

胡 云,徐如宏,程剑平. 小麦高蛋白含量基因与部分优质基因的聚合研究[J]. 江苏农业科学,2016,44(6):50-53.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.06.011

小麦高蛋白含量基因与部分优质基因的聚合研究

胡 云¹, 徐如宏², 程剑平²

(1. 安顺学院农学院, 贵州安顺 561000; 2. 贵州大学麦作研究中心, 贵州贵阳 550025)

摘要:利用分子标记辅助选择与传统育种相结合的方法,将来自美国的小麦高蛋白基因 *GPC-B1* 与抗白粉病基因 *Pm21*, 优质亚基 *1Dx5*、*1Dy10* 等优良基因聚合到同一植株。首先将携带高蛋白含量基因 *GPC-B1* 小麦分别与抗白粉病基因 *Pm21*、优质亚基 *1Dx5*、*1Dy10* 小麦杂交得到 F₂, 利用分子标记辅助选择对亲本及杂交后代进行筛选, 结合小麦抗病性鉴定、小麦籽粒蛋白质含量测定等方法对结果做进一步鉴定。结果发现, F₂ 群体中 100 个株系中有 6 株聚合了 *GPC-B1*、*Pm21*、*1Dx5*、*1Dy10* 4 种基因, 11 株聚合高蛋白基因 *GPC-B1* 和抗白粉病基因 *Pm21*, 8 株聚合了 *GPC-B1* 和 5 + 10 亚基。本研究为培育具有高蛋白含量及多个优质基因的小麦优良品系提供了育种材料和理论依据。

关键词:小麦; 优质; 基因; 聚合; 高蛋白

中图分类号: S512.103 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)06-0050-03

传统育种技术通常受环境条件和显隐性关系等因素的影响, 存在效率低、选择时间长等缺点。分子标记辅助选择可降低育种盲目性、缩短育种时间、提高选择效率^[1-2]。在聚合育种方面, 相关报道并不少见, 如通过聚合育种获得了带有抗白粉病基因 *Pm2* + *Pm4a*, *Pm4a* + *Pm21* 的新品系^[3-4], 以及具有优质亚基 *HNW-GS 1*、*14* + *15*、*5* + *10* 的聚合体^[5-8]。但是, 相关报道基本上是针对不同基因控制的同一表现性状, 而本研究是利用传统育种和分子标记辅助选择相结合的方法,

将高蛋白含量基因 *GPC-B1*、抗白粉病基因 *Pm21* 以及优质亚基 *1Dx5* 和 *1Dy10* 等控制不同性状的优良基因进行杂交, 选育出聚合有 *GPC-B1*、*Pm21*、*1Dx5* 和 *1Dy10* 等优质基因的植株, 为小麦选育优良种质资源提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究选用 11 个试验小麦材料, 详见表 1。

表 1 试验材料及相关特性

编号	名称	抗病性	感病性	特征	备注
1	A - GPC			携带高蛋白含量基因 <i>GPC-B1</i> (用作父本)	来自美国, 由程剑平教授提供
2	R - GPC				
3	PF638741				
4	PI638740			<i>GPC-B1</i> , 早熟 (用作父本)	
5	贵农 17 号	对白粉病、条锈病免疫		(用作母本)	贵州当地种质, 由贵州大学麦作研究中心提供
6	贵农 21	抗白粉病		<i>Pm21</i> ; 5 + 10 (用作母本)	
7	莱州 137		感白粉病	矮秆; 株型较好 (用作母本)	
8	贵农 775	抗白粉病		<i>Pm21</i> ; 亚基 1、20、2 + 12 (用作母本)	
9	Laura			5 + 10 (用作母本)	
10	Laura × 贵农 21F ₁	抗白粉病		5 + 10 (用作母本)	
11	X - 2003			复合杂交后代, 含有 <i>1D5</i> + <i>10</i> 、7 + 8、5 + 10 和 <i>Pm21</i> (用作母本)	

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取 采用 CTAB 法^[9]提取小麦亲本、杂交 F₁ 总 DNA, 以及 100 个 F₂ 抗病单株的 DNA。待小麦长至 3~4 片叶时, 取 0.2 g 新鲜幼嫩叶片放入研钵中, 加入 750 μL 的

提取缓冲液磨碎, 缓冲液为 50 mmol/L EDTA - Na₂, 100 mmol/L Tris - HCl, 2% CTAB, 100 mmol/L NaCl; 倒入 1.5 mL 离心管 65 ℃ 下水浴 1 h, 其间上下颠倒 2 次; 加入等体积的氯仿 - 异戊醇 (24 : 1), 混匀 10 min, 18 ℃、13 000 r/min 冷冻离心机内离心 10 min; 取上清液放入 1.5 mL 离心管中, 加入 750 μL 异丙醇混匀 10 min; 去上清液, 加入 1 mL 70% 乙醇清洗 DNA, 室温下放置 5~10 min, 7 500 r/min 离心 5 min, 去上清液、干燥。加入 100 μL 0.1 × TE 混匀, 37 ℃ 下水浴 1 h, 取 2 μL 总 DNA, 1% 琼脂糖电泳检测其纯度和浓度。其余 DNA 在 4 ℃ 条件下保存。

1.2.2 小麦优质基因的分子标记辅助选择 (1) 小麦高蛋白基因的 SSR 分析。与高蛋白基因 *GPC-B1* 连锁的特异引

收稿日期: 2015-05-13
基金项目: 贵州省省长基金 (编号: 2005175)。
作者简介: 胡 云 (1982—), 女, 贵州织金人, 讲师, 从事作物遗传育种研究。E-mail: 705498263@qq.com。
通信作者: 徐如宏, 教授, 硕士生导师, 从事小麦遗传育种及分子标记研究。E-mail: xrlhgz@163.com; 程剑平, 教授, 博士生导师, 从事野生麦类作物和我国西南岩溶地区石漠化综合治理研究, E-mail: chengjianping@gmail.com。

物为 Xuhw89^[9], 其序列为: UHW89 - BF: 5' - TCTCCAA-GAGGGGAGAGACA - 3', UHW89 - R: 5' - TTCCTCTACCCAT-GAATCTAGCA - 3'。特异引物 UHW89 - BF、UHW89 - R 扩增多态性标记为 SSR₁₂₂。所有 PCR 反应都在 Perkin - Thermocycle 480 上进行, 反应总体积为 20 μ L。SSR 反应体系中含有 10 mmol/L Tris - HCl (pH 值 8.8), 50 mmol/L KCl; 2 mmol/L MgCl₂; 100 μ mol/L dNTP; 0.5 μ mol/L 特异引物; 1 U Taq DNA 聚合酶(上述药品均购自上海生工生物工程技术有限公司); 50 ~ 100 ng 模板 DNA, 加 ddH₂O 至终体积 20 μ L。加 1 滴矿物油覆盖后进行扩增。反应条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 60 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 循环 40 次; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。

(2) 小麦抗白粉病基因的 SCAR 分析。与 *Pm21* 基因连锁的 SCAR 引物序列: D - R: 5' - CCTCGTTGTCAGCCTC-TATG - 3', D - L: 5' - CTATGGAGTATCAATACGACTCCT - 3'。其扩增多态性标记 SCAR140。SCAR 反应体系中含有 10 mmol/L Tris - HCl (pH 值 8.8), 50 mmol/L KCl; 2 mmol/L MgCl₂; 100 μ mol/L dNTP; 0.5 μ mol/L 特异引物; 1 U Taq DNA 聚合酶; 50 ~ 100 ng 模板 DNA, 加 ddH₂O 至终体积 20 μ L。加 1 滴矿物油覆盖后进行扩增。反应条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 55 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 循环 40 次; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。

(3) 小麦高分子量谷蛋白亚基的 PCR 分析^[10-15]。1 对 Glu - D1y 位点的特异引物设计^[7], 其序列为: 10S - 1: 5' - GTTGGCCGCTCGGCTGCCATG - 3', 10S - 2: 5' - TG-GAGAACTTGGATAGTACC - 3'; 与 Glu - D1x 位点连锁的特异引物序列为: P1: 5' - GCCTAGCAACCTTCACAAATC - 3', P2: 5' - GAAACCTGCTGCGGACAAAGT - 3'。*IDx5* 基因扩增片段为 450 bp, *IDy10* 基因扩增片段为 576 bp。扩增程序同上。

1.2.3 小麦白粉病的抗性鉴定 参照徐如宏等的方法^[5]。当感病对照莱州 137 发病严重时对田间所有小麦植株进行白粉病抗性鉴定和记录。

1.2.4 小麦籽粒蛋白质含量的测定 采用微量凯氏定氮法测定小麦籽粒的蛋白质含量。准确称取 0.1 g 干燥样品 3 份于 50 mL 消化管内, 加 0.5 g 催化剂(硫酸钾: 硫酸铜 = 3: 1)、5 mL 30% 过氧化氢 - 浓硫酸 - 蒸馏水(3: 2: 1)混合液。稍加振荡, 斜置于电炉上, 在通风橱内进行消化; 消化到溶液显浅蓝绿色的透明状时, 继续加热沸腾 10 min。撤离热源, 待消化液冷却至室温后, 加水 10 ~ 20 mL, 待溶液温度降至室温后, 转入 100 mL 的容量瓶中, 加水稀释到刻度混匀备用。然后用 Foss kjeltecTM2200 型全自动凯氏定氮仪测定。

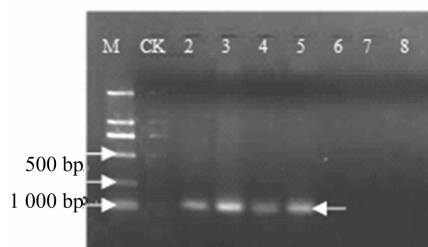
2 结果与分析

2.1 小麦高蛋白含量基因 *GPC-B1* 的 SSR 标记

引物 Xuhw89 在 122 bp 的位置显示特征带, 4 个小麦高蛋白材料都在同一位置出现了 1 条特征 DNA 片段。对照材料莱州 137 和其他 5 个贵州地方小麦材料都不具有此特征带(图 1)。再对 F₂ 群体的 100 个单株进行检测, 其中 76 株中检测出携带 *GPC* 基因, 24 株未检测出特异带(图 2)。

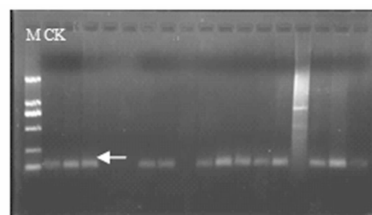
2.2 Glu - 1 位点等位基因的 PCR 检测

2.2.1 小麦优质亚基 *IDx5* 特异 PCR 标记 对 F₂ 群体的



CK—莱州137; M—marker; 2—A-GPC; 3—R-GPC; 4—PF638741; 5—PI638740; 6—X-2003; 7—贵农21; 8—贵农17号; 白色箭头为目标片段

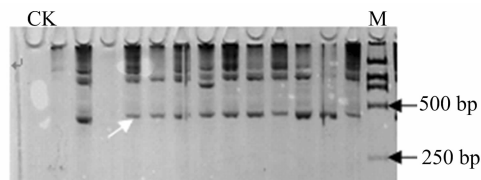
图1 Xuhw89 引物对不同材料的扩增结果



CK为高蛋白含量对照; M为标准分子量 marker PI638740; 其余为部分F₂单株; 白色箭头为目标片段

图2 引物 Xuhw89 在 F₂ 部分群体的扩增结果

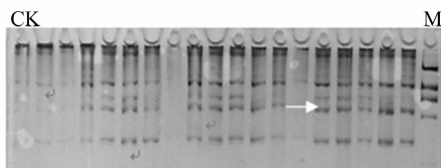
100 个单株进行检测, 其中在 38 株中未检测出特异带, 62 株中检测出携带 *IDx5* 基因(图 3)。*IDx5* 亚基引物的特异性较强, 可用作 *IDx5* 基因的 PCR 检测。



M为 marker; CK为不含 *IDx5* 基因的对照材料 PI638740; 其余为部分F₂单株; 白色箭头为目标片段

图3 *IDx5* 特异引物在 F₂ 部分植株中的扩增结果

2.2.2 *IDy10* 亚基特异 PCR 标记 对 F₂ 群体的 100 个单株进行检测, 其中 42 个样本株中检测出携带 *IDy10* 基因, 58 株中未检测出特异带(图 4)。对 HWM - GS 基因检测结果表现为共显性(10 亚基的 PCR 标记)或显性(5 亚基的 PCR 标记), 与梁荣奇等的研究结果^[15]一致。



M为 marker; CK为不含 *IDy10* 基因的对照材料 PI638740; 其余为部分F₂单株; 白色箭头为目标片段

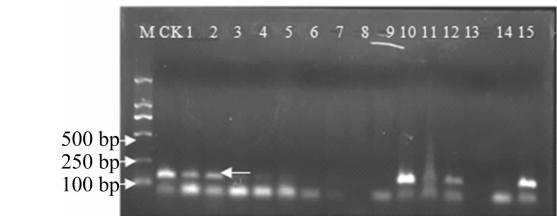
图4 *IDy10* 引物在 F₂ 部分植株中的扩增结果

2.3 抗白粉病基因的 SCAR 标记

对 F₂ 群体中 100 个单株进行抗白粉病基因 *Pm21* 分子标记检测, 结果见图 5 和表 2。具有抗病标记的单株有 78 株, 无特异标记的有 22 个单株。在 F₂ 群体中, 抗白粉病性状呈现近 3: 1 的比例, 表明了抗白粉病基因 *Pm21* 是显性单基因控制的遗传。

2.4 小麦白粉病抗性鉴定

为验证小麦抗白粉病基因分子标记结果,对亲本材料及 F₂ 群体中的 100 个单株分别进行了田间白粉病抗性鉴定。鉴定结果表明,亲本材料中除 X-2003、贵农 775、贵农 17 号、贵农 21、laura × 贵农 21 F₁ 对白粉病免疫以外,莱州 137 和 4 份高蛋白材料 A-GPC、R-GPC、PF638741、PI638740 均感病。另外,PI638740 的成熟期比其他研究材料提前 1 周左右; F₂ 群体中 100 个单株的白粉病抗性见表 2(此处仅列出前 20 个单株的鉴定结果)。



M 为标准分子量 marker; CK 为对照材料 PI638740; 1~15 为 F₂ 部分单株; 白色箭头为目标片段
图5 Pm21 特异引物在 F₂ 部分植株中的扩增结果

表 2 20 个 F₂ 群体的分子标记检测及抗性鉴定结果

株号	PCR 标记 (5 + 10)	PCR 标记 (GPC)	SCAR 标记	抗病性
1	576 bp	—	+	R
2	450 bp + 576 bp	122 bp	+	R
3	576 bp	122 bp	+	R
4	450 bp + 576 bp	—	+	R
5	450 bp + 576 bp	122 bp	+	R
6	450 bp	122 bp	+	R
7	450 bp + 576 bp	—	—	S
8	450 bp + 576 bp	122 bp	+	R
9	450 bp + 576 bp	122 bp	—	S
10	450 bp + 576 bp	122 bp	—	S
11	450 bp + 576 bp	—	+	R
12	450 bp	122 bp	—	S
13	450 bp + 576 bp	122 bp	+	R
14	576 bp	—	—	S
15	450 bp + 576 bp	122 bp	—	S
16	576 bp	122 bp	+	R
17	—	122 bp	+	R
18	—	—	+	R
19	450 bp + 576 bp	122 bp	+	R
20	450 bp + 576 bp	—	+	R

在 F₂ 群体中的 100 个单株中,同时具有 5 + 10 亚基、高蛋白基因 GPC-BI 和抗白粉病基因 Pm21 标记的单株有 6 株;同时有高蛋白基因、抗白粉病基因标记的有 11 株;具有高蛋白基因 GPC-BI 和 5 + 10 亚基的群体为 8 株。

2.5 小麦籽粒蛋白质含量的测定

用微量凯氏定氮法对供试材料进行蛋白质含量的测定(表 3)。7 个母本材料中小麦蛋白质含量在 13.05% ~ 18.61%,平均含量 16.55%。4 个父本中 PI638740 的蛋白质含量比另外 3 个材料较高,为 20.41%;其余 3 个高蛋白材料比部分贵州当地材料的蛋白质含量低,而分子标记的结果表明它们均含有高蛋白含量基因 GPC-BI,这可能是由于地理、气候等方面的因素所致,使其性状未表达。在 4 组杂交

F₁ 中,小麦籽粒蛋白质含量有的在 2 个亲本之间,有的比蛋白质含量最低的亲本稍小。

表 3 亲本及杂交 F₁ 籽粒蛋白质的含量

名称 (亲本)	蛋白质含量 (%)	名称 (F ₁)	蛋白质含量 (%)
PI638740	20.41	X-2003/PI638740	18.03
PF638741	16.97	X-2003/PI638741	16.80
R-GPC	16.28	X-2003/R-GPC	16.52
A-GPC	13.82	X-2003/A-GPC	13.92
贵农 775	18.61		
laura × 贵农 21 F ₁	18.28		
贵农 17 号	17.21		
X-2003	16.77		
laura	16.13		
贵农 21	15.82		
莱州 137	13.05		

3 讨论

本研究表明,来自美国的高蛋白材料 PI638740 不仅蛋白质含量比贵州当地小麦高,而且其成熟期也提前 1 周左右^[8-13]。对于 4 个携带高蛋白基因的育种材料而言,综合其分子标记辅助选择、小麦籽粒蛋白质含量的测定、抗病性鉴定以及成熟时间来看,在今后的小麦育种过程中,我们将首选 PI638740 作为父本材料来进行下一步的聚合研究。蛋白质含量低一直是贵州小麦品质发展的一个瓶颈,GPC 基因是小麦育种者眼中的一个亮点,是提高贵州小麦蛋白质含量的一个宝贵资源,将其转育到具有优质基因的小麦种质中是一个重要育种目标,有望进一步改善贵州小麦的营养价值,以逐渐符合人们对小麦越来越高的饮食要求。

在本研究中,利用分子标记辅助选择和多基因聚合研究相结合,快速准确鉴别所需转移的目的基因,对选育优质、高蛋白、抗病的小麦品种(系)具有重要意义。跟传统育种技术相比,分子标记技术在育种过程中不仅可以对早代材料的目的基因进行选择,并且还能快速掌握亲本的育种特点,对其选择适合的杂交方式如回交、复交等,可缩短育种年限,大大提高育种效率,加快品种的繁育速度。

本研究通过传统育种技术和分子标记相结合的育种方式,将控制高蛋白含量的基因 GPC-BI、与烘烤品质有关的优质亚基 1Dx5、1Dy10 和抗白粉病基因 Pm21 中的 2 个或 2 个以上的基因聚合到同一植株中,为培育贵州小麦新品系提供了重要育种材料和理论依据。

参考文献:

[1] Tansley S D, Yong N D, Paterson A H, et al. RFLP mapping in plant breeding new tools for old science[J]. Biotechnology, 1989, 7(3): 257-264.
[2] 刘景芳, 张增艳, 陈孝, 等. 小麦抗白粉病基因 Pm13 及 Pm4 累加体的分子标记辅助选择[J]. 植物病理学报, 2002, 32(4): 296-300.
[3] 王心宇, 陈佩德, 张守忠. 小麦白粉病抗性基因的聚合及其分子标记辅助选择[J]. 遗传学报, 2001, 28(7): 640-646.

张 涛, 韩 梅, 刘翠晶. 人参 *CYP716A53v2* 基因的克隆与序列分析[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(6): 53–56.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.06.012

人参 *CYP716A53v2* 基因的克隆与序列分析

张 涛, 韩 梅, 刘翠晶

(吉林农业大学中药材学院, 吉林长春 130118)

摘要: 研究人参皂苷生物合成途径中的影响因子。以五年生人参根组织为试验材料, 提取总 RNA, 反转录合成 cDNA 的第 1 条链, 利用 PCR 法对人参中的原人参三醇合成酶 (*CYP716A53v2*) 基因的 cDNA 进行克隆及序列分析。获得 *CYP716A53v2* 基因全长片段为 1 506 bp, 开放阅读框长 1 410 bp, 编码 470 个氨基酸多肽。生物信息学分析显示, *CYP716A53v2* 基因编码蛋白质不含跨膜区域。说明 *CYP716A53v2* 基因与其他植物氨基酸序列具有较高同源性, 其中与人参、西洋参、三七同源性分别为 99%、98%、98%。

关键词: 人参皂苷; 基因克隆; 序列分析

中图分类号: S567.5⁺10.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)06-0053-04

人参 (*Panax ginseng* C. A. Meyer) 为五加科人参属名贵药材, 自古以来是中国重要药用植物, 有“百草之王”的美誉。现代药理学研究表明, 人参皂苷为人参主要药效成分, 按苷元基本骨架可分为齐墩果烷型和达玛烷型, 属于三萜类化合物。目前, 已从人参中分离得到约 90 种人参皂苷单体^[1-3]。抗癌活性成分人参皂苷 Rg3 已经于 2000 年批准为一类新药^[4]; 随着老龄化人口增加和疾病的改变, 如心血管疾病和肿瘤人口的增加, 人参皂苷 Rg 和 Re 被命名为血管生长因子。人参皂苷含量和组成是人参质量的重要指标, 人参皂苷的含量较低, 人工合成次生代谢产物人参皂苷尚未实现, 对于一些含量甚

微的单体皂苷的新药开发还较为困难。人参皂苷的生物合成途径与功能基因的表达量之间的关系仍处于探究阶段。深入了解人参皂苷生物合成途径及其调控机理, 在分子水平上实现人参皂苷的人工合成, 这将是利用生物技术手段大量生产人参皂苷的必然前提。

原人参三醇合成酶 (*CYP716A53v2*) 是达玛烷型人参皂苷合成的重要调控酶, 原人参三醇合成酶催化原人参二醇到原人参三醇的过程, 相关试验研究认为, 细胞色素 P450 *CYP716A53v2* 基因 mRNA 表达量与三萜皂苷的生成量呈正相关^[5]。本试验对人参皂苷生物合成途径中的细胞色素 P450 *CYP716A53* 基因进行了克隆与序列分析, 目的在于从基因水平研究人参皂苷生物合成途径的调控机制, 实现三萜皂苷基因的高效表达, 增加人参药材的药效成分含量, 提高人参药材质量和经济价值, 为实现未来药材质量安全、可控、稳定、有效的发展目标提供理论依据。

收稿日期: 2015-05-05

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 31270371); 国家科技支撑计划 (编号: 2011BAI03B01-02)。

作者简介: 张 涛 (1991—), 男, 硕士研究生, 主要从事药用植物分子生态学。E-mail: 251073371@qq.com。

通信作者: 韩 梅, 教授, 主要从事药用植物资源与药材质量评价。E-mail: hanmei77@sohu.com。

[4] 张增艳, 陈 孝, 张 超, 等. 分子标记选择小麦抗白粉病基因 *Pm4b*、*Pm13* 和 *Pm21* 聚合体[J]. 中国农业科学, 2002, 35(7): 789–793.

[5] 徐如宏, 任明见, 黄世全, 等. 小麦抗病种质贵农 775 中抗白粉病基因的 RAPD 标记[J]. 作物学报, 2005, 31(2): 243–247.

[6] 徐如宏, 张庆勤. 贵农系列高产, 多抗小麦新材料中 HMW-GS 的组成研究[M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2003: 193–197.

[7] 孙 辉, 刘志勇, 李保云, 等. 利用 PCR 技术鉴定普通小麦 Glu-1 位点的某些等位基因[J]. 作物学报, 2002, 28(6): 734–737.

[8] Smith R L, Schweder M C, Bamett R D. Identification of glutenin alleles in wheat and triticale using PCR-generated DNA markers[J]. Crop Science, 1994, 34(5): 1373–1378.

[9] 胡 云, 徐如宏. 小麦高蛋白质含量基因 *GPC-B1* 的分子标记研究[J]. 天津农业科学, 2014, 20(9): 6–10.

[10] Joppa LR, Cantrell R G. Chromosomal location of genes for grain protein content in wild tetraploid wheat[J]. Crop Science, 1994, 30(5): 1059–1064.

[11] Joppa LR, Du C, Hart G E, et al. Mapping gene(s) for grain protein in tetraploid wheat (*Triticum turgidum* L.) using a population of recombinant inbred chromosome lines[J]. Crop Science, 1997, 37(5): 1586–1589.

[12] Mesfin A, Froberg R C, Anderson J A. RFLP markers associated with high grain protein from *Triticum turgidum* L. var. *dicoccoides* introgressed into hard red spring wheat[J]. Crop Science, 1999, 39(2): 508–513.

[13] Dubcovsky J, Fahima T. Positional cloning of a gene responsible for high grain protein content in tetraploid wheat[R]. BARD Final Scientific Report, 2004.

[14] Avivi L. High protein content in wild tetraploid *Triticum dicoccoides* Korn[C]. Proceedings of the 5th International Wheat Genetics Symposium, 1978: 372–380.

[15] 梁荣奇, 张义荣, 尤明山, 等. 利用高分子量谷蛋白亚基的特异 PCR 标记辅助选育优质面包小麦[J]. 农业生物技术学报, 2001, 9(4): 322–325, 409.