

青海春小麦高分子量谷蛋白亚基分子标记辅助回交选择

刘永安^{1,2}, 陈志国¹, 王海庆¹, 沈裕琥¹, 窦全文¹

(1. 中国科学院西北高原生物研究所, 青海西宁 810001; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘要: 为了改良青海省现有小麦主栽品种的品质性状, 以青海省春小麦主栽品种青春 533 和高原 602 为轮回亲本, 以具有 1Dx5 + 1Dy10 基因且综合性状良好的宁春 4 号为非轮回亲本, 利用与 1Dx5 基因共分离的 PCR 分子标记对 BC₁F₁、BC₂F₁ 和 BC₃F₁ 植株进行目标基因检测; 将筛选到的具有 1Dx5 基因的 BC₃F₁ 植株进行自交, 获得了 BC₃F₂ 种子, 利用 SDS-PAGE 电泳对 BC₃F₂ 种子进行 HMW-GS 分析, 分别从青春 533 × 宁春 4 号和高原 602 × 宁春 4 号的 BC₃F₂ 中筛选出 5 粒和 2 粒具有纯合 5 + 10 亚基的种子, 且中选植株的农艺性状基本接近轮回亲本。

关键词: 春小麦; 分子标记辅助选择; 品质改良; 1Dx5 + 1Dy10

中图分类号: S512.1; S331

文献标识码: A

文章编号: 1009-1041(2008)03-0410-05

Molecular Marker-Assisted Backcross Selection on HMW-GS of Spring Wheat Cultivars in Qinghai

LIU Yong-an^{1,2}, CHEN Zhi-guo¹, WANG Hai-qing¹, SHEN Yu-hu¹, DOU Quan-wen¹

(1. Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining, Qinghai 810001, China;

2. Graduate school, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Abstract: In order to select spring wheat lines of high yield and good quality, Qingchun 533 and Plateau 602 which were main cultivars in Qinghai province were used as recurrent parents, Ningchun 4 with excellent agronomic traits was used as 1DX5 + 1DY10 gene donor. Target genes were screened and individuals with target gene were selected in BC₁F₁; BC₂F₁; BC₃F₁ by using a PCR molecular marker co-segregated with 1DX5 gene. The selected BC₃F₁ which carried 1DX5 gene were selfed to produce BC₃F₂, SDS-PAGE analysis was carried out to detect the presence of 1DX5 among the progeny of (Qingchun 533 × Ningchun 4) and 2 plants from progeny of (Plateau 602 × Ningchun 4) containing homozygous 5 + 10 subunits were acquired, respectively, and the agronomic traits of these selected plants were similar to recurrent parents in general. It is shown that molecular assisted selection, along with biochemical marker and phenotypic selection, is a quick and effective method for transferring of good quality HMW-GS into common wheat cultivars by backcross. It is hopeful that new cultivars with good quality and high yield will be developed in the near future using this research system.

Key words: Spring wheat; MAS; Quality improving; 1DX5 + 1DY10

小麦高分子量谷蛋白亚基 (High-molecular-weight glutenin subunits, HMW-GS) 组成对小麦烘烤品质有重要的影响, 其中 5 + 10 亚基和 2 + 12 亚基与小麦面包烘烤品质密切相关^[1,2]。

Gupta 等^[3]研究表明, 聚合有 5 + 10 亚基的等位基因系中 SDS-不溶性谷蛋白聚合体的含量比聚合有 2 + 12 亚基的等位基因系高; 5 + 10 亚基对

* 收稿日期: 2007-11-20

修回日期: 2008-02-10

基金项目: 中国科学院院长基金特别支持项目“抗病、优质春小麦分子标记辅助育种”。

作者简介: 刘永安 (1980 →), 男, 在读硕士, 研究方向为植物遗传育种。E-mail: liuanliuan123@163.com。

通讯作者: 窦全文 (1970 →), 男, 博士, 副研究员, 主要从事小麦遗传育种研究。E-mail: douqw@nwipb.ac.cn。

间的互作对提高和面时间的效应比 2 + 12 亚基好;10 亚基对 SDS 沉淀值有正效应,而 12 亚基对 SDS 沉淀值具有负效应。因此,用 5 + 10 亚基替代 2 + 12 亚基,将有可能使面筋的弹性增强,谷蛋白聚合体的数量增多、比例增大,并且具有较高的沉淀值和优良的烘烤品质。

中国小麦聚合有 5 + 10 优质亚基的品种较少。青海省在小麦品种选育过程中,长期以来偏重高产,忽视了对品质的改良,育成品种的品质普遍较差,聚合有 5 + 10 优质亚基的品种尤为缺少。因此,选育含有 5 + 10 优质亚基的品种(系)成为我省小麦品质改良的重要内容之一。

分子标记辅助育种具有准确性高和效率高的优点,该方法已运用于小麦品质育种工作中。梁荣奇、张晓科等^[4,5]研究表明,利用 5 + 10 优质亚基的分子标记可以对亲本以及杂交后代中的 5 + 10 优质亚基进行准确鉴定;利用分子标记结合回交转育是快速定向聚合多种优质亚基基因的有效手段。但在青海省小麦品质育种中,结合分子标记辅助选择的研究还比较少。因此,本研究以青海当地主栽品种为轮回亲本,以引进的具有 5 + 10 优质亚基的品种为非轮回亲本,采用回交与 1Dx5 基因的 PCR 分子标记辅助选择相结合选育农艺性状与轮回亲本相近且含有 5 + 10 亚基的优良后代,以期改良青海现有推广小麦品种的面包烘烤品质。

1 材料与方 法

1.1 材 料

以春小麦品种高原 602、青春 533 和宁春 4 号为试验材料。其中高原 602(1,7 + 8,2 + 12)和青春 533(Null,7,2 + 12)分别是青海省广泛种植的旱地品种和水地品种;宁春 4 号(1,17 + 18,5 + 10)为宁夏广泛种植的春小麦品种。

1.2 回交世代的创造

回交世代创造的整个过程都在温室里的花盆中进行。先将宁春 4 号分别与高原 602 和青春 533 杂交得到 F₁,再分别以高原 602 和青春 533 为轮回亲本与 F₁ 回交得到 BC₁F₁,利用 PCR 分子标记检测出携带 1Dx5 基因的植株,选择与轮回亲本性状的植株继续回交,得到 BC₂F₁ 和 BC₃F₁。为得到目标基因纯合的植株,将携带 1Dx5 且性状与轮回亲本相近的 BC₃F₁ 自交得到 BC₃F₂。

1.3 DNA 的提取

亲本以及 BC₁F₁、BC₂F₁、BC₃F₁、BC₃F₂ 叶片 DNA 的提取按照 CTAB 法^[6]进行。

1.4 目标基因的 PCR 检测

编码 5 亚基的 1Dx5 基因与 10 亚基的 1Dy10 基因紧密连锁,它们通常伴随出现。在本研究中,1Dx5 基因的检测参照 R. D'Ovidio 等^[7]的方法进行,在该方法中 PCR 引物根据 1Dx5 基因的序列合成,扩增出的 DNA 片段为 1Dx5 基因的一部分,因此,检测 1Dx5 基因的分子标记与 1Dx5 基因是共分离的。通过 PCR 检测,凡携带 1Dx5 基因的植株均能扩增出 450 bp 的特异条带,而未携带该基因的植株则不能扩增出此条带。引物 1 为:5 - GCCTA GCAACCTTCACAA TC - 3 ;引物 2 为:5 - GAAACCTGCTGCGGACAA G - 3 。PCR 反应体系为:模板 DNA 25 ~ 100 ng,引物 10 mmol/L ,dNTP 2.5 mmol/L ,MgCl₂ 5 mmol/L ,Taq 酶 1U,1 ×PCR Buffer,反应体积为 20 μL。PCR 反应条件为:预变性 94 1 min,变性 94 30 s,退火 65 45 s,延伸 72 50 s,35 个循环,最后延伸 72 5 min;PCR 产物在 1%琼脂糖凝胶上电泳,紫外灯下检测、照相。

1.5 SDS-PAGE 电泳

为了筛选具有 5 + 10 优质亚基且其 HMW-GS 位点纯合的个体,随机选取 BC₃F₂ 代种子,用 SDS-PAGE 电泳分析每粒种子 HMW-GS 的组成。HMW-GS 的提取和电泳参照徐黎黎等^[8]的方法,改用 Tris-甘氨酸(含 2% SDS)为电极缓冲液;亚基命名采用 Payne 等^[9]建立的系统。

1.6 农艺性状调查

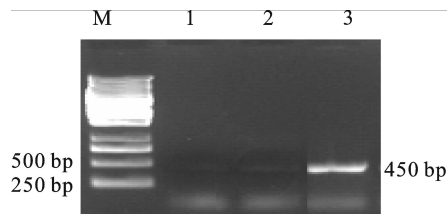
成熟期考察植株的株高、穗长、穗粒数等性状,以整株收获的种子进行千粒重的考察。

2 结果与分析

2.1 亲本中 1Dx5 基因的 PCR 检测结果

已知高原 602 和青春 533 在 Glu-D1 位点为 1Dx2 + 1Dy12 基因,宁春 4 号在 Glu-D1 位点为 1Dx5 + 1Dy10 基因。本研究中,对各亲本进行了 PCR 分子标记鉴定,在宁春 4 号中扩增出 450 bp 的目标片段(图 1),而在高原 602 和青春 533 中没有扩增出 450 bp 的目标基因片段。此结果验证了 PCR 分子标记的可靠性,同时在 DNA 分子水平上证实了轮回亲本和非轮回亲本中 1Dx5 基因的携带情况,为进一步建立回交世代以及回

交世代中目标基因的分子标记选择奠定了基础。



M: marker; 1:高原 602; 2:青春 533; 3:宁春 4 号
M: marker; 1: Plateau 602; 2: Qingchun 533; 3: Ningchun 4

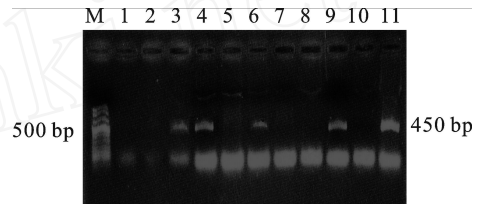
图 1 亲本中 1Dx5 + 1Dy10 基因的 PCR 检测结果

Fig. 1 PCR detection for 1Dx5 + 1Dy10 gene in parents

2.2 回交世代的建立及回交世代中目标基因的分子鉴定

本研究中,首先以轮回亲本和非轮回亲本杂交获得 F₁ 代,再以高原 602 和青春 533 为轮回亲本进行回交,获得 BC₁F₁,利用 1Dx5 基因的 PCR 分子标记对回交后代植株进行鉴定,选择具有 1Dx5 基因的植株继续与轮回亲本杂交,依次获得 BC₂F₁、BC₃F₁。对 BC₁F₁、BC₂F₁、BC₃F₁ 植株中目标基因进行 PCR 分子鉴定,结果 8 个(青春

533 × 宁春 4 号)和 5 个 BC₁F₁ (高原 602 × 宁春 4 号)分别有 4 个和 2 个植株、8 个(青春 533 × 宁春 4 号)和 11 个(高原 602 × 宁春 4 号)BC₂F₁ 分别有 3 个和 5 个植株(图 2)、12 个(青春 533 × 宁春 4 号)和 6 个(高原 602 × 宁春 4 号)BC₃F₁ 分别有 6 个和 2 个植株能扩增出 450 bp 的目标片段,即有近 1/2 的植株能扩增出 450 bp 的目标片段,说明通过该分子标记可以准确筛选出具有 1Dx5 基因的回交后代植株。



M: marker; 1 ~ 11:高原 602 × 宁春 4 号 BC₂F₁ 的不同植株
M: marker; 1 ~ 11: different plants of BC₂F₁ of (Plateau 602 × Ningchun 4)

图 2 (高原 602 × 宁春 4 号) BC₂F₁ 植株 1Dx5 + 1Dy10 基因的 PCR 检测结果

Fig. 2 PCR detection for 1Dx5 + 1Dy10 gene in BC₂F₁ of (Plateau 602 × Ningchun 4)

表 1 (青春 533 / 高原 602 × 宁春 4 号)BC₃F₁ 中含 1Dx5 + 1Dy10 基因植株的农艺性状

Table 1 Agronomic characters of the individuals carried 1Dx5 + 1Dy10 in BC₃F₁ of Qingchun 533 (or Plateau 602) × Ningchun 4

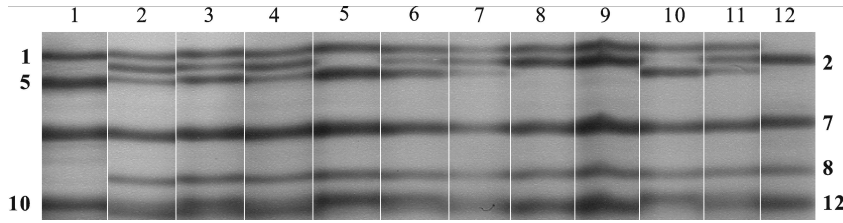
品种或组合 Variety or cross Combination	株高 Plant height (cm)	穗长 Spike length (cm)	小穗数 Number of spikelets	不孕小穗数 Number of sterile spikelets	穗粒数 Number of spike kenels	千粒重 TKW (g)
青春 533 Qingchun 533	65	9.0	20	4	36	25.5
BC ₃ F ₁ (青春 533 × 宁春 4 号)	80	9.0	16	2	47	28.6
BC ₃ F ₁ (Qingchun 533 × Ningchun4)						
高原 602 Plateau 602	65	9.2	18	1	47	48.8
BC ₃ F ₁ (高原 602 × 宁春 4 号)	65	10.0	21	2	46	47.0
BC ₃ F ₁ (Plateau 602 × Ningchun4)						

2.3 BC₃F₁ 目标植株的农艺性状

对 BC₃F₁ 中具有目标基因的植株进行农艺性状的初步调查,结果表明,在青春 533 × 宁春 4 号的 BC₃F₁ 中,聚合有目标基因植株的株高比高原 533 稍高,穗粒重和千粒重等农艺性状比轮回亲本高原 533 大;在高原 602 × 宁春 4 号的 BC₃F₁ 中,目标植株的农艺性状与高原 602 很接近(表 1)。由于 BC₃F₁ 的农艺性状与轮回亲本很接近,并且考虑到目标基因供体亲本(宁春 4 号)也为农艺性状良好的品种,在 BC₃F₁ 植株中有可能保留了来自宁春 4 号的有益剩余变异。为了尽快得到遗传稳定并且能够在生产上利用的优良品系,选择农艺性状良好且具有 1Dx5 + 1Dy10 基因的 BC₃F₁ 植株进行自交,获得了 BC₃F₂。

2.4 BC₃F₂ 种子的 SDS-PAGE 鉴定结果

本研究中检测 1Dx5 基因的分子标记为显性标记,不能很好地区别纯合基因型和杂合基因型,而且考虑到遗传背景有可能影响该基因的表达^[10],因此利用生化标记 SDS-PAGE 对 BC₃F₂ 种子进行 HWM-GS 组成分析(图 3)。对(青春 533 × 宁春 4 号)BC₃F₂ 种子分析结果表明,21 粒种子中有 5 粒的 Glu-D1 位点为 5 + 10 亚基类型,2 粒的 Glu-B1 位点为 17 + 18 亚基类型;对(高原 602 × 宁春 4 号)BC₃F₂ 种子分析的结果表明,10 粒种子中有 2 粒的 Glu-D1 位点为 5 + 10 亚基类型(表 2)。两个组合的 BC₃F₂ 中具有纯合 5 + 10 优质亚基类型个体出现的频率约为 1/4,符合 1 对等位基因在 F₂ 代的遗传分离规律。



1,12 为 HMW-GS 组成对照品种;2~11 为 BC₃F₂ 后代单株。 1,12: CK; 2~11 is individuals of BC₃F₂

图 3 (高原 602/ 宁春 4) BC₃F₂ 后代单株的 HMW-GS 电泳图谱

Fig. 3 HMW-GS electrophoresis detection of BC₃F₂ derived from(Plateau 602 ×Ningchun 4)

表 2 BC₃F₂ 后代植株的 HMW-GS 组成

Table 2 HMW-GS compositions in BC₃F₂ of Qingchun 533(or Plateau 602) ×Ningchun 4

组合后代 Combination progeny	HMW-GS 组成 Compositions of HMW-GS			检测种子数 No. of individuals
	Glur-A	Glur-B1	Glur-D1	
(青春 533 ×宁春 4 号)BC ₃ F ₂ (Qingchun 533 ×Ningchun 4)BC ₃ F ₂	Null	17 + 18	5 + 10	1
	Null	7; 17 + 18	2 + 12	1
	Null	7	5 + 10; 2 + 12	11
	Null	7	2 + 12	3
	Null	7	5 + 10	4
(高原 602 ×宁春 4 号)BC ₃ F ₂ (Plateau 602 ×Ningchun 4)BC ₃ F ₂	1	7 + 8	5 + 10; 2 + 12	6
	1	7 + 8	2 + 12	2
	1	7 + 8	5 + 10	2

2.5 BC₃F₂ 代中含纯合目标基因个体的农艺性状表现

对以上利用生化标记 SDS-PA GE 鉴定出的具有纯合 1Dx5 + 1Dy10 基因的种子进行编号, 具体为:(青春 533 ×宁春 4 号)BC₃F₂ 植株编号为 533-1、533-2、533-3、533-4 和 533-5 (Glur-B1 位点为 17 + 18 亚基);(高原 602 ×宁春 4 号)BC₃F₂ 植株编号为 602-1 和 602-2。然后将这些种子种植在温室里的花盆中,成熟期对其部分农艺性状

进行了调查,结果表明,虽然这些植株的外部形态与轮回亲本相似,但不同个体的具体农艺性状并不一致。在(青春 533 ×宁春 4 号)BC₃F₂ 植株中,533-4 的株高较低,而其它植株的株高较为接近,533-4 的穗长、小穗数及穗粒数与其它植株也一致;533-3 和 533-5 的籽粒千粒重低于其它植株。(高原 602 ×宁春 4 号)BC₃F₂ 植株中,602-1 与 602-2 在株高、穗长、穗粒数上表现上也不尽一致(表 3)。

表 3 BC₃F₂ 含纯合 1Dx5 + 1Dy10 基因植株的农艺性状

Table 3 Agronomic characters of the individuals carried 1Dx5 + 1Dy10 gene in BC₃F₂ of Qingchun 533 (or Plateau 602) ×Ningchun4 (greenhouse)

株号 No. of Plants	株高 Plant height (cm)	穗长 Spike length (cm)	小穗数 Number of spikelets	不孕小穗数 Number of sterile spikelets	穗粒数 Number of spike kenels	千粒重 TKW (g)
533-1	71.0	10.0	24	3	60	32.1
533-2	69.0	9.5	24	2	67	30.0
533-3	69.0	10.5	23	1	65	20.0
533-4	59.0	8.0	20	3	42	31.4
533-5	71.5	10.5	24	2	68	20.0
602-1	84.5	12.0	23	1	61	40.1
602-2	102.0	15.0	23	2	45	41.3

3 讨论

PCR 分子标记已被广泛地用于小麦等作物的抗逆、抗病和优质育种中。目前,小麦品质育种

中用于辅助选择的 HMW-GS 分子标记主要为 1Dx5 基因的 PCR 分子标记。张晓科等^[5]以小偃 6 号(14 + 15)为轮回亲本,以法国优质面包小麦品系 707(5 + 10)为非轮回亲本,用该分子标记和生化标记 SDS-PA GE 筛选到 6 个具有纯合 1、14

+15、5+10 亚基的 BC₃F₂ 植株。徐相波等^[11]利用该分子标记转育成含有 1Dx5 + 1Dy10 基因的新农大 3383 等品系。宋吉轩^[12]等以小偃 22 为轮回亲本,738 为非轮回亲本,用该分子标记检测出含有 1Dx5 + 1Dy10 基因的 F₄、BC₂F₂ 等杂交、回交后代植株。与以前的这些研究相比,本研究在利用 PCR 分子标记辅助选择优点的同时也重视生化标记 SDS-PAGE 在选择具有纯合目标基因个体中的作用。利用 PCR 分子标记辅助选择,可以在群体极少的早期回交世代中筛选到聚合有目标基因的植株。结合温室加代,在短期内得到具有目标基因的 BC₃F₁ 代植株。由于 1Dx5 基因的 PCR 分子标记是显性标记,不能区分纯合型或杂合型,而且遗传背景也有可能影响该基因的表达。利用生化标记 SDS-PAGE 分析 BC₃F₂ 种子的高分子量谷蛋白亚基组成,不仅能筛选出聚合有纯合 1Dx5 + 1Dy10 基因的个体,而且还能了解小麦籽粒 HMW-GS 组成的总体情况,便于得到聚合多个优质亚基的植株。本研究筛选出 1 个既聚合有纯合 5 + 10 亚基,同时又聚合有纯合 17 + 18 亚基的植株。虽然理论上生化标记 SDS-PAGE 有可能降低小麦籽粒的发芽率,但由于 BC₃F₂ 籽粒的数目较多,并且在本研究中筛选到的具有纯合目标基因的籽粒(半粒)都能发芽,因而生化标记 SDS-PAGE 基本上不会降低得到优良植株的概率。所以在强调 PCR 分子标记辅助选择先进性的同时,也应该重视生化标记 SDS-PAGE 在整个育种过程中应用。

在本研究中,选择宁春 4 号作为 1Dx5 + 1Dy10 目标基因的供体,作为一个在西北地区种植的春性小麦品种,它的综合农艺性状良好,且在 Glu-B1 位点上具有 17 + 18 优质亚基,与青海种植的小麦品种在环境适应性上可能具有相似的遗传特性。以其作为非轮回亲本,很快得到了具有纯合 1Dx5 + 1Dy10 基因而且农艺性状与轮回亲本相似的 BC₃F₂ 植株,而且在 BC₃F₂ 中选择得到了 1 个既聚合有纯合 5 + 10 亚基,同时又聚合有纯合 17 + 18 亚基的植株。

本试验中,由于 BC₃F₂ 植株是种植在温室里的花盆中,光温条件与大田自然条件不尽相同,在温室盆栽条件下不同 BC₃F₂ 植株的农艺性状也不尽相同。因此,有必要将每植株的种子单独收获,在下一个生长季节将它们种植在大田条件下,

以便选择出产量等农艺性状接近或优于轮回亲本的新品系。

本研究得到了农艺性状与轮回亲本相似,并聚合有纯合 5 + 10 优质亚基的高代植株,对这些材料进一步进行品质及综合农艺性状的选择,有望在较短时间内育成可在青海种植的优质高产的小麦新品系(种)。

参考文献:

- [1] Payne P I, Corfield K G, Holt L M, *et al.* Correlation between the inheritance of certain high-molecular-weight subunits of glutenin and bread-making quality in progenies of six crosses of bread-wheat[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1981, 32: 51 - 60.
- [2] 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 Food and Agriculture*, 1987, 40: 51 - 65.
- [3] Gupta R B, Paul J G, Comish G B, *et al.* Allelic Variation at Glutenin Subunit and Gliadin Loci, Glu-1, Glu-3 and Gli-1, of Common Wheats. I. Its Additive and Interaction Effects on Dough Properties [J]. *Journal of Cereal Science*, 1994, 19 (1): 9 - 17.
- [4] 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): 32 - 325.
- [5] 张晓科, 谢惠民, 付晓洁. 多种优质高分子量谷蛋白亚基的聚合育种研究[J]. *西北植物学报*, 2003, 23(11): 1899 - 1904.
- [6] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程(第二版)[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 744.
- [7] R. D'Ovidio, Anderson O D. PCR analysis to distinguish between alleles of a member of a multigene family correlated with wheat bread-making quality[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1994, 88: 759 - 763.
- [8] 徐黎黎, 颜泽洪, 魏育明, 等. 东方小麦高分子量谷蛋白亚基组成分析[J]. *四川农业大学学报*, 2005, 23(2): 137 - 141.
- [9] Payne P I, Lawrence G J. Catalogue of alleles for the complex gene loci, Glu-A1, Glu-B1 and Glu-D1 which code for High-molecular-weight subunits of glutenin in hexaploid wheat[J]. *Cereal Research Communications*, 1983, 11: 29 - 35.
- [10] 刘广田, 许明辉. 普通小麦胚乳谷蛋白亚基的遗传研究—高分子量谷蛋白亚基变异的多样性及其在 F₁ 的遗传行为[J]. *中国农业科学*, 1988, 21(1): 56 - 60.
- [11] 徐相波, 刘冬成, 郭小丽, 等. 小麦谷蛋白亚基 1Dx5 的分子鉴定及标记辅助选择[J]. *中国农业科学*, 2005, 38(2): 415 - 419.
- [12] 宋吉轩, 张晓科, 刘斌. 小麦分离后代高分子量谷蛋白 D_x5 基因的 PCR 测定[J]. *贵州农业科学*, 2005, 33(2): 17 - 18.