

研究论文

Research Article

利用功能标记检测小麦品质相关性状的基因组成

陈桂玲¹, 余利¹, 崔法¹, 王洪刚^{1,2}, 李兴锋^{1,2}

1 作物生物学国家重点实验室, 山东省作物生物学重点实验室, 山东农业大学, 泰安, 271018

2 国家小麦改良中心泰安分中心, 山东农业大学农学院, 泰安, 271018

✉ 通讯作者及电子邮件: lixf@sdau.edu.cn; ✉ 作者

分子植物育种, 2010年, 第8卷, 第8篇 DOI: 10.5376/mpb.cn.2010.08.0008

收稿日期: 2010年9月17日

接受日期: 2010年10月21日

发表日期: 2010年11月1日

这是一篇开放获取的论文, 其论文发布和传播接受《Creative Commons Attribution License》所有条款。只要对本原作有恰当的引用, 版权所有人允许和同意第三方无条件的使用、传播以及任何媒介的复制或再制作。

建议最佳引用格式:

陈桂玲等, 2010, 利用功能标记检测小麦品质相关性状的基因组成, 分子植物育种 Vol.8 No.8 (DOI: 10.5376/mpb.cn.2010.08.0008)

摘要 利用新型功能分子标记可以快速准确地鉴定小麦品种相关基因的等位变异。本研究利用高分子量麦谷蛋白亚基(high molecular weight glutenin subunits, HMW-GS) *Glu-A1*、*Glu-D1* 位点上的标记 UMN19、UMN25 和 UMN26, 位于 7AL、7B 染色体与黄色素含量相关的八香番茄红素合成酶基因(Phytoene synthase, PSY) *Psy-A1*、*Psy-B1* 的标记 YP7A、YP7B-1, 以及位于 2AL、2DL 染色体的多酚氧化酶(Polyphenol oxidase, PPO)活性基因标记 PPO18、PPO29 等 7 个小麦品质相关性状功能性分子标记, 对山东省近年选育的 44 份小麦品种(系)进行了基因等位变异检测。结果表明: 在 *Glu-A1* 位点含有优质亚基 Ax2* 的材料 5 份, 占 11.3%, 在 *Glu-D1* 位点含有优质亚基组合 5+10 的材料有 8 份, 占 18.1%, 同时含亚基 Ax2*、5+10 的材料 1 份, 占 2.3%; 在 7A 染色体上含 *Psy-A1b* (低黄色素含量)等位变异基因的材料 7 份, 占 15.9%, 在 7B 染色体上含 *Psy-B1b* (低黄色素含量)等位变异基因的材料 17 份, 占 38.3%, 在 7A、7B 染色体上同时含低黄色素含量等位变异基因的材料 3 份, 占 6.8%; 在 2AL 染色体上含 *Ppo-A1b* (低 PPO 活性)等位变异材料 33 份, 占 75%, 在 2DL 染色体上含 *Ppo-D1a* (低 PPO 活性)等位变异材料 22 份, 占 50%, 在 2AL、2DL 染色体上同时含低 PPO 活性等位变异基因的材料 16 份, 占 36.3%。所用的 7 个标记均为基因特异性标记, 扩增结果稳定, 可有效地应用于小麦品质改良的分子标记辅助选择。

关键词 小麦, 品质性状基因, 功能标记

Molecular Characterization of Genes associated with Quality Related Traits in Wheat by Functional Markers

Chen Guiling¹, Yu Li¹, Cui Fa¹, Wang Honggang^{1,2}, Li Xingfeng^{1,2}

1 State Key Laboratory of Crop Biology, Shandong Key Laboratory of Crop Biology, Shandong Agricultural University

2 Subcentre of National Wheat Improvement Benter, Shandong Agricultural University

✉ Corresponding author, lixf@sdau.edu.cn; ✉ Authors

Abstract The newly developed functional molecular markers was useful for detected the allelic variations of wheat quickly and precisely. In this study, seven functional molecular makers including markers named UMN19, UMN25 and UMN26 for detection of high molecular weight glutenin subunits (HMW-GS) gene *Glu-A1*, *Glu-D1*, and YP7A, YP7B-1 for detection of *Psy-A1*, *Psy-B1* genes located on 7AL, 7B chromosomes associated with yellow pigment content of the Phytoene synthase (PSY), and PPO18, PPO29 for detection of PPO activity genes located on 2AL, 2DL chromosomes were used to detect allelic variation in 44 wheat varieties (lines) of Shandong province. The results showed that among the 44 wheat varieties (lines), 5 varieties (lines) contained high-quality glutenin subunit Ax2* at the locus *Glu-A1*, 8 contain 5+10 subunits combination at *Glu-D1*, while 1 contain both the

high-quality subunits Ax2* and 5+10, accounted for 11.3%, 18.1% and 2.3%, respectively. 7 varieties contained allelic variation of low yellow pigment *Psy-Alb* on the 7A chromosome, 17 varieties contained allelic variation of low yellow pigment *Psy-B1b* on 7B, and 3 contained good allelic variations on both chromosomes, accounted for 15.9%, 38.3% and 6.8%, respectively. Varieties (lines) contained low PPO activity related alleles *Ppo-Alb* on the 2AL chromosome, 22 varieties contained low PPO activity related alleles *Ppo-D1b* on 2DL, and 16 contained good allelic variations on the both chromosomes, accounting for 75%, 50% and 36.3%, respectively, 7 markers employed in this study were all gene-specific, PCR amplification and stability. Thus the 7 tested markers could be used as efficient molecular tools for marker-assisted selection (MAS) in wheat quality improvement programs.

Keywords Wheat, quality traits related genes, functional molecular makers

研究背景

随着结构及功能基因组学的飞速发展, 基因功能标记的开发与应用逐渐成为小麦等重要农作物分子育种的重要方向。利用功能型分子标记对小麦品质相关性状进行检测具有快速、准确、方便等特点, 在分子标记辅助育种上大大提高了选择效率; 同时为育种过程中亲本选择和确定材料的利用价值提高重要信息(杨景华等, 2008; Bagge et al., 2007; 2008)。因而, 在小麦育种工作中具有较大应用价值, 特别在小麦品质改良方面受到广泛应用(何中虎等, 2006)。

高分子量谷蛋白亚基、黄色素含量、籽粒 PPO 活性等性状对小麦面粉韧性、粘性、光滑性、适口性、面粉及面制食品色泽具有重要影响, 最终影响日常生活所食用面制品的加工品质(如面包, 面条和馒头等)。高分子量谷蛋白亚基(HMW-GS)主要影响面团的粘弹性、面粉加工品质和烘烤品质, 由 *Glu-A1*、*Glu-B1*、*Glu-D1* 位点控制。每个位点由两个紧密连锁的基因组成, 分别编码 X-type 和 Y-type 两种类型的亚基, 并且每个基因位点都存在大量等位变异。在 *Glu-A1*、*Glu-D1* 位点上的等位基因 Ax2* 和 1/null、Dx5+Dy10 和 Dx2+Dy12 与小麦的烘烤品质关系密切, 是评价育种材料烘烤品质的重要指标, 因此常选用对烘烤品质贡献极大的 Ax2*、Dx5+Dy10 基因来改良面包小麦品质。其中 Ax2*、5+10 亚基与高面筋强度密切相关, 而 null、2+12 亚基与弱面筋强度相关联。

小麦籽粒黄色素含量主要影响面粉及加工品外观颜色, 因此加工面条、馒头等面制品应选择低黄色素含量的小麦品系, 从而使面制品具有较好的外观品质和销售价值。而影响小麦黄色素含量的关

键基因——八氢番茄红素合成酶(PSY)基因, 由多个基因位点控制, 但位于 7A、7B 等同源群上检测到的 QTL 效应值最大(Elouafi et al., 2001)。He 等(2008; 2009)针对黄色素含量这一性状开发的功能性基因标记 YP7A、YP7B-1, 可以有效地将位于小麦 7AL、7B 染色体上控制不同黄色素含量的等位基因 *Psy-Ala*、*Psy-Alb* 和 *Psy-Bla*、*Psy-B1b* 区分开。

小麦籽粒中多酚氧化酶(PPO)活性与面条等面制品在制作过程中颜色变褐密切相关, 不同小麦品种间 PPO 活性差异很大, 主要受 PPO 基因的等位变异影响。面粉中 PPO 的含量虽然仅占籽粒总 PPO 含量的 3%, 但可以解释面制品加工和贮藏过程中色泽褐变的 50%-70% (Kruger et al., 1994)。PPO 催化内源酚酸的氧化成为醌类物质, 后者经自身聚合或与多肽的氨基基团聚合生成褐色多聚体, 导致面团褐变, 严重影响面制品的外观质量和商品价值(Jimenez et al., 1999)。Mares 等(2001)研究发现控制 PPO 活性的主效基因位于第二同源群染色体上, 其它染色体如 3B、3D、6B、6D 上亦存在一些微效基因。张立平等人(2005)研究结果表明位于 2AL、2DL 染色体上的 PPO 活性基因能够分别解释 37.2%-50.1%和 25.1%-29.1%的表型变异, 认为是控制 PPO 活性的主效基因。Sun 等(2005)和 He 等(2007; 2008)在 2AL 和 2DL 染色体上开发了多酚氧化酶主效基因的功能性基因标记 PPO18 和 PPO29, 可以有效区分控制高多酚氧化酶活性和低多酚氧化酶活性的等位基因。以上相关品质性状的功能标记为分子标记辅助选择育种和小麦种质的鉴定奠定了基础, 同时也加快了小麦品质改良的步伐。

本实验利用 UMN19、UMN25、UMN26、YP7A、YP7B-1、PPO18、PPO29 等标记对部分山东省冬小

麦品种进行相关基因的分子检测, 目的是进一步验证相关标记的有效性和实用性, 为利用功能标记进行分子育种奠定基础, 并进一步明确不同的材料所具有的基因种类及相关品质状况, 选育具有优良性状的小麦种质, 为小麦品质育种优良亲本材料的选育提供依据。

1 结果与分析

1.1 供试材料HWM-GS组成的等位变异

本研究所用的 UMN19、UMN25、UMN26 均为共显性标记, 其中标记 UMN19 在含 Ax2*的材料中可扩增出 344bp 的片段, 在含 Ax1、null 的材料中可扩增出 362bp 的片段(图 1); 标记 UMN25 在 Dx2 的材料中可扩增出 299bp 的片段, 在含 Dx5

的材料中可扩增出 281bp 的片段; 标记 UMN26 在含 Dy10 的材料中可扩增出 397bp 的片段, 在含 Dy12 的材料中可扩增出 415bp 的片段(图 2)。44 份小麦品种(系)在 Glu-A1 位点含有亚基 Ax2*的材料 5 份, 分别为山农 2618、山农 6343、临麦 2 号、临麦 4 号、鲁麦 5 号, 占 11.3%。在 Glu-D1 位点含有亚基组合 5+10 的材料有 8 份, 分别为山农 12、山农 8355、泰农 18、烟农 19、烟农 21、鲁麦 5 号、济宁 12、淄麦 12 号, 占 18.1%; 其中材料济宁 13 和山农 2618 在 Glu-D1 位点扩增出 3 条带, 是一种特殊类型, 有待进一步研究(图 2)。其中在 Glu-A1 扩增出 Ax2*的材料、Glu-D1 位点均表现优质亚基 (Ax2*、5+10)的材料 1 份, 只有鲁麦 5 号。

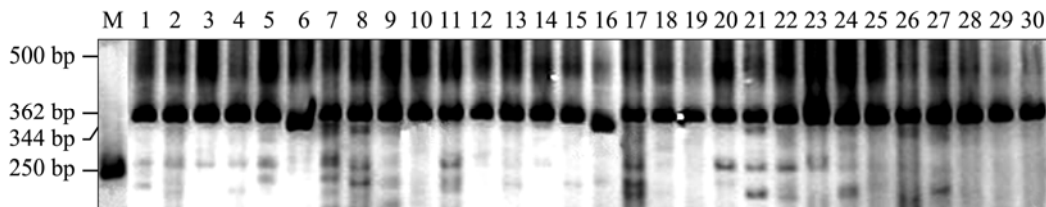


图 1 引物 UMN19 的 PCR 扩增结果

Fig1 Result of PCR amplification with primer UMN19

注: 1:山农 11;2:山农 12;3:山农 14;4:山农 15; 5:山农 16;6:山农 2618;7:山农 98;8:泰山 21;9:泰山 22;10:泰山 24;11:济南 13;12:济南 17;13:济麦 19; 14:济麦 20;15:济麦 22;16:临麦 4 号;17:临麦 7 号; 18:烟农 15;19:烟农 19;20:烟农 21;21:烟农 24;22:烟农 25; 23:鲁麦 14;24:鲁麦 21;25:鲁麦 23;26:济宁 12; 27:济宁 13;28:潍麦 8 号;29:田 62008;30:淄麦 12 号; M:DNA Marker DL-2000

Note:1:Shannong11;2:Shannong12;3:Shannong14;4:Shannong15;6:Shannong2618;7:Shannong98;8:Taishan21;9:Taishan22;10:Taishan24;11:Jinan13;12:Jinan17;13:Jimai19;14:Jimai20;15:Jimai22;16:Linmai4;17:Linmai7;18:Yannong15;19:Yannong19;20:Yannong21;21:Yannong24;22:Yannong25;23:Lumai14;24:Lumai21;25:Lumai23;26:Jining12;27:Jining13;28:Weimai8;29:Tian62008;30:Zimai12;M:DNA Marker DL-2000

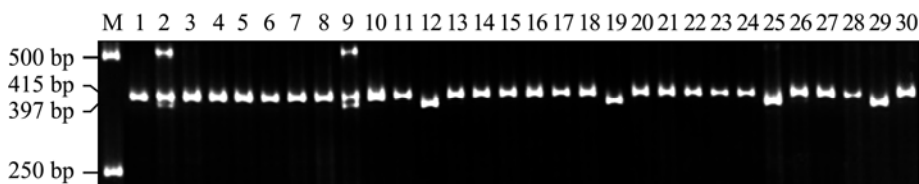


图 2 引物 UMN26 的 PCR 扩增结果

Fig2 Result of PCR amplification with primer UMN26

注:1:山农 11;2:济宁 13;3:山农 14;4:山农 15; 5:山农 16;6:山农 6343;7:山农 98;8:泰山 21;9:山农 2618;10:泰山 24;11:济南 13;12:山农 8355;13:济麦 19; 14:济麦 20;15:济麦 22;16:临麦 4 号;17:临麦 7 号; 18:烟农 15;19:泰农 18;20:烟农 23;21:烟农 24;22:烟农 25; 23:鲁麦 14;24:鲁麦 21;25:烟农 19;26:山农优麦 2 号; 27:山农优麦 3 号;28:潍麦 8 号;29:鲁麦 5 号;30:田 62008; M:DNA Marker DL-2000

Note:1:Shannong11;2:Jining13;3:Shannong14;4:Shannong15;5:Shannong16;6:Shannong6343;7:Shannong98;8:Taishan21;9:Shannong2618;10:Taishan24;11:Jinan13;12:Shannong8355;13:Jimai19;14:Jimai20;15:Jimai22;16:Linmai4;17:Linmai7;18:Yannong15;19:Tainong18;20:Yannong23;21:Yannong24;22:Yannong25;23:Lumai14;24:Lumai21;25:Yannong19;26:Shannongyoumai2;27:Shannongyoumai3;28:Weimai8;29:Lumai5;30:Tian62008;M:DNA Marker DL-2000

1.2 供试材料黄色素含量基因的等位变异

共显性功能标记 YP7A, 在高黄色素含量和低黄色素含量的小麦材料中分别可以扩增出 194bp 和 231bp 大小的片段(图 3), 相对应的等位变异基因分别为 *Psy-Ala*、*Psy-Alb*; 共显性标记功能 YP7B-1, 在高黄色素含量和低黄色素含量的小麦材料中分别可以扩增出 151bp 和 156bp 大小的片段, 相对应的等位变异基因为分别为 *Psy-B1a*、*Psy-B1b*。供试材

料中在 7A 染色体上含 *Psy-Alb* 等位变异基因的材料 7 份, 分别为山农 14、山农 664、临麦 2 号、临麦 4 号、鲁麦 21、鲁麦 23、淄麦 12 号, 占 15.9%。在 7B 染色体上含 *Psy-B1b* 等位变异基因的材料 17 份, 占 38.3%。其中山农 14、鲁麦 21、淄麦 12 号在 7A、7B 染色体上同时含低黄色素含量基因的等位变异基因, 占 6.8%。

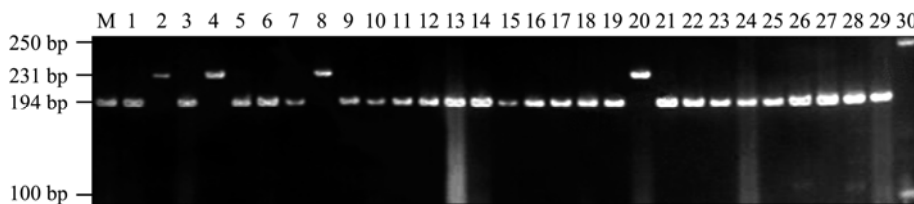


图 3 引物 YP7A 的 PCR 扩增结果

Fig3 Result of PCR amplification with primer YP7A

注:1:山农 11;2:济宁 13;3:山农 14;4:山农 15; 5:山农 664;6:山农 6343;7:山农 98;8:泰山 21;9:临麦 2 号;10:泰山 24;11:济南 13;12:山农 8355;13:济麦 19; 14:济麦 20;15:济麦 21;16:济麦 22;17:临麦 7 号; 18:烟农 15;19:泰农 18;20:烟农 23;21:鲁麦 23;22:烟农 25; 23:鲁麦 5 号;24:鲁麦 14;25:烟农 19;26:山农优麦 2 号; 27:山农优麦 3 号;28:潍麦 8 号;29:良星 99;30:田 62008; M:DNA Marker DL-2000

Note:1:Shannong11;2:Jining13;3:Shannong14;4:Shannong15;5:Shannong664;6:Shannong6343;7:Shannong98;8:Taishan21;9:Linmai2;10:Taishan24;11:Jinan13;12:Shannong8355;13:Jimai19;14:Jimai20;15:Jimai21;16:Jimai22;17:Linmai7;18:Yannong15;19:Tainong18;20:Yannong23;21:Lumai23;22:Yannong25;23:Lumai5;24:Lumai14;25:Yannong19;26:Shannongyoumai2;27:Shannongyoumai3;28:Weimai8;29:Langxing99;30:Tian62008;M:DNA Marker DL-2000

1.3 供试材料多酚氧化酶基因的等位变异

共显性功能标记 PPO18, 在高多酚氧化酶活性和低多酚氧化酶活性的小麦材料中分别可以扩增出 685bp 和 876bp 大小的片段, 相对应的等位变异基因分别为 *Ppo-Ala*、*Ppo-Alb*(图 4); 显性功能标记 PPO29, 在低 PPO 活性的材料中无扩增片段, 高 PPO 活性的材料中扩增 490bp 的片段, 相应的等位基因分别为 *Ppo-D1a* 和 *Ppo-D1b*。供试材料在 2AL 染色体上含 *Ppo-Alb*(低 PPO 活性)等位变异材料 33 份, 占 75%, 在 2DL 染色体上含 *Ppo-D1a*(低 PPO 活性)等位变异材料 22 份, 占 50%; 在 2AL、2DL 染色体上同时含低 PPO 活性等位变异基因的材料

16 份, 占 36.3%。

2 讨论

2.1 小麦功能型分子标记的开发与利用

近年来,随着分子生物学技术的快速发展和众多小麦基因的发现,已获得许多重要农艺性状相关基因的分子标记,其中 SSR、EST-SSR 和 AFLP 标记已广泛应用于小麦遗传图谱的绘制、基因的分子标记分析和辅助育种等方面。但是目前广泛使用的基于 PCR 基础的分子标记如 SSR、AFLP 等标记一般是扩增非编码区域(重复序列),或是随机在基因组中扩增,得到的位点一般与目标性状基因存在一定的遗传距离。这使得分子标记在应用上与其目标

有一定的偏差。而重要农艺性状基因定位与图位克隆以及分子标记辅助育种等都要求标记位点与目标性状基因间的距离较近, 而目前使用的这些分子标记普遍距离编码序列较远或很难在目标性状基因附近存在标记位点。

随着结构及功能基因组学的飞速发展, 基于目的基因开发形成的目的基因标记或功能型分子标记(functional markers, FMs)成为一类新型分子标记类型。Andersen 和 Lübberstedt(2003)最早定义了功能型分子标记的概念, 即与表型相关的功能基因基序中功能型单核苷酸多态性位点开发而成的新型分子标记。功能型分子标记不依赖于分子遗传作图, 由于该标记直接检测的是功能基因的不同等位变异, 所以比传统的分子标记在标记辅助育种中更具有优越性。

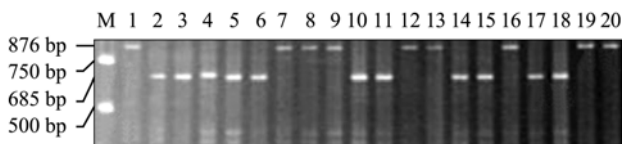


图 4 引物 PPO18 的 PCR 扩增结果

Fig4 Result of PCR amplification with primer PPO18

注:1:山农 2618;2:山农 11;3:山农 6343;4:泰山 21; 5:泰山 223;6:泰山 23;7:山农 8355;8:泰农 18;9:山农 664;10:泰山 24;11: 济麦 20;12:济南 17;13:济麦 19; 14:鲁麦 21;15:鲁麦 23;16:烟农 21;17:潍麦 8 号; 18:田 62008;19:济宁 12;20:良星 99; M:DNA Marker DL-2000

Note:1:Shannong2618;2:Shannong11;3:Shannong6343;4:Taishan21;5:Taishan223;6:Taishan23;7:Shannong8355;8:Tainong18;9:Shannong664;10:Taishan24;11:Jimai20;12:Jinan17;13:Jimai19;14:Lumai21;15:Lumai23;16:Yannong21;17:Weimai8;18:Tian62008;19:Jining12;20:Langxing99;M:DNA MarkerDL-2000

目前在小麦中, 已有许多不同基因的功能标记的研究和报道(Bagge et al., 2007), 如 Sun(2005)和 He 等(2007)分别开发的多酚氧化酶(PPO)活性等位基因、He 等(2008)开发的八氢番茄红素合成酶(PHY)等位变异基因、高低分子麦谷蛋白、Wx 蛋白、籽粒硬度等品质相关性状功能标记基因被开发利用; Ellis(2002)开发的矮秆基因 Rht1、Rht2 和 Rht8 的分子标记; Yan 等(2003;2004) 和 Fu(2005)在 Vrn-A1、Vrn-B1、Vrn-D1 和 Vrn-B3 位点开发的春化基因分

子标记; 另外白粉病基因 Pm3(Tommasini et al., 2006)、抗穗发芽基因(郭凤芝等,2009)、春化基因(姜莹等,2010)等陆续被开发利用。本实验利用的高分子量谷蛋白亚基、黄色素含量、籽粒 PPO 活性等与品质性状相关的功能标记扩增结果特异性强、条带清晰, PCR 扩增条带与前人文献结果一致(杨芳萍等,2008;肖永贵等,2008), 表明利用功能标记对相关性状检测方法简单、重复性好、准确率高、结果可靠, 可以很好的区分不同遗传背景材料, 并进一步验证了以上标记的有效性和实用性。在品质育种中可直接利用这些标记进行标记辅助选择、小麦新品种选育, 以提高育种效率、加快育种进程。

随着小麦基因组计划的进展和基因组序列的公布, 将会有越来越多的功能标记被开发出来, 用于小麦育种的标记辅助选择。

2.2 材料的优良等位变异

综合以上三个性状分析: 山农 14、淄麦 12 号既含有低黄色素含量等位基因 Psy-A1b、Psy-B1b, 又含有低 PPO 活性基因 Ppo-Alb、Ppo-D1b; 鲁麦 5 号含有低黄色素含量等位基因 Psy-B1b 和低 PPO 活性基因 Ppo-Alb、Ppo-D1b。这三个材料可作为改良面制食品外观品质的候选亲本, 有利于提高面条和馒头等传统食品的色泽。另外, 鲁麦 5 号含有优质亚基 Ax2*、5+10 的等位基因, 淄麦 12 号含有优质亚基 5+10 的等位基因。在所检测的 50 份材料中鲁麦 5 号和淄麦 12 号综合品质性状比较好, 在面制品加工行业可作为优选材料, 不仅有利于改变食品色泽, 而且面团弹性较强。在今后的小麦品质育种工作中, 鲁麦 5 号和淄麦 12 号作为候选亲本, 有利于改善小麦品质性状, 加快小麦品质改良的步伐。

不同的面制食品对小麦品质的要求也有所不同, 就馒头、面条、面包而言, 对面粉的色泽及面筋强度的要求较高, 需要进一步的改良。在所检测的山东省小麦材料中黄色素含量(PHY)、PPO 活性基因及高分子谷蛋白亚基的等位变异基因存在着一定差异。检测中含低黄色素含量的等位变异基因 Psy-A1b、Psy-B1b 的材料分别占 14%、34%。可见山东省小麦品种中 Psy-A1b、Ppo-Alb 的频率较低, 在过去的小麦育种中还没有针对黄色素含量(PHY)

基因进行选择, 因此在今后小麦新品种的选育及育种过程中, 应重视低黄色素和低 PPO 活性两种指标, 在面制品加工过程中有望减缓食品的变褐速度, 进一步提高面条、馒头等面制品的白度。高分子量麦谷蛋白亚基(HMW-GS)是决定面团弹性的重要因素, 与强面筋强度密切相关。在检测的 50 份材料中含有优质亚基 Ax2*、5+10 的材料频率分别为 18%、18%。由此可见山东省小麦品种(系)含优质高分子麦谷蛋白亚基(HMW-GS)的材料普遍较少, 在今后的小麦育种工作中有待进一步加强。在所检测的几个品质性状均符合要求的材料没有发现, 其中鲁麦 5 号和淄麦 12 号聚合的优良品质性状较多。因此, 在今后的小麦育种工作中需要加强以多个优良品质性状的聚合为重点的品质性状改良, 从而提高小麦的综合加工性能。

3 材料与方法

3.1 实验材料

供试小麦材料于2009年秋在国家小麦改良中心泰安分中心实验基地播种, 次年3月返青时期进行田间取样。所用44份山东省小麦品种(系)的名称和来源见表1。

3.2 基因组 DNA 的提取

每个材料选取幼嫩叶片, 用改良的CTAB法(Hill-Ambroz et al., 2002)提取小麦基因组DNA, 并用琼脂糖电泳检测DNA的质量, 用于品质基因位点的检测。

作者贡献

陈桂玲是本实验的实验设计和实验研究的执行人; 并且完成了数据分析, 论文初稿的写作; 余利参与了田间取样及DNA的提取, 崔法在实验操作及论文初稿修改过程中给予了较多的帮助和指导。王洪刚老师主要为实验完成提供了实验仪器、设备及其操作平台。导师李兴锋是本实验的构思者及负责人, 指导实验设计, 数据分析, 论文写作与修改。全

参考文献

- Andersen J.R., Lubberstedt T., 2003, Functional markers in plants, Trends in Plant Science, 8(11): 554-560
Bagge M., Xia X.C., Lubberstedt T., 2007, Functional markers in wheat, Current Opinion in Plant Biology, 10:211-216
Bagge M., Lübberstedt T., 2008, Functional markers in

3.3 参照材料的特异性标记

本实验所用的特异标记 UMN19、UMN25、UMN26、YP7A、YP7B-1、PPO18、PPO29 均为前人开发(Liu et al.,2008;He et al.,2007,2008,2009;)。PCR 反应体系及扩增条件: 实验所用标记反应体系均为 25 μ L, 含 2.5 μ L10 \times PCR buffer, 2 μ L 2mmol \cdot L⁻¹ MgCl₂, 1.5 μ L 200 mmol \cdot L⁻¹ dNTPs, 每个引物 1 μ L 约 10 ng, 基因组 DNA (3 μ L) 30~100ng、*Taq*DNA 聚合酶 1U, 其余由 ddH₂O 补至 25 μ L。标记 UMN19、UMN25、UMN26 的扩增程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30s; 60 $^{\circ}$ C 复性 30s; 72 $^{\circ}$ C 延伸 1.5min; 40 个循环; 72 $^{\circ}$ C 最后延伸 5min。标记 YP7A、YP7B-1 的扩增程序为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5min; 95 $^{\circ}$ C 变性 30s; 复性温度(分别为 65 $^{\circ}$ C、60 $^{\circ}$ C)30s; 然后 72 $^{\circ}$ C 延伸 30s; 经 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5min。PPO18、PPO29 的扩增程序为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5min; 94 $^{\circ}$ C 变性 1min; 复性温度(分别为 52 $^{\circ}$ C、68 $^{\circ}$ C)退火 1min; 72 $^{\circ}$ C 延伸(时间分别为 1min、40s); 36 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5min。

PCR 扩增的产物用 6%的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)检测, 缓冲液体系为 1 \times TE 溶液, 经硝酸银染色显影, 最后采用天能 GIS 凝胶图像处理系统扫描成像。

体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究由国家自然科学基金资助项目 (No: 30800684) 资助, 感谢国家小麦改良中心泰安分中心实验室所有人员在本实验过程中的技术支持和有益的建议, 感谢匿名的同行评审人的评审建议和修改建议。

wheat:technical and economic aspects, Mol Breeding, 22:319-328

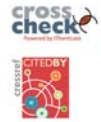
Ellis M. H., Spielmeier W., Gale K.R., Rebetzke G.J., Richards R.A., 2002, Perfect markers for Rht-B1b and Rht-D1b dwarfing genes in wheat, Theor Appl Genet, 105:

- 1038-1042
- Elouafi I., Nachit M.M., Martin L.M., 2001, Identification of a microsatellite on chromosome 7B showing a strong linkage with yellow pigment in durum wheat (*Triticum* growth habit in barley and wheat, *Mol Genet Genomics*, 273:54-65
- and Evolution of Allelic Variation of Vp1B3 in Shandong Wheat, *Mailei Zuowu Xuebao (Journal of Triticeae Crops)*, 29(4):575-578 (郭凤芝, 梁伟光, 樊庆琦, 黄承彦, 高庆荣, 李根英, 2009, 穗发芽相关基因 Vp1B3 不同等位变异在山东小麦中的分布于演变, *麦类作物学报*, 29(4):575-578)
- He Z.H., Yan Y.M., Zhuang Q.S., Zhang Y., Xia X.C., Zhang Y., Wang D.S., Xia L.Q., Hu Y.K., Min H., Chen X.M., Yan J., Zhou Y., 2006, Establishment of Quality Evaluation System and Utilization of Molecular Methods for the Improvement of Chinese Wheat Quality, *Zhongguo Nongye Kexue (Scientia Agricultura Sinica)*, 39(6):1091-1101 (何中虎, 晏月明, 庄巧生, 张艳, 夏先春, 张勇, 王德森, 夏兰芹, 胡英考, 民华, 陈新民, 阎俊, 周阳, 2006, 中国小麦品种品质评价体系建立与分子改良技术研究, *中国农业科学*, 39(6):1091-1101)
- He X.Y., Zhang Y.L., He Z.H., Wu Y.P., Xiao Y.G., Ma C.X., Xia X.C., 2008, Characterization of phytoene synthase 1 gene (*Psy1*) located on common wheat chromosome 7A and development of a functional marker, *Theoretical and Applied Genetics*, 116:213-221
- He X.Y., He Z.H., Zhang Y.L., Sun J.D., Morris F.C., Fuerst P.E., Xia X.C., 2007, Allelic variation of polyphenol oxidase (*PPO*) genes located on chromosomes 2A and 2D and development of functional markers for the *PPO* genes in common wheat, *Theoretical and Applied Genetics*, 115:47-58
- He X.Y., He Z.H., Ma W., Appels R., Xia X.C., 2009, Allelic variants of phytoene synthase 1 (*Psy1*) genes in Chinese and CIMMYT wheat cultivars and development of functional markers for flour colour, *Mol Breeding*, 23:553-563
- Hill-Ambroz K.L., Brown-Guedira G.L., Fellers J.P., 2002, Modified rapid DNA extraction protocol for high throughput microsatellite analysis in wheat, *Crop Science*, 42:2088-2091
- Jimenez M., Dubcovsky J., 1999, Chromosome location of genes affecting polyphenol oxidase activity in seeds of common and durum wheat, *Plant Breeding*, 118:395-398
- turgidum* L. var. durum), *Hereditas*, 135: 255-261
- Fu D., Szücs P., Yan L., Helguera M., Skinner J.S., Zitzewitz J.V., Hayes P.M., Dubcovsky J., 2005, Large deletions within the first intron in VRN-1 are associated with spring
- Guo F.Z., Liang W.G., Fan Q.Q., Huang C.Y., Gao Q.R., Li G.Y., 2009, The Distribution
- Jiang Y., Huang L.Z., Hu Y.G., 2010, Distribution of Vernalization Genes in Chinese Wheat Landraces and Their Relationship with Winter Hardness, *Zhongguo Nongye Kexue (Scientia Agricultura Sinica)*, 43(13): 2619-2632 (姜莹, 黄林周, 胡银刚, 2010, 中国小麦地方品种春花基因的分布及其与冬春性的关系, *中国农业科学*, 43(13):2619-2632)
- Kruger J.E., Hatcher D.W., DePauw R., 1994, A whole seed assay for polyphenol oxidase in Canadian prairie spring wheats and its usefulness as a measure of noodle darkening, *Cereal Chemistry*, 71: 324-326
- Liu S.X., Chao S.M., Anderson J.A., 2008, New DNA markers for high molecular weight glutenin subunits in wheat, *Theoretical and Applied Genetics*, 118: 177-183
- Mares D.J., Campbell A.W., 2001, Mapping components of flour and noodle colour in Australian wheat, *Australian Journal of Agricultural Research*, 52:1297-1309
- Sun J.D., Zhang L.P., Xia X.C., He L.H., Ge X.X., Wang H., 2005, Validation of SSR Marker Assisted Selection for Polyphenol Oxidase Activities in Common Wheat, *Zhongguo Nongye Kexue (Scientia Agricultura Sinica)*, 38(7):1295-1299 (孙道杰, 张立平, 夏先春, 何中虎, 葛秀秀, 徐兆华, 王辉, 2005, 小麦多酚氧化酶 (*PPO*) 活性的 SSR 标记筛选与验证, *中国农业科学*, 38(7):1295-1299)
- Tommasini L., Yahiaoui N., Srichumpa P., Keller B., 2006, Development of functional markers specific for seven *Pm3* resistance alleles and their validation in the bread wheat gene pool, *Theoretical and Applied Genetics*, 114:165-175
- Wang X.P., Ma C.X., He K.Q., Si H.Q., Zhang Y.L., 2008, Development and Application of a STS Marker for Grain *PPO* Gene Located on Chromosome 2D in Common Wheat, *Zhongguo Nongye Kexue (Scientia Agricultura Sinica)*, 41(6):1583-1590 (王晓波, 马传喜, 何克勤, 司红起, 张叶伦, 2008, 小麦 2D 染色体多份氧化酶 (*PPO*) 基因 STS 标记的开发与应用, *中国农业科学*, 41(6):1583-1590)
- Xiao Y.G., He X.X., Sun D.J., Xia X.C., He Z.H., 2008, Molecular Identification and Distribution of the Polyphenol Oxidase Genes in Chinese Winter Wheat

- Cultivars, *Zhongguo Nongye Kexue (Scientia Agricultura Sinica)*, 41(5):954-960(肖永贵,何心尧,刘建军,孙道杰,夏先春,何中虎,2008,我国冬小麦品种多酚氧化酶活性基因等位变异检测及其分布规律研究,中国农业科学, 41(5):954-960)
- Yan L., Helguera M., Kato K., Fukuyama S., Sherman J., Dubcovsky J., 2004, Allelic variation at VRN-1 promoter region in polyploidy wheat, *Theor Appl Genet*, 109:1677-1686
- Yan L., Loukoianov A., Blech A., Tranquili G., Ramakrishna W., Sanmiguel P., Bennetzen J.L., Echenique V., Dubcovsky J., 2004, The wheat VRN2 gene is a flowering repressor down-regulated by vernalization, *Science*, 303: 1640-1644
- Yan L., Loukoianov A., Tranquili G., Helguera M., Fahima T., Dubcovsky J., 2003, Positional cloning of the wheat vernalization gene VRN1, *Proc Natl Acad Sci USA*, 100:6263-6268
- Yang F.P., He X.X., He Z.H., Shang X.W., Yang W. X., Xia X. C., 2008, Molecular Detection and Distribution of Allelic Variation of a Gene for Yellow Pigment Content in Chinese Winter Wheat Cultivars, *Zhongguo Nongye Kexue (Scientia Agricultura Sinica)*, 41(10):2923-2930(杨芳萍,何心尧,何中虎,尚勋武,杨文雄,夏先春, 2008,中国小麦品种黄色素含量因等位变异分子检测及其分布规律研究,中国农业科学, 41(10):2923-2930)
- Yang J.H., Wang S.W., Liu X.Y., Yang J.F., Zhang M.F., 2008, Development and Application of Functional Markers in Higher Plants, *Zhongguo Nongye Kexue (Scientia Agricultura Sinica)*, 41(11):3429-3436 (杨景华,王士伟,刘训言,杨加付,张明方,2008,高等植物功能性分子标记的开发与利用,中国农业科学,41(11):3429-3436)
- Zhang L.P., Ge X.X., He Z.H., Wang D.S., Xia X.C., Mark M.S., 2005, Mapping QTLs for Polyphenol Oxidase Activity in a DH Population from Common Wheat, *Zuowu Xuebao(Acta Agronomica Sinica)*,31:7-10(张立平,葛秀秀,何中虎,王德森,闫俊,夏先春,Mark M Sutherland, 2005,普通小麦多酚氧化酶活性的QTL分析,作物学报, 31:7-10)



《分子植物育种》是一份为转基因育种、分子标记辅助育种及常规育种服务的科学杂志,也是中国唯一的一份以育种为名的科学杂志。于2003年创刊,创刊伊始即被美国化学文摘(CA),中国科学引文数据库、中国科技期刊全文数据库、中国引文数据库,中国科技期刊数据库、中文科技期刊数据库,中国核心期刊(遴选)数据库,中国生物学文摘和中国生物学数据库等多家中外文献数据库收录。



在线投稿: <http://mpb.chinese.sophiapublisher.com>



5thPublisher是一个致力于科学与文化传播的中文出版平台

在5thPublisher上发表论文,任何人都可以免费在线取阅您的论文

- ※同行评审, 论文接受严格的高质量的评审
- ※在线发表, 论文一经接受, 即刻在线发表
- ※开放取阅, 任何人都可免费取阅无限使用
- ※快捷搜索, 涵盖谷歌学术搜索与知名数据库
- ※论文版权, 作者拥有版权读者自动授权使用

在线投稿: <http://5th.sophiapublisher.com>