

普通小麦中 *Puroindoline b-2* 基因的分子鉴定及表达分析

张福彦^{1,2}, 陈 锋¹, 张建伟², 董中东¹, 杨保安², 崔党群¹

(¹河南农业大学农学院/河南省粮食作物协同创新中心/小麦玉米作物学国家重点实验室, 郑州 450002;

²河南省核农学重点实验室/河南省科学院同位素研究所有限责任公司, 郑州 450015)

摘要: *Puroindoline b-2* 基因与小麦子粒硬度及其产量密切相关。本研究采用特异引物 PCR 扩增, 荧光定量 PCR (RT-PCR) 方法以及 DNA 测序技术, 对 81 份国内外小麦品种 (系) 的 *Puroindoline b-2* 不同变异类型进行了分子鉴定, 并对 *Puroindoline b-2* 的不同变异类型在子粒、叶片以及根系部位中的表达水平进行了定量分析。结果表明, 所有试验材料中的 D 和 A 基因组上均含有 *Pinb-D2v1* 和 *Pinb-A2v4* 类型, 而 B 基因组上的 *Pinb-B2v3* 类型在所有材料中所占比例最高, 为 91.4%; *Pinb-B2v2* 类型比例较低, 仅为 8.6%。不同变异类型间 *Pinb-B2* 基因表达量分析表明, 小麦子粒中 *Pinb-B2v3b* 的表达量显著高于 *Pinb-B2v2* 变异类型。进一步研究表明, *Pinb-B2v3b* 类型的相对表达量显著高于 *Pinb-B2v3a* 和 *Pinb-B2v3c* 两种类型, 而此 2 种变异之间无明显差异 (*Pinb-B2v3c* 略高于 *Pinb-B2v3a* 变异)。不同组织间 *Pinb-B2* 基因表达量分析表明, 小麦叶片中 *Pinb-B2* 的表达量显著高于根系中的表达量。本研究为进一步理解 *Pinb-2* 基因分子遗传基础提供了一定的理论依据。

关键词: 普通小麦; *Puroindoline b-2* 基因; 荧光定量 PCR; 基因表达

Molecular Characterization and Expression Analysis of *Puroindoline b-2* Alleles in Bread Wheat

ZHANG Fu-yan^{1,2}, CHEN Feng¹, ZHANG Jian-wei², DONG Zhong-dong¹, YANG Bao-an², CUI Dang-qun¹

(¹National Key Laboratory of Wheat and Corn Crop/Collaborative Innovation Center of Food Crops in Henan Province/Agronomy College, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002; ²Henan Key Laboratory of Nuclear Agricultural Sciences/Isotope Institute Co., Ltd, Henan Academy of Sciences, Zhengzhou 450015)

Abstract: *Puroindoline b-2* is related to wheat grain hardness and yield-related traits. In this study, 81 wheat cultivars or advanced lines from four different countries were used to identify allelic variation of *Puroindoline b-2* by PCR amplification with specific primers and DNA sequencing. The relative expression levels of different *Puroindoline b-2* alleles were examined in grain, leaf, and root of selected wheat cultivars by real-time quantitative PCR (RT-PCR). The results showed that all bread wheat cultivars surveyed contained *Pinb-D2v1* and *Pinb-A2v4* variants in their genome D and A, respectively. However, *Pinb-B2v3* variant was identified on the B genome of 74 wheat cultivars and advanced lines, and *Pinb-B2v2* variant was found in the remaining 7 cultivars and advanced lines. Therefore, *Pinb-B2v3* was the most prevalent variant in *Pinb-2* locus with percentage of 91.4%, while *Pinb-B2v2* was only 8.6%. RT-PCR result indicated that the expression level of *Pinb-B2v3b* was significantly higher than that of *Pinb-B2v2* in wheat grain. Furthermore, the expression level of *Pinb-B2v3b* variant was significantly higher than those of *Pinb-B2v3a* and *Pinb-B2v3c* variants that had no significant difference even though *Pinb-B2v3c* was slightly higher

收稿日期: 2013-06-04 修回日期: 2013-07-14 网络出版日期: 2014-01-24

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/10.13430/j.cnki.jpgr.2014.02.017.html>

基金项目: 国家自然科学基金(31370031); 国家重点基础研究发展计划(“973”计划)项目(2014CB138105); 教育部新世纪优秀人才项目和郑州市重大科技攻关项目(121PZDGG071); 河南省小麦产业技术体系建设专项资金资助项目(Z2010-01-04)

第一作者研究方向为小麦遗传育种。E-mail: zhangfuyan704@163.com

通信作者: 陈锋, 研究方向为小麦遗传育种, E-mail: chf0088@sina.com.cn。崔党群为并列通信作者, E-mail: cdq62@sohu.com

than that *Pinb-B2v3a*. In addition, the expression level of *Pinb-B2* in leave of wheat was significantly higher than that in roots. This study could provide a better understanding of molecular and genetics basis of *Pinb-2* gene.

Key words: *Triticum aestivum*; *Puroindoline b-2* gene; real-time quantitative PCR; gene expression

子粒硬度是普通小麦最重要的品质性状之一。其遗传率较高,主要受 5D 染色体短臂上的 *Puroindoline a* 和 *b* 基因控制,其任一基因的突变或缺失都会导致小麦子粒变硬^[1-2]。随着子粒硬度分子机理研究的不断深入,与其密切连锁的 *Gsp-1* 基因以及与 *Puroindoline b* (*Pinb-D1a*) 基因同源性较高的 *Puroindoline b-2* (*Pinb-2*) 基因也成为国内外学者研究的热点之一。

子粒硬度是由胚乳细胞中蛋白质基质和淀粉颗粒之间的结合强度所决定的,这种结合强度受遗传控制^[3-4]。前人研究表明,*Puroindoline* 基因是控制小麦子粒硬度的主效基因,而与其紧密连锁的 *Gsp-1* 基因却对子粒硬度没有明显的调节作用^[5-6]。M. Wilkinson 等^[7]首次在普通小麦的 cDNA 中发现了 3 种与 *Puroindoline b* 非常相似的基因序列,分别命名为:*Pinb-A1*、*Pinb-A2* 和 *Pinb-A3*,并将其定位于 7AL 染色体上。F. Chen 等^[8]在普通小麦的基因组 DNA 中也发现了一种新的类似 *Puroindoline b* 变异序列,命名为 *Pinb-A2v4*,并对先前发现的 3 种变异重新命名,分别为 *Pinb-D2v1*、*Pinb-B2v2* 和 *Pinb-B2v3*,将该 4 个变异基因重新定位于 7DL、7BL、7B 和 7AL。近来研究发现普通小麦中 *Pinb-A2v4*/*Pinb-B2v3*/*Pinb-D2v1* 是 *Puroindoline b-2* 基因中最常见的类型,在所有的品种中,都含有 *Pinb-D2v1* 和 *Pinb-A2v4* 基因,而位于 B 组染色体上的 *Pinb-B2v2* 和 *Pinb-B2v3* 变异则总是互补出现^[9-11], H. W. Geng 等^[12]以 3 个不同的 F₂ 群体为材料进行研究,结果表明二者为一对等位基因。进一步研究表明^[10-11], *Pinb-B2v3* 变异的品种在千粒重、单穗产量、粒径、穗粒数、旗叶宽度和旗叶面积等方面显著高于 *Pinb-B2v2* 变异。F. Chen 等^[13]在硬粒小麦品种 Langdon 中发现一个新的变异类型,命名为 *Pinb-2v5*,该类型与 *Pinb-A2v4* 变异同源性高达 98.8%。A. Ramalingam 等^[14]分别以二倍体、四倍体和六倍体小麦为材料对 *Puroindoline b-2* 基因多态性进行了研究,结果表明 *Puroindoline b-2* 基因属于一个包含有多种变异类型的基因家族,研究发现的 17 个单倍型中有 13 个为新单倍型,并进一步验证了已报道的 *Pinb-D2v1* 到 *Pinb-2v5* 单倍型,且鉴别出一个新单倍型 *Pinb-2v6*。而 F. Chen 等^[15]在中国冬小麦品种豫农

202 中也发现 *Pinb-2v6* 类型,认为 *Pinb-2v5* 和 *Pinb-2v6* 类型相似,只出现在少数普通小麦品种中。此外, F. Chen 等^[13]对 *Pinb-B2v3* 变异类型进行研究后发现与普通小麦品种 Witchta 的 *Pinb-B2v3* 序列 (AM99733 和 GQ496618) 相比,在第 6 位点上的碱基 G 突变成 T,将其命名为 *Pinb-B2v3a*,而 12 个硬粒小麦品种的 *Pinb-B2v3* 的编码区在第 311 位点上的碱基 T 突变成 C,从而导致第 104 处的缬氨酸变成丙氨酸,并将这种新的等位变异命名为 *Pinb-B2v3b*,之后研究又发现了 *Pinb-B2v3c* 变异类型。

由于 *Pinb-2* 基因与品质性状有一定关系,且该基因表达情况可能与控制子粒硬度的主要基因 *Puroindoline* 不同,并非种子特异性表达,同时 *Pinb-2* 基因与产量相关性状也具有一定关系^[10-11],因此,本研究在对 *Pinb-2* 基因的不同变异类型鉴定的基础上,进一步采用小麦植株的不同器官对发现的 4 种变异类型 *Pinb-B2v2*、*Pinb-B2v3a*、*Pinb-B2v3b* 和 *Pinb-B2v3c* 的相对表达量进行了分析,旨在进一步对 *Puroindoline b-2* 基因的分子遗传基础进行研究。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以从乌克兰、西班牙和俄罗斯 3 个国家引进的 73 份农艺性状优异的普通小麦种质资源以及河南农业大学小麦遗传育种研究室保存的 8 个优异种质资源(豫农 949、小偃 4 号、新麦 18、内乡 184、冀麦 30、豫农 202、周麦 16 和豫农 201)为材料,对 *Pinb-2* 基因变异类型和表达量进行研究。所有试验材料种植于河南农业大学科教示范试验园育种亲本圃中,每个种质 2 行,行长 1.5 m,田间管理同大田生产,及时去杂,收获后人工脱粒,自然晾干,室内保存备用。

1.2 试验方法

1.2.1 小麦成熟子粒 RNA 的提取

选取 1 粒有代表性的种子,用锤子砸碎后迅速转移至研钵中加液氮充分研磨呈粉末状,迅速转移于 2.0 mL 离心管中,加入 0.5 mL 的提取缓冲液。此方法根据李浩等^[16]提取 RNA 的方法,略有改进。RNA 提取缓冲液现用现配,混匀后冰浴,其配制试剂(10 mL)如下: 0.5 mL Tris-HCl(1 mol/L)、1 mL NaCl(2 mol/L)、

1 mL SDS (10%)、0.4 mL EDTA (0.5 mol/L)、0.1 mL DTT (1 mol/L)、7 mL DEPC-H₂O (0.1%)。将提取的 RNA, 室温放置 20 min 使 RNA 干燥, 加入 50 μ L DEPC-H₂O 溶解, 取 2 μ L RNA 在 2.0% 琼脂糖电泳检测 RNA 的完整性。

1.2.2 cDNA 第一链的合成及 RT-PCR 反应 以 RNA 作模板, 用反转录酶 MMLV (200 U/ μ L, TaKaRa) 合成 cDNA 第一链。RT-PCR 反应在美国伯乐 iQ5 实时荧光定量 PCR 仪中进行, 试剂采用 TaKaRa 公司 SYBR Premix Ex Taq II 试剂盒 (Code: DRR081), 内参基因 β -actin 和扩增目的基因的通用引物用 Primer premier 5.0 设计, 并由上海生工生物工程有限公司进行合成, 引物序列见表 1。Real-

Time PCR 反应体系中包含 2 μ L 的 cDNA、10 pmol 的上下游引物各 0.5 μ L、SYBR Premix Ex Taq II (2 \times) 10 μ L, 加 dd H₂O 补足体系至 20 μ L; RT-PCR 反应程序参照周扬等^[17] 程序进行, 取 5 μ L 反应 PCR 产物用 2.5% 琼脂糖凝胶电泳检测是否与扩增曲线结果吻合。

1.2.3 Puroindoline b-2 变异类型的鉴定 所有试验材料的基因组 DNA 的提取按照 F. Chen 等^[18] 改进的方法进行, PCR 扩增时的反应体系和程序同张福彦等^[11] 的方法。采用 F. Chen 等^[8] 报道的方法, 对试验材料 *Puroindoline b-2* 基因的变异类型进行鉴定的引物见表 1。

表 1 普通小麦中鉴别 *Puroindoline b-2* 基因变异类型的引物

Table 1 Primers for identification of *Puroindoline b-2* variants in bread wheat

基因型 Genotype	上游引物 Forward primer	下游引物 Reverse primer	退火温度(℃) Annealing temperature	扩增片段(bp) Amplified fragments
<i>Pinb-D2v1</i>	GGGTTCTCAAAACTGCCCAT	ACTTGCAGTTGGAATCCAG	60	319
<i>Pinb-B2v2</i>	CTTGTAGTGAGCACAACTTTGCA	GTATGGACGAACTTGCAGCTGGAG	64	401
<i>Pinb-B2v3</i>	GCAGAAAAAGCCATTGCACCTA	CATTAGTAGGGACGAACTTGCAGCA	64	528
<i>Pinb-A2v4</i>	CCTTTCTCTTGTAGTGAGCACAAACA	GACGAACTTGCAGTTGGAATCCAA	60	403
<i>Pinb-B2v23RT</i>	GATGTGAGGCCATTTGGAGG	ACTAKGGACGAACTTGCAGC	58	146
<i>Wac(β-actin)</i>	GTTCCAATCTATGAGGGATACACGC	GAACCTCCACTGAGAACAACATTACC	56	422

1.2.4 测序鉴定 为进一步明确 *Pinb-B2* 不同变异类型之间的序列特征, 本研究将 PCR 产物用快速纯化试剂盒 (Takara) 纯化目的片段, 纯化产物将连接到 PGEM-T 载体 (Promega) 中, 进行克隆、测序。利用 Chromas 1.4.5 软件分析序列图谱, 以核查测序结果的可靠性, 用 DNAMAN 6.0 软件对序列进行分析 and 多重比对。

2 结果与分析

2.1 *Puroindoline b-2* 基因的分子鉴定

利用 *Puroindoline b-2* 特异性引物 (表 1) 进行 PCR 扩增, 结果表明, 81 份优异种质资源中均含有 *Pinb-D2v1* 和 *Pinb-A2v4* 两种类型。同时, 在 73 份国外材料中, 只有 5 个品种 (系) 是 *Pinb-B2v2* 变异类型 (其组合为 *Pinb-A2v4/Pinb-B2v2/Pinb-D2v1*), 占国外材料的 6.8%; 而剩余的 68 份材料中都是含有 *Pinb-B2v3* 类型 (其组合为 *Pinb-A2v4/Pinb-B2v3/Pinb-D2v1*), 占国外材料的 93.2%; 国内的 8 个普通小麦品种中也只有 2 份属于 *Pinb-A2v4/Pinb-B2v2/*

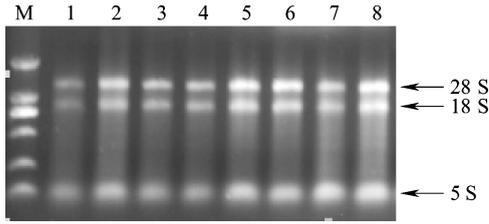
Pinb-D2v1 组合, 6 份为 *Pinb-A2v4/Pinb-B2v3/Pinb-D2v1* 组合。结果表明, 无论是国外材料还是国内材料, *Pinb-A2v4/Pinb-B2v3/Pinb-D2v1* 组合均是最为常见的类型。

2.2 *Puroindoline b-B2* 表达量分析

2.2.1 RNA 及 cDNA 检测结果 从小麦成熟子粒中提取高纯度 RNA, 用 2.0% 的琼脂糖电泳检测 RNA 的质量, 小麦子粒中的 RNA 28S、18S 和 5S 基本完整, 表明 RNA 质量完好 (图 1), 同时用 DNA 酶去除 RNA 中的 DNA 分子, 以防止 DNA 污染。

用反转录酶 MMLV 将 RNA 反转录成 cDNA, 用 β -actin 引物 (表 1) 检测 cDNA 质量, 预期扩增片段长度为 422 bp, 扩增结果见图 2, 扩增产物特异性高, 没有副产物的干扰, 表明转录的 cDNA 质量较好。

2.2.2 溶解曲线及标准曲线方程的建立 在荧光定量 PCR 过程中, 以荧光值和临界循环值 (Ct 值) 作图, 得到扩增曲线, 内参基因 β -actin 的扩增曲线方程和目的基因 *Puroindoline b-B2* 的扩增曲线方程



M:DL2000;1:豫农 949;2:小偃 4 号;3:新麦 18;
4:内乡 184;5:冀麦 30;6:豫农 202;
7:周麦 16;8:豫农 201,下同
M:DL 2000,1:Yunong 949,2:Xiaoyan 4,
3:Xinmai 18,4:Neixiang 184,5:Jimai 30,
6:Yunong 202,7:Zhoumai 16,8:Yunong 201,
the same as below

图 1 普通小麦成熟子粒 RNA 的提取结果

Fig. 1 RNA extraction of mature grain in bread wheat

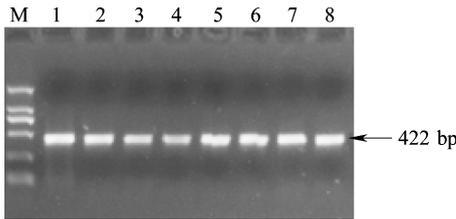


图 2 β -actin 基因扩增结果

Fig. 2 PCR amplification of β -actin gene in different cultivars

列于图 3。图 3-A 中 β -actin 标准曲线的相关系数为 0.9974,扩增效率为 1.06,该基因 Ct 值与起始模板数之间的标准曲线方程为: $y = -0.2887x + 8.7572$ 。图 3-B 中 *Puroindoline b-B2* 基因标准曲线的相关系数为 0.9998,扩增效率为 0.93,该基因 Ct 值与起始模板数之间的标准曲线方程为: $y = -0.2844x + 9.7086$ 。内参基因和目的基因标准曲线的相关系数分别高达 99.74% 和 99.98%,说明 Ct 值与荧光吸收值相关性较高,PCR 反应扩增效率高。

通过对 β -actin(图 4-A)和 *Puroindoline b-B2*(图 4-B)这 2 个基因的溶解曲线进行分析,可以看出,这 2 个基因的溶解曲线都是单峰分布,说明在 PCR 扩增过程中,没有出现非特异性扩增。用 2.5% 琼脂糖凝胶电泳检测,其结果一致,均扩增出内参基因和目的基因的带型,且产物特异性较好。

2.2.3 *Puroindoline b-B2* 基因特异性表达 采用 Primer premier 5.0 软件设计的通用引物 *Pinb-B2v23RT* 可以同时 在 cDNA 中扩增出 *Puroindoline b-B2* 基因的不同变异类型,将其 PCR 产物进行纯化、连接到 PGEM-T 载体 (Promega) 中,进行克隆测序。

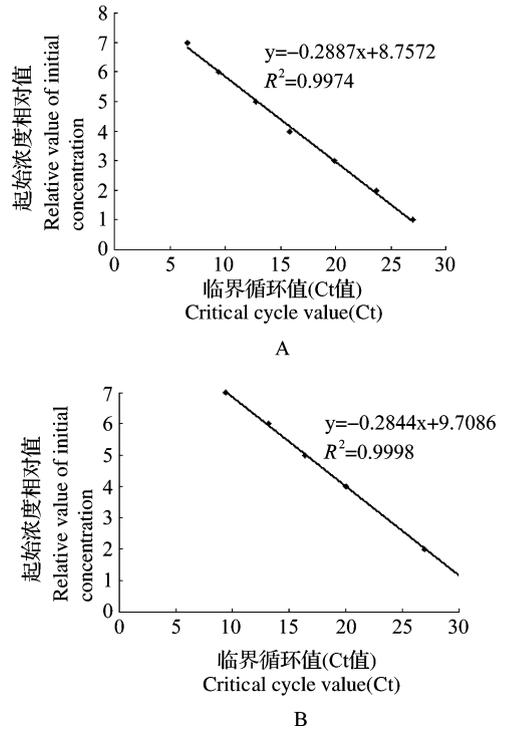


图 3 β -actin 基因 (A) 和 *Puroindoline b-B2* 基因 (B) 实时定量 PCR 扩增曲线方程

Fig. 3 Real-time quantitative equation of PCR amplification of the β -actin gene (A) and *Puroindoline b-B2* gene (B)

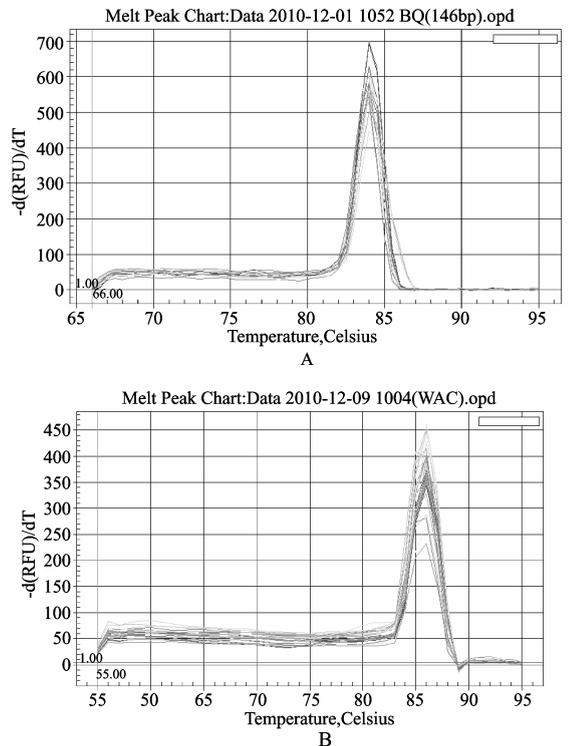
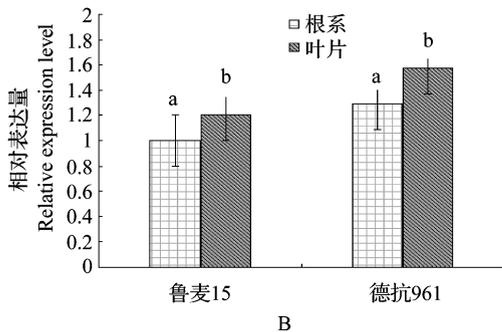
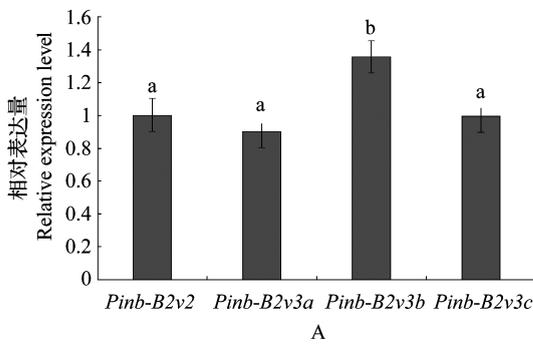


图 4 β -actin 基因 (A) 和 *Puroindoline b-B2* 基因 (B) PCR 溶解曲线

Fig. 4 Melt curve of the β -actin gene (A) and *Puroindoline b-B2* gene (B)

结果表明,供试品种豫农 949 和小偃 4 号为 *Pinb-B2v2* 变异类型;新麦 18 和内乡 184 为 *Pinb-B2v3a* 变异类型;冀麦 30 和豫农 202 为 *Pinb-B2v3b* 变异类型;周麦 16 和豫农 201 为 *Pinb-B2v3c* 变异类型。

荧光定量 PCR 结果表明, *Pinb-B2v3b* 变异类型在小麦子粒中的表达量显著高于其他 3 种类型,但 *Pinb-B2v2*、*Pinb-B2v3a* 与 *Pinb-B2v3c* 变异之间差异不显著(图 5-A)。结合 F. Chen 等^[10]和张福彦等^[11]的研究结果,推测 *Pinb-B2v3b* 类型表达量相对较高可能是导致该类型小麦品种千粒重、粒径、穗粒数和单穗粒重等产量相关性状上显著优越于拥有 *Pinb-B2v2* 类型小麦品种的重要原因之一,但 *Pinb-B2v3b* 变异类型的高表达量是否是导致其在产量相关性状上显著优越于拥有 *Pinb-B2v2* 类型小麦品种的主要原因仍需要进一步的研究证实。



不同字母表示不同基因或不同组织间差异达到显著水平($P=0.05$)

Different letters indicate significant difference at $P=0.05$ level

图5 *Puroindoline b-B2* 基因在 *Puroindoline b-B2* 不同变异类型(A)和不同组织(B)中的相对表达量

Fig. 5 Relative expression level of *Puroindoline b-B2* gene in different tissues(A) and different *Puroindoline b-B2* alleles (B)

另外, *Puroindoline b-B2* 基因在德抗 961 (*Pinb-B2v3b*) 和鲁麦 15 (*Pinb-B2v2*) 的根和叶中的相对表达量比较结果表明, *Pinb-B2* 基因在 2 个品种叶片中的相对表达量均显著高于其在根中的表达量(图 5-B)。

3 讨论

小麦子粒硬度分子遗传机理的研究已开展多年,而类 *Puroindoline* 基因的遗传基础以及某些结构功能仍不是很清楚。前人研究认为, *Gsp-1* 存在着大量的变异类型,但具有脂联(lipid-binding)作用最重要的蛋白功能区却变化不大,从而认为 *Gsp-1* 基因对小麦子粒硬度的影响不大^[3,19-20]。而 P. Gollan 等^[21]研究表明, GSP-1 蛋白与抗菌功能的蛋白质极其相似,都具有较低的分子量、拥有 5 个二硫键和 1 个半胱氨酸丰富区。因此推测, GSP-1 在植物防御中可能发挥着重要作用。

Pinb-2 基因被发现已有 5 年,然而其功能研究仍处于探索阶段。F. Chen 等^[13]在 DNA 水平上,对 *Pinb* 和 6 种 *Pinb-2* 变异类型的序列进行分析,结果表明 *Pinb-2v6* 与 *Pinb-D1a*、*Pinb-D2v1*、*Pinb-B2v2*、*Pinb-B2v3a*、*Pinb-A2v4* 和 *Pinb-2v5* 的同源性分别为 74.0%、95.4%、94.7%、92.3%、98.7% 和 98.0%。但是,与拥有以 WRWWKWWK 色氨酸丰富区的 PINA-D1a 蛋白和以拥有 WPTKWWK 色氨酸丰富区的 PINB-D1a 蛋白相比, *Puroindoline b-2* 变异蛋白的色氨酸丰富区仅为 KWWK,这表明 PINB-2 变异的脂联能力可能会弱于 PINA-D1a 和 PINB-D1a,但是又强于在相应区域内只有 1 个半胱氨酸残基的 GSP-1 蛋白。F. Chen 等^[10]研究发现在 *Puroindoline-D1* 软质品种中, *Pinb-B2v3* 类型的品种 SKCS 硬度平均值要显著高于 *Pinb-B2v2* 类型,而 2 种硬质类型 *Puroindoline-D1* (*Pinb-D1b* 和 *Pinb-D1p*) 中 *Pinb-B2v2* 和 *Pinb-B2v3* 两种变异的 SKCS 硬度值没有显著差别。因而认为 *Puroindoline b-B2* 基因很可能对软质小麦的子粒硬度影响更大。H. W. Geng 等^[9]以美国西北太平洋地区小麦育种种质资源为材料分别对 *Puroindoline-D1* 和 *Puroindoline b-2* 进行研究,结果表明 *Puroindoline-D1* 是控制小麦子粒硬度的主效基因,而 *Puroindoline b-2* 对小麦子粒硬度的影响不大。本研究发现在所有试验材料中,都含有 *Pinb-D2v1* 和 *Pinb-A2v4* 基因,并发现位于 B 组染色体上 *Pinb-B2v2* 和 *Pinb-B2v3* 变异类型则是互补出现,但 *Pinb-B2v3* 类型所占比例较高,为 91.4%, *Pinb-B2v2* 为 8.6%,这与 H. W. Geng 等^[9]和 F. Chen 等^[10]研究结果一致。

在小麦品种的长期改良过程中,提高产量始终是小麦育种进程中最重要的目标之一^[22]。随着现代生物技术的发展,分子标记辅助选择和传统育种

技术相结合逐渐成为小麦改良的主要手段之一。前人研究表明,在普通小麦中子粒产量相关的一些 QTL 被定位在 1B、1D、4AL、5AL、4D、7AL、7BL 和 7D 等染色体上^[23-25]。F. Chen 等^[10] 研究发现,位于 7B 染色体上的 *Puroindoline b-B2* 变异对小麦的穗粒数、单穗粒重、旗叶面积、千粒重、小穗数、粒长、粒宽等产量性状有显著影响。由于 *Puroindoline b-B2* 基因的相关功能研究还处于探索阶段,就 *Pinb-B2v3a*、*Pinb-B2v3b* 和 *Pinb-B2v3c* 变异类型还没有开发出非常便捷的分子标记检测技术,目前主要通过测序技术进行鉴定,故本试验只对 B 组染色体上 *Pinb-B2v2* 和 *Pinb-B2v3* 类型进行基因型鉴定,而没有对 *Pinb-B2v3a*、*Pinb-B2v3b* 和 *Pinb-B2v3c* 类型进行基因型鉴定。通过对 *Puroindoline b-B2* 基因不同变异类型之间的相对表达量进行分析,结果表明,*Pinb-B2v3* 变异类型的相对表达量显著高于 *Pinb-B2v2* 变异类型的表达量,3 种不同类型的 *Pinb-B2v3* 等位变异类型中,*Pinb-B2v3b* 的相对表达量最高。而先前研究表明,拥有 *Pinb-B2v3* 类型的小麦品种产量相关性状明显优于拥有 *Pinb-B2v2* 类型的品种^[10-11],因此推测认为,*Puroindoline b-B2* 基因的表达量可能与小麦产量相关性状呈正相关关系,从而可能为我国高产小麦育种提供一定的信息。

参考文献

- [1] Morris C F. Puroindolines: the molecular genetic basis of wheat grain hardness[J]. *Plant Mol Biol*,2002,48: 633-647
- [2] 陈锋,董中东,程永水,等. 小麦 *puroindoline* 及其相关基因分子遗传基础研究进展[J]. *中国农业科学*,2010,43(6): 1108-1116
- [3] Barlow K K, Buttrose M S, Simmonds D H, et al. The nature of the starch-protein interface in wheat endosperm[J]. *Cereal Chem*, 1973,50: 443-454
- [4] Bhavne M, Morris C F. Molecular genetics of puroindolines and related genes: regulation of expression, membrane binding properties and applications[J]. *Plant Mol Biol*,2008,66: 221-231
- [5] Tranquilli G, Heaton J, Chicaiza O, et al. Substitutions and deletions of genes related to grain hardness and their effect on grain texture[J]. *Crop Sci*,2002,42: 1812-1817
- [6] Bhavne M, Morris C F. Molecular genetics of puroindolines and related genes: allelic diversity in wheat and other grasses[J]. *Plant Mol Biol*,2008,66: 205-219
- [7] Wilkinson M, Wan Y F, Tosi P, et al. Identification and genetic mapping of variant forms of *puroindoline b* expressed in developing wheat grain[J]. *J Cereal Sci*,2008,48: 722-728
- [8] Chen F, Beecher B S, Morris C F. Physical mapping and a new *puroindoline b-2* gene in wheat[J]. *Theor Appl Genet*, 2010, 120: 745-751
- [9] Geng H W, Beecher B S, He Z H, et al. Prevalence of *Puroindoline D1* and *Puroindoline b-2* variants in U. S. Pacific Northwest wheat breeding germplasm pools, and their association with kernel texture[J]. *Theor Appl Genet*,2012,124: 1259-1269
- [10] Chen F, Zhang F Y, Cheng X Y, et al. Association of *Puroindoline b-B2* variants with grain traits, yield components and flag leaf size in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties of the Yellow and Huai Valleys of China[J]. *J Cereal Sci*,2010,52: 247-253
- [11] 张福彦,陈锋,董中东,等. 黄淮麦区小麦新品系籽粒硬度相关基因分子鉴定及其对产量相关性状的影响[J]. *中国农业科学*,2011,44(16): 3289-3296
- [12] Geng H W, Beecher B S, Pumphrey M, et al. Segregation analysis indicates that *Puroindoline b-2* variants 2 and 3 are allelic in *Triticum aestivum* and that a revision to *Puroindoline b-2* gene symbolization is indicated[J]. *J Cereal Sci*,2013,57: 61-66
- [13] Chen F, Xu H X, Zhang F Y, et al. Physical mapping of *puroindoline b-2* genes and molecular characterization of a novel variant in durum wheat (*Triticum turgidum* L.) [J]. *Mol Breeding*,2011, 28: 153-161
- [14] Ramalingam A, Enzo A, Bhavne M. The *Pinb-2* genes in wheat comprise a multigene family with great sequence diversity and important variants[J]. *J Cereal Sci*,2012,56: 171-180
- [15] Chen F, Li H H, Shang X L, et al. A novel *Puroindoline b-2* variant present in Chinese winter wheat cultivar Yunong 202 [J]. *J Cereal Sci*,2013,57(3): 1-4
- [16] 李浩,张平平,查向东,等. 高质量的小麦种子总 RNA 的快速提取方法[J]. *分子植物育种*,2006,4(6): 877-881
- [17] 周扬,徐园园,江行玉,等. 小麦质膜 N⁺/H⁺ 逆转运蛋白 TaSOS1 的表达分析[J]. *麦类作物学报*,2011,31(1): 64-69
- [18] Chen F, He Z H, Xia X C, et al. A new puroindoline b mutation presented in Chinese winter wheat cultivar Jingdong 11 [J]. *J Cereal Sci*,2005,42: 267-269
- [19] Jolly C J, Glenn G M, Rahman S. *Gsp-1* genes are linked to the grain hardness locus (*Ha*) on wheat chromosome 5D [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*,1996,93: 2408-2413
- [20] Chantret N, Salse J, Sabot F, et al. Molecular basis of evolutionary events that shaped the *hardness* locus in diploid and polyploid wheat species (*Triticum* and *Aegilops*) [J]. *Plant Cell*,2005, 17: 1033-1045
- [21] Goollan P, Smith K, Bhavne M. *Gsp-1* genes comprise a multigene family in wheat that exhibits a unique combination of sequence diversity yet conservation [J]. *J Cereal Sci*,2007,45: 184-198
- [22] Quarrie S A, Quarrie S P, Radosevic R, et al. Dissecting a wheat QTL for yield present in a range of environments: from the QTL to candidate genes [J]. *J Exp Bot*,2006,11: 2627-2637
- [23] Quarrie S A, Steed A, Calestani C, et al. A high-density genetic map of hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) from the cross Chinese Spring × SQ1 and its use to compare QTLs for grain yield across a range of environments [J]. *Theor Appl Genet*, 2005,110: 865-880
- [24] Kuchel H, Williams J K, Langridge P, et al. Genetic dissection of grain yield in bread wheat. I. QTL analysis [J]. *Theor Appl Genet*,2007,115: 1029-1041
- [25] McIntyre C L, Mathews K L, Rattay A, et al. Molecular detection of genomic regions associated with grain yield and yield-related components in an elite bread wheat cross evaluated under irrigated and rainfed conditions [J]. *Theor Appl Genet*,2010,120: 527-541
- [26] Chen F, Zhang F Y, Dong Z D, et al. Allelic variation of puroindoline b-B2 variant and their independent heredity in bread and durum wheat as well as their association with grain texture [J/OL]. *Mol Breeding*,2013, DOI: 10.1007/s11032-013-9879-z