

多重 PCR 的建立及黄淮麦区主要品种品质相关基因的鉴定

万映秀¹, 张晓科², 夏先春³, 张平治¹, 何中虎^{3,4}

(¹安徽省农业科学院作物研究所/安徽省农作物品质改良重点实验室, 合肥 230031; ²西北农林科技大学农学院, 陕西杨凌 712100; ³中国农业科学院作物科学研究所/国家小麦改良中心/国家农作物基因资源与基因改良重大科学工程, 北京 100081; ⁴CIMMYT 中国办事处, 北京 100081)

摘要:【目的】小麦加工品质由多个位点控制, 而每个位点又有多个等位基因控制。建立品质性状多重 PCR 反应体系是提高分子标记辅助选择效率及降低成本的一种重要措施。【方法】选择影响小麦品质性状重要基因的分子标记, 即高分子量谷蛋白亚基基因标记 Ax2*、Bx14、Bx17 和 Dx5; 低分子量谷蛋白亚基基因标记 Glu-A3d; 糯蛋白亚基 Wx-B1 基因标记 BDFL-BRD 和 Wx-D1 基因标记 MAG269; 1BL/1RS 易位标记 ω -sec 及多酚氧化酶 (PPO) 活性基因标记 PPO18。根据优质面包、优质面条亚基组成要求及引物的退火温度, 建立 3 个多重 PCR 反应体系 PCR-I (Ax2*/Bx17/Dx5)、PCR-II (BDFL-BRD/MAG269/PPO18) 和 PCR-III (Bx14/Glu-A3d/ ω -sec)。【结果】用构建的 3 个多重 PCR 对 141 份黄淮麦区小麦品种加工品质相关基因的分布情况进行了检测。结果表明 Ax2*、Bx14、Bx17 具有较低分布频率, 分别为 4.3%、7.1%、1.4%; Dx5 和 Glu-A3d 分布频率相对较高, 分别为 17.7%和 27.7%; 而 1BL/1RS 易位和低 PPO 活性 (扩增片段为 876 bp) 的材料分别占 44.0%和 51.8%; Wx-B1 缺失材料占 4.3%。在供试的 141 份材料中已有 80 份进行了高、低分子量谷蛋白亚基和黑麦碱的 SDS-PAGE 电泳检测, 与本研究建立的多重 PCR 检测结果完全一致。【结论】建立的多重 PCR 体系可以准确、稳定、高效地检测 9 个小麦品质性状的基因组成。

关键词: 普通小麦; 加工品质; 多重 PCR

Development of Multiplex PCR and Identification of Major Quality Genes in Cultivars from Yellow and Huai River Valley Wheat Region

WAN Ying-xiu¹, ZHANG Xiao-ke², XIA Xian-chun³, ZHANG Ping-zhi¹, HE Zhong-hu^{3,4}

(¹Crop Research Institute, Anhui Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of Crop Quality Improvement, Anhui Province, Hefei 230031; ²College of Agronomy, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling 712100, Shaanxi; ³Institute of Crop Sciences, National Wheat Improvement Center/The Nation Key Facility for Crop Gene Resource and Genetic Improvement, Chinese Academy of Agricultural Sciences (CAAS), Beijing 100081; ⁴CIMMYT China Office, c/o CAAS, Beijing 100081)

Abstract:【Objective】Wheat quality is controlled by many loci and each of them has several alleles. Development of multiplex PCR is very important to enhance the efficiency and reduce the cost in molecular marker assisted breeding for wheat quality traits.

【Method】In the present study, the molecular markers for important quality trait genes, i.e., high-molecular-weight glutenin subunit (HMW-GS) genes Ax2*, Bx14, Bx17 and Dx5, and low-molecular-weight glutenin subunit (LMW-GS) gene Glu-A3d, as well as the marker BDFL-BRD for Wx-B1, MAG269 for Wx-D1, ω -sec for 1BL/1RS translocation and PPO18 for polyphenol oxidase (PPO) activity, were chosen. Three combinations of multiplex PCRs, PCR-I (Ax2*/Bx17/Dx5), PCR-II (Bx14/Glu-A3d/ ω -sec) and PCR-III (BDFL-BRD/MAG269/PPO18) were built up according to genes controlling for pan bread and Chinese noodle quality, and the annealing temperatures of different markers. 【Result】A total of 141 wheat cultivars from Yellow and Huai River Valley wheat region were evaluated adopting the multiplex PCRs, and 80 of them were previously assessed using SDS-PAGE for HMW-GS, LMW-GS and secalin, and the corresponding results were identical. Of the 141 wheat cultivars, the frequencies of Ax2*, Bx14 and

收稿日期: 2007-01-09; 接受日期: 2007-05-21

基金项目: 安徽省自然科学基金 (050410101)、农业部“948”重大国际合作项目 (2006-G2) 和“863”项目 (2006AA100102)

作者简介: 万映秀 (1980-), 男, 安徽宣城人, 硕士, 研究方向为小麦育种。E-mail: wanyingxiu@163.com。通讯作者张平治 (1962-), 男, 研究员, 安徽含山人, 研究方向为小麦遗传育种。E-mail: pzzha@yahoo.com; 何中虎 (1963-), 男, 研究员, 陕西蒲城人, 研究方向为小麦遗传育种。E-mail: zhhe@public3.bta.net.cn

Bx17 were 4.3%, 7.1%, and 1.4%, while Dx5 and Glu-A3d accounted for 17.7% and 27.7%, respectively. Presences of 1BL/1RS translocation and low polyphenol oxidase (PPO) activity genes were much higher, up to 44.0% and 51.8%, respectively. Wx-B1 null type accounted for 4.3%, and no Wx-D1 null type presented. 【Conclusion】 The results indicated that the three multiplex PCRs developed can be used to detect the nine genes stably and efficiently.

Key words: Common wheat (*Triticum aestivum* L.); Processing quality traits; Multiplex PCR

0 引言

【研究意义】品质改良是中国小麦育种的重要目标。高、低分子量麦谷蛋白亚基[high-molecular-weight glutenin subunits (HMW-GS)、low-molecular-weight glutenin subunits (LMW-GS)]组成对小麦品质有重要影响^[1], 具备高分子谷蛋白亚基组成 1 或 2*、7+8/7+9 或 17+18、5+10 的基因型具有较好的面包加工品质, 而低分子量谷蛋白亚基 Glu-A3d 和 1BL/1RS 易位分别对面包和面条品质有较大正向和负向影响^[2-6]。多酚氧化酶 (polyphenol oxidase, PPO) 活性是引起面团或鲜面条颜色褐变的主要原因, 可解释面条颜色变异的 55%~70%^[7,8]。陈东升等^[9]的研究表明 Wx-B1 缺失和 Wx-D1 缺失两种类型的面条总体评分最高。虽然利用 SDS-PAGE 和化学方法可以对上述性状进行较准确的分析, 但操作步骤繁琐、效率较低, 不适合育种早代选择; 此外, 对有些高分子量谷蛋白亚基 (或 Wx 亚基), 其分子量和等电点相近, 分离效果不佳, 如 5+12 和 2+10 亚基还会产生误判, 低分子量亚基检测也不很准确, 难以适应育种要求。分子标记技术可直接检测 DNA 序列的多态性, 不受环境和发育时期限制, 已成为植物遗传育种研究的有效工具。但与传统方法相比, 分子标记辅助选择育种成本较高, 限制了该技术的大规模应用。多重 PCR (multiplex PCR) 就是在一个 PCR 反应体系中加入多对特异性引物, 针对同一 DNA 模板的不同区域扩增多个目的片段的 PCR 技术, 能同时扩增多个目的基因, 具有节省时间、降低成本、提高效率的优点。【前人研究进展】近年来, 一些学者对于小麦多重 PCR 体系的构建进行了一些研究, Fraaije 等^[10]开发了一个多重 PCR 体系, 可同时检测小麦对两种叶枯和两种锈病的抗性。Nakamura 等^[11]建立了一个鉴定 Wx-A1、Wx-B1 及 Wx-D1 位点等位性变异类型的多重 PCR, 能够同时区分 3 种等位变异类型。Ma 等^[12]设计了 HMW-GS Ax2*、Bx17 和 Dx5 位点的 3 对引物的多重 PCR 反应体系, 然而由于引物间的相互作用, 在含有 Ax2*亚基的材料中, Ax2*位点并未扩增出 1 319 bp 的目标片段。【本研究切入点】目前国

外针对小麦品质性状的多重 PCR 体系构建报道很少, 且研究的主要目标是高分子量谷蛋白亚基和淀粉特性基因, 尚未涉及到其它与品质相关的重要性状或基因, 而国内尚无品质性状多重 PCR 构建的相关报道。【拟解决的关键问题】本研究基于优质面条和优质面包的品质及便于育种使用的要求, 用前人已开发的多个品质基因的分子标记构建了多重 PCR 反应体系, 并用本研究建立的多重 PCR 反应体系检测了黄淮麦区 133 份和国外 8 份小麦品种和亲本的品质基因或亚基构成, 为小麦品质改良提供信息和方法。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 构建 PCR-I 和 PCR-II 体系的试验材料 选用在 *Glu-A1*、*Glu-B1*、*Glu-D1*、*Glu-A3* 位点及 1BL/1RS 易位上包含各种等位变异类型的材料 16 份 (表 1), 亚基组成数据引自刘丽^[13]和张平平^[14]。

1.1.2 构建 PCR-III 体系的试验材料 根据徐兆华^[15]研究结果, 选用 4 份 Wx 亚基组成正常的普通小麦 (豫麦 50、HS97-10、晋麦 67 和 98-中-18), 1 份 Wx-D1 缺失材料白火麦, 4 份 Wx-B1 缺失材料 (云麦 42、川麦 107、绵阳 940112 和绵阳 98-17), 1 份 Wx-A1 和 Wx-B1 双缺失的材料关东 107。

1.1.3 多重 PCR 检测材料 利用 3 个多重 PCR 体系检测黄淮麦区主栽品种及重要的亲本材料 133 份和国外材料 8 份, 明确主栽品种和亲本品质相关基因或亚基的构成及分布情况。其中有 80 份材料已用 SDS-PAGE 检测了高低分子量麦谷蛋白亚基及 1BL/1RS 组成^[13], 可进一步验证多重 PCR 体系的可靠性。

1.2 DNA 提取

选取 1 粒有代表性的种子, 粉碎后放入 2.0 ml 离心管中, 按陈锋等^[16]方法提取基因组 DNA。提取液含 288 mmol·L⁻¹ NaCl, 200 mmol·L⁻¹ Tris-HCl (pH 8.0), 25 mmol·L⁻¹ EDTA 和 0.5% SDS。用 1% 的琼脂糖凝胶检测模板 DNA 的质量和浓度, -20℃ 下保存备用。

1.3 PCR 和电泳

表 1 构建多重 PCR-I 和 PCR-II 体系所用的小麦品种及其品质相关基因和亚基组成

Table 1 Wheat varieties used to develop multiplex PCR-I and PCR-II and genes and subunits related to processing quality

编号 No.	品种 Cultivar	<i>Glu-A1</i>	<i>Glu-B1</i>	<i>Glu-D1</i>	<i>Glu-A3</i>	1BL/1RS
1	农大 3291 Nongda 3291	N	6+8	3+12	Glu-A3e	+
2	晋麦 50 Jinmai 50	N	7+8	3+12	Glu-A3d	—
3	徐州 25 Xuzhou 25	N	7+9	2+12	Glu-A3d	—
4	农大 99-5009 Nongda 99-5009	N	7*+8	2+12	Glu-A3d	—
5	绵 98-17 Mian 98-17	N	17+18	5+10	Glu-A3a	+
6	郑州 992 Zhengzhou 992	N	17+18	2+12	Glu-A3c	+
7	中优 14 Zhongyou 14	1	7+8	5+10	Glu-A3d	—
8	德麦 3 号 Demai 3 hao	1	7 ^{0E} +8*	2+12	Glu-A3a	—
9	济麦 20 Jimai 20	1	13+16	4+12	Glu-A3d	—
10	皖麦 33 Wanmai 33	1	13+19	5+10	Glu-A3d	—
11	陕优 225 Shanyou 225	1	14+15	2+12	Glu-A3d	—
12	陕 898-33 Shan 898-33	1	14+15	2+12	Glu-A3e	—
13	云麦 42 Yunmai 42	2*	7	5+10	Glu-A3a	—
14	临汾 98-6269 Linfen 98-6269	2*	7+8	2+12	Glu-A3d	—
15	京 411 Jing 411	2*	7+8*	2+12	Glu-A3c	—
16	豫农 94268 Yunong 94268	2*	7+9	5+10	Glu-A3d	+

1BL/1RS 易位和非 1B/1R 分别用+和-表示

+ and - indicate 1BL/1RS translocation and Non-1B/1R, respectively

试验所用引物均由北京奥科公司合成, 相应的标记名称及引物序列见表2。PCR反应在PTC-200型PCR扩增仪中进行。

3个多重PCR扩增体系均为20 μl, 包括DNA模板100 ng、dNTP 100 μmol·L⁻¹、10×buffer 2.0 μl和2 U Taq-DNA聚合酶。

表 2 多重 PCR 标记及其相关信息

Table 2 The markers for multiplex PCR and their related information

多重 PCR 体系 Multiplex PCR	基因/标记名称 Gene/Marker name	序列 Sequence (5'→3')	PCR 产物大小 PCR fragment size	参考文献 Reference		
I	Ax2* (Ax2*)	F	ATGACTAAGCGGTTGGTTCTT	Ax2*: 1319 bp	Ma, et al ^[12]	
		R	ACCTTGCTCCCCTGTCTTT	Non-Ax2*: No-band		
	Bx17 (Bx17)	F	CGCAACAGCCAGGACAATT	Bx17: 669 bp		
		R	AGAGTTCTATCACTGCCTGGT	Non-Bx17: 630/766 bp		
	Dx5 (Dx5)	F	GCCTAGCAACCTTCACAATC	Dx5: 450 bp		Anderson, et al ^[17]
		R	GAAACCTGCTGCGGACAAG	Non-Dx5: No-band		
II	Bx14 (Bx14)	F	GCCATTACGTGGCTTATAGCAGACC	Bx14: 407 bp	王欣等 ^[15] Wang X, et al ^[18]	
		R	GCTCGAGCTCGCGCTTCCGG	Non-Bx14: No-band		
	Glu-A3d (Glu-A3d)	F	ACCAGTTATTCATCCATCTGCTC	Glu-A3d: 488 bp	Zhang, et al ^[19]	
		R	GTGGTTTCGTACAACGGCTCG	Non-Glu-A3d: No-band		
	1BL/1RS (ω-sec)	F	ACCTTCCTCATCTTTGTCCT	1BL/1RS: 1100 bp	Chai, et al ^[20]	
		R	CCGATGCCTATACCACTACT	Non-1BL/1RS: No-band		
III	Wx-B1 (BDFL-BRD)	F	CTGGCCTGCTACCTCAAGAGCAACT	Wx-B1: 425/455/497bp	Nakamura, et al ^[10]	
		R	CTGACGTCCATGCCGTTGACGA	Wx-B1 deletion: 455/497bp		
	Wx-D1 (MAG269)	F	CGAGCGGCTACTCAAGAGC	Wx-D1: 1400 bp	刘迎春等 ^[21] Liu Y C, et al ^[21]	
		R	GGCGGTCATCTGTCAATTTCC	Wx-D1 deletion: 800 bp		
PPO (PPO18)	F	AACTGCTGGCTCTTCTCCCA	Low PPO activity: 876 bp	Sun, et al ^[22]		
	R	AAGAAGTTGCCATGTCCGC	High PPO activity: 685 bp			

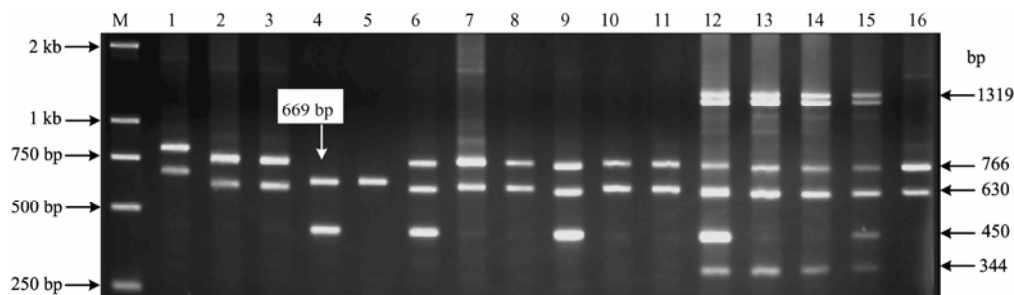
PCR-I 用于同时检测 *Ax2**、*Bx17* 和 *Dx5* 3 个位点的多态性, 相应 3 个标记的引物量分别为 3、2 和 1 pmol, 热循环条件为 94°C 下预变性 5 min, 然后 94°C 1 min、60°C 45 s 和 72°C 1 min 30 s, 35 个循环, 最后 72°C 下延伸 10 min。PCR-II 用于同时检测 *Bx14*、*Glu-A3d*、*IBL/IRS* 这 3 个位点的多态性, 相应 3 个标记的引物量均为 2 pmol, 热循环条件为 94°C 预变性 5 min, 然后 94°C 1 min、62°C 45 s 和 72°C 1 min 30 s, 35 个循环, 最后 72°C 下延伸 10 min。PCR-III 用于同时检测 *Wx-B1*、*Wx-D1*、*PPO* 这 3 个位点的多态性, 相应这 3 个标记的引物量分别为 2、6 和 4 pmol; 热循环条件为 94°C 预变性 5 min, 然后 94°C 1 min、64°C 45 s 和 72°C 1 min 30 s, 35 个循环, 最后 72°C 下延伸 10 min。

多重 PCR-I 和 PCR-II 扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳分离, 150 V 电泳 1~1.5 h; PCR-III 扩增产物用 3% 琼脂糖凝胶电泳分离, 150 V 电泳 2.5 h, 采用缓冲体系为 1×TAE 溶液, 溴化乙锭 (EB) 染色, 用 Molecular Imager Gel Doc XR System 扫描成像。

2 结果与分析

2.1 多重 PCR-I 的构建

用 *Ax2**/*Bx17*/*Dx5* 这 3 个标记的多重 PCR 体系检测 16 个普通小麦材料 *Glu-A1*、*Glu-B1* 及 *Glu-D1* 位点的等位变异 (图 1), 结果表明, 在 *Glu-A1* 位点, 所有含 *Ax2** 的材料均能扩增出一条为 1 319 bp 的目标片段, 且在所有扩增出 *Ax2** 的材料中还出现了一条略小于 1 319 bp 和一条 344 bp 非特异性扩增条带, 而含有 *Ax1* 和 Null 的材料均未扩增出任何条带; 在 *Glu-B1* 位点上, 含有 *Bx17* 的材料在该位点均扩增出一条 669 bp 的片段, 而在非 *Bx17* 的材料中, *Glu-B1* 位点的亚基组成为 7、7*+8、7+8、7+8*、7^{OE}+8*、7+9、13+16、13+19、14+15 的所有材料中均扩增出 630 bp 和 766 bp 的两种条带, 而在该位点亚基为 6+8 的农大 3291 (null, 6+8, 3+12), 扩增出两个明显大于其它类型品种的基因片段。在 *Glu-D1* 位点上, 只在含 *Dx5* 的材料中才出现一条 450 bp 的扩增条带。



M: DL2000; 泳道所对应的品种: 1. 农大 3291; 2. 晋麦 50; 3. 徐州 25; 4. 绵 98-17; 5. 郑州 992; 6. 中优 14; 7. 德麦 3 号; 8. 济麦 20; 9. 皖麦 33; 10. 陕优 225; 11. 陕 898-33; 12. 云麦 42; 13. 临汾 98-6269; 14. 京 411; 15. 豫农 94268; 16. 农大 99-5009
M: DL2000; Cultivars in the corresponding lanes: 1. Nongda 3291; 2. Jinmai 50; 3. Xuzhou 25; 4. Mian 98-17; 5. Zhengzhou 992; 6. Zhongyou 14; 7. Demai 3; 8. Jimai 20; 9. Wanmai 33; 10. Shaanyou 225; 11. Shaan 898-33; 12. Yunmai 42; 13. Linfen 98-6269; 14. Jing 411; 15. Yunong 94268; 16. Nongda 99-5009

图 1 多重 PCR-I (*Ax2**/*Bx17*/*Dx5*) 的检测品种

Fig. 1 The varieties were assayed using multiplex PCR-I (*Ax2**/*Bx17*/*Dx5*)

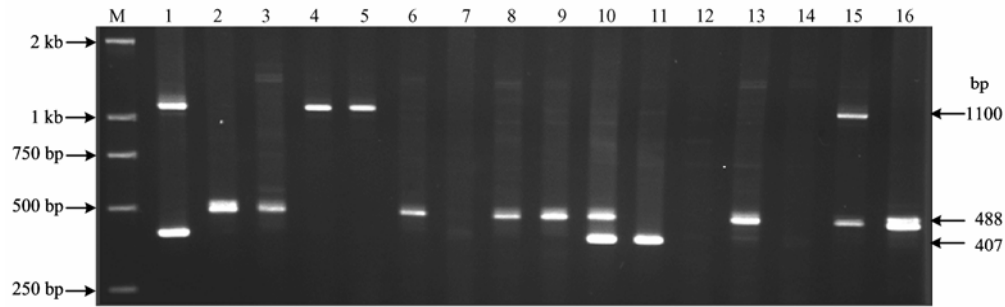
2.2 多重 PCR-II 体系构建

用 *Bx14*/*Glu-A3d*/ ω -sec 这 3 个标记的多重 PCR 体系检测 16 个普通小麦材料 *Glu-B1*、*Glu-A3* 位点等位变异及 *IBL/IRS* 易位 (图 2), 结果表明, 在 *Glu-B1* 位点上, 除亚基组成为 14+15 的材料扩增出一条 407 bp 的片段, 亚基组成为 6+8 的农大 3 219 也扩增出相同的片段, 其他所有类型的材料在该位点均未出现扩增条带; 在 *Glu-A3* 位点上, 所有含 *Glu-A3d* 的材料均扩增出一条 488 bp 的片段, 其它材料均无扩增产物出

现; 所有 *IBL/IRS* 易位材料均扩增出一条 1 100 bp 左右的条带, 而非 *IBL/IRS* 易位材料均未扩增出该条带。

2.3 多重 PCR-III 体系构建

用 *BDFL-BRD*/*MAG269*/*PPO18* 这 3 个标记的多重 PCR 体系检测 10 个小麦材料 *Wx-B1*、*Wx-D1* 及 *PPO* 位点的等位变异类型 (图 3), 结果表明, 在 *Wx-B1* 位点上, *Wx-B1* 缺失材料 (云麦 42、川麦 107、绵阳 940112 和绵阳 98-17) 和 *Wx-A1*/*Wx-B1* 双缺失的材料关东 107 中均扩增出 455、497 bp 和略小于 497 bp



M: DL2000; 泳道所对应的品种: 1. 农大 3291; 2. 晋麦 50; 3. 徐州 25; 4. 绵 98-17; 5. 郑州 992; 6. 中优 14; 7. 德麦 3 号; 8. 济麦 20; 9. 皖麦 33; 10. 陕优 225; 11. 陕 898-33; 12. 云麦 42; 13. 临汾 98-6269; 14. 京 411; 15. 豫农 94268; 16. 农大 99-5009
M: DL2000; Cultivars in the corresponding lanes: 1. Nongda 3291; 2. Jinmai 50; 3. Xuzhou 25; 4. Mian 98-17; 5. Zhengzhou 992; 6. Zhongyou 14; 7. Demai 3; 8. Jimai 20; 9. Wanmai 33; 10. Shaanyou 225; 11. Shaan 898-33; 12. Yunmai 42; 13. Linfen 98-6269; 14. Jing 411; 15. Yunong 94268; 16. Nongda 99-5009

图 2 多重 PCR-II (Bx14/Glu-A3d/ ω -sec) 的检测品种

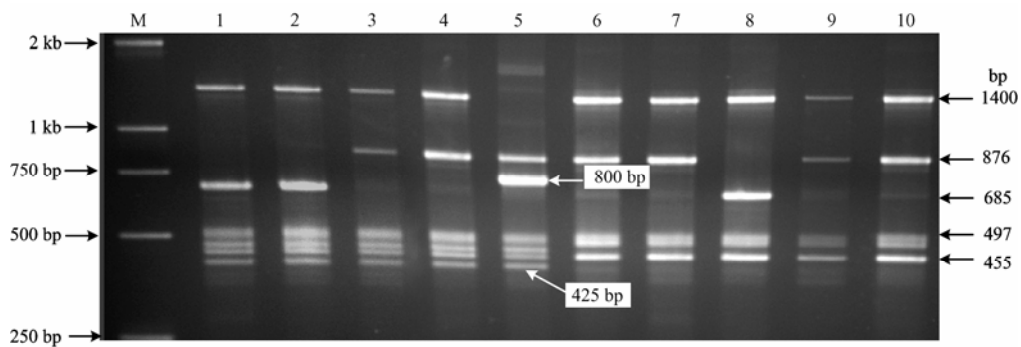
Fig. 2 The varieties were assayed using multiplex PCR-II (Bx14/Glu-A3d/ ω -sec)

的 3 个片段; 而 Wx 亚基正常的材料 (豫麦 50、HS97-10、晋麦 67 和 98-中-18) 和 Wx-D1 缺失的材料白火麦中均扩增出 425、455、497 bp 和略大于 455 bp 的 4 个片段。在 Wx-D1 位点上, 在 Wx-D1 缺失材料白火麦中仅扩增出一条 800 bp 左右的目标片段; 而 Wx 亚基正常、Wx-B1 缺失和 Wx-A1/Wx-B1 双缺失的材料在该位点上均扩增出 1 400 bp 左右的目标片段。在 PPO 位点上, 晋麦 67、98-中-18、白火麦、云麦 42、川麦 107、绵阳 98-17 及关东 107 在该位点上

扩增出 876 bp 的片段, 其它材料在该位点上均扩增出 685 bp 的条带。

2.4 利用 3 个多重 PCR 体系检测 141 份供试材料品质基因的分布

利用构建的 3 个多重 PCR 反应体系检测黄淮麦区骨干亲本、主栽品种及主要优质麦材料 133 份和 8 份国外材料 (表 3), 结果表明: 在 *Glu-A1* 位点, 有 6 份材料含有 Ax2* 亚基, 占供试材料总数的 4.3%; 在 *Glu-B1* 位点, 含有 14+15 和 17+18 亚基的材料分别为



M: DL2000; 泳道所对应的品种及亚基组成: 1. 豫麦 50; 2. HS97-10; 3. 晋麦 67; 4. 98-中-18; 5. 白火麦 (Wx-D1 缺失); 6. 云麦 42 (Wx-B1 缺失); 7. 川麦 107 (Wx-B1 缺失); 8. 绵阳 940112 (Wx-B1 缺失); 9. 绵阳 98-17 (Wx-B1 缺失); 10. 关东 107 (Wx-A1/Wx-B1 双缺失)
M: DL2000; Cultivars and subunits represented by corresponding lanes: 1. Yumai 50; 2. HS97-10; 3. Jinmai 67; 4. 98-zhong-18; 5. Baihuomai (Wx-D1 null); 6. Yunmai 42 (Wx-B1 null); 7. Chuanmai 107 (Wx-B1 null); 8. Mianyang 940112 (Wx-B1 null); 9. Mianyang 98-17 (Wx-B1 null); 10. Kanto 107 (Wx-A1/Wx-B1 null)

图 3 多重 PCR-III (BDFL-BRD/MAG269/PPO18) 的检测品种

Fig. 3 The varieties were assayed using multiplex PCR-III (BDFL-BRD/MAG269/PPO18)

表 3 141 份供试材料小麦品种品质基因的分布

Table 3 Distribution of quality trait genes for 141 genotypes tested

品种 Cultivar	<i>Glu-A1</i>	<i>Glu-B1</i>	<i>Glu-D1</i>		<i>Glu-A3d</i>	1BL/1RS	<i>PPO18</i>	<i>Wx-B1</i>	<i>Wx-D1</i>
	2*	14+15	17+18	5+10					
皖麦 19 Wanmai 19	—	—	—	—	—	—	+	+	+
皖麦 26 Wanmai 26	—	+	—	—	—	+	—	+	+
皖麦 27 Wanmai 27	—	—	—	—	—	+	+	+	+
皖麦 29 Wanmai 29	—	—	—	—	—	+	+	+	+
皖麦 30 Wanmai 30	—	+	—	+	—	—	—	+	+
皖麦 31 Wanmai 31	—	—	—	—	—	+	+	+	+
皖麦 32 Wanmai 32	+	—	—	+	—	+	—	+	+
皖麦 38 Wanmai 38	—	—	—	—	—	—	+	+	+
皖麦 42 Wanmai 42	—	—	—	—	—	+	—	+	+
皖麦 43 Wanmai 43	—	—	—	—	—	—	+	+	+
皖麦 44 Wanmai 44	—	—	—	+	+	—	—	+	+
皖麦 48 Wanmai 48	—	—	—	—	—	—	+	+	+
皖麦 54 Wanmai 54	—	—	—	—	—	—	+	+	+
皖 23094 Wan 23094	—	—	—	—	—	—	—	+	+
皖 95028-1-3 Wan 95028-1-3	—	—	—	+	—	—	—	+	+
皖 9231-8 Wan 9231-8	—	—	—	—	—	—	+	+	+
安农 0202 Annong 0202	—	—	—	—	+	—	+	+	+
安农 0305 Annong 0305	—	—	—	—	—	—	+	+	+
安农 98005 Annong 98005	—	—	—	—	—	—	+	+	+
安 1331 An 1331	—	—	—	—	+	—	+	+	+
宿 9514 Su 9514	—	—	—	—	+	+	+	+	+
宿 9908 Su 9908	—	—	—	—	—	—	+	+	+
宿县育 1 号 Suxianyu 1	—	+	—	—	—	—	—	+	+
阜阳 0402 Fuyang 0402	—	—	—	—	—	—	+	+	+
阜 119 Fu 119	—	—	—	+	—	—	—	+	+
阜 936 Fu936	—	—	—	—	—	—	+	+	+
阜 98-46 Fu98-46	—	—	—	—	—	+	+	+	+
阜 9943 Fu 9943	—	—	—	—	—	—	+	+	+
阜 9948 Fu 9948	—	—	—	—	—	—	+	+	+
涡 9916 Guo 9916	—	—	—	—	—	—	+	+	+
泰山 1 号 Taishan 1	—	—	—	—	+	—	—	+	+
泰山 21 Taishan 21	—	—	—	—	—	—	+	+	+
泰山 23 Taishan 23	—	—	—	—	—	—	+	+	+
泰山 24 Taishan 24	—	—	—	—	+	—	+	+	+
泰山 223 Taishan 223	—	—	—	—	—	—	—	+	+
泰山 269 Taishan 269	—	—	—	—	—	—	+	+	+
泰山 9818 Taishan 9818	—	—	—	—	—	+	—	+	+
鲁 95(6)161 Lu 95(6)161	—	—	—	—	—	+	+	+	+
鲁麦 1 Lumai 1	—	—	—	—	—	+	—	+	+
鲁麦 7 Lumai 7	—	—	—	—	+	+	—	+	+
鲁麦 13 Lumai 13	—	—	—	—	—	—	+	+	+
鲁麦 14 Lumai 14	—	—	—	—	—	+	+	+	+
鲁麦 23 Lumai 23	—	+	—	—	—	—	+	+	+
济南 9 号 Jinan 9	+	—	—	—	—	—	+	+	+
济南 16 Jinan 16	—	—	—	—	—	+	—	+	+
济南 17 Jinan 17	—	—	—	—	—	—	+	+	+
济麦 19 Jimai 19	—	—	—	—	—	—	+	+	+

续表 3 Continued table 3

品种 Cultivar	<i>Glu-A1</i> 2*	<i>Glu-B1</i> 14+15	<i>Glu-D1</i> 17+18	<i>Glu-D1</i> 5+10	<i>Glu-A3d</i>	1BL/1RS	<i>PPO18</i>	<i>Wx-B1</i>	<i>Wx-D1</i>
济麦 20 Jimai 20	—	—	—	—	+	—	+	+	+
烟农 15 Yannong 15	—	—	—	—	—	—	+	+	+
烟农 18 Yannong 18	—	—	—	+	—	+	—	—	+
烟农 19 Yannong 19	—	—	+	—	—	—	+	+	+
烟辐 188 Yanfu 188	—	—	—	—	+	—	+	+	+
潍麦 8 号 Weimai 8	—	—	—	—	—	+	+	+	+
潍麦 0205 Weimai 0205	—	—	—	—	—	—	+	+	+
潍麦 0206 Weimai 0206	—	—	—	+	—	+	+	+	+
山农 617 Shannong 617	—	—	—	—	—	+	+	+	+
山农 664 Shannong 664	—	—	—	—	—	+	+	+	+
山农 1355 Shannong 1355	—	—	—	—	—	+	—	+	+
山农 9738 Shannong 9738	—	—	—	+	—	—	—	+	+
山农 60182 Shannong 60182	—	+	—	—	+	—	+	+	+
山东 413863 Shandong 413863	—	—	—	—	—	+	+	+	+
山东辐 63 Shandongfu 63	—	—	—	—	—	—	+	+	+
37042	—	—	—	—	—	—	+	+	+
04J156	—	—	—	—	—	+	+	+	+
豫麦 13 Yumai 13	—	—	—	—	+	+	—	+	+
豫麦 17 Yumai 17	—	—	—	—	+	+	—	+	+
豫麦 18 Yumai 18	—	+	—	—	—	—	—	+	+
豫麦 21 Yumai 21	—	—	—	—	+	+	—	+	+
豫麦 25 Yumai 25	—	—	—	—	+	—	—	+	+
豫麦 28 Yumai 28	—	—	—	—	—	+	—	+	+
豫麦 34 Yumai 34	—	—	—	+	+	—	—	+	+
豫麦 35 Yumai 35	—	—	—	+	—	+	—	+	+
豫麦 47 Yumai 47	—	—	—	—	—	—	+	—	+
豫麦 49 Yumai 49	—	—	—	—	+	—	—	+	+
豫麦 50 Yumai 50	+	—	—	—	—	+	—	+	+
豫麦 51 Yumai 51	—	—	—	—	+	+	—	+	+
豫麦 62 Yumai 62	—	+	—	—	+	+	—	+	+
豫麦 69 Yumai 69	—	—	—	—	—	—	—	+	+
兰考 906 Lankao 906	—	—	—	—	—	+	+	+	+
周麦 9 号 Zhoumai 9	—	—	—	—	+	+	—	+	+
周 11 Zhou 11	—	—	—	—	+	+	—	+	+
周麦 13 号 Zhoumai 13	—	—	—	—	+	+	—	+	+
周麦 14 Zhoumai 14	—	—	—	—	+	+	—	+	+
周麦 16 Zhoumai 16	—	—	—	—	—	+	—	+	+
周麦 17 Zhoumai 17	—	—	—	—	+	+	—	+	+
周麦 18 Zhoumai 18	—	—	—	—	—	+	—	+	+
周麦 18-2 Zhoumai 18-2	—	—	—	—	—	+	—	+	+
周 8425B Zhou 8425B	—	—	—	—	—	+	—	+	+
周 92031 Zhou 92031	—	—	—	—	—	+	—	+	+
周 96037 Zhou 96037	—	—	—	—	—	+	—	+	+
周 9811 Zhou 9811	—	—	—	—	+	+	—	+	+
周 9823 Zhou 9823	—	—	—	—	+	—	—	+	+
周 98165 Zhou 98165	—	—	—	—	+	+	—	+	+
周 9926 Zhou 9926	—	—	—	—	—	+	+	+	+
内乡 19 Neixiang 19	—	—	—	—	—	+	+	+	+

续表 3 Continued table 3

品种 Cultivar	<i>Glu-A1</i>	<i>Glu-B1</i>	<i>Glu-D1</i>		<i>Glu-A3d</i>	1BL/1RS	<i>PPO18</i>	<i>Wx-B1</i>	<i>Wx-D1</i>
	2*	14+15	17+18	5+10					
内乡 36 Neixiang 36	—	—	—	—	—	—	±	+	+
内乡 188 Neixiang 188	—	—	—	+	—	+	—	+	+
内 2938 Nei 2938	—	—	—	+	—	—	+	—	+
内 4103 Nei 4103	—	—	—	+	+	—	±	+	+
郑农 17 Zhengnong 17	—	—	—	—	+	+	—	+	+
郑农 21 Zhengnong 21	—	—	—	—	+	+	+	+	+
郑麦 005 Zhengmai 005	—	—	—	—	+	—	+	+	+
郑麦 98 Zhengmai 98	—	—	—	+	—	+	—	+	+
郑麦 336 Zhengmai 336	—	—	—	+	—	—	+	—	+
郑麦 9201 Zhengmai 9201	—	—	—	—	—	+	+	+	+
郑麦 9405 Zhengmai 9405	—	+	—	+	—	—	+	+	+
郑 9023 Zheng 9023	—	—	—	—	—	—	—	+	+
郑州 97199 Zhengzhou 97199	—	—	—	+	—	+	+	+	+
郑育麦 033 Zhengyumai 033	—	—	—	—	+	+	+	—	+
洛麦 21 Luomai 21	—	—	—	—	—	+	—	+	+
新麦 18 Xinmai 18	—	—	—	+	—	—	—	+	+
偃 4110 Yang 4110	—	+	—	—	—	—	—	+	+
中 892 Zhong 892	+	—	—	—	—	+	+	+	+
中育 5 号 Zhongyu 5	—	—	—	—	+	+	+	—	+
冀麦 26 Jimai 26	+	—	—	—	—	+	+	+	+
农大 393 Nongda 393	—	—	—	—	+	—	+	+	+
农大 738 Nongda 738	—	—	—	+	—	—	+	+	+
中作 1 号 Zhongzuo 1	—	—	—	—	—	—	+	+	+
中优 16 Zhongyou 16	—	—	—	+	+	—	+	+	+
中优 9844-9 Zhongyou 9844-9	—	—	—	+	—	—	+	+	+
扬麦 10 号 Yangmai 10	—	—	—	—	—	—	—	+	+
扬麦 11 Yangmai 11	—	—	—	—	—	—	—	+	+
扬麦 12 Yangmai 12	—	—	—	—	—	—	—	+	+
徐州 25 Yangmai 25	—	—	—	—	+	—	—	+	+
徐州 826 Xuzhou 826	—	—	—	—	—	+	—	+	+
徐麦 270 Xumai 270	—	—	—	—	+	—	—	+	+
淮麦 16 Huaimai 16	—	—	—	—	—	—	—	+	+
淮麦 17 Huaimai 17	—	—	—	—	—	+	—	+	+
淮麦 18 号 Huaimai 18	—	—	—	+	+	+	+	+	+
淮麦 0566 Huaimai 0566	—	—	—	+	+	+	+	+	+
淮 0302 Huai 0302	—	—	—	—	—	+	+	+	+
99-3.4.5.4	—	+	—	—	—	—	+	+	+
94.33.3.4.3.5	—	*	—	+	—	—	+	+	+
Allie	+	—	—	—	—	—	—	+	+
Centenaire	—	*	—	—	—	—	—	+	+
Farandole	—	—	—	—	+	—	—	+	+
Fovrmi	—	*	—	—	—	—	—	+	+
Koeh	—	*	—	—	—	—	—	+	+
Pajero	—	—	—	—	—	—	+	+	+
Patrel	—	*	—	—	—	—	—	+	+
Qualibo	—	—	+	+	—	—	+	+	+

PPO18 扩增出 876 bp 片段用+表示, 685 bp 的用-表示, * 表示 *Glu-B1* 位点的亚基组成为 6+8; 对于其他基因, 含有目标基因的用+表示, 反之用-表示

+ and - represent an 876 bp and 685 bp PCR fragment for PPO18, respectively; *Glu-B1* locus (6+8) was indicated by *; For other genes, + and - indicated the presence and absence of target genes, respectively

10 个和 2 个, 占供试材料的 7.1% 和 1.4%; 在 *Glu-D1* 位点, 有 25 个材料含有 5+10 亚基, 占供试材料的 17.7%; 在 *Glu-A3* 位点, 39 个材料含有 *Glu-A3d* 亚基, 占供试材料 27.7%; 有 62 个材料为 1BL/1RS 易位系, 占供试材料的 44.0%; 73 个材料具有较低的 PPO 活性 (扩增片段为 876 bp), 占供试材料的 51.8%, 另外有 2 份材料表现为杂合类型; 有 6 份材料表现为 Wx-B1 缺失类型, 占供试材料总数的 4.3%, 在所有供试材料中均未发现 Wx-D1 缺失材料。在供试的 141 份小麦品种中, 有 80 份材料已用 SDS-PAGE 检测了高低分子量麦谷蛋白亚基及 1BL/1RS 组成^[13], 其结果与本研究多重 PCR 反应体系的检测结果一致。

3 讨论

多重 PCR 较单个 PCR 具有更高的扩增效率、较低的成本, 且节约试验样品, 但多重 PCR 对于试验的条件要求相对比较严格, 如何提高多重 PCR 的稳定性和重复性是该技术能否大规模应用于育种的关键。

根据本研究的经验, 要保证多重 PCR 具有较好的重复性和稳定性, 应注意以下 6 个方面: (1) 模板 DNA 应具有较高的纯度和完整性, 应进行模板 DNA 浓度定量, 使各模板 DNA 浓度基本一致; (2) 多重 PCR 反应尽量在同一台 PCR 仪或同型号的不同 PCR 仪上扩增; (3) 引物选择: 选择引物退火温度相近, 引物间二聚体较少的组合; (4) 各引物浓度的优化: 先加入相同浓度的各引物量, 然后根据电泳结果调整引物用量, 增加弱扩增产物的引物量, 减少强扩增产物的引物量; (5) 退火温度的选择: 采用所有引物中退火温度最低温度作为最初的退火温度, 然后再根据扩增的结果调整, 若非特异性扩增很多, 可以逐步提高退火温度; (6) 延伸时间选择: 若扩增条带比较弱, 延长延伸时间, 有助于提高扩增产物的量。

根据何中虎等^[23]研究, 选取了那些对小麦面包和面条品质影响较大的亚基用于构建该体系, 此外考虑到方便育种实践上的应用, 希望笔者构成的多重 PCR 体系, 能够使用普通琼脂糖电泳完成检测, 因此, 在引物的选择上, 选用那些扩增产物差异不大也不小的, 且引物间错配及退火温度差异不大的引物组合。最后筛选出了 PCR-I、PCR-II 和 PCR-III 这 3 个多重 PCR 反应体系。

本研究建立的 3 个多重 PCR 反应体系, 检测 141 份供试材料, 其中 80 份材料刘丽^[13]已经用 SDS-PAGE 检测了高、低分子量麦谷蛋白亚基及 1BL/1RS 组成,

两者检测结果完全一致。表明本研究建立的 3 个多重 PCR 体系稳定、可靠。

在本研究构建的 3 个多重 PCR 反应组合中, 多重 PCR-I 与 Ma 等^[12]构建的体系相似, 但 Ma 等^[12]构建的多重 PCR 反应体系不能成功地扩增出 Ax2*1 319 bp 的目标片段, 而本研究构建的体系用 Anderson^[17]设计的 Dx5 标记代替 Ma^[12]构建多重 PCR 时所采用的 Dx5 标记, 成功地扩增出了 Ax2*1 319 bp 的目标基因片段。

多重 PCR-I 与 SDS-PAGE 蛋白电泳结果比较, 在非 Bx17 的材料中, 除农大 3291 (null, 6+8, 3+12) 外, 标记 Bx17 在 *Glu-B1* 位点扩增出的基因片段与 Ma 等^[12]报道的结果一致, 而农大 3291 在该位点扩增出的基因片段较其它非 Bx17 材料明显要大, 因而本研究构建的多重 PCR-I 扩展了 Ma 等^[12]体系检测的能力, 即发现 Bx17 标记不仅可以作为 *Bx17* 基因的特异性标记还可以作为 *Bx6* 基因的特异性标记。多重 PCR-II 结果表明, 当 *Glu-B1* 位点亚基组成为 6+8 时, 标记 Bx14 在该位点能扩增出一段与亚基 14+15 相同的片段, PCR-I 和 PCR-II 结合可以准确地检测 Ax2*、Bx6、Bx14、Dx5、*Glu-A3d* 亚基和 1BL/1RS 易位的遗传多样性; 而多重 PCR-III 能准确的检测 Wx-B1、Wx-D1 亚基及 *PPO* 位点等位变异。本研究构建的多重 PCR 反应体系中 Ax2* 和 Wx-B1 位点均出现了非特异性扩增片段, 但在这两个位点用相应的单标记且在相同的反应条件下检测时均未发现非特异性扩增, 可推断这些非特异性扩增片段可能主要是由多对引物之间的相互干扰而形成。这些非特异性扩增并不会影响各品种亚基类型的分析, 且本研究构建的 3 个体系均可用普通琼脂糖电泳完成对各位点等位变异类型的检测, 因而能方便、准确、高效地应用于分子标记辅助选择育种。

用本研究构建的 3 个多重 PCR 反应体系对供试的 141 份材料优质亚基组成进行分析, 结果表明, 优质 HMW-GS 2*、14+15、17+18、5+10 的频率分别为 4.3%、7.1%、1.4% 和 17.7%, 比 Ma 等^[12]分析的澳大利亚小麦品种优质 HMW-GS 的频率 2* (45.4%)、17+18 (39.3%) 和 5+10 (30.5%) 明显偏低, 特别是 Ax2*、Bx14、Bx17 亚基分布频率很低, 导致这种状况的主要原因可能是: 中国小麦地方品种及骨干亲本中优质亚基分布频率较低; 其次对品质改良的重视程度不够, 过于强调产量和抗性; 再次对小麦品质相关基因及优质亚基研究起步较晚, 品质相关基因及亚基对品质的贡献率不清楚, 很难在育种上很好的应用。

最后, 大部分育种单位缺乏利用优质基因和亚基必需的手段和设施。

针对中国小麦主栽品种及重要亲本材料优质亚基和基因分布频率低的现状。在今后育种中, 首先调整育种目标, 在重视产量及抗性的同时兼顾品质改良, 其次加强国际交流, 加大优质种质引进的力度, 加快种质资源的创新, 再次加快小麦优质亚基和基因的构成与品质相关性的研究, 最后, 在育种手段上, 分子生物学技术与常规育种手段相结合, 提高优质基因和亚基的筛选的效率, 将更多的优质亚基聚合起来, 为优质新品种的选育奠定坚实的基础。

此外, 1BL/1RS 易位材料占较大比例 (44.0%), 刘丽等^[2]表明 1BL/1RS 易位对面团流变学特性、面包和面条品质皆有极显著的负面影响, 但是, 含有 1BL/1RS 易位的品种在丰产性和适应性方面具有明显优势^[23]。Glu-A3d 分布频率为 27.7%, 何中虎等^[24]表明 Glu-A3d 的材料不仅具有较好的面包品质, 而且对于面条品质也具有较大的正向效应, 因而为中国消费者和育种家所喜爱。Wx-B1 缺失材料分布频率很低 (4.3%), 所检测材料中未出现 Wx-D1 缺失材料, 今后应在育种计划中加强应用。孙道杰等^[22]设计的一对 PPO 基因位点的 STS 标记, 研究表明, 扩增产物为 876 bp 片段的类型具有较低的 PPO 活性。葛秀秀等^[25]研究表明面粉 PPO 活性与面粉白度及 24 h 面团颜色呈显著负相关。中国消费者习惯上偏好白度较好的面粉, 而且是越白越好, 在今后的育种过程中, 应注意筛选低 PPO 活性材料, 改善我国小麦面粉的白度。

4 结 论

本研究针对小麦品质性状的改良, 建立了 3 个多重 PCR 体系, 检测了 141 份国内外小麦品种, 并与 SDS-PAGE 结果比较, 证明这 3 个多重 PCR 体系可以准确、稳定、高效地检测 9 个小麦品质性状的基因组成, 为小麦品质改良和分子标记辅助选择提供了有效的技术方法。

References

[1] Cornish G B, Panozzo J F, Wrigley C W. Victorian wheat protein families. *Cereals* 98, *Proceedings of the 48th Australian Cereal Chemistry Conference*. RACI: Melbourne, Australia, 1998: 183-188.

[2] 刘 丽, 周 阳, 刘建军, 何中虎, 杨 金. *Glu-1* 和 *Glu-3* 等位变异及 1BL/1RS 易位与面包和面条品质关系的研究. *中国农业科学*, 2004, 37: 1265-1273.

Liu L, Zhou Y, Liu J J, He Z H, Yang J. Effect of allelic variation at the *Glu-1* and *Glu-3* loci and presence of 1BL/1RS translocation on pan bread and dry white Chinese noodle quality. *Scientia Agricultura Sinica*, 2004, 37: 1265-1273. (in Chinese)

[3] 刘 丽, 阎 俊, 张 艳, 何中虎, Peña R J, 张立平. 冬播麦区 *Glu-1* 和 *Glu-3* 位点变异及 1B/1R 易位与小麦加工品质性状的关系. *中国农业科学*, 2005, 38: 1944-1950.

Liu L, Yan J, Zhang Y, He Z H, Peña R J, Zhang L P. Allelic variation at the *Glu-1* and *Glu-3* loci and presence of 1B/1R translocation, and their effects on processing quality in cultivars and advanced lines from autumn-sown wheat regions in China. *Scientia Agricultura Sinica*, 2005, 38: 1944-1950. (in Chinese)

[4] Liu L, He Z H, Yan J, Zhang Y, Peña R J. Allelic variation at the *Glu-1* and *Glu-3* loci, presence of 1B/1R translocation, and their effect on mixographic properties in Chinese bread wheats. *Euphytica*, 2005, 142: 197-204.

[5] 陈东升, 刘 丽, 董建力, 何中虎, 张 艳, 刘建军, 王德森. HMW-GS 和 LMW-GS 组成及 1BL/1RS 易位对春小麦品质性状的影响. *作物学报*, 2005, 31: 414-419.

Chen D S, Liu L, Dong J L, He Z H, Zhang Y, Liu J J, Wang D S. Effect of HMW and LMW glutenin subunits and presence of 1BL/1RS translocation on quality traits in spring wheat. *Acta Agronomica Sinica*, 2005, 31: 414-419. (in Chinese)

[6] He Z H, Liu L, Xia X C, Liu J J, Peña R J. Composition of HMW and LMW glutenin subunits and their effects on dough properties, pan bread, and noodle quality of Chinese bread wheats. *Cereal Chemistry*, 2005, 82: 345-350.

[7] Demeke T, Morris C F, Campbell K G, King G E, Anderson J A, Chang K G. Wheat polyphenol oxidase: distribution and genetic mapping in three inbred line populations. *Crop Science*, 2001, 41: 1750-1757.

[8] Demeke T, Morris C F. Molecular characterization of wheat polyphenol oxidase (PPO). *Theoretical and Applied Genetics*, 2002, 104: 813-818.

[9] 陈东升, C.Kiribuchi-Otobe, 徐兆华, 陈新民, 周 阳, 何中虎, H. Yoshida, 张 艳, 王德森. Waxy 蛋白缺失对小麦淀粉特性和中国鲜面条品质的影响. *中国农业科学*, 2005, 38: 865-873.

Chen D S, Kiribuchi-Otobe C, Xu Z H, Chen X M, Zhou Y, He Z H, Yoshida H, Zhang Y, Wang D S. Effect of Wx-A1, Wx-B1 and Wx-D1 protein on starch properties and Chinese fresh noodle quality. *Scientia Agricultura Sinica*, 2005, 38: 865-873. (in Chinese)

[10] Fraaije B A, Lovell D J, Coelho J M, Baldwin S, Hollomon D W.

- PCR-based assays to assess wheat varietal resistance to blotch (*Septoria tritici* and *Stagonospora nodorum*) and rust (*Puccinia striiformis* and *Puccinia recondita*) diseases. *European Journal of Plant Pathology*, 2001, 107: 905-917.
- [11] Nakamura T, Vrinten P, Saito M, Konda M. Rapid classification of partial waxy wheats using PCR-based markers. *Genome*, 2002, 45: 1150-1156.
- [12] Ma W, Zhang W, Gale K R. Multiplex-PCR typing of high molecular weight glutenin alleles in wheat. *Euphytica*, 2003, 134: 51-60.
- [13] 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, 中国农业科学院硕士学位论文, 2004.
Liu L. *Allelic Variation at the Glu-1 and Glu-3 Loci and Presence of 1B/1R Translocation in Chinese Wheat and Their Effects on Breadmaking Quality*. Master thesis of Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2004. (in Chinese)
- [14] 张平平. 贮藏蛋白组份对小麦面团特性与食品加工品质的影响. 华中农业大学博士学位论文, 2006.
Zhang P P. *Effects of Gluten Protein Fractions to Dough Properties and End-products Quality in Bread Wheat*. Doctor dissertation of Huazhong Agricultural University, 2006. (in Chinese)
- [15] 徐兆华. 小麦淀粉特性与糯蛋白的生化及分子标记. 新疆农业大学硕士学位论文, 2003.
Xu Z H. *Starch Property and Biochemical and Molecular Markers of Waxy Protein in Bread Wheat*. Master thesis of Xinjiang Agricultural University, 2003. (in Chinese)
- [16] 陈 锋, 夏先春, 王德森, Morten Lillemo, 何中虎. CIMMYT 人工合成小麦与普通小麦杂交后代籽粒硬度 puroindoline 基因等位变异检测. *中国农业科学*, 2006, 39: 440-447.
Chen F, Xia X C, Wang D S, Morten L, He Z H. Detection of allelic variation for puroindoline alleles in CIMMYT germplasm developed from synthetic wheat crossing with common wheats. *Scientia Agricultura Sinica*, 2006, 39: 440-447. (in Chinese)
- [17] 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. *Theoretical and Applied Genetics*, 1989, 77: 689-700.
- [18] 王 欣, 范三红, 阎晓华, 罗龙海, 郭嵩光. 小麦 HMW-GS 1Bx14 基因特异标记体系的建立. *西北植物学报*, 2005, 25: 2189-2192.
Wang X, Fan S H, Yan X H, Luo L H, Guo A G. Developing specific molecular marker for wheat HMW-GS 1Bx14 Gene. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2005, 25: 2189-2192. (in Chinese)
- [19] Zhang W, Gianibelli M C, Rampling L R, Gale K R. Characterization and marker development for low molecular weight glutenin genes from Glu-A3 alleles of bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 2004, 108:1409-1419.
- [20] Chai J F, Zhou R H, Jia J Z, Liu X. Development and application of a new codominant PCR marker for detecting 1BL·1RS wheat-rye chromosome translocations. *Plant Breeding*, 2006, 125: 302-304
- [21] 刘迎春, 朱惠兰, 程顺和, 马正强. 小麦 Wx-A1 和 Wx-D1 位点的 PCR 分子标记. *麦类作物学报*, 2005, 25: 1-5.
Liu Y C, Zhu H L, Cheng S H, Ma Z Q. PCR-based molecular markers for Wx-A1 and Wx-D1 genes of wheat. *Journal of Tritical Crops*, 2005, 25: 1-5. (in Chinese)
- [22] Sun D J, He Z H, Xia X C, Zhang L P, Morris C F, Appels R, Ma W J, Wang H. A novel STS marker for polyphenol oxidase activity in bread wheat. *Molecular Breeding*, 2005, 16: 209-218.
- [23] 任 燕, R.A.Graybosch, 王 涛. 小麦中的 1BL/1RS 染色体易位. *麦类作物学报*, 2006, 3: 152-158.
Ren Y, R. A. Graybosch, Wang T. 1BL/1RS Chromosomal Translocation in Wheat. *Journal of Triticeae Crops*, 2006, 3: 152-158. (in Chinese)
- [24] 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, 蔡民华, 陈新民, 阎 俊, 周 阳. 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*, 2006, 39: 1091-1101.
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, Cai M H, Chen X M, Yan J, Zhou Y. Establishment of quality evaluation system and utilization of molecular methods for the improvement of Chinese wheat quality. *Scientia Agricultura Sinica*, 2006, 39: 1091-1101. (in Chinese)
- [25] 葛秀秀, 何中虎, 杨 金, 张歧军. 我国冬小麦品种多酚氧化酶活性的遗传变异及其与品质性状的相关分析. *作物学报*, 2003, 29: 481-485.
Ge X X, He Z H, Yang J, Zhang Q J. Polyphenol oxidase activities of Chinese Winter Wheat cultivars and correlations with quality characteristics. *Acta Agronomica Sinica*, 2003, 29: 481-485. (in Chinese)

(责任编辑 于 竞)