蛋白质含量有一个最低要求, 只有蛋白质含量在 15% 以上的小麦才适于制作面包<sup>[2]</sup>。研究表明, 小麦蛋白质含量是一复杂的数量性状, 受环境的影响大, 由分布于基因组的几个主效基因和多个微效基因控制<sup>[3, 4]</sup>。Kuspira 等<sup>[7]</sup>报道中国春的蛋白质含量基因位于染色体 3D, 4D, 5A, 5B 和 7B 上<sup>[5]</sup>, 而 Morris 等发现品种 Atlas 66 的高蛋白质含量基因位于 5D 染色体

上<sup>[6]</sup>。Stein 等<sup>[7]</sup>报道品种 Plainsman V 的高蛋白质含量的基因位于 1A, 1B 和 7A 染色体上, 而品种 Wichita 则位于染色体 5B 上。陈喜文等研究发现, 在 1B 和 6A 染色体上有对蛋白质含量贡献率分别为 13.2% 和 15.6% 相关的 QTL 各 1 个<sup>[8]</sup>。这些结果不仅进一步证明小麦蛋白质含量由位于染色体上的多个 QTL 控制的数量性状, 而且由于小麦蛋白质含量性状非常复杂, 与之相关的 QTL 常常因材料遗传背景不同而不同, 因此, 不同研究所得的结果一般难以相互借鉴和利用。

收稿日期: 2006-10-16

基金项目: 天津市应用基础研究计划面上项目 (043612011); 南开大学 2004 年科技创新基金项目

作者简介: 陈喜文 (1966-), 女, 湖南湘乡人, 副教授, 主要从事生物化学与分子生物学研究工作。

本试验在找到 2 个影响小麦蛋白质含量的 QTL 后,利用与蛋白质含量连锁的分子标记对回交后代群体的蛋白质含量进行间接选择,比较利用分子标记辅助选择(Marker-assisted selection, MAS)的效果,为将分子标记与育种实践相结合奠定基础。

# 1 材料和方法

## 1.1 材料

小麦蛋白质含量分子标记辅助选择的效果分析必须具备 3 个条件:建立合适的群体,有与蛋白质含量相关 QTL,在相同环境条件下测定群体的表型。为此,我们以高蛋白质含量的品系 M5 为父本,与低蛋白质含量 M16 为母本杂交获得 F<sub>1</sub>,将 F<sub>1</sub> 与 M5 亲本进行回交得 BC<sub>1</sub> 回交群体,共计收集 2 000 粒种子。BC<sub>1</sub> 回交群体分成 3 部分,一部分用于蛋白质含量的测定,并从中选择出蛋白质含量最高的 20 株为供体亲本,然后再与高蛋白质含量的品系 M5 进行回交构建 PHEBC<sub>2</sub>;一部分用于分子标记的分析,从中选择出 20 株为供体亲本,与轮回亲本 M5 杂交构建 MASBC<sub>2</sub>;再从第三部分材料中随机选取单株作为供体亲本,与轮回亲本 M5 杂交构建 RNDBC<sub>2</sub>(图 1)。

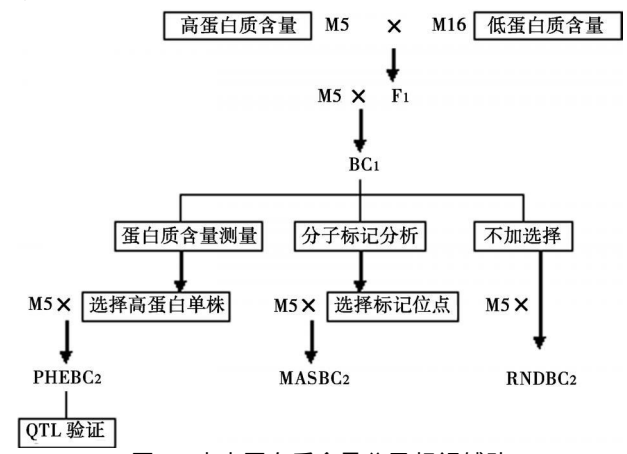


图 1 小麦蛋白质含量分子标记辅助选择建立的遗传群体

Fig 1 The backcross population derived from marker-assisted selection for protein content in wheat

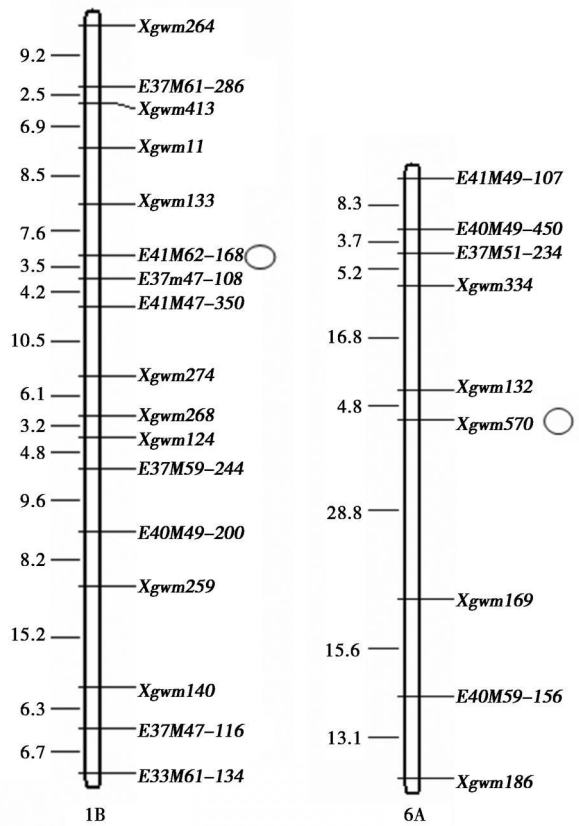
## 1.2 小麦蛋白质含量的测定

将不同来源的种子于秋天种植在大棚中,按小区随机排列设计,各处理设置 3 次重复。春天收获小麦,用近红外(NIR)分析仪测定 14% 湿基的蛋白质含量,然后用统计分析软件 SPSS ver12.0 对性状结果进行方差分析。

## 1.3 QTL 验证

前文我们获得了 2 个与蛋白质含量相关的分子标记(图 2),即 *Xgwm570* (SSR 标记)和 *E41M62-168*

(AFLP 标记),分别能解释蛋白质含量变异的 15.6% 和 13.2%。为了分析它们与蛋白质含量的相关性,我们以 PHEBC<sub>2</sub> 群体为材料,选择出 200 个单株,检测分子标记的类型。同时以分布于不同染色体上与蛋白质含量无关的 4 个 SSR 标记<sup>[8]</sup> (*Xgwm136*, 1A; *Xgwm140*, 1B; *Xgwm186*, 6A 和 *Xgwm205*, 5A) 作正对照,分析标记在群体中的分离比例。亲本和群体单株播种在大田中,待发芽并长出真叶后,收集 0.1~0.2 g 幼叶,按 CTAB 法<sup>[9]</sup> 提取基因组 DNA。用琼脂糖凝胶电泳估测浓度,稀释至 50 ng/μL。SSR 标记分析参照 Roeder<sup>[10]</sup> 的方法,反应均在 PCR 仪(MJ Research PTG-200)上进行。AFLP 分析参照 Vos<sup>[11]</sup> 的方法。用 *Eco* R I 和 *Mse* I 双酶切,采用 E41 和 M62 引物组合进行选择扩增产。分别用 6% 和 4.5% 聚丙烯酰胺凝胶电泳(7 mol/L 尿素变性)分离 SSR 扩增产物和 AFLP 扩增产物,扩增产物在 3 000 V 电压、75 W 恒定功率条件下电泳 100 min,然后进行银染显色。



此图是以 M5 和 M16 为亲本构建的 RIL 群体为材料制作的,圆圈所示标记是本研究用于分子标记辅助选择的与蛋白质含量相关的分子标记

The map was drawn with the RIL population derived from parents of M5 and M16. The circled markers are the ones used in marker-assisted selection for protein content in wheat

图 2 小麦 1B, 6A 染色体的分子标记连锁图

Fig 2 The genetic linkage map of chromosome 1B and 6A

1.4 分子标记辅助选择

为了比较分子标记辅助选择的效果, 我们除了测定 3 种不同来源群体 PHEBC<sub>2</sub>, MASBC<sub>2</sub> 和 RNDBC<sub>2</sub> 的蛋白质含量和蛋白质含量高于 16. 5% 的单株百分比外, 还分析了 PHEBC<sub>2</sub> 和 MASBC<sub>2</sub> 单株中 *Xgwm570* 和 *E41M62-168* 的类型, 并将其分成 A、B 和 C 3 类。A 型单株含有高蛋白质含量亲本所具有 2 个位点, B1 型含有高蛋白质含量亲本所具有的 *Xgwm570* 位点, B2 型含有高蛋白质含量亲本所具有的 *E41M62-168* 位点, C 型不含有高蛋白质含量亲本所具有的位点, 比较每组蛋白质含量的差异。蛋白质含量的数据分析采用 1. 2 所述方法。

2 结果与分析

2.1 对现有 QTL 的验证

为了检验前文中获得的与小麦蛋白质含量的 QTL 是否真正有效, 我们分析了这 2 个标记在 PHEBC<sub>2</sub> 群体中的分离情况。同时分析 4 个与蛋白质含量无关的 *Xgwm136*, *Xgwm140*, *Xgwm186* 和 *Xgwm20* 标记, 以此为对照, 结果如图 3 和表 1 所示。图 3 为

*Xgwm570* 标记在 PHEBC<sub>2</sub> 中的分离情况。与蛋白质含量不相关的分子标记由于呈中性, 在群体中基本呈现 1: 3 分离比例(供体亲本: 轮回亲本); 然而 *Xgwm570* 和 *E41M62-168* 这 2 个与蛋白质含量相关的分子标记则明显地偏离 1: 3 的分离比例, 表明它们与蛋白质含量确实存在相关性, 可以用于进一步分子标记的辅助选择研究。

2.2 分子标记辅助选择的效果

来源于 BC<sub>1</sub> 群体中选择出蛋白质含量最高的 5% 的单株, 分子标记分析后含有 2 个高蛋白质含量亲本位点的单株和随机选取的单株 3 种材料, 与轮回亲本 M5 杂交分别构建 PHEBC<sub>2</sub>、MASBC<sub>2</sub> 和 RNDBC<sub>2</sub>。测定来源于这 3 种群体的蛋白质含量的平均值和蛋白质含量高于 16. 5% 单株所占总测定单株的比例, 结果见表 2。PHEBC<sub>2</sub> 群体(16. 1%) 和 MASBC<sub>2</sub> 群体(16. 2%) 的蛋白质含量平均值没有显著差异, 但均显著高于没有施加任何选择所获得的随机群体 RNDBC<sub>2</sub>。而且, 在 PHEBC<sub>2</sub> 群体和 MASBC<sub>2</sub> 群体中蛋白质含量高于 16. 5% 的植株所占比例显著高于随机群体。

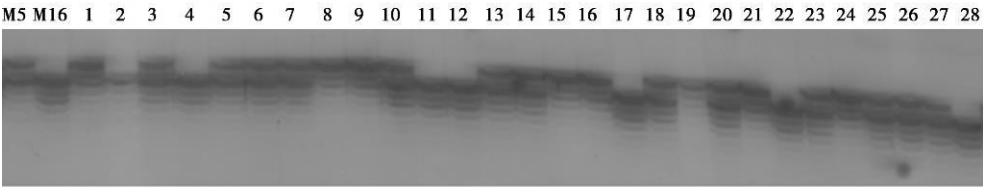


图 3 *Xgwm570* 在部分 PHEBC<sub>2</sub> 群体中的分离情况

Fig 3 The segregation pattern of *Xgwm570* in parts of PHEBC<sub>2</sub> population

表 1 与蛋白质含量相关和不相关分子标记在回交群体中的分离比例

Tab. 1 Chi-square tests for segregation of marker associated and not associated with QTLs for protein content in wheat								
标记名称 Marker	类型 Type	位点类型 Locus type	染色体位置 Location	贡献率/ % R <sup>2</sup>	植株数/ 株 No. plants	预测株数/ 株 Expected	实际株数/ 株 Observed	χ <sup>2</sup>
<i>Xgwm570</i>	SSR	QTL	6A	15. 6	200	50	106	21. 78
<i>E41M62-168</i>	AFIP	QTL	1B	13. 2	200	50	98	20. 65
<i>Xgwm136</i>	SSR	中性( Neutral)	1A	—	200	50	48	0. 07
<i>Xgwm140</i>	SSR	中性( Neutral)	1B	—	200	50	47	0. 12
<i>Xgwm186</i>	SSR	中性( Neutral)	6A	—	200	50	51	0. 03
<i>Xgwm205</i>	SSR	中性( Neutral)	5A	—	200	50	52	0. 06

表 2 来源于相同群体的小麦不同群体间蛋白质含量的比较

Tab. 2 Comparison of protein content between wheat populations derived from identical base population			
基础群体 Base population	比较群体 Comparison population	蛋白质含量/ % Protein content	高于 16. 5% 单株比例/ % Percentage of plants higher than 16. 5%
BC <sub>1</sub>	PHEBC <sub>2</sub>	16. 1	11. 2a
BC <sub>1</sub>	MASBC <sub>2</sub>	16. 2	12. 3a
BC <sub>1</sub>	RNDBC <sub>2</sub>	15. 1	4b

2.3 不同分子标记类型单株蛋白质含量的差异

为了进一步研究分子标记类型与蛋白质含量的相关性, 分析了部分 PHEBC<sub>2</sub> 和 MASBC<sub>2</sub> 群体中单株

*Xgwm570* 和 *E41M62-168* 的类型, 并按照其分子标记类型将植株分成 A、B( B1, B2) 和 C 3 大类。测定各种类型的蛋白质含量和蛋白质含量高于 16. 5% 的单株所占比例, 结果见表 3。3 类植株蛋白质含量的平均值从高到低的排列顺序为: A 类植株> B 类植株> C 类植株; 在 B 类植株中, 分别含有高蛋白质含量亲本位点 *Xgwm570* ( B1) 或 *E41M62-168* ( B2) 的蛋白质含量差异不显著。3 类植株中蛋白质含量高于 16. 5% 的比例相差非常显著, 其中 A 类植株显著高于 B 类植株, B 类植株显著高于 C 类植株。

表 3 不同分子标记类型单株蛋白质含量的差异  
Tab.3 Comparison of protein content between plants

having different molecular marker type		
分子标记类型 Marker type	蛋白质含量/ % Protein content	高于 16.5% 单株比例/ % Percentage of plants higher than 16.5%
A	16.3	28.5 a
B <sub>1</sub>	15.6	15.7 b
B <sub>2</sub>	15.7	13.6 b
C	14.2	4.2 c

3 讨论

目前,分子标记辅助选择在改良数量性状方面进行了很多有益的尝试。Ribaut 等<sup>[12]</sup>曾对玉米耐旱性进行分子标记辅助选择,以改良不耐旱自交系CML247,用耐旱供体与其杂交然后在回交和自交的过程中,利用与耐旱性有关的5个QTL进行辅助选择,得到的70个BC<sub>2</sub>F<sub>3</sub>用2个测验种测交,结果在干旱条件下其产量的均值显著高于对照。Hasha 等<sup>[13]</sup>探讨了谷子和高粱在改良饲料品质方面利用MAS的可行性。Ioannidoua 等<sup>[14]</sup>将抗水稻黄斑病毒的主效QTL转到改良品种IR64中,创建近等基因系,接种后14和28 d的抗病性明显提高。Kellya 等<sup>[15]</sup>报道了含500个分子标记的菜豆和豇豆连锁图,并定位了许多农艺性状,将MAS和常规种相结合用于改良品种特性。Charles 等<sup>[16]</sup>利用MAS把产量QTL转移到改良自交系,组配杂交种,结果比原自交系组配的杂交种产量提高。本试验利用与小麦蛋白质含量相关的QTL辅助选择,大大提高了回交后代蛋白质含量,进一步证实了利用分子标记辅助选择的有效性和可行性。

然而,由于数量性状的复杂性,利用分子标记辅助选择的难度亦很大。众所周知,数量性状QTL位置和效应的准确性是进行分子标记辅助选择的前提。工作中,考虑到研究成本和工作量而产生的作图群体大小和结构、环境重复、标记数目等因素的限制,QTL定位的准确性和精确度达不到MAS的要求。对控制同一性状的QTL数目、位置、效应等常常因材料的遗传背景不同而不同,因此,不同研究所得的结果一般难以相互借鉴和利用。本研究在选择作图群体上使用与育种直接有关的亲本材料,利用在M5亲本中定位的小麦蛋白质含量QTL进行辅助选择,选择效率大大提高,同时缩短基因定位研究与育种实践应用的距离,大大提高了育种的效率。但是否这些QTL可用于其他来源材料的育种选择,有待进一步研究。尽管MAS在改良数量性状方面还存在很多困难,随着QTL图谱的不断完善和MAS方法的改进,MAS在育种工作中的应用将日益广泛。

参考文献:

[1] Dong H, Cox T S, Sears R G, *et al.* High molecular weight glutenin genes: effect on quality in wheat [J]. *Crop Sci*, 1991, 31: 974– 979.

[2] Bhatt G M, Derera N F. Genotype environment interactions for heritabilities and correlations among quality traits in wheat [J]. *Euphytica*, 1975, 24: 597– 604.

[3] Diehl A L, Johnson V A, Mattern P J. Inheritance of protein and lysine in three wheat crosses [J]. *Crop Sci*, 1978, 17: 391– 395.

[4] Perretant M R, CadalenT, Chamet G, *et al.* QTL analysis of bread-making quality in wheat using a doubled haploid population [J]. *Theor Appl Genet*, 2000, 100: 1167– 1175.

[5] Kuspira J, Unrau J. Genetic analysis of certain characters in common wheat using whole chromosome substitution lines[ J]. *Can J Plant Sci*, 1957, 37: 300– 326.

[6] Morris R, Mattern P J, Schmidt J W, *et al.* Studies on protein, lysine and leaf rust resistance in the wheat cultivar “Atlas 66” using chromosome substitutions[M]// Ramanujan S. *Proceedings of the Fifth International Wheat Genetic Symposium*. New Delhi: Indian Agricultural Research Institute, 1978: 447– 454.

[7] Stein I S, Sears R G, Gill B S, *et al.* Heterogeneity of the “Wichita” wheat monosomic set for grain quality and agronomic traits [J]. *Crop Sci*, 1992, 32: 581– 584.

[8] 陈喜文,刘晓光,陈德富,等. 影响小麦加工品质数量性状位点的研究[J]. *南开大学学报: 自然科学版*, 2006, 39(6): 6– 11.

[9] Saghai-Maroo M A, Soliman K M, Jorgensen R A, *et al.* Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics [J]. *Proc Nat Acad. Sci USA* 1984, 81: 8014– 8018.

[10] Roeder M S, Korzun V, Wendenhake K, *et al.* A microsatellite map of wheat [J]. *Genetics*, 1998, 149: 2007– 2023.

[11] Vos P, Hogers R, Bleeker M, *et al.* AFLP: a new technique for DNA fingerprinting [J]. *Nucleic Acids Research*, 1995, 23: 4407– 4414.

[12] Ribaut J, Beltran M. Single large-scale marker-assisted selection [J]. *Mol Breeding*, 1999, 5: 531– 541.

[13] Hasha C T, Bhasker A G, Raja, *et al.* Opportunities for marker-assisted selection (MAS) to improve the feed quality of crop residues in pearl millet and sorghum[ J]. *Field Crops Research*, 2003, 84: 79– 88.

[14] Ioannidoua D, Pinela C, Brugidoua L, *et al.* Characterisation of the effects of a major QTL of the partial resistance to Rice yellow mottle virus using a near isogenic-line approach [J]. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2003, 63: 213– 221.

[15] Kellya J D, Geptsb P, Mklasc P N, *et al.* Tagging and mapping of genes and QTL and molecular marker-assisted selection for traits of economic importance in bean and cowpea [J]. *Field Crops Research*, 2003, 82: 135– 154.

[16] Charles W, Polacco M, M Lynn Senior. Synergy of empirical breeding, marker-assisted selection, and genomics to increase crop yield potential [J]. *Crop Science*, 1999, 39: 1571– 1583.