

分类号:

学 号: 2013107015

密 级:

单位代码: 10759

# 石河子大学

## 硕 士 学 位 论 文



### 小麦淀粉合成关键酶基因 SNP 多态性及 与淀粉合成的相关分析

学 位 申 请 人

韩俊杰

指 导 教 师

李卫华 教授

刘 伟 副教授

申请学位门类级别

农学 硕士

学 科 、 专 业 名 称

作物遗传育种

研 究 方 向

植物重要农艺性状基因克隆  
与功能研究

所 在 学 院

农学院

中国·新疆·石河子

2016年6月

分类号:

学 号: 2013107015

密 级:

单位代码: 10759

# 石河子大学

## 硕 士 学 位 论 文



### 小麦淀粉合成关键酶基因 SNP 多态性及 与淀粉合成的相关分析

学 位 申 请 人	韩俊杰
指 导 教 师	李卫华 教授 刘 伟 副教授
申请学位门类级别	农学 硕士
学 科 、 专 业 名 称	作物遗传育种
研 究 方 向	植物重要农艺性状基因克隆 与功能研究
所 在 学 院	农学院

中国·新疆·石河子

2016 年 6 月

**Correlation analysis between SNP polymorphisms of wheat starch  
synthesis enzymes gene and starch content (*Triticum aestivum* L.)**

A Dissertation Submitted to

**Shihezi University**

In Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of

**Master of Agriculture**

Han Jun-jie

(Crop Genetics and Breeding)

Dissertation Supervisor: Prof.Li Wei-hua

June, 2016

## 石河子大学学位论文独创性声明及使用权声明


### 学位论文独创性声明

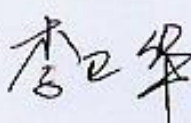
本人所提交的学位论文是在我导师的指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含其他个人已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中作了明确的说明并表示谢意。

研究生签名： 时间：2016年5月30日

### 使用授权说明

本人完全了解石河子大学有关保留、使用学位论文的规定，学校有权保留学位论文的规定，学校有权保留学位论文并向国家主管部门或指定机构送交论文的电子版和纸质版。有权将学位论文在学校图书馆保存并允许被查阅。有权自行或许可他人将学位论文编入有关数据库提供检索服务。有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

研究生签名： 时间：2016年5月30日

导师签名： 时间：2016年5月30日

## 摘 要

【目的】发掘并验证淀粉合成相关酶基因中可能存在的 SNP 位点，从单碱基突变上阐明造成小麦品种（系）淀粉含量差异的原因，为后续 SNP 标记的开发和辅助选择提供理论基础。

【方法】通过同源克隆获得淀粉含量差异较大的小麦品种（系）淀粉合成酶基因 *SSIIa*、淀粉分支酶基因 *SBEIIa* 和 *SBEIIb*，通过比对和多态性分析，发掘基因内有差异的单碱基位点，并以这些等位基因位点设计特异 PCR 扩增引物，采用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱技术（MALDI-TOF-MS）检测 162 个群体样本，通过 SPSS 统计分析，发掘与淀粉含量有显著相关性的位点。

### 【主要结论】

1、*SSIIa* 基因序列高度保守，与 GeneBank 中已发表的序列相似度达 98.19%以上，共发现 40 个单核苷酸变异，导致 20 个氨基酸发生了变异。通过蛋白结构域分析显示，这些变异位点位于 $\alpha$ -淀粉酶催化酶氨基 N-末端外侧，而在其催化区域中没有发现变异位点。此外，在新春 12 中发现了一个缺失位点，缺失片段为 249 bp，该缺失片段中包括了糖基转移酶的部分位点。

2、*SSIIa* 基因核苷酸变异丰富，其第 2 外显子区为变异富集区。*SBEIIa* 基因 SNP 变异主要发生在第 3、第 15 和第 18 外显子区。*SBEIIb* 基因大部分变异位点则集中于第 3 外显子区。对 *SBEIIb* 和 *SBEIIa* 基因 ORF 与 GenBank 中已登记的序列同源性分别为 99.04%和 98.64%。

3、对这 3 个基因的单核苷酸多态性分析表明， $\pi$ 值在 0.01637~0.01884 之间，Watterson's  $\theta_w$  值的范围是 0.01668~0.02523，表明这 3 个基因具有高度的核苷酸多样性。3 个基因的单倍型数相同，但其单倍型多样性并不一致。Tajima's D 检验 D 值均不显著，符合中性选择理论。

4、在单倍型分析中，这 3 个基因分为不同的单倍型，但不同的单倍型与支链淀粉含量之间有良好的对应关系，支链淀粉含量较高品种（系）往往被分在同一簇中，低支链淀粉含量品种（系）也被分在同一类，说明支链淀粉含量相近的材料可能有相似的单核苷酸序列变异。

5、对 90 个 SNP 位点进行检测发现，所有的位点均与直链淀粉含量之间没有明显的相关关系，ss2a-rs31 位点和 sbe2a-rs10 位点与支链淀粉含量之间有显著的相关性。关联分析发现，ss2a-rs31 位点 CT 基因型与 TT 基因型高支链淀粉含量之间差异不显著 ( $P>0.05$ )，而在中等支链淀粉和低支链淀粉含量中差异性显著 ( $P<0.05$ )；CC 基因型的个体支链淀粉含量显著高于 TT 基因型和 CT 基因型。在 sbe2a-rs10 位点 GG 基因型的高支链淀粉含量显著低于 AA 基因型和 AG 基因型 ( $P<0.05$ )；而在中等支链淀粉含量和低支链淀粉含量中，AG 基因型显著高于 AA 基因型和 GG 基因型。初步推断，这两个位点对支链淀粉的含量贡献较大，可以作为 SNP 标记开发的候选位点。

本研究通过对不同淀粉含量的小麦品种（系）的 3 个淀粉合成相关酶基因的研究，发掘基因内部可能存在的 SNP 位点信息，结合基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱技术（MALDI-TOF-MS）对候选的 SNP 位点检测，利用 SPSS 统计分析，发现 ss2a-rs31 位点 (C $\leftrightarrow$ T) 和 sbe2a-rs10 位点 (A $\leftrightarrow$ G) 可能是造成支链淀粉含量差异的有效位点。

关键词：小麦；淀粉含量；SNP；相关性分析

## Abstract

**Objective:** We identify and verify the SNP may be present in starch synthesis genes and elucidate the causes of wheat varieties (lines) starch content differ from a single base mutation. This will give us the subsequent development of SNP markers and assisted selection basis.

**Method:** In this study, the *SS IIa*、*SBE IIa* and *SBE II b* genes were cloned from wheat varieties (lines) with different contents of starch. By comparison and analysis of polymorphisms, we discover many different single base site, and design specific PCR amplification primers. Then we use matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) to detect 162 colony samples, to explore significantly correlated sites with starch content by SPSS statistical analysis.

### The main results and conclusions:

1、*SS II a* gene sequences are highly conserved, compared with the sequence published in GenBank similarity of more than 98.19%. It was found 40 single nucleotide mutation, resulting in 20 amino acids mutated. Protein domain analysis found that these mutation sites are located outside of the  $\alpha$ -amylase enzyme N-terminal, and in structural domain analysis was not found any differences in alpha starch catalytic enzyme. In addition, we also found a deletion fragment of 249bp in XinChun 12, which including part of the glycosyltransferase locus.

2、*SS II a* gene nucleotide variation is richful, and the second exon is mutation enrichment Area. *SBE II a* gene SNP variation occurs mainly in the 3rd, 15th and 18th exon Area. *SBE II b* gene mutation sites are concentrated in the third exon. For *SBE II b* and *SBE II a* are similar to the sequences which published in GeneBank more than 99.04% and 98.64%.

3、These three gene single nucleotide polymorphism analysis showed that,  $\pi$  value between 0.01637 - 0.01884, the scope of Watterson's  $\theta_w$  value is 0.01668 - 0.02523, suggesting that these genes have a high degree of nucleotide diversity. The three genes have the same haplotype number, but it is not consistent haplotype diversity. Tajima's D test D value not significant, in line with the neutral theory of molecular.

4、In the haplotype analysis, these three genes were divided into different haplotypes, but there is good correspondence between different haplotypes and amylopectin content, higher levels of amylopectin varieties (lines) often was in the same cluster, the low amylopectin content cultivars (lines) are also classified in the same category, explanatory material similar amylopectin content may have similar single nucleotide sequence variations.

5、Detected by 90 SNP loci we found that all these sites were no significant correlation between amylose content, there is a significant correlation between *ss2a-rs31* site and *sbe2a-rs10* sites and amylopectin content. Correlation analysis found that the differences between *ss2a-rs31* locus genotype CT and TT genotypes with high amylopectin was not significant ( $P > 0.05$ ), while in the medium starch and low-branched amylopectin content of the difference significant ( $P < 0.05$ ); CC genotype individual branched starch content was significantly higher than CT genotype and TT genotype. In the high amylopectin, *sbe2a-rs10* locus GG genotype was significantly lower than AA and AG genotypes ( $P < 0.05$ );

while in the middle amylopectin content and a low content of amylopectin, AG genotype was significantly higher than that AA genotype and GG genotype. It concluded that the two sites have a larger contribution on the content of amylopectin, and it may be a candidate locus for SNP marker development.

In this study, we study three starch synthesis related enzymes *SS II a*, *SBE II a* and *SBE II b* from wheat varieties (lines) with different contents of resistant starch, and explore the SNP locus information which may be present inside the gene. Combined with matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) to detect the SNP, using SPSS statistical analysis, we found ss2a-rs31 site (C↔T) and sbe2a-rs10 site (A↔G) may be effective sites cause differences amylopectin content.

**Keywords:** wheat; starch content; SNP; correlation analysis

# 目 录

Abstract.....	III
缩略词表.....	VII
引 言.....	1
第一章 文献综述.....	2
1.1 小麦胚乳淀粉组成及结构.....	2
1.1.1 胚乳淀粉的组成.....	2
1.1.2 胚乳淀粉的结构.....	3
1.1.3 小麦直支链淀粉的区别.....	4
1.2 小麦淀粉合成中的几种关键酶.....	4
1.2.1 ADP 葡萄糖的合成.....	5
1.2.2 淀粉合成酶和淀粉分支酶酶学研究.....	5
1.3 植物中 SNP 的研究现状.....	10
1.3.1 SNP 的概念.....	10
1.3.2 SNP 的研究方法.....	10
1.3.3 SNP 在植物研究中的应用.....	11
1.4 SNP 与关联分析.....	12
1.4.1 LD 连锁不平衡 (linkage disequilibrium, LD) .....	13
1.4.2 关联分析的应用.....	13
1.4.3 基于 SNP 的关联分析在植物中的应用.....	14
1.5 本研究的目的与意义.....	14
第二章 材料与方法.....	15
2.1 试验材料、试剂及仪器.....	15
2.1.1 试验材料.....	15
2.1.2 试验试剂.....	16
2.1.3 试验仪器.....	16
2.2 实验方法.....	16
2.2.1 小麦籽粒直、支链淀粉含量的测定.....	16
2.2.2 小麦基因组 DNA 的提取.....	17
2.2.3 小麦籽粒 RNA 提取及 cDNA 合成.....	17
2.2.4 目的基因克隆.....	18
2.2.5 扩增片段电泳检测及回收.....	18
2.2.6 目的片段与 pEASY-T 载体的连接转化.....	18
2.2.7 质粒 DNA 提取.....	19
2.2.8 阳性重组子筛选及酶切验证.....	19
2.2.9 生物信息学分析.....	20
2.2.10 特异 PCR 引物设计.....	20
第三章 结果与分析.....	23
3.1 小麦籽粒淀粉含量及差异分析.....	23
3.2 淀粉合成关键酶基因克隆及生物信息学分析.....	23
3.2.1 <i>SS IIa</i> 基因克隆及序列结构分析.....	23
3.2.2 <i>SBE IIa</i> 和 <i>SBE IIb</i> 基因克隆及序列结构分析.....	27
3.3 <i>SS IIa</i> 、 <i>SBE IIa</i> 和 <i>SBE IIb</i> 基因序列多态性及单倍型分析.....	27

3.3.1 基因序列多态性分析.....	27
3.3.2 基因编码区核苷酸多态性分析.....	29
3.3.3 基因序列单倍型分析.....	29
3.4 SNP 检测及与淀粉含量的关联分析.....	30
3.4.1 SNP 分型结果.....	30
3.4.2 基因型和等位基因频率分析.....	30
第四章 讨论与结论.....	32
4.1 影响 SNP 检测的两个因素.....	32
4.1.1 实验材料的选取.....	32
4.1.2 基因组 DNA 的提取.....	32
4.2 SNP 的检测方法.....	32
4.3 <i>SSIIa</i> 基因序列差异对淀粉含量的影响.....	33
4.4 <i>SSIIa</i> 、 <i>SBEIIa</i> 和 <i>SBEIIb</i> 编码区核苷酸多态性.....	33
4.5 SNP 多态性与淀粉含量的相关关系.....	34
4.6 SNP 多态性关联分析总结与展望.....	35
4.7 结论.....	35
参考文献.....	36
致 谢.....	49

## 缩略词表

缩写	英文全称	中文名称
AMP	Ampicillin	氨苄青霉素
AGPase	ADP-glucose pyrophosphorylase	ADP-葡萄糖糖焦磷酸化酶
bp	Base pair	碱基对
DBE	De-branching enzyme	淀粉去分支酶
DEPC	Diethyl pyrocarbonate	焦碳酸二乙酯
dNTP	Deoxynucleoside triphosphate	脱氧核苷酸磷酸
EB	Ethidium bromide	溴化乙锭
EDTA	Ethylenediaminetetra Acetic Acid	乙二氨四乙酸二钠
EST	Expressed sequence tags	表达序列标签
GBSS	Granule bound starch synthase	颗粒结合淀粉合成酶
MALDITOF	matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry	基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱技术
HR	Homologous recombination	同源重组
IPTG	Isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside	异丙基- $\beta$ -D-硫代吡喃半乳糖苷
LB	Luria-bertain meduim	LB培养基
LD	Linkage disequilibrium	连锁不平衡
NCBI	National center for biotechnology information	美国国立生物技术信息中心
ORF	Open reading frame	开放阅读框
RNAi	RNA interference	RNA干扰
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction	反转录聚合酶链式反应
SBE	Starch Branching enzyme	淀粉分支酶
SNP	Single nucleotide polymorphism	单核苷酸多态性
SBE II a	Starch branching enzyme II a	淀粉分支酶 II a
SBE II b	Starch branching enzyme II b	淀粉分支酶 II b
SS	Starch synthase	淀粉合成酶
SSS	Soluble starch synthase	可溶性淀粉合成酶
X-gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl $\beta$ -D-Galactopyranoside	5-溴-4-氯-3-吲哚- $\beta$ -D-半乳糖苷
MAS	molecular assisted selection	分子辅助选择

## 引言

淀粉是谷物类作物胚乳的主要组成部分，其积累过程也是能量存储的过程。大约有成熟小麦籽粒干重的 65%到 70%，为人类和动物主要提供碳水化合物。在小麦灌浆过程中，光合器官首先合成蔗糖，然后在一系列的酶促反应下最终合成淀粉，在这个过程中需要多种酶的参与。这些酶主要有四大类，分别为：腺苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶(ADPG Pyrophosphorylase,AGPase)、淀粉合成酶(Starch Synthase,SS)、淀粉分支酶(Starch Branching Enzyme,SBE)和淀粉去分支酶(Starch Debranching Enzyme,DBE)。AGPase 主要催化 ADP-葡萄糖(ADPG)的形成而作为淀粉合成的底物；SBE 从淀粉长链非还原末端切下一个小片段并将其连接到淀粉链的一个葡萄糖残基上，从而形成分支；DBE 主要催化多糖链中 $\alpha$ -1-6-糖苷键的水解，去除多余的分支，起修饰作用。在国家经济繁荣发展和人民生活水平逐渐改善的带动下，人们对饮食的要求也不断提高，作为三大粮食作物之一的小麦，其淀粉品质的改善也十分必要。由于常规育种手段耗时较长、效率不高，因此，人们寄希望于生物工程手段来对淀粉的合成进行调节，以达到缩短时间、获得能满足相应需求的“天然淀粉”。近些年来，淀粉生物合成机理的研究已经非常清楚，对淀粉合成过程中调节酶的研究也越来越深入。通过一系列的生物学方法，已成功分离、鉴定和克隆了淀粉合成关键酶的编码基因，并完成测序。基于这些基础，通过转基因和基因干扰表达(如 VIGS、RNAi 等)来验证基因功能和对淀粉合成途径进行定向调控，在改良淀粉品质上已取得初步成果。淀粉合成关键酶是由其基因编码获得，若位于其编码序列上的酶基因发生突变或缺失，则会造成酶活性的下降或丧失，其调控的淀粉含量也会相应的下降。

随着人类、拟南芥和水稻等基因组测序的完成，研究重点开始集中于单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms,SNPs)的筛选及其检测上。人类基因组研究表明：不同群体 SNP 频率分布不同，并且这些差异在不同人群之间是有代表性的。因此，通过研究 SNP 可以有利于我们解释个体的表型差异以及不同群体或个体对疾病的易感性等。另外，对不同物种 SNP 差异比较还有助于了解其亲缘进化关系。植物研究者借鉴人类 SNP 研究方法，将其应用到植物研究当中，玉米、小麦等作物的高度遗传多样性更有利于 SNP 的鉴别。作为第三代标记类型，它比 RFLP、SSR 标记等更有优势，是目前所有标记类型中精确度最高的标记类型。随着大量 SNP 标记的开发，基于 SNP 标记的关联分析已成为研究植物数量性状的重要手段。

因此，在前人研究基础上，本试验选取与淀粉合成密切相关的关键酶基因 *SSIIa*、*SBEIIa* 和 *SBEIIb* 为目的基因，通过生物信息学手段分析基因序列间存在的差异位点，并结合生物信息数据库查找已发表的 SNP 位点，设计特异引物验证，分析来源广泛的小麦材料在不同位点上的遗传多态性，对验证正确的 SNP 位点作为候选基因位点并设计特异引物，作为一个 SNP 标记，为分子标记辅助选育、改良小麦淀粉性质奠定理论及物质基础。

## 第一章 文献综述

### 1.1 小麦胚乳淀粉组成及结构

小麦淀粉主要由直链淀粉和支链淀粉两种类型组成，其中直链淀粉约占 24%，支链淀粉约占 75%。相比其它作物，小麦的碳水化合物含量相对较高，而脂肪含量和纤维含量相对较低，且易于消化吸收，能提供较多的能量（表 1.1）。

表 1.1 谷物籽粒的组成与能量（Juliano,1985）

Table 1.1 Composition and energy balance data of whole-grain cereals(from Juliano,1985)

性状 Property	糙米 Brown rice	小麦 Wheat	玉米 Corn	大麦 Barley	粟 Millet	高粱 Sorghum	黑麦 Rye	燕麦 Oat
蛋白 Protein(%)	7.3	10.6	9.8	11.0	11.5	8.3	8.7	9.3
脂肪 Fat(%)	2.2	1.9	4.9	3.4	4.7	3.9	1.5	5.9
可利用碳水化合物 Available carbohydrate(%)	64.3	69.7	63.6	55.8	63.4	58.0	71.8	62.9
纤维 Fibre(%)	0.8	1.0	2.0	3.7	1.5	4.1	2.2	5.6
灰分 Ash(%)	1.4	1.4	1.4	1.9	1.5	2.6	1.8	2.3
蛋白利用率 Net protein utilization (%)	73.8	53.0	58.0	62.0	56.0	50.0	59.0	59.1
可利用能量 Digestible energy (KJ.100g <sup>-1</sup> )	1550.0	1360.0	1450.0	1320.0	1440.0	1290.0	1330.0	1160.0

#### 1.1.1 胚乳淀粉的组成

淀粉主要以淀粉粒的形态存在于植物体内，因种属的不同而形态大小各异。在成熟的小麦籽粒中充满了淀粉粒，有 3 种类型：A 型淀粉粒、B 型淀粉粒和 C 型淀粉粒。与其它作物不同，在小麦造粉体中只有一个淀粉粒，被称为简单淀粉粒。A 型淀粉粒直径在 10 -30 $\mu\text{m}$ ，B 型淀粉粒直径 5-10 $\mu\text{m}$ ，C 型淀粉粒直径小于 5 $\mu\text{m}$ 。B 型淀粉粒含量非常多，占总淀粉粒的 95%以上；A 型淀粉粒数量较少，但其占淀粉粒质量的 70-80%。A 型淀粉粒呈盘状或透镜状，发育较早，开始于胚乳细胞有丝分裂早期，大约在分裂停止后 7d，其数目基本不再增加，但体积会持续增长；B 型淀粉粒呈球形或多边形，发育较晚，开始于花后 16d 并持续到胚乳细胞的膨胀阶段；C 型淀粉粒于花后 21 d 开始形成。在胚乳干燥的过程中会破坏造粉体的膜结构，释放淀粉颗粒并与胚乳中的蛋白结合。结合颗粒主要有两种类型：嵌入式类型和表面附着式类型，附着式类型能够被蛋白酶 K 消

化（图 1.1）。淀粉粒是由直、支链淀粉组成的淀粉大分子聚合体，这两种淀粉含量比例的变化将直接影响淀粉的理化特性。

Endosperm proteins attached to surface of granule

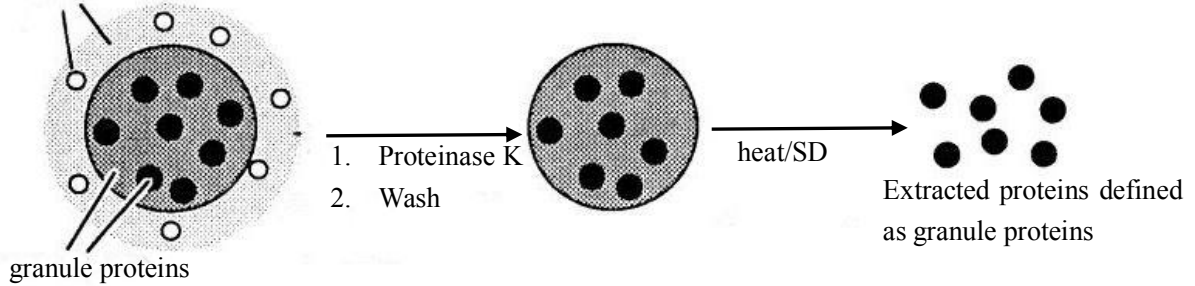


图 1.1 蛋白酶 K 对小麦淀粉粒作用示意图 (Greenwell, 1986)

Fig 1.1 Schematic representation of the effect of proteinase K on wheat starch granules (from Greenwell,1986)

### 1.1.2 胚乳淀粉的结构

#### 1.1.2.1 直链淀粉

直链淀粉是 $\alpha$ -D-葡萄糖以 $\alpha$ -1,4 糖苷键连接形成的葡聚糖合体，含有极少的分支或基本没有分支。研究表明，其分支数不到 1/1000，聚合度 DP (degree of polymerization, DP) 1000~1700，分子量  $10^5$ - $10^6$ kDa。带分支的直链淀粉数量较少，约占 20-50%，质量约为 30-60%。其空间构象卷曲为螺旋状结构，且每一回转为 6 个葡萄糖基。暴露在螺旋体外侧的是葡萄糖残基中的氢氧根，而内侧是疏水管。因此，通过相邻分子间的作用力，直链淀粉形成的螺旋结构能够使疏水复合体稳定的存在。

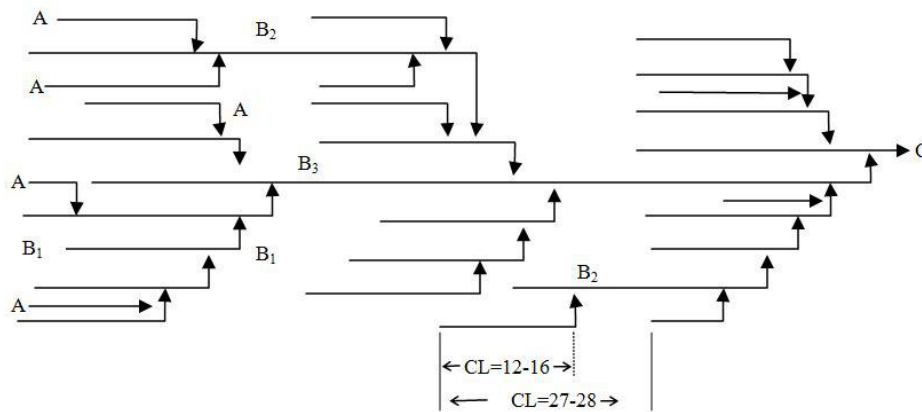


图 1.2 支链淀粉模型 (Hizukuri,1986)

Fig 1.2 The cluster model of amylopectin

注：C：还原末端；细线： $\alpha$ -1,4 糖苷键；箭头： $\alpha$ -1,6 糖苷键；CL：平均链长

Notes: C: reducing chain-end; solid lines:(1,4)-  $\alpha$ -D-glucan chain; arrows:  $\alpha$ -1,6 linkage; CL:average chain length

### 1.1.2.2 支链淀粉

支链淀粉是在 $\alpha$ -1,4糖苷键形成的直链葡聚糖链上再通过 $\alpha$ -1,6糖苷键连接分支形成的,平均聚合度为5000~50000个葡萄糖单位,分子量为 $10^7\sim 10^9$ kDa。平均每20-26个葡萄糖基上就有一个 $\alpha$ -1,6分支点,分支的链长平均为18~25DP,因此,支链淀粉存在很多的分支。支链淀粉的分支分布并不是散乱无章的,而是以“簇”为单位进行分布,平均7-10nm形成一簇(Hizukuri,1986)。这种簇状结构有三种类型:A链,B链和C链。A链位于最外侧,通过还原性末端与B链相连,所以它本身没有分支;B链可以通过多个葡糖糖残基和C链相连,所以它有分支;C链因为具有还原末端而是支链淀粉分子的主链,而且只有一条(图1.2)。

### 1.1.3 小麦直支链淀粉的区别

直链淀粉与支链淀粉结构存在较大差异(表1.2)。直链淀粉的分支数很少,支链淀粉的分支数很多,大约20个葡萄糖单位就有一个分支点;直链淀粉的链长一般较支链淀粉的长,二者的重量比也差异较大;直链淀粉由分子间作用力形成螺旋状结构,而支链淀粉则为“簇”状且结构层次性很强。因为直链淀粉平均六个葡萄糖单位构成一个螺旋,并且构成的螺旋圈非常大,当与碘分子接触时,碘分子进入螺旋内,平均一圈螺旋可以束缚一个碘分子,所以,它可以结合本身重量20%的碘。反之,支链淀粉与碘的结合力则较差。直链淀粉遇碘显蓝色,支链淀粉遇碘显紫红色。

表 1.2 直/支链淀粉的特性

Table 1.2 Properties of amylose and amylopectin

项目 Items	直链淀粉 amylose	支链淀粉 amylopectin
重量比 Weight percentage in granule(%)	25	75
形成分支的葡萄糖残基比 Percentage of $\alpha$ -1,6 branching(%)	0.2-1	4-5.5
链长 Chain length	100-1000	3-60
聚合度 Degree of polymerization	$10^2$ - $10^3$	$10^3$ - $10^4$
分子量 Molecular weight(kDa)	$10^5$ - $10^6$	$10^7$ - $10^8$
A/B 链 A/B chain		1.0-1.5
链结构 Chain structure	螺旋	簇
遇碘显色 Iodine staining	蓝色	紫红色
溶解性 Solubility	溶于热水	不易溶于水

## 1.2 小麦淀粉合成中的几种关键酶

小麦淀粉的合成是植物光合作用的产物,在一系列酶促反应下进行的(如图1.3)。叶绿体产生的“临时淀粉”被分解后通过体内转运后输送到其它组织中,在其贮藏器官中形成“贮藏淀粉”。淀粉的整个合成途径分为三种:①ADP葡萄糖产生;②直链淀粉的合成;③支链淀粉的合成。

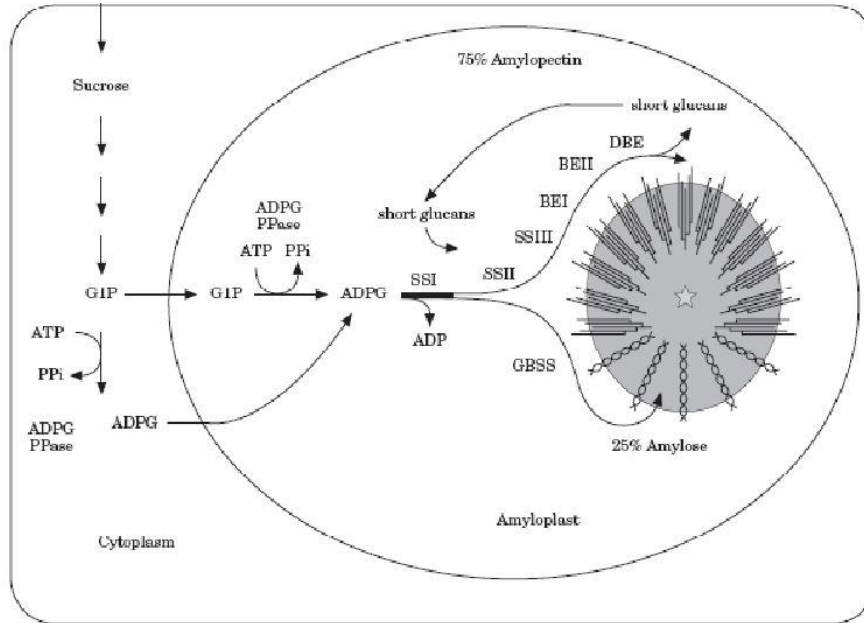


图 1.3 淀粉的合成路径

Fig 1.3 General scheme for starch biosynthesis(Rahman,2000)

### 1.2.1 ADP 葡萄糖的合成

蔗糖是小麦胚乳淀粉合成的最初原材料。在蔗糖合成酶的作用下，蔗糖分解为果糖和 UDPG。在果糖激酶和葡萄糖磷酸变位酶的作用下，果糖形成 6-磷酸葡萄糖，而 UDPG 继而也可形成 1-磷酸葡萄糖。1-磷酸葡萄糖则在葡萄糖焦磷酸化酶（AGPase）的作用下合成 ADP-葡萄糖（ADPG），然后再在一系列淀粉合成相关酶的作用下合成淀粉。由此可见，ADPG 是淀粉合成的直接供体。

### 1.2.2 淀粉合成酶和淀粉分支酶酶学研究

#### 1.2.2.1 淀粉合成酶

淀粉合成酶（starch synthase,SS）是由多基因控制的，因此其有很多的类型。其中，游离于质体基质中的被称为可溶性淀粉合成酶（soluble starch synthase,SSS）；与淀粉颗粒紧密结合的被称为颗粒结合淀粉合成酶（granule bound starch sythase,GBSS）。它们都以 ADPG 为底物催化淀粉的合成，SSS 负责支链淀粉合成，而 GBSS 负责直链淀粉合成。

根据 SSS 基因序列保守性分为 5 类，分别是 GBSS、SSI、SSII、SSIII 和 SSIV。他们在淀粉合成的过程中起着不同的作用。SSI 主要负责 10 个以下的葡聚糖支链合成；SSII 负责中等长度支链的形成；SSIII 则负责 25-35 个长链的形成；SSIV 通过参与淀粉颗粒引物的形成来控制淀粉颗粒的数目。

小麦胚乳中直链淀粉的合成主要受 GBSS 的影响。GBSS 分为 GBSSI 和 GBSSII，其中 GBSSI 又叫 Wx 蛋白，有 A、B、D 三种亚型，分别由 *Wx-A1*、*Wx-B1* 和 *Wx-D1* 控制，通过  $\alpha$ -1,4 糖苷键将 ADPG 中的残基添加到引物非还原端来延长链长。这三种亚基的缺失或突变对直链淀粉的合成影响不同。有研究表明，*Wx-B1* 缺失对直链淀粉含量的影响为三种亚基中最大，其次是 *Wx-D1*，而 *Wx-A1* 的影响最小。当这三种亚基同时缺

失, 则胚乳中几乎没有直链淀粉。由于 GBSSI 与直链淀粉的显著相关性, 因此很多的研究者利用 Wx 蛋白亚基缺失或突变材料设计特异引物作为分子标记来鉴定和选育优质作物品种。有研究者利用 Wx-B1 缺失材料设计特异引物, 不能扩出 440bp 的目的片段, 可以作为 Wx-B1 突变的分子标记(Briney,1998)。根据 Wx-D1 突变材料的 3'段有部分缺失设计 PCR 引物, 扩增出比正常材料少 588bp 的片段, 以此作为一个突变位点标记(Shariflou,1999)。宋建民等通过对不同来源的 14 个小麦品种 Wx 蛋白多态性鉴定, 结果表明: Wx-A1 位点突变材料扩增产物为 327 bp, 而正常材料中扩增不到该特异带, 以此可以作为一个标记位点(宋建民,2004)。另外, 有研究表明, GBSSI 对支链淀粉的合成也有一定的影响(Takeda,1993;Hizukuri,1989)。GBSSII 是 GBSS 的同工酶, 主要存在于小麦的非贮藏组织中, 参与临时性直链淀粉的形成。在大豆和马铃薯的研究中, 表现出 GBSSII 与支链淀粉具有较高的亲和力, 可能参与支链淀粉的合成, 表现出物种特异性。

SS 在叶片和贮藏器官中均有存在, 但是主要存在于植物的贮藏器官中。ADPG 合成后, 在 SS 的催化作用下, 通过加入 $\alpha$ -1, 4 糖苷键来延伸链长。在淀粉分支酶的作用下, 延伸的长链又作为底物合成支链淀粉。在不同的植物中, SS 的类型不同, 功能也有所差异。Nakamura 首次在水稻中对 SSI 缺失突变体进行研究, 通过逆转座子的插入分析对胚乳中支链淀粉的链长影响, 发现 DP (6-7) 增加, 而 DP (8-12) 缺乏(Nakamura,2002)。最近的研究表明, SSI 羧基端的完整对葡聚糖结合是必须的, 而氨基端则不是必不可少的; 而且, SSI 的亲和力随着基质链长而增加, 但是它的催化能力会减弱(Commuri,2001)。根据目前的研究, SSI 主要负责 DP<10 的链的合成, 即 A 和 B1 链(Tetlow,2006)。SSI 在不同植物中的表达部位也不同, 小麦中 SSI 主要在早期胚乳中表达(Li,1999); 水稻的叶片和种子中均有表达(Baba,1993), 而马铃薯叶片中的表达量最多(Kossmann,1999)。

小麦中 SSII 有两种类型: SSIIa、SSIIb。Yamamori 等将 SSII 命名为 Sgp-1, 有 A、B、D 三个亚基, 在不同的植物中相似度很高(Yamamori,1994)。如玉米中 SSIIa 和 SSIIb 均含有 LXGGL (Lys-X-Gly-Gly-Leu) 序列, 二者与小麦、豌豆、马铃薯等的同源性很高。SSIIa 主要存在于小麦的胚乳中, SSIIb 主要在光和器官中表达。对 SSII 突变体的淀粉 X-衍射表明, 同时缺失 Wx 和 SSII 的小麦中仍有直链淀粉的存在, 推测可能是 SSII 缺失使支链淀粉侧链变长, 从而表现出直链淀粉的性质(Denyer,2001)。SSII 的 N-端有两个不同重复区, 其中一个区域与 DBE 的 N-端和 SBEIIa 特异结合形成酶复合体, 如果 SSII 基因在该位点发生突变则会破坏 SS、DBE 和 SBE 形成的复合体, 从而影响淀粉生物合成(Gao,1998)。在贮藏器官淀粉合成上, SSII 比其它几种同工酶表现出更为重要的作用。Delrue 等的研究发现, 在 SSII 缺失的豌豆中, rug5 突变使淀粉粒畸变, 而这种缺失作用均不能被其它几种同工酶所替代 (Delrue,1992)。小麦、大麦和玉米中 SSIIa 基因的缺失导致支链淀粉生物合成的受阻, 从而导致直链淀粉含量的增加(Smidansky,2002)。Gao 对玉米的 SSII 基因缺失突变研究表明, 由于该基因的缺失导致玉米籽粒表明光泽消失, 直链淀粉含量发生较大变动(Gao,1998)。Umemoto 对 S 型水稻研究表明, SSIIa 基因活性降低导致 A 链增加及部分 B1 链的减少(Umemoto,2005)。在

合成中等长度侧链中 *SS IIa* 发挥特殊作用，其功能无法被其它 SS 同工酶替代。

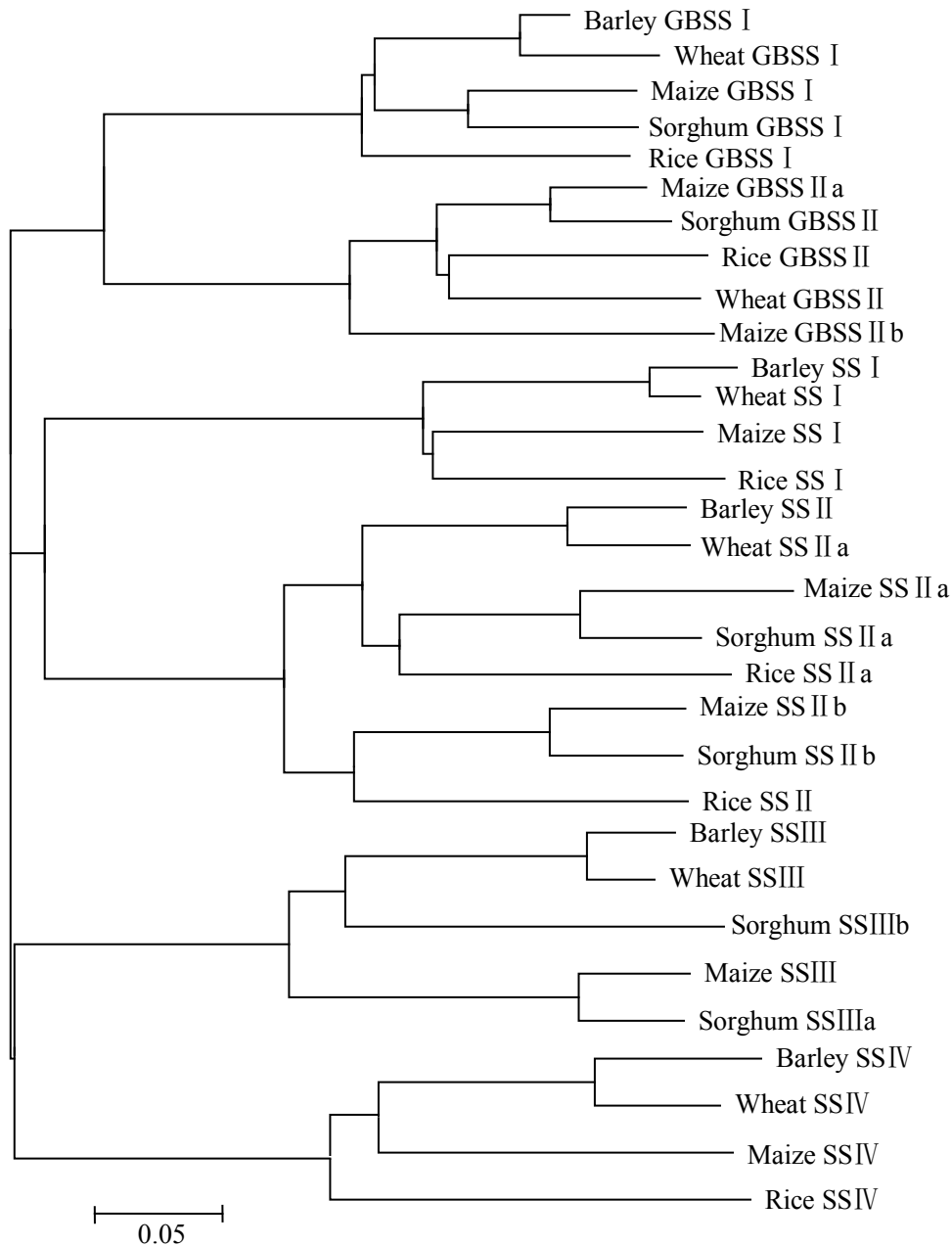


图 1.4 不同谷物淀粉合成酶系统进化树

Fig.1.4 Dendrogram of the relationship between the cereals deduced amino acid sequence of SS by the PILEUP program

SSIII最早是从马铃薯中分离得到的，研究发现，SSIII对马铃薯 SSS 酶活性贡献最大(Abel,1996)。但是，通过反义抑制 SSIII活性却并未对马铃薯淀粉含量造成显著影响，其淀粉粒却出现明显的裂缝和变形。SSIII反义植株中支链淀粉长链减少，说明 SSIII与长 B1 和 B2 链关系更加密切(Edwards,1986)。在玉米的研究中，只有 SSIII和 Wx 同时突变的情况下才会表现出与马铃薯相似的表型。Zhang 的研究表明，SSIII与其它几种酶形成复合体，影响淀粉合成速率(Zhang,2005)。在水稻的研究中发现，SSIII有两种类型：

SSIII-1 和 SSIII-2。SSIII-2 只存在于籽粒中，负责支链长链的合成，并对其它 SS 酶起调节作用(Crofts,2012)。SSIII-1 主要在叶片中表达，对稻米品质有显著影响(王芳,2007)。

目前，对 SSIV 基因的研究较少，迄今为止还没有 SSIV 突变体的研究报道。目前，只在水稻的籽粒和叶片中检测到 SSIV 的表达(Dian,2005)；拟南芥叶片 SSIV 活性的丧失使淀粉粒体积增大但数目减少(Roldán,2007)。几种谷物作物 SS 基因亲缘进化关系如图 1.4。

#### 1.2.2.2 淀粉分支酶

支链淀粉是小麦籽粒淀粉的主要组成部分，它的合成与淀粉分支酶 (Starch Branching Enzyme, SBE) 密切相关，SBE 又称 Q 酶。它具有双重作用：①切开 $\alpha$ -1,4 糖苷键连接的葡聚糖链；②催化 $\alpha$ -1,6 糖苷键的形成，产生分支，使链长得到进一步延伸 (Smith,1995)。

SBE 有两种类型：SBE I、SBE II，在小麦中，两者大小相同 (88kD)。SBE II 又有两种同工酶：SBE II a、SBE II b，这两种同工酶基因在多种植物中 (如玉米、水稻、大麦、小麦等) 均能克隆得到，它们 cDNA 序列相似性 85% 左右，氨基酸序列相似性 80% 左右。两者均有 22 个外显子组成，其中 3-21 外显子序列完全一致(Kim,1998)。

在玉米的研究中发现，SBE I 有比 SBE II b 更长的转运链(Takeda,1993)；SBE I 优先作用于直链淀粉，支链淀粉作用速率要比直链淀粉低 10%，通过对比发现，以支链淀粉为底物时，SBE II 作用于分支支链淀粉的速率是分支直链淀粉的 6 倍(Guan,1993)。豌豆高直链淀粉突变体研究表明，SBE I 基因失活导致豌豆皱缩表型的出现 (Bhattacharya,1990)；水稻 SBE I 缺失体中，DP>16 的长链减少而 DP≤12 的短链增加 (Nishi,2001)，进一步说明 SBE I 更倾向于长链的合成；然而在土豆、玉米和小麦 SBE I 缺失体中并没有表现出明显的表型差异(Regina,2004)；在土豆中，SBE I 和 SBE II 同时缺失才表现出高直链淀粉的类型(Schwall,2000)。在六倍体小麦中，SBE I 约有 10 个拷贝，但其中一些是假基因，编码无活性的 SBE。目前研究表明，有表达功能的 SBE I 共有 5 个：*D<sub>4</sub>*、*sbe I<sup>#19</sup>*、*sbe I<sup>#9</sup>*、*sbe I-1* 和 *sbe I-2*，它们之间具有高度的同源性 (McCue,2002)。

研究表明，SBE II 的两种亚型空间分布并不相同，SBE II a 和 SBE II b 分别主要在叶片和胚乳中表达(Gao,1997)。在水稻胚乳细胞中 SBE II a 和 SBE II b 均存在，但 SBE II b 则是主要存在的亚型(Yamanouchi,1992)；在大麦中，SBE II a 和 SBE II b 表现出相似的活性，但 SBE II b 仅在胚乳中表达(Sun,1997)；Morell 等对小麦可溶性提取物做阴阳离子层析，分离得到 3 种 SBE：SBE I<sub>AD</sub>、SBE I<sub>B</sub> 和 SBE II 并分别对其进行了定位，SBE I 位于第 7 部分同源染色体上，SBE II 位于 2 号染色体长臂上(Morell,1997)。在小麦可溶性基质中，SBE II a 占 SBE II 蛋白总量的 82% 左右；而 SBE II b 主要与淀粉粒结合，占 SBE II 结合蛋白的 72%。SBE II a 和 SBE II b 的表达时期不同，在水稻中，SBE II a 在花后 3d 开始表达，花后 5-7d 达到最大值(Mizuno,2001)，小麦中花后 15d 达到最大值；SBE I 和 SBE II b 转录开始较晚，开始于花后 7-10d(Rahman,2001)。水稻和玉米的 ae

(amylose-extent,ae) 突变体中, SBE II b 缺失使直链淀粉含量显著升高(Regina,1993), 在小麦中, 则需同时抑制 SBE II a 和 SBE II b 的表达才能得到同种表型(Stinard,2006)。水稻中 ae/Wx 同时突变时, 支链淀粉链长被大幅度延伸而直链淀粉缺失; 与此同时, ae 突变体造成 SS I 活性降低 50%, 这表明 SBE II b 和 SS I 是相互影响的(Nishi,2001)。在玉米和水稻研究中, SBE II a 突变缺失并未对胚乳淀粉组成和支链淀粉的结构造成影响, 这种现象可能是 SBE II a 在支链淀粉合成中未起到关键作用或者是其它 SBE 亚型基因的补偿作用造成的(Blauth,2001)。在大麦和小麦中, 抑制 SBE II a 活性使籽粒中直链淀粉含量提高了 70%(Regina,2006)。Francesco Sestili 等研究表明, 通过 RNA 干扰将 *SBEIIa* 基因沉默, 与野生型植株相比, 直链淀粉的含量有了显著增加(Sestili,2010)。不同植物之间的 SBE 亲缘进化关系见图 1.5。

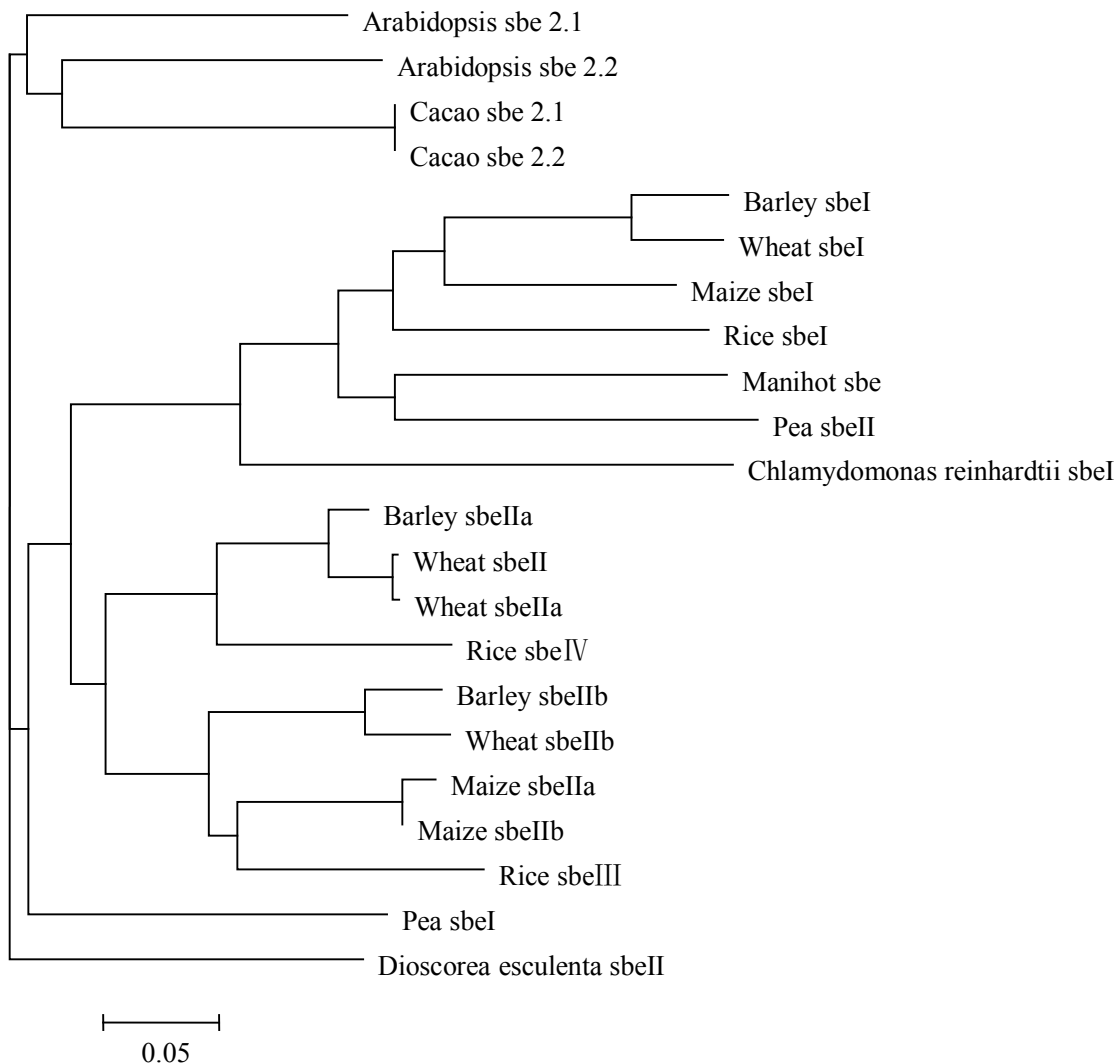


图 1.5 不同植物淀粉分支酶系统进化树

Fig.1.5 Dendrogram of the relationship between the various deduced amino acid sequence of SBE by the PILEUP program.

### 1.3 植物中 SNP 的研究现状

目前,包括人类、水稻和拟南芥等越来越多的生物基因组已被测序,这其中,这促使人们将研究的焦点再次聚集在研究种内 DNA 序列的差异上。随着人类和动物基因组研究的快速发展,推动了生物信息学、统计学和基因组技术的迅速发展,从而为植物 SNP 研究奠定了一定基础。很多研究表明,在植物的基因组内存在丰富的多态性,特别是在小麦中,由于其庞大的基因组使其 SNP 更为丰富。近年来,有关植物 SNP 的报道越来越多,如玉米、大豆、油菜等,在多样性分析、群体遗传进化和基因组学等领域体现了重要的应用价值。

#### 1.3.1 SNP 的概念

单核苷酸多态性 (Single nucleotide polymorphism, SNP) 是在 DNA 序列上发生的单碱基变异,包括单碱基的转换和颠换,以及插入和缺失等,从而造成 DNA 序列的多态性。这种差异可以作为一个分子标记,即 SNP 标记,最早是由 MIT 的 Lander 提出,被称为“第三代遗传标记”。单碱基的变异多发生的是转换 (C-T, G-A) 和颠换 (C-A, G-T, C-G, A-T)。根据 SNP 的位置可将其分为两类:一是编码区功能性突变,即 cSNP (coding single nucleotide polymorphism, cSNP),可能造成氨基酸序列的变异,这种变异数目较少;二是非编码区变异,包括基因周边 SNP (perigenic SNP) 和基因间 SNP (intergenic SNP),这种变异类型数目非常多,是 SNP 存在的主要类型。根据 SNP 是否造成氨基酸变异,对其功能是否造成影响, cSNP 又分为同义 cSNP (synonymous SNP) 和反义 cSNP (non-synonymous SNP)。同义 cSNP 不会造成氨基酸变异,不影响功能表达;反义 cSNP 改变了氨基酸序列,影响其功能表达,可能会对生物的性状表现造成影响。研究表明,由于基因非编码区承受较小的选择压力,变异频率较高,因此是 SNP 的多发区。虽然这些 SNP 在个体中意义不大,但是仍然在生物进化中有积极的意义 (Meyers, 2001)。

#### 1.3.2 SNP 的研究方法

目前,在动植物中 SNP 的研究正在广泛进行,大量 SNP 标记的开发也促使 SNP 的检测手段日益更新,现在 SNP 的检测方法已经颇为成熟,已经形成了一套行之有效的方法。植物 SNP 研究应该注意以下两点:基因位点的选择和核心群体选择,尤其是对于禾谷类作物来说,最好选择有代表的近等基因系。

##### 1.3.2.1 数据库中筛选 SNP

利用现有的 DNA 数据库或 EST 序列数据库筛选 SNP,目前已经建立了很多植物的 DNA 数据库,如 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)、拟南芥 (<http://www.arabidopsis.org/>)、大麦 (<http://cnrgv.toulouse.inra.fr/en/Library/Barley>)、小麦 (<http://www.wheatgenome.info/>)、水稻 (<http://rice.genomics.org.cn/rice/jsp/chrview.jsp?chr=6&organism=9311>)、其它谷物类 ([http://www.cerealsdb.uk.net/cerealgenomics/Index\\_Home.html](http://www.cerealsdb.uk.net/cerealgenomics/Index_Home.html)) 等。

##### 1.3.2.2 PCR 扩增目的产物直接测序法及酶切法

PCR 产物直接测序法是最简捷有效的方法,选择差异较大的近等基因系进行 PCR

扩增,对测序结果进行比对分析,发现 SNP。如果 SNP 位置发生在一个酶切位点上,那么这个酶切位点就会消除或者产生新的酶切位点,从而使酶切后 DNA 片段的大小发生改变。因此,它可以用来鉴定 SNP。然而,利用 RFLP 鉴定 SNP 有很大的局限性,只能对酶切位点进行鉴定而不能鉴定所有的 SNP 位点;RAPD 鉴定虽然操作简单,成本较低,但是必须在稳定的条件下才能进行。

#### 1.3.2.3 基于杂交的方法

包括基因芯片技术和等位基因特异寡核苷酸杂交探针(ASO)。基因芯片技术利用大量的探针对 DNA 分子进行检测,可以获得很大的信息量并降低成本,但是它不能确定 SNP 的位置,检测的灵敏性和多态性也较差。ASO 利用杂合子和纯合子在解链时的  $T_m$  差值来确定 SNP,可以对多个 SNP 进行平行分析,目前已被广泛应用。另外,飞行质谱法(matrix assisted laser desorption time of flight mass spectrometry,MALDITOF)更为高效,DNA 片段与 ASO 杂交洗脱后用质谱仪分析,可以在几秒钟内分析大批量样品,是一种强有力的 SNP 分析工具。它的主要优势有:1)检测的是分子的本质特征—分子量,没有涉及到荧光标记、凝胶电泳等,准确性高,机器本身出错的概率非常低;2)质谱仪灵敏度非常高,检测窗口内,任何 pmol 的物质都能检测出;3)时间短,几秒就可以检测完一个反应孔;4)操作简单便捷,除质谱仪外,其它均是常规 PCR 仪器;5)灵活便宜,每天可以完成上万个反应,引物没有荧光标记,每个反应孔中能完成至少 4 重反应;6)兼容性强,一管式操作,可以进行蛋白组学、微生物鉴定等领域,所有反应均在一个孔中进行,没有多次转移,减少污染概率。

#### 1.3.2.4 DNA 构象为基础的方法

DNA 分子构象由碱基序列决定的,如果一个碱基发生改变则会导致 DNA 分子构象在非变性条件下发生微小差异,在电泳时就会造成移动速度不同而得以区分。常用的方法有四种,如温度梯度凝胶电泳(temperature gradient gel electrophoresis,TGGe)、变性梯度凝胶电泳(denaturing gradient gel electrophoresis,DGGE)、单链构象多态性(single strand conformational polymorphism,SSCP)和高效液相色谱(High Performance Liquid Chromatography, HPLC)。这些方法能够快速确定 DNA 序列中 SNP 存在,然而却不能确定突变碱基类型。

#### 1.3.3 SNP 在植物研究中的应用

SNP 包含的信息非常丰富,在基因组中发生的频率很高,对 SNP 的研究主要集中在人类和小鼠上,在植物研究中的应用也是最近几年兴起的。SNP 标记作为“第三代遗传标记”,因其更为精细而被广泛应用。Hayashi 等通过研究水稻 Piz 和 Piz-t 基因的 SNP 和插入/缺失(InDel),并以此作为一种 DNA 标记应用于育种工作中,并成功开发出 SNP 分型标记(Hayashi,2004)。Jeong 等对大豆抗病相关的两个基因 Rsv1 和 Rsv3 进行研究,利用 AS-PCR 技术对这两个基因的 SNP 进行检测和分型(Jeong,2004)。Drenkard 等同样利用 AS-PCR 技术对拟南芥 SNP 进行分析,为其基因图为克隆奠定基础(Drenkard,2000)。Bundock 等在 2003 年的文章中报道,对大麦细胞色素 P450 基因序列比对分析,成功找

出基因内的 SNP 位点并开发了标记引物(Bundock,2003); 在 2004 年的一篇报道中, 又分析了大麦 *Isa* ( $\alpha$ -淀粉酶抑制蛋白) 基因的 SNP 和单倍型, 为标记引物的开发奠定基础(Bundock,2004)。Sonneveld 等利用同样的方法对甜樱桃自交不亲和基因 S1、S2 的 SNP 做了检测(Sonneveld,2003)。Riedelsheimer 等利用 56110 个 SNP 标记, 分别对 289 份玉米自交系的表型和生理性状进行全基因组关联分析, 最后找到 15 个 SNP 标记与生理性状显著关联(Riedelsheimer,2012)。Aranzana 等为了研究拟南芥的花期和抗病性与 SNP 位点的相关性, 利用了覆盖全基因组的 2553 个 SNP 标记做关联分析, 结果表明, 有 4 个基因与目标性状存在关联(Aranzana,2005)。目前, 国内对作物 SNP 标记的开发利用还比较少。郝德荣等对 191 个大豆地方品种的 209 个单倍型和 SNP 分析, 得到与产量性状显著相关的 SNP 标记位点(郝德荣,2012)。吴玲等从数据库中获得大量的覆盖玉米全基因组的 EST 序列标签, 共发掘出 80363 个 SNP 位点, 并开发出 12388 个 SNP 标记(吴玲,2010)。

此外, SNP 对植物逆境的研究也起着十分重要的作用。张洪映等用抗旱性不同的小麦品种, 对其抗旱相关基因 *TaPK7* 的 SNP 进行检测, 揭示了该基因与抗旱性的关系(张洪映,2008)。卫波通过对小麦抗旱相关基因 *TaDREB1*SNP 的检测, 并设计特异引物, 用缺体四体系验证后, 将该基因定位在 3BS 染色体上(卫波,2006)。郝岗平等以不同生态环境下的拟南芥为材料, 分析了这些材料的抗旱性关系和抗旱转录因子 *CBF4* 的 SNP(郝岗平,2004)。苏治军等在玉米自交系中发现, *dbf1* 基因序列中 SNP 造成了抗旱性状的表型差异, 这对开发该基因耐旱性状标记有着积极的作用(苏治军,2010)。Rostoks 等利用 SNP 关联分析方法对大麦在逆境条件下基因的功能进行分析, 这种 SNP 与遗传和表型数据信息将促进对大麦和其它非模式植物基因功能的识别(Rostoks,2005)。

由于 SNP 在基因组中的广泛性和多发性, 使之在自动化大规模扫描上更加适用。SNP 标记的开发也大大弥补了 SSR 标记的不足, 对遗传图谱的构建更为有力。在拟南芥植物中, Cho 等通过利用 237 个 SNP 标记构建出抗真菌病基因 *Eds16* 的二等位遗传图谱, 使其遗传距离缩小到 3.5cM(Cho,1999)。玉米多为杂交种, 其 SNP 信息更为丰富, 目前研究发现至少有 2 千万个 SNP 可供使用, 这对构建玉米 EST 遗传图谱更为容易(Rafalski,2002)。Davis 等对玉米的作图群体的父母本的目标基因 3'端 UTR 区 SNP 进行检测, 然后记录 SNP 的流程对子代基因型作图, 成功的构建了高分辨率玉米遗传图谱(Davis,2001)。SNP 可以将 QTL 定位更加精准, 这也将有利于遗传图谱和物理图谱的整合, 在标记辅助选择育种和品种资源的鉴定上也有重要意义。

#### 1.4 SNP 与关联分析

关联分析, 也称连锁不平衡作图 (LD mapping), 是基于连锁不平衡上用以鉴定群体内目标性状与遗传标记相关关系的方法(Flint-Garcia,2003)。关联分析最早在人类疾病的研究中得以应用, 并取得了丰硕的成果。目前, 在人类不同致病基因方面已有许多成功的报道(Gibbs,2003)。在动物中的应用中也相对较多, 如奶牛、鱼、羊、猪、鸡等。然而由于目前对植物的基因组 LD 结构的认识还不够全面, 导致关联分析在植物中的应用

相对较少(Flint-Garcia,2005)。但是,随着生物信息学、统计学和基因组学技术的快速发展,关联分析也已成功的应用到许多植物上,如玉米、小麦、拟南芥、大麦、大豆等。近年来,许多植物的全基因组测序已完成,极大地促进了基因组学的发展,特别是近年来大量 SNP (single nucleotide polymorphisms) 标记的开发,关联分析在植物关键基因的发掘上更是得到了广泛的应用,为植物分子育种提供标记,这在国际上已经成为热点研究方向。

#### 1.4.1 LD 连锁不平衡 (linkage disequilibrium, LD)

连锁不平衡是自然选择的一种现象,在一个群体中,如果两个等位基因同时出现的概率与期望值不相同,那么它们就处于 LD 状态。连锁不平衡和遗传连锁是不相同的,遗传连锁指的是由于物理作用而导致的不同位点不分离的现象,而连锁不平衡则是等位基因间的作用。当两个基因位点紧密连锁时,那么就会导致 LD 值处在比较高的水平。关联分析是基于 LD 的,对 LD 结构的了解是关联分析的前提。因此影响 LD 的因素同样影响关联分析的结果,这些因素有选择、突变、重组、遗传漂变、群体混合等。选择、遗传漂变和群体混合会使 LD 程度增加,从而使关联分析的精确性降低;而突变和重组由于多态性位点的产生而破坏 LD 状态,因此突变和重组是影响 LD 的两个最主要的因素。标记类型也是 LD 的一个影响因素,Remington 等用 SSR 标记和 SNPs 对来自全世界的 102 份常用玉米育种自交系全基因组标记的 LD 大小进行了研究。研究表明 SSR 标记检测的 LD 水平明显偏高,这说明在反应群体演化中 SSR 标记更有说服力(Remington,2001)。另外,授粉方式也是影响 LD 的因素。一般而言,异花授粉重组率高于自花授粉,其 LD 水平相较于自花授粉作物要低,所以,异花授粉作物做关联分析效果要好于自花授粉作物。

#### 1.4.2 关联分析的应用

很多农艺性状都属于数量性状,例如株高、产量、营养品质和抗病性等,了解这些数量性状的遗传规律对作物的改良有重要意义。目前,人们主要是通过全基因组图谱和 QTL 定位来了解植物数量性状,而关联分析是 QTL 定位的有效手段,在分子育种中发挥了重要作用。近年来,新一代分子标记--SNPs 标记技术的出现,以及植物基因组测序技术日趋成熟,植物遗传学研究已经进入基因组研究时代。如今,许多重要作物中都已经应用到关联分析技术,不仅包括模式植物、三大粮食作物,还在甘蔗、大豆、马铃薯、甜菜、番茄和向日葵等其他植物得到大量的应用。关联分析常用的研究方法有两种:全基因组扫描和候选基因途径。全基因组扫描是在标记水平上对一些突变位点进行扫描,这些突变位点可能造成表型变异。而候选基因途径则是通过统计分析,将那些与目标性状相关的等位基因从种质资源中挖掘出来,这是在基因序列水平上进行的。进行关联分析,群体结构是关键。一个群体中存在较多的亚群,可能会增加 LD 水平,会导致性状和不相干基因座之间出现假关联,造成定位错误(Flint - Garcia,2005)。为了解决这一问题,提前对群体结构进行调整是必要的,选择一些与目的基因不连锁的标记进行检测,对存在的假连锁予以矫正。

### 1.4.3 基于 SNP 的关联分析在植物中的应用

SNP 标记作为第三代标记类型, 它比 RFLP、SSR 标记等更有优势, 是目前所有标记类型中精确度最高的。除了前述中所说的应用外, SNP 标记在群体遗传中进行关联分析才是最具吸引力的。现今, 越来越多的 SNP 标记的开发, 基于 SNP 标记的关联分析已经成为了研究植物数量性状的一种重要手段。姚玉莹对水稻做全基因组关联分析, 发现在检测到的 48 个 SNPs 中有 6 个水稻种质资源农艺性状显著相关(姚玉莹,2014)。Belo 等通过采用全基因组扫描的方法, 对 553 份优良自交系的 8950 个 SNP 位点与油酸性状进行关联分析表明一个油酸去饱和酶基因 *fad2* 与油酸含量相关联, 鉴定出了与油酸含量相关的主效位点 (Belo,2008)。任凤阳用玉米 10 条染色体上的 35171 个 SNP 标记对 172 份玉米自交系在干旱胁迫条件下的相对发芽率、相对活力指数以及综合指标进行关联分析, 发现与 3 个指标相关联的标记有 114 个, 其中 20 个 SNP 标记与相对发芽率关联、53 个 SNP 标记与相对活力指数关联、41 个 SNP 标记与综合指标关联(任凤阳,2014)。Andersen 等对玉米开花期相关基因 Dwarf8 进行关联分析验证, 发现有 6 个 SNP 与开花期相关(Andersen,2005)。Bao 等选取 30 个糊化温度差异较大的水稻品种测定淀粉合成酶基因 SSIIa 序列, 通过分析发现, SNP 变异位点 (GC/TT) 与糊化温度呈现显著相关 (Bao,2006)。Cheng 等以大豆异黄酮合成酶 IFS1 和 IFS2 以及黄烷酮 3-羟化酶基因 F3H 为候选基因与大豆花叶病 (soybean mosaic virus,SMV) 关联分析, 发现 IFS1 中 SNP 单倍型与 SMV 菌株 SC-3 抗性极显著相关(Cheng,2010)。

在植物遗传研究中, 各种类型的分子标记不断被发现, 特别是 SNP 高密度图谱构建, 对目标 QTL 的定位越来越精细。目前, 基于 SNP 的关联分析已经得到了十分广泛的应用, 通过关联分析可以找到与性状相关的位点, 实现标记的精确定位, 也能够对候选基因进行多态性分析, 验证候选基因功能。利用连锁分析作图, 一般其 QTL 位点目的基因之间的图距都比较大, 利用关联分析鉴定标记则可以达到单基因水平, 使精度大幅度提升, 在 MAS(molecular assisted selection)中可极大地提高选择的的目的性和准确性, 进而提高育种效率。通过关联分析对大量等位基因分析, 不但有助于了解不同基因变异对基因功能的影响, 同时还可以通过基因变异发现最适合的等位基因, 为作物数量性状的遗传改良提供新的手段。

## 1.5 本研究的目的是与意义

小麦是我国主要粮食作物之一, 淀粉是影响小麦产量的主要因素。SSIIa、SBEIIa 和 SBEIIb 是小麦淀粉合成过程中的三个关键酶基因, 研究其基因多态性对淀粉合成的影响, 有助于了解造成淀粉含量差异的分子机理, 对小麦的遗传改良有重要意义。

植物中 SNP 研究虽起步较晚, 但是发展迅速, 取得了一系列研究成果, 在遗传标记、生物进化分析和辅助育种上体现出很大的应用价值。本研究以淀粉含量不同的小麦自然群体为材料, 通过对以上三个基因 DNA 序列上差异位点的发掘, 利用关联分析方法研究单核苷酸变异对淀粉合成的影响, 期望从分子水平上解释造成淀粉含量差异的原因, 并以此开发出 SNP 标记用于小麦分子标记辅助育种。

## 第二章 材料与方法

### 2.1 试验材料、试剂及仪器

#### 2.1.1 试验材料

本研究实验材料由石河子大学麦类作物研究所提供,选取了 162 份来源广泛的小麦品种(系)自然群体为材料(材料名称及来源见附表 1),2014 至 2015 年种植于石河子大学农学院试验站,成熟收获后测定籽粒中直、支链淀粉含量,以两年平均值做为该性状测定值与 SNP 进行关联分析。从供试材料中选择出直、支链淀粉差异较大的 12 份材料作为基因序列分析试验材料(表 2.1),该实验材料种植于石河子大学绿洲生态重点实验室人工气候室内。供试材料于三叶期提取植物基因组 DNA,于花后 15d 天提取 RNA。

表 2.1. 不同小麦品种(系)名称及淀粉含量

Tab. 2.1 Names of common wheat varieties and grain starch contents in these varieties

编号 No.	材料名称 Material Name	来源 Origin	直链淀粉含量 (%) Amylose content	支链淀粉含量 (%) Amylopectin content
1	波塔姆 Botamu	墨西哥 Mexico	19.64	55.38
2	宁春 4 号 Ningchun 4	中国宁夏 Ningxia, China	16.74	78.75
3	武春 3 号 Wuchun 3	中国甘肃 Gansu, China	15.06	84.96
4	新春 12 号 Xinchun 12	中国新疆 Xinjiang, China	16.26	63.59
5	新春 19 号 Xinchun 19	中国新疆 Xinjiang, China	16.74	74.29
6	新春 31 号 Xinchun 31	中国新疆 Xinjiang, China	22.05	71.78
7	SD06-5	中国新疆 Xinjiang, China	20.03	71.54
8	野猫 Yemao	加拿大 Canada	16.35	62.68
9	D68-20	中国甘肃 Gansu, China	14.42	60.36
10	M150	墨西哥 Mexico	16.31	78.32
11	M190	墨西哥 Mexico	17.83	79.22
12	安农 90202 Annong 90202	中国安徽 Anhui, China	17.26	79.04

### 2.1.2 试验试剂

大肠杆菌 Top10 由石河子大学绿洲生态农业重点实验室 411 室保存。RNA 提取试剂 RNAiso Plus (Code No: 9108) 和 Fruit-mate™ for RNA purification (Code No: 9192)、LA Taq®with GC Buffer (Code No: RR02AG)、Marker 2000、Marker 1.5K、氨苄青霉素 (AMP)、内切酶和 Quant cDNA 第一链合成试剂盒自 TAKARA 公司购买; 麦康凯培养基自北京奥博星生物技术有限责任公司购买; DNA 提取试剂、DNA 凝胶回收试剂盒自天根生化科技(北京)有限公司购买; 质粒提取试剂盒自北京康为世纪生物科技有限公司购买; pEASY-T1 自全式金公司购买; 序列测序及引物合成由北京华大科技公司完成; 直/支链淀粉标准品自 Sigma 公司购买; 树脂购自 Sequenom 公司。

### 2.1.3 试验仪器

离心机 (Eppendorf Centrifuge 5424 和 5810R); PCR 仪 (Peltier Thermal Cycler 200); 水浴锅 (DK-8D 型, 上海精宏); 快速混匀器 (SK-1, 江苏正基); 精密天平 (Sartorius BS210S, 德国赛多利斯); DNA 浓度检测仪 (NanoDrop 1000, 美国); PH 仪 (Sartorius Professional Meter PP-20); 恒温培养箱 (DNP-9162, 上海精宏); 超低温冰箱 (MDF-U53V, 日本三洋); 722G 可见光分光光度计 (上海精科); 粉碎磨 (上海嘉定); UV-2601 双光束紫外可见分光光度计 (杭州建德); T-1 thermocycler 384 孔 PCR 仪 (Biometra 公司); PCR-384-C 反应板 (AxyGEN 公司); Massarray SNP 时间飞行质谱仪 (Sequenom 公司)。

## 2.2 实验方法

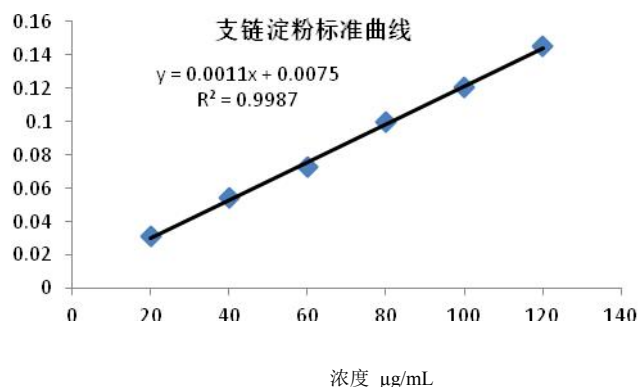
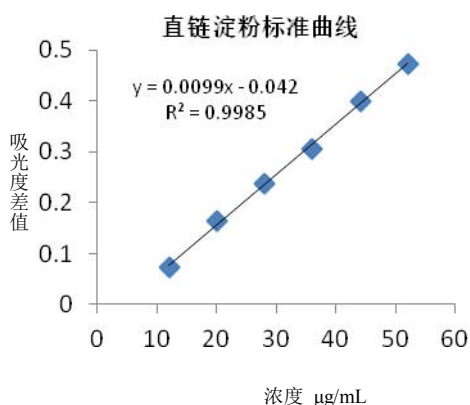
### 2.2.1 小麦籽粒直、支链淀粉含量的测定

小麦籽粒经粉碎磨粉碎, 过 100 目筛, 直链淀粉测定方法参照汪连爱(1999)方法并稍作改进进行测定, 支链淀粉测定参照金玉红(2009)方法测定, 重复三次测定。

式中:  $W_1$  为直链淀粉含量%;  $W_2$  为支链淀粉含量%;  $A_{600nm}$ 、 $A_{441nm}$  为直链淀粉测定和参比波长吸光度值;  $A_{540nm}$ 、 $A_{707nm}$  为支链淀粉测定和参比波长吸光度值;  $X$  为含水量 g/g; 10 为单位换算系数;  $M$  为淀粉质量, 其它几个数字为标准曲线系数。

$$W_1 = \frac{(A_{600nm} - A_{441nm}) + 0.042}{0.0099 \times M \times (1 - X) \times 10}$$

$$W_2 = \frac{(A_{540nm} - A_{707nm}) - 0.0075}{0.0011 \times M \times (1 - X) \times 10}$$



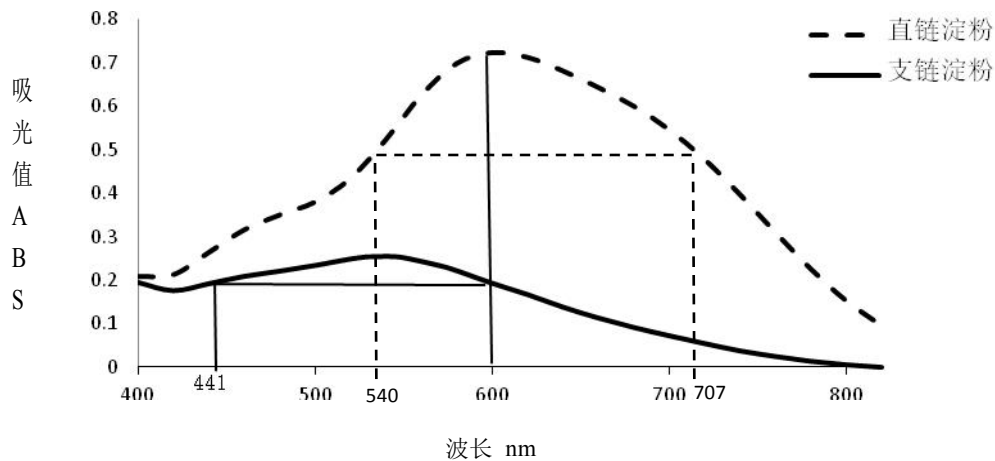


图 2.1 直/支链淀粉标准曲线扫描图

Fig 2.1 Standard curve scans of amylose/ amylopectin

利用 SPSS 软件的聚类分析结果，可分为高中低 3 组，用于 SNP 的相关性分析。

### 2.2.2 小麦基因组 DNA 的提取

取每份材料种子 10 粒，室内种植至三叶期，黄化处理后取幼嫩叶片 200mg，CTAB 法提取基因组 DNA，步骤为：

第一步：配制 CTAB 缓冲液

Tris 1.21g，加 EDTA 0.73g，调节 PH 至 8.0，加入 CTAB 2g，NaCl 8.18g，β巯基乙醇 0.4ml，加水定容至 100ml。

第二步：提取 DNA

a) 叶片放入研钵中液氮冷激，迅速研磨后收集到 2ml 离心管中；

b) 加入预热（60℃）的 CTAB 450μL, 60℃ 水浴 30min；

c) 加入氯仿：异戊醇（24:1），振荡混匀；

d) 4℃ 4000rpm 离心 10min，取上清液至新的离心管；

e) 加入 2/3 体积的异丙醇，混匀后 -20℃ 过夜保存；

f) 4000rpm 离心 10min，去上清，加入 500μL 70% 乙醇清洗，4000rpm 离心 5min，重复一次；

g) 自然风干或置于超净工作台上风干；

h) 加入 50μL 1×TE 重悬，加入 50μg/mL 的 Rnase 消解 RNA；

第三步：DNA 质量检测

分光光度计检测提取 DNA 的浓度和纯度，核酸检测仪（NanoDrop 1000, 美国）测定 DNA 浓度，1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 提取质量，-80℃ 保存备用。

### 2.2.3 小麦籽粒 RNA 提取及 cDNA 合成

取花后 15d 的同一日开花的小麦籽粒（3-5 穗），液氮冷激后 -80℃ 冷冻保存备用。

取 3 粒籽粒，去除颖壳和胚后液氮冷激研磨，按照 RNA 提取说明书提取总 RNA，1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测合格后用于 cDNA 第一链的合成。

参照 TAKARA 反转录试剂盒，利用内参 *Actin* 检测反转录 cDNA 质量。*Actin* 基因引物：F-CGGGACCTCACGGATAATCTAAT; R-CCTCCACTGAGAACAACATTACC。反应体系为（10 $\mu$ L）：

cDNA：0.5 $\mu$ L；*Actin* 引物（10mmol/L）：各 0.5 $\mu$ L；ddH<sub>2</sub>O:3.5 $\mu$ L;ES Taq MasterMix:5 $\mu$ L。

扩增程序为：

94 $^{\circ}$ C 预变性 2min	}	29 Cycle
94 $^{\circ}$ C 变性 30s		
55 $^{\circ}$ C 退火 30s		
72 $^{\circ}$ C 延伸 30s		
72 $^{\circ}$ C 终延伸 3min		

## 2.2.4 目的基因克隆

### (1) *SSIIa* 基因片段克隆

根据 GenBank 中已发布的 *SSIIa* 基因 cDNA 序列（AF155217.2），利用 Primer5.0 软件设计分段扩增引物（表 2.2），扩增长度为 1000bp 和 1800bp。PCR 反应体系（10 $\mu$ L）：La Taq 酶 0.1 $\mu$ L；Buffer II 5 $\mu$ L；dNTP 1.6 $\mu$ L；cDNA 1 $\mu$ L；上、下引物各 0.5 $\mu$ L；ddH<sub>2</sub>O 1.3 $\mu$ L。PCR 反应条件为：94 $^{\circ}$ C 预变性 3min；94 $^{\circ}$ C 变性 30s；58 $^{\circ}$ C 退火 30s；72 $^{\circ}$ C 延伸 2min，35 个循环，最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。

表 2.2 *SS IIa* 基因片段扩增引物

Table 2.2 PCR amplification primer of *SS IIa* genes partial sequence

引物 primer	引物序列 sequence	退火温度 Tm ( $^{\circ}$ C)
F1 (上游)	CCGCGCATCGTACCATC	
R1 (下游)	AACAGCCCAGCCATCATCC	58
F2 (上游)	AAGGATGATGGCTGGGCT	
R2 (下游)	ATAACGCATACAACATAGCAAAC	58

### (2) *SBEIIa* 和 *SBEIIb* 片段克隆

*SBEIIa* 和 *SBEIIb* 基因由本室师兄王昊龙克隆获得(2015)。

## 2.2.5 扩增片段电泳检测及回收

配制浓度为 1.2% 的琼脂糖凝胶和浓度为 1% 的 1 $\times$ TAE 电泳缓冲液，PCR 产物中加入 3 $\mu$ L 10 $\times$ loading buffer，电压 120V，电泳 12min 后在凝胶成像系统下观察结果。对扩增效果较好的产物片段用凝胶回收试剂盒回收，电泳检测回收结果。

## 2.2.6 目的片段与 pEASY-T 载体的连接转化

取 PCR 产物 4 $\mu$ L，pEASY-T1 克隆载体 1 $\mu$ L 于微型离心管中，轻弹混匀后置于 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱孵育 10min。反应结束后，离心管置于冰上。

转化：

- a)将全部连接产物加入 50 $\mu$ L Top10 感受态中，轻弹混匀，冰浴 30min；
- b)42 $^{\circ}$ C 热激 30s 后立即置于冰上 2min；
- c)向离心管中加入 500 $\mu$ L LB 液体培养基，200r，37 $^{\circ}$ C 孵育 1h；
- d)短暂离心，弃上清液，反复吹打沉淀几次，吸取全部沉淀物均匀的涂布在麦康凯培养基平板上，37 $^{\circ}$ C 倒置过夜培养；
- e)挑取白色单菌落，接种至 5ml LB 液体培养基中（已添加 0.1mg/ml AMP），37 $^{\circ}$ C 过夜振荡培养；
- f)吸取 500 $\mu$ L 菌液和 500 $\mu$ L 50%甘油于 1.5ml 离心管中，-80 $^{\circ}$ C 保存。剩余菌液用于质粒提取。

### 2.2.7 质粒 DNA 提取

溶液 I：50mmol/L 葡萄糖，25 mmol/L Tris.Cl (PH8.0), 10 mmol/L EDTA (PH8.0)，分装成每瓶 100mL，高压蒸汽灭菌 16min，4 $^{\circ}$ C 冰箱保存。

溶液 II: 0.4mol/L NaOH, 2% SDS（需现配现用）。

溶液 III: 5mol/L KAc 60mL，冰醋酸 11.5mL，H<sub>2</sub>O 28.5mL，定容至 100mL，灭菌备用。

提取步骤：

- a)取 1.5mL 菌液于 1.5mL eppendorf 管中，4 $^{\circ}$ C 12000r 离心 2min（此步骤可以重复进行，以获取较多的菌体）；
- b)弃上清，用移液枪将离心管中剩余液体吸干，稍微放置数分钟；
- c)加入 200 $\mu$ L 溶液 I，移液枪反复吹打几次（或剧烈振荡），室温放置 5min；
- d)加入现配的溶液 II 400 $\mu$ L，迅速将 eppendorf 管上下颠倒数次（注意不要振荡）；
- e)加入 4 $^{\circ}$ C 预冷的溶液 III 300 $\mu$ L，轻轻振荡数秒，使白色沉淀均匀分布，冰浴 5min，4 $^{\circ}$ C 12000r 离心 5min；
- f)吸取上清液到新的离心管中，加入等体积氯仿/异戊醇（24:1），颠倒混匀，4 $^{\circ}$ C 12000r 离心 5min；
- g)吸取上层液体至新的离心管中，加入 2 倍体积无水乙醇，-20 $^{\circ}$ C 冰箱静置 10min；
- h)4 $^{\circ}$ C 12000r 离心 10min，弃上清并加入 70%乙醇洗涤沉淀，4 $^{\circ}$ C 12000r 离心 5min，重复一次；
- i)弃上清，真空干燥，加入 50 $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O（内含 40 $\mu$ g/mL RNase A），-20 $^{\circ}$ C 保存。

### 2.2.8 阳性重组子筛选及酶切验证

#### (1) 重组子 PCR 鉴定

PCR 扩增体系为（10 $\mu$ L）：Es Taq 酶:5  $\mu$ L；质粒模板:1  $\mu$ L；M13F/R 引物各 1  $\mu$ L；ddH<sub>2</sub>O:2  $\mu$ L。反应程序为：94 $^{\circ}$ C 预变性 3min；94 $^{\circ}$ C 变性 40s；55 $^{\circ}$ C 退火 30s；72 $^{\circ}$ C 延伸 1min；共 30 个循环；终延伸 5min。PCR 扩增产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测，检测到正确扩增片段的质粒做酶切验证。

#### (2) 质粒酶切验证

根据扩增序列及载体选择合适的酶切位点,选择限制性内切酶做酶切验证(表 2.3)。反应体系为(10 $\mu$ L):内切酶 0.5  $\mu$ L; Buffer 1  $\mu$ L; 质粒 2.5  $\mu$ L; ddH<sub>2</sub>O 6  $\mu$ L。反应条件为:30 $^{\circ}$ C/37 $^{\circ}$ C酶切 1h,加入 2 $\mu$ L 10 $\times$ loading buffer 终止反应。酶切产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测,酶切正确的质粒送北京华大科技公司测序。

表 2.3 内切酶

Table 2.3 Incision enzyme

重组质粒 recombinant plasmid	内切酶 incision enzyme	10 $\times$ buffer	反应温度( $^{\circ}$ C) reaction temperature
T1-SS II a 上	BamH I	K	30
T1-SS II a 下	Sac I	L	37
T1-SBE II a 上	BamH I	K	30
T1-SBE II a 下	Sac I	L	37
T1-SBE II b 上	Sac I	L	37
T1-SBE II b 下	BamH I	K	30

### 2.2.9 生物信息学分析

序列测序完成后,经 DNAMAN 软件拼接序列,提交到 GenBank 进行 BLAST 比对(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)。

Clustal X2 软件对不同序列进行比对分析,发掘不同序列间的差异位点。

DNAMAN 软件将其核苷酸序列翻译成氨基酸序列,利用 Protparam (<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>)计算蛋白质的相对分子量、等电点、稳定性和亲水性等;利用 Tmpred([http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html))分析蛋白结构的跨膜区;利用 NCBI Conserved Domains (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/structure/cdd/wrpsb.cgi>)和 InterPro (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/scan.html>)在线网站对 *SS IIa*、*SBE IIa* 和 *SBE IIb* 基因蛋白结构域预测。

BioEdit 软件和 MEGA5.1 处理序列后,由 PAUP 软件建树,观察各品种(系)的亲缘进化关系。

SNP 检测结果采用 Epi Data 3.02 软件录入数据并检错,Hardy-Weinberg 平衡确认样本群体代表性。利用 SPSS17.0 软件计算等位基因频率, $\chi^2$  检验进行组间比较,组间变量采用 t 检验。直接计数法记录等位基因。

### 2.2.10 特异 PCR 引物设计

利用 MassArray SNP 检测平台 Mysequenom 网站 SNP 引物设计软件 AssayDesigner3.0 设计特异 PCR 扩增引物,结合飞行时间质谱法检测 SNP(附表 2)。其原理是:在 SNP 位点左右各 100bp 范围内设计 2 条扩增引物 PF 和 PR,通过先期扩增扩大模板浓度,反应结束后用碱性磷酸酶(shrimp alkaline phosphatase,SAP)处理,除去游离的 dNTPs,再用第三条引物 Extend Primer 进行单碱基延伸反应,在反应板对应的孔内加入 16 $\mu$ L H<sub>2</sub>O 和 6mg Clean Resin 树脂,低速旋转混合 15min 以上,3500rpm

离心 10min，进行质谱检测。如图 2.2。

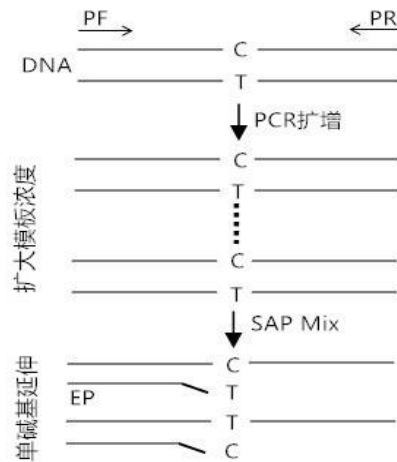


图 2.2 SNP 检测示意图

Fig 2.2 SNP testing process

步骤:

a) PCR

PCR 反应体系 (5 $\mu$ L): Water: 1.8 $\mu$ L; 10 $\times$ PCR Buffer: 0.5 $\mu$ L; 25mM MgCl<sub>2</sub>: 0.4 $\mu$ L; 25mM dNTP Mix: 0.1 $\mu$ L; 0.5 $\mu$ M primer Mix: 1 $\mu$ L; 5U/ $\mu$ L PCR Enzyme: 0.2 $\mu$ L; 模板 DNA: 1 $\mu$ L。反应条件为:

94 $^{\circ}$ C 预变性 4min	} 45 Cycle
94 $^{\circ}$ C 变性 20s	
56 $^{\circ}$ C 退火 30s	
72 $^{\circ}$ C 延伸 1min	
72 $^{\circ}$ C 终延伸 3min	

b) SAP

SAP 体系为 (2 $\mu$ L): Water: 1.53 $\mu$ L; 10 $\times$ SAP Buff: 0.17 $\mu$ L; SAP Enzyme(1.7U/ $\mu$ L): 0.3 $\mu$ L。反应条件为: 37 $^{\circ}$ C (40min); 85 $^{\circ}$ C (5min)。

c) EXTEND

EXTEND 反应体系为(2 $\mu$ L): Water: 0.619 $\mu$ L; 10 $\times$ buffer plus: 0.2 $\mu$ L; iplex terminator: 0.2 $\mu$ L; 10 $\mu$ M Primer Mix: 0.94 $\mu$ L; iplex Enzyme: 0.041。反应条件为:

94 $^{\circ}$ C	30s	} 40 Cycle
94 $^{\circ}$ C	5s	
52 $^{\circ}$ C	5s	
80 $^{\circ}$ C	5s	
72 $^{\circ}$ C	3min	

#### d) Sample Cleanup

每个反应孔中加入 16 $\mu$ L H<sub>2</sub>O，轻轻上下震荡几次；然后每个反应孔中加入 6mg 树脂，低速翻转 15min 以上，3500rpm 竖直离心 10min，小心取出后放入质谱仪分析。

#### e) SNP 检测

第一步：实验相关信息录入

在质谱仪电脑记录数据库中录入相关实验信息，如：反应板对应引物反应详细表单、样本编号等，详细见 Sequenom 公司《Ipelex Application Guide》指导说明书。

第二步：芯片上机点样

使用 MassARRAY Nanodispenser 从 384 孔板反应液中点取纯化产物转入 SpectroCHIP(Sequenom)芯片上。详细操作参见 Sequenom 公司《Massarray Nanodispenser RS1000 User's Guide》说明书。操作前应注意：

- 核对芯片日期，必须在保质期内使用；
- 点样前先进行点样容量测试 (volume check)，保证点样量在 10nL 左右；
- 切勿用手直接接触芯片点样点，拿取时用镊子夹取。

第三步：质谱仪检测

检测方法原理及结果分析参见 Sequenom 公司《Typer v4.0 User's Guide》。最后用 TYPER4.0 软件分型并输出结果。

#### 2.2.11 统计学分析

采用 SPSS17.0 统计学软件对数据进行统计学处理。Hardy-Weinberg 平衡确认样本群体代表性。计量资料用均数 $\pm$ 标准差 ( $\bar{X}\pm S$ ) 表示，组间采取 t 检验。计量资料之间有无相关采取相关分析。由基因型频率计算等位基因频率，组间等位基因频率和基因频率比较采用 $\chi^2$  检验。

## 第三章 结果与分析

### 3.1 小麦籽粒淀粉含量及差异分析

实验群体材料直支链淀粉含量的测定采用双光束紫外可见光分光光度法，测定统计结果见表 3.1。从表中可以看出，162 份春小麦品种（系）直链淀粉含量变幅为 12.87-25.12%，均值为 18.26%，变异系数为 11；支链淀粉含量变幅为 47-91.07%，均值为 73.48%，变异系数为 16。群体直支链淀粉含量变幅较大，差异明显，均有丰富的多样性。通过 SPSS17.0 做聚类分析（聚类图略），结果表明，实验材料可划分为高中低三组。在同一分组中，包含来自不同地区的材料，同时，来自同一个地区的材料也被分在不同的组中，说明群体材料分布广泛，选择合理。

表 3.1 群体材料淀粉含量差异分析

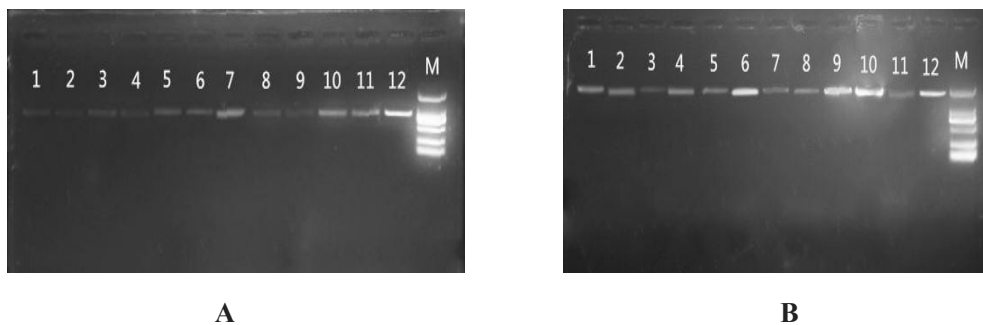
性状	最大值	最小值	平均值	标准差	变异系数(%)
直链淀粉	25.12	12.87	18.26	1.97	11
支链淀粉	91.07	47	73.48	11.62	16

### 3.2 淀粉合成关键酶基因克隆及生物信息学分析

#### 3.2.1 *SS IIa* 基因克隆及序列结构分析

##### 3.2.1.1 *SS IIa* 基因克隆

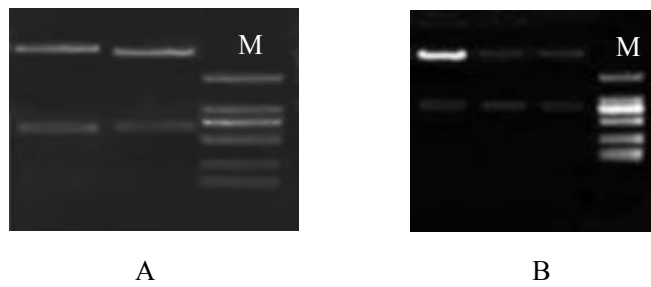
利用设计好的引物对 *SS IIa* 基因进行 PCR 扩增，扩增片段大小分别为 1000bp 和 1800bp，并用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测，结果表明，12 份材料均得到相应的目的片段（图 3.1）。切胶回收后，与克隆载体 pEASY-T1 连接转化大肠杆菌 Top10，提取阳性克隆并进行酶切验证。酶切结果表明，酶切片段与预期结果一致（图 3.2）。测序结果对照峰图检查，排除测序错误，通过 DNAMAN 软件拼接后与 NCBI GenBank 中公布的 *SS IIa* 基因（AF155217.2）cDNA 序列做 BLAST 比对，所有材料的 *SS IIa* 基因相似性均在 98% 以上，说明成功克隆到 *SS IIa* 基因。



M: DNA ladder 2000; 1-12 为品种编号; A: *SS IIa* 基因上半段扩增结果 (1000bp); B: *SS IIa* 基因下半段扩增结果 (1800bp);

图 3.1 *SS IIa* 基因扩增产物

Fig3.1 PCR products of *SS IIa*



M: DNA ladder 2000; A: T1-SS II a 上半段重组质粒酶切结果 (650bp); B: T1-SS II a 下半段重组质粒酶切结果 (900bp);

图 3.2 重组质粒酶切电泳图

Fig3.2 The digestion of the recombinant plasmids

NCBI 查找小麦 *SS IIa* 基因 DNA 序列全长 7252 bp, 包含 7 个内含子 (intron) 和 8 个外显子 (exon) 及 5'端和 3'端非编码区, 从 247 bp 开始为 cDNA 编码, 到 6898 bp 位点编码终止, 编码 799 aa; *SBE IIb* 基因全长 14896 bp, 包含 16 个外显子 (exon) 和 15 个内含子 (intron) 及两端非编码序列, 从 1371 bp 开始编码, 到 11175 bp 位点终止, 编码基因全长 2511 bp, 编码 836 aa; *SBE IIa* 基因 DNA 序列全长 10219 bp, 包含 22 个外显子 (exon) 和 21 个内含子 (intron) 及两端非编码区, 从 78bp 开始至 9970 bp 终止编码, 共编码 cDNA 长度 2472 bp, 编码 823 aa (图 3.3)

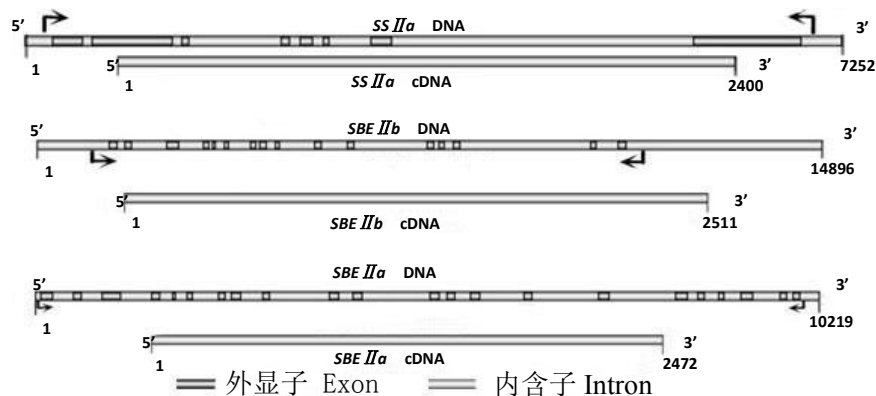


图 3.3 小麦 *SS IIa*、*SBE IIa* 和 *SBE IIb* 基因结构示意图

Fig 3.3 Schematic representations of wheat *SS IIa*、*SBE IIa* and *SBE IIb* genes

注: 图中箭头位置表示本实验引物开始位置

Notes: The arrows indicate the positions of the primers used in this experiment

### 3.2.1.2 *SS IIa* 基因序列分析

本研究克隆得到的 *SS IIa* 基因与 GenBank 中公布的序列相似性达到 98.19%, 氨基酸序列相似度达到 97.6%。比对结果表明, 在供试材料中存在丰富的单核苷酸变异, 其中一些是无义突变, 而且在这些变异中, 多发生的是碱基的转换 (C↔T 和 A↔G), 占变异总数的 60%以上 (表 3.2)。对部分材料氨基酸序列分析发现, 其中有 20 个氨基酸位点存在差异 (图 3.4)。这些差异位点为第 31 位点 (Q/P)、第 59 位点 (L/R)、第 67 位点 (G/R)、第 71 位点 (A/D)、第 75 位点 (V/A)、第 81 位点 (L/R)、第 110 位点 (S/A)、

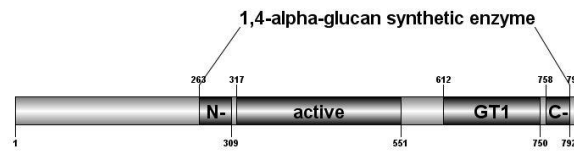
第 127 位点 (M/T)、第 149 位点 (T/A)、第 162 位点 (A/V)、第 182 位点 (A/V)、第 183 位点 (A/V)、第 185 位点 (S/P)、第 207 位点 (T/P)、第 216 位点 (E/S)、第 217 位点 (S/V)、第 226 位点 (T/I)、第 227 位点 (V/D)、第 232 位点 (Q/P) 和第 246 位点 (K/N)。其中, 一些氨基酸的变异导致出现了一些超家族特征基序, 如在第 216 和 226 位点的变化出现酪蛋白激酶 II 磷酸化位点; 在第 59、67 和 127 位点变异导致 N-端十四烷酰化位点出现。而其他位点的变异多表现为极性和非极性之间的转换, 如第 59 位点由亮氨酸转变为精氨酸 (L→R); 第 71 位点由丙氨酸转变为天冬氨酸 (A→D); 第 149 位点由苏氨酸转变为丙氨酸 (T→A)。在以往的研究中证明, 亲水氨基酸和疏水氨基酸的变化可能对基因功能有重要影响, 因此, 这些位点的变化是非常值得重视的。另外, 第 67、71、75 和 81 位点氨基酸的变异则发生在 $\alpha$ -螺旋区域, 而这几个位点中除了第 71 个位点为非极性氨基酸之间的转变外, 其他 3 个位点均为极性和非极性之间的转变, 而这种转变可能会影响 $\alpha$ -螺旋的帽化, 从而影响与其他末端非极性残基的疏水作用。在新春 12 号第 552~634 位点有大片段缺失, 在缺失部分有糖基转移酶位点, 对基因功能的影响需要进一步研究。

表 3.2 部分材料 *SSIIa* 基因片段单核苷酸变异

Tab. 3.2 Variation of single nucleotides in the segment of *SSIIa*

序列名称 Segment name	单核苷酸位点 Sites of nucleotides																																								
	27	48	92	118	164	171	176	202	212	224	242	276	300	323	330	340	360	380	393	426	445	485	545	548	553	619	647	650	657	670	677	680	688	690	696	718	720	738	792		
M150	A	A	A	T	C	G	T	A	C	T	T	A	C	G	C	G	G	T	C	T	A	C	C	C	T	A	A	C	C	T	C	T	C	T	C	G	A	G	T	G	T
SD06-5	A	A	A	T	C	G	T	A	C	T	T	A	C	G	C	G	G	T	C	T	A	C	C	C	T	A	A	C	C	T	C	T	C	T	C	G	A	G	T	G	T
波塔母 Botamu	A	A	A	T	C	G	T	A	C	T	T	A	C	G	C	G	G	T	C	T	A	C	C	C	T	A	A	C	C	T	C	T	C	G	A	G	T	G	T		
新春31号 Xinchun 31	A	A	A	T	C	G	T	A	C	T	T	A	C	G	C	G	G	T	C	T	A	C	C	C	T	A	A	C	C	T	C	T	C	G	A	G	T	G	T		
D68-20	G	C	C	C	G	C	G	G	A	C	G	G	T	C	A	C	A	C	T	C	G	T	T	T	C	T	T	T	C	T	A	T	T	T	A	C	C	C			
新春12号 Xinchun 12	G	C	C	C	G	C	G	A	C	G	G	T	C	A	C	A	C	T	C	G	T	T	T	C	C	T	T	C	T	A	T	T	T	A	C	C	C				
新春19号 Xinchun 19	G	C	C	C	G	C	G	A	C	G	G	T	C	A	C	A	C	T	C	G	T	T	T	C	C	T	T	T	C	T	A	T	T	T	A	C	C	C			
宁春4号 Ningchun 4	G	C	C	C	G	C	G	A	C	G	G	T	C	A	C	A	C	T	C	G	T	T	T	C	C	T	T	T	C	T	A	T	T	T	A	C	C	C			





N-: 氨基 N-末端; active: 催化中心; GT1: 糖基转移酶; C-: 羧基 C-末端  
 N-: N-terminal early set; active: The catalytic center; C-: C-terminal all-beta

图 3.5 *SSIIa* 基因结构域预测示意图

Fig 3.5 Conserved domain of protein about *SSIIa*

### 3.2.1.4 *SSIIa* 蛋白质亲/疏水性分析

由于在以往的研究中证明，蛋白质的亲/疏水性的改变对蛋白的功能有较大影响，本试验中氨基酸的改变多发生极性与非极性之间的转变，对蛋白质的亲/疏水性有较大影响，因此对 *SSIIa* 做蛋白质亲/疏水性分析（图 3.6），可见，在约 20~280 个氨基酸残基之间有一个强亲水区域，而基本所有的氨基酸变异均发生在这个区域，这些变异可能对其理化性质均有较大影响。因此，这些氨基酸差异位点是影响其功能的原因。

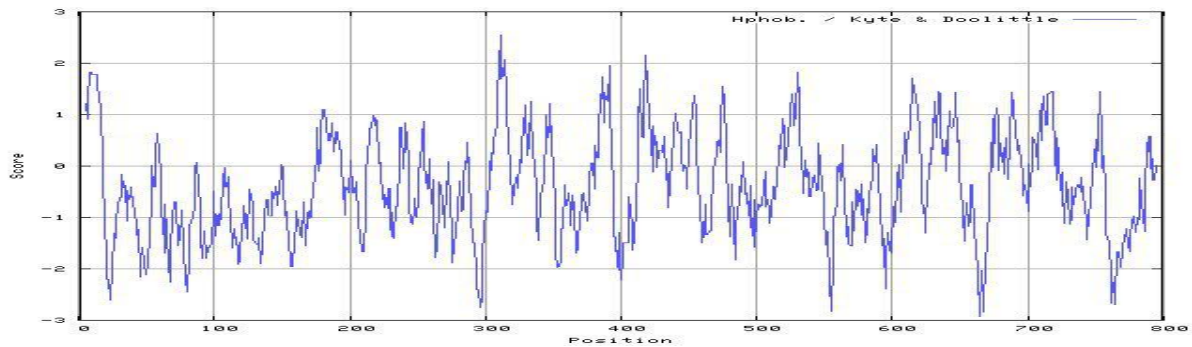


图 3.6 *SSIIa* 蛋白质亲/疏水性分析

Fig.3.6 *SSIIa* protein affinity/hydrophobicity analysis

### 3.2.2 *SBE IIa* 和 *SBE IIb* 基因克隆及序列结构分析

采取分段扩增方法，利用设计的特异扩增引物分别对不同小麦品种（系）*SBE IIa* 和 *SBE IIb* 基因片段进行 PCR 扩增。回收 PCR 产物并与载体连接转化大肠杆菌 Top10，提取质粒并做酶切验证，DNAMAN 软件拼接后进行 BLAST 比对，与 GenBank 中公布的小麦 *SBE IIa* (AF286319.1)、*SBE IIb* (AY740401.1) 相似性均在 98% 以上。序列分析发现，在 *SBE IIa* ORF 序列淀粉催化活性区域和 C-各有一个变异位点；N-序列则有 6 个 SNP 变异。在 *SBE IIb* ORF 序列中， $\alpha$ -淀粉催化酶结构域中有 3 个突变位点；C-结构域中，部分材料有 2 个突变位点。通过生物信息学分析，筛选出可能造成淀粉含量差异的两个 A↔G 突变位点。（引自王昊龙，2015）。

## 3.3 *SS IIa*、*SBE IIa* 和 *SBE IIb* 基因序列多态性及单倍型分析

### 3.3.1 基因序列多态性分析

NCBI/Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) 核苷酸同源比对结果表明 *SS IIa*、

*SBE IIa* 和 *SBE IIb* 与 GenBank 中已登记的序列相似性分别高达 98.19%、98.64% 和 99.04% 以上。3 个基因的多态性分析结果见表 3.3。

表 3.3 基因序列多态性分布

Tab 3.3 Polymorphism of *SS IIa*, *SBE IIa* and *SBE IIb* gene sequences

基因	大小	等位变异数	备注
Gene	size	No.of allele mutation	comments
<i>SS IIa</i>	2400 bp	SNP 38	1 SNP/63bp
		InDel 2	1 InDel/1200bp
<i>SBE IIa</i>	2472 bp	SNP 12	1 SNP/206bp
		InDel 2	1 InDel/1236bp
<i>SBE IIb</i>	2511 bp	SNP 18	1 SNP/139bp



图 3.7 *SS IIa*、*SBE IIa* 和 *SBE IIb* 基因部分序列比对结果

Fig. 3.7 The partial sequence alignment results of *SS IIa*、*SBE IIa* and *SBE IIb*

Notes: A: *SS IIa*; B: *SBE IIa*; C: *SBE IIb*

对 *SS IIa* 基因多态性分析表明，整个编码区共有 40 个碱基位点变化，其中有 2 个 InDel (图 3.7)，SNP 位点主要发生在第 1、第 2 外显子内，在不同的品种中都有碱基变化，但不同位点的变化材料不同。在第 2 外显子区共有 29 个 SNP 位点，在所有的单核苷酸变异中，有 24 个为碱基的转换，其它为颠换，其中 20 个为非同义突变，造成了氨基酸变异。在对 *SBE IIa* 的核苷酸多态性分析中，共有 12 个 SNP 位点和 2 个 InDel，主要发生在第 3、第 15 和第 18 外显子区，在新春 19 号和 M150 的第 45~53bp 和 213~215bp 处分别由 9 bp 和 3 bp 碱基缺失，这些 SNP 位点中有 8 个位点造成了氨基酸序列变异，其他均为同义突变。对 *SBE IIb* 核苷酸多态性分析表明，在发现的 18 个 SNP 位点主要集中在第 3 外显子区，其中共有 12 个非同义突变位点，如第 1986 位点(A→G)使天冬酰胺转变为天冬氨酸，第 2173 位点(A→G)使谷氨酰胺转变为精氨酸，这些非同义变异位点也可能是影响淀粉合成的原因之一。

### 3.3.2 基因编码区核苷酸多态性分析

用 Dnasp5.0 软件 (<http://www.ub.edu/dnasp/>) 分析这 3 个基因的单核苷酸多态性。本研究中 $\pi$ 值的范围从 0.01637 到 0.01884, 平均为 0.01778; Watterson's  $\theta_w$  值的范围是 0.01668 到 0.02523, 平均值为 0.02027 (表 3.4)。上述结果表明所检测的基因具有高度的核苷酸多样性。表 3.3 还反映出各个基因的核苷酸多样性变化不同, 其中 *SBE IIa* 的 $\pi$ 值最大为 0.01884, 而 *SBE IIb* 的 $\pi$ 值最小为 0.01637, 且 $\pi$ 值在非同义部分变化范围较大。3 个基因的单倍型数相同, *SS IIa*、*SBE IIa* 和 *SBE IIb* 均为 3 种, 但是单倍型多样性不一致, 变化范围为 0.53~0.87。单倍型多样性最高的为 *SBE IIb* 基因(0.87), 最低的为 *SS IIa* 基因(0.53)。同义突变多样性( $\pi_{syn}$  为 0.00168)低于非同义突变多样性( $\pi_{nonsyn}$  为 0.00808)。

利用 Dnasp5.0 软件分析 Tajima's D, Fu and Li's F\* 和 Fu and Li's D\*。通过中性检测发现, 只有 *SS IIa* 基因的 Tajima's D 为正值, 其余 2 个基因全为负值。

表 3.4 小麦 3 个淀粉合成关键酶基因的核苷酸多样性的评价

Tab 3.4 Evaluation on nucleotide diversity of *SS IIa*, *SBE IIa* and *SBE IIb* genes in wheat

Gene	$\pi$	$\theta_w$	$\pi_{nonsyn}$	$\pi_{syn}$	$\pi_s$	H	Hd±SD	Tajima's D
<i>SS IIa</i>	0.01812	0.01668	0.00687	0.00164	0.01721	3	0.53±0.045	0.37663
<i>SBE IIa</i>	0.01884	0.02523	0.01001	0.00183	0.02651	3	0.86±0.039	-1.24152
<i>SBE IIb</i>	0.01637	0.01889	0.00736	0.00158	0.01961	3	0.87±0.034	-0.67994
Mean	0.01778	0.02027	0.00808	0.00168	0.02111	3	0.75±0.039	-0.5149

注:  $\pi$ 和 $\theta_w$  为总核苷酸多样性;  $\pi_{nonsyn}$  为非同义突变多样性;  $\pi_{syn}$  为同义突变多样性;  $\pi_s$  为沉默位点多样性; H 单倍型数; Hd 单倍型多样性; SD 标准差

Notes:  $\pi$  and  $\theta_w$ , nucleotide diversity;  $\pi_{nonsyn}$ ,  $\pi_{syn}$  and  $\pi_s$ , nucleotide diversity of non-synonymous, synonymous and silent sites, respectively; H, Number of haplotypes; Hd, haplotype diversity; SD, standard deviation

### 3.3.3 基因序列单倍型分析

为了探究供试的 12 个不同小麦品种 (系) *SS IIa*、*SBE IIa* 和 *SBE IIb* 的进化关系, 利用建树工具采用 Neighbor-joining tree 法对材料做单倍型分析 (图 3.8)。在 12 个供试材料中, 每个基因包含的单倍型数相同, 各单倍型中所包含的材料数不尽相同, 每种单倍型所包含材料的淀粉含量也有所差异。

*SS IIa* 被分为三种单倍型, 第一种单倍型 (I) 包括 3 个品种 (系), 分别为 M150、武春 3 号和安农 90202, 这三个品种均为支链淀粉较高的品种 (系), 同时直链淀粉属于中等偏低类型; 第二种单倍型 (II) 包括新春 12 号、新春 19 号、宁春 4 号、D68-20 和野猫 5 个品种 (系), 与其它两种单倍型距离明显较远, 该类型直链淀粉含量均较低; 单倍型 (III) 中包括 4 个品种 (系): M190、SD06-5、波塔姆和新春 31 号, 除了波塔姆支链淀粉含量较低外, 其它 3 个品种 (系) 支链淀粉含量均较高。*SBE IIa* 也包含三种单倍型, 单倍型 (I) 又分为三种亚单倍型, 在亚单倍型 I<sub>1</sub> 中, 新春 19 号、M150、M190 和安农 90202 聚在一起, 且这 4 个品种 (系) 的支链淀粉含量均较高; 亚单倍型

I<sub>2</sub>中, 新春 12 号、野猫和 D68-20 则相对较近, 也都是支链淀粉含量较低的品种(系)类型, 同时它们的直链淀粉含量也都属于偏低类型。这两种亚单倍型品种在分类中被分在同一个单倍型中。第二种单倍型(II)中, 宁春 4 号和 SD06-5 为支链淀粉含量较高的品种。*SBE IIb* 被分为三种单倍型, 其中第一种单倍型又分为两种亚单倍型。包含在亚单倍型 I<sub>1</sub>中的有波塔姆、安农 90202、新春 31 号和 SD06-5, 除了波塔姆以外, 其它 3 个品种的支链淀粉含量均较高, 它们共同形成一簇; 而在亚单倍型 I<sub>2</sub>中 5 个材料均是直链淀粉含量较低的类型, 它们也被分在同一簇中; 单倍型 II 中, 武春 3 号和 M150 为高支链淀粉含量品种。从单倍型分析结果来看, 单倍型与淀粉含量之间存在较好的对应关系, 初步推测支链淀粉含量相近的材料可能有相似的单核苷酸序列变异。

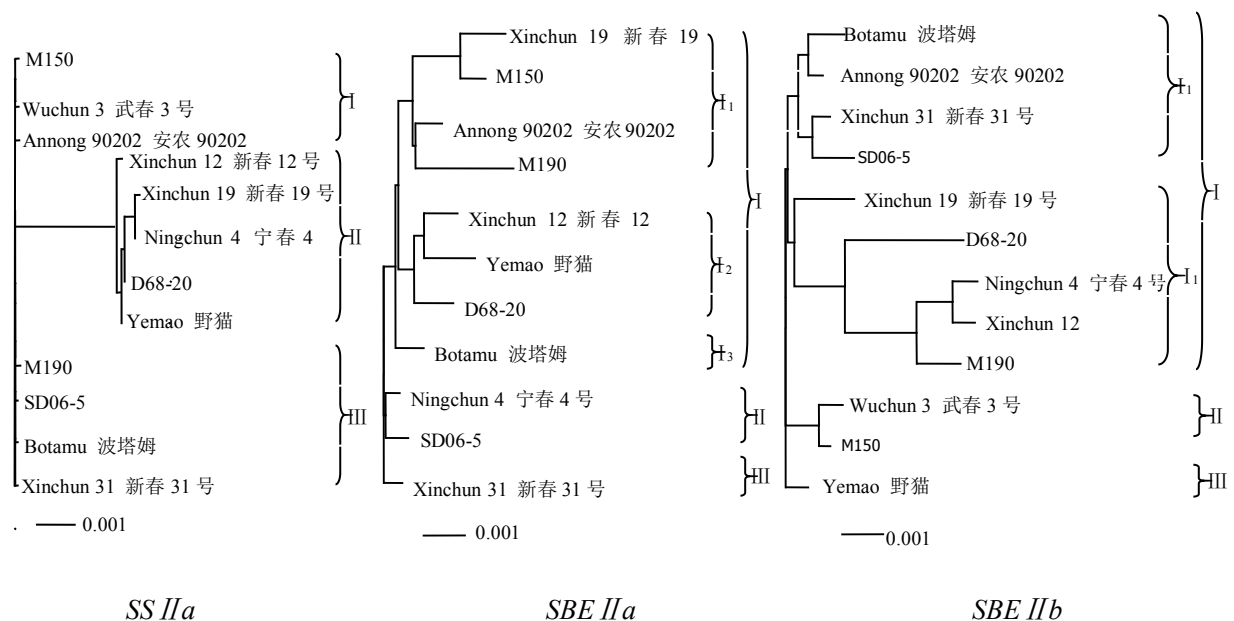


图 3.8 不同品种淀粉合成关键酶基因单倍型关系结构树

Fig.3.8 Haplotype analysis of starch biosynthetic gene originated from difference wheat cultivars

### 3.4 SNP 检测及与淀粉含量的关联分析

通过 SPSS 软件对 SNP 检测结果分析表明, 检测的 90 个 SNP 位点均与直链淀粉含量之间没有明显的相关性; 而 *SS IIa*-rs31 和 *SBE IIa*-rs10 两个位点与支链淀粉之间有显著相关性, 其它位点之间均未表现出明显的相关性。

#### 3.4.1 SNP 分型结果

*SS IIa*-rs31 位点具有 CC、CT 和 TT 三种基因型, *SBE IIa*-rs10 具有 AA、AG 和 GG 三种基因型。这两个位点的分型成功率均在 96% 以上, 符合 Hardy-Weinberg 平衡 ( $\chi^2=0.65$ ,  $P>0.05$ ), 表明这两个位点均已达到遗传平衡, 具有良好的代表性。

#### 3.4.2 基因型和等位基因频率分析

支链淀粉含量高低两组 *SS IIa*-rs31 位点和 *SBE IIa*-rs10 位点基因型分布频率与中等支链淀粉含量比较具有统计学意义 ( $P<0.05$ )。高支链淀粉含量组 *SS IIa*-rs31 和

*SBE IIa*-rs10 等位基因分布频率与中等支链淀粉含量组比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 低支链淀粉含量组 *SS IIa*-rs31 和 *SBE IIa*-rs10 等位基因分布频率与中等支链淀粉含量组比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见表 3.5-3.6。

表 3.5 三组间 *SS IIa*-rs31 位点基因多态性分布Tab 3.5 Among the three groups *ss2a*-rs31 locus gene polymorphism

组别	例数	基因型			P	等位基因		P
		CC	CT	TT		C	T	
高	86	14	62	10	0.024	90	82	0.033
中	24	4	17	3		25	23	
低	52	8	38	6	0.031	54	50	0.045

表 3.6 三组间 *SBE IIa*-rs10 位点基因多态性分布Tab 3.6 Among the three groups *sbe2a*-rs10 locus gene polymorphism

组别	例数	基因型			P	等位基因		P
		AA	AG	GG		A	G	
高	72	13	43	16	0.004	69	75	0.003
中	31	5	22	4		32	30	
低	59	11	35	13	0.035	57	61	0.05

### 3.4.3 *SS IIa*-rs31 位点和 *SBE IIa*-rs10 位点多态性与支链淀粉含量关联分析

表 3.7 *SS IIa*-rs31 位点和 *SBE IIa*-rs10 位点与支链淀粉含量的关联分析Tab 3.7 Association analysis of *ss2a*-rs31 and *sbe2a*-rs10 locus with Amylopectin content

位点	基因型	高	中	低
<i>SS IIa</i> -rs31	CC	87.54±0.07 <sup>b</sup>	70.33±0.07 <sup>c</sup>	60.04±0.08 <sup>c</sup>
	CT	84.80±0.04 <sup>a</sup>	67.41±0.04 <sup>b</sup>	57.13±0.05 <sup>b</sup>
	TT	78.93±0.05 <sup>a</sup>	65.54±0.05 <sup>a</sup>	50.66±0.06 <sup>a</sup>
<i>SBE IIa</i> -rs10	AA	81.32±0.06 <sup>a</sup>	68.47±0.09	55.48±0.08
	AG	88.51±0.04 <sup>a</sup>	71.93±0.06 <sup>b</sup>	61.81±0.05 <sup>b</sup>
	GG	77.77±0.14 <sup>b</sup>	66.26±0.14 <sup>a</sup>	52.37±0.13 <sup>a</sup>

由表 3.7 可知, *SS IIa*-rs31 位点 CT 基因型与 TT 基因型高支链淀粉含量之间差异不显著 ( $P > 0.05$ ), 而在中等支链淀粉和低支链淀粉含量中差异性显著 ( $P < 0.05$ ); CC 基因型个体的支链淀粉含量显著高于 CT 基因型和 TT 基因型。在 *SBE IIa*-rs10 位点 GG 基因型的高支链淀粉含量显著低于 AA 基因型和 AG 基因型 ( $P < 0.05$ ); 而 AG 基因型的中等支链淀粉含量和低支链淀粉含量显著高于 AA 基因型和 GG 基因型。

## 第四章 讨论与结论

单核苷酸多态性是单个核苷酸变异引起的,是所有遗传变异中最为常见的一种。在玉米基因组中每 57 bp 约有 1 个 SNP(Guillet,2004);大豆基因组中每 272 bp 约有 1 个 SNP(Zhu,2003);人类基因组中每 1000 bp 约有 1 个 SNP(Frazer,2007)。目前 SNP 检测大多是基于 DNA 序列的整个基因序列的检测,然而 EST 序列是在生物基因组中表达并体现功能的序列,常常编码功能基因,因此在 EST 中筛选 SNP 可能更具有意义。近年来,很多研究通过 ESTs 序列数据分析后,发现了基因相关的 SNPs。Useche 等(José Useche,2001)对玉米的 EST 序列进行分析,并成功的从 68000 条 EST 序列中发现 2439 个候选的 SNPs 位点以及 822 个插入/缺失多态性位点。Picoult-Newberg 等曾经在来自 19 个不地区的人的 cDNA 文库的 EST 序列中完成了 850 个候选 SNP 位点的发掘(Picoult-Newberg,1999)。FahrenKrug 等将自建猪的 cDNA 文库中 EST 序列和 GenBank 中非冗余数据库确定 SNPs 位点进行比对分析,在 403 个扩增中发现了 1650 候选 SNPs 位点(FahrenKrug,2002)。因此,对基因表达序列分析也是发现 SNP 的有效手段。

### 4.1 影响 SNP 检测的两个因素

#### 4.1.1 实验材料的选取

合适实验材料的选择是寻找主效基因、发掘有效 SNP 位点或者准确的进行基因定位、验证基因功能等的先决条件,因此,选取目标性状分离群体作为实验材料十分必要。本研究旨在发掘造成小麦淀粉含量差异的基因位点,并通过关联分析验证候选 SNP 位点的有效性以及与淀粉含量是否存在显著性相关。因此,本实验选取淀粉含量差异较大的春小麦品种为实验材料,根据 NCBI 已发表的 *SSIIa*、*SbellA* 和 *SbellB* 基因为候选基因,研究在不同春小麦品种上的多态性。

#### 4.1.2 基因组 DNA 的提取

MassArray SNP 检测平台对 DNA 质量的要求很高,是 SNP 检测的关键因素。好的 DNA 样品必须具备两个条件:一是高纯度,二是高分子量。长期保存的样品须在-70℃保存,短期可在-20℃保存,防止 DNA 降解。本实验采取 SDS 碱裂解法提取基因组 DNA,抽提过程中,酚:氯仿:异戊醇抽提 2 次,75%乙醇抽提 3 次,最大可能的去除杂质,提高 DNA 纯度。

### 4.2 SNP 的检测方法

SNP 在基因组 DNA 中广泛存在,且其在群体中的频率不小于 1%。由于 SNP 的广泛性和稳定性特点,且与多种疾病直接相关,因此对 SNP 的研究和检测手段的开发越来越多。本实验采取飞行时间质谱法来测定 SNP 位点,采用的测定方式为:单碱基引物延伸(PinPoint 法),在引物 3'端进行单碱基延伸,根据引入的 dNTP 类型不同形成的质量差异,在电场的作用下飞行到荧光板的时间不同来提高分辨率和准确性。这是目前最快最准确的 SNP 检测平台之一,应用前景广阔。

### 4.3 *SSIIa* 基因序列差异对淀粉含量的影响

*SSIIa* 基因作为淀粉合成关键酶基因, 在不同品种中其 DNA 序列表现出较强的多态性, 而这种多态性的存在很可能是造成不同小麦品种淀粉含量差异的原因所在, 因此, 从基因水平上研究淀粉合成酶已成为近年来的研究热点。本研究利用同源克隆技术克隆 *SSIIa* 基因, 具有完整的开放阅读框, 编码 799 个氨基酸。与其他作物做同源性比对结果发现, *SSIIa* 基因与大麦、二穗短柄草、水稻和玉米的一致性分别为 96%、88%、87% 和 85%。通过对不同小麦品种(系)的 *SSIIa* 基因比对分析发现, 不同淀粉含量品种之间核苷酸差异位点明显, 单核苷酸变异丰富, 多发生的是核苷酸之间的转换 (C↔T 和 A↔G), 占了 60%, 颠换 C↔A (G↔T)、C↔G (G↔C) 和 T↔A (A↔T) 则有 14 个, 这要高于其它研究成果(唐立群,2012)。在玉米的研究中证明, su2 突变体就是 *SSIIa* 基因突变引起的; Craig 对豌豆研究表明 rug5 碱基位点的突变导致 *SSII* 活性降低, 淀粉粒形态异常(Craig,1998)。因此, 这些位点可能是区别不同淀粉含量品种的特殊区域。在对 *SSIIa* 基因各区段核苷酸多态性位点分布情况分析结果发现, 从 27~810 bp 是一个变异富集区, 该区段主要为第 2 外显子区域, 这与朱彩梅等的研究结果一致(朱彩梅,2010)。在一共 40 个单核苷酸的变异中, 共造成 20 个氨基酸位点的改变。一些位点的核苷酸变异, 并未造成氨基酸改变, 属于无义突变, 对蛋白质的结构也未造成影响。通过分析发现, 这些氨基酸的变异多发生在 $\alpha$ -淀粉催化酶的氨基 N-末端外侧, 并未对 $\alpha$ -淀粉催化酶区域的结构没有造成影响, 这与 Hamada 等“淀粉合成酶活性的不同可能是其氨基 N-末端和羧基 C-末端结构域的差异所决定”研究不同(Hamada,2007)。比对 $\alpha$ -淀粉催化酶的功能区域发现, 各品种(系)核苷酸序列高度保守, 并未发生变异。由于多数氨基酸变异发生在极性氨基酸与非极性氨基酸之间, 在对 *SSIIa* 做蛋白质亲/疏水性分析表明, 所有氨基酸变异均发生在强亲水区域, 因此, 这些氨基酸差异位点可能是影响其功能的原因。而且这种变异导致超家族特征基序的出现(如第 216 和 226 位点的变异导致出现酪蛋白激酶 II 磷酸化位点), 改变了氨基酸序列的理化性质(如等电点、亲疏水性等), 这或许也是造成 $\alpha$ -淀粉催化酶催化作用不同的原因。*SSIIa* 基因单核苷酸的变异导致翻译的氨基酸序列发生变化, 如果这种变化发生在功能蛋白质的关键氨基酸位点上, 则可能会致使表型性状发生变异。另外, 在新春 12 号品种中, 其核苷酸序列有 249bp 丢失, 丢失的部位包含了糖基转移酶的部分位点, 但其淀粉含量并未表现出显著性变化, 这说明缺失部分并未对 $\alpha$ -淀粉催化酶的功能造成显著影响。由于淀粉在形成过程中受多基因调控, 并不能排除其他基因的参与, 因此, 这些区域缺失对基因功能的影响需要进一步研究。

### 4.4 *SSIIa*、*SBEIIa* 和 *SBEIIb* 编码区核苷酸多态性

多样性指数 $\pi$ 表示每个核苷酸在基因序列中被随即替换的可能性, 主要是用来反映一个基因的遗传变异程度, 对这 3 个基因编码区核苷酸多样性分析结果表明, *SSIIa*、*SBEIIa* 和 *SBEIIb* 的 $\pi$ 值分别为 0.01812、0.01884 和 0.01637, 这与已报道的玉米、大刍草均有所不同(Ponomarenko,2001), 这也说明 $\pi$ 的变异可能与植物种类有关。 $\pi$ 值可以表

明基因区段所承受的选择压力大小, *SBE IIa* 基因的 $\pi$ 值最大, 说明该基因所承受的选择压力最小。在这 3 个基因的中性检测结果中, Tajima's D 值都没有表现出显著性, 说明这 3 个基因在自然选择中均遵循中性理论。单倍型多样性是指随机抽取 2 个不同单倍型样本的概率, 如果单倍型多样性越高, 说明遗传多样性越高, 遗传资源越丰富。在单倍型分析中, 这 3 个基因分为不同的单倍型, 但不同的单倍型与支链淀粉含量之间有一定的对应关系, 支链淀粉含量较高品种(系)往往被分在同一簇中, 低支链淀粉含量品种(系)也被分在同一类, 说明支链淀粉含量相近的材料可能有相似的单核苷酸序列变异。在本研究中, 同样也存在着大量的同义 SNP(sSNP), 虽然不会造成氨基酸的变异, 但是仍然有着重要的作用。有研究表明, sSNP 会影响外显子的剪切, 如果 sSNP 发生在某个外显子剪切增强子(ESEs)内, 就会影响 mRNA 的剪切过程, 因此, 对本研究中出现的 sSNP 还需要进一步研究。

#### 4.5 SNP 多态性与淀粉含量的相关关系

大量研究表明, 一个或几个位点的基因突变是导致某些基因改变或丧失的原因, 从而影响表型的改变。Umemoto 等在玉米的研究中发现, *SS IIa* 基因中位于 C 末端的两个 SNPs 引起氨基酸变化, 这也可能是影响其酶活性改变的主要原因。Spielmeyer 等在水稻研究中发现, 赤霉素氧化酶(GA20-ox)基因编码区第 798 个碱基发生突变(C→T)使第 266 个氨基酸由亮氨酸转变为丙基丙氨酸, 导致 GA20-ox 功能缺失, 从而使水稻由高秆突变为矮秆(Spielmeyer, 2002)。Bryan 等发现水稻抗稻瘟病基因与感病基因存在 7 个碱基替换, 造成 5 个氨基酸差异, 而其中第 918 个氨基酸的改变是造成功能差异的关键因素(抗病为丙氨酸, 感病为丝氨酸)(Bryan, 2000)。淀粉是小麦籽粒的主要组成部分, 对控制淀粉合成相关酶的研究是目前研究的热门领域, 但是关于 *SS IIa*、*SBE IIa* 和 *Sbe IIb* 基因多态性与淀粉含量的相关关系尚无报道, *SS IIa*-rs31 和 *SBE IIa*-rs10 位于两个基因的上游变异区, 利用高精度/高灵敏度的时间飞行质谱法来进行基因组 SNP 的分析检测, 具有快速、精确和可靠的特点。

在本研究中, 对 90 个候选的 SNP 位点进行筛选验证, 检测结果与直支链淀粉含量做相关性分析, 结果表明, 只有 *SS IIa*-rs31 和 *SBE IIa*-rs10 两个位点与支链淀粉之间存在明显的相关性, 其它位点则没有显著相关性, 无统计学意义; 在所有的检测位点中, 均与直链淀粉之间没有显著的相关性。*SS IIa*-rs31 和 *SBE IIa*-rs10 的基因型频率在高低两组的分布差异具有统计学意义, 而且这两个位点 SNP 的 CT 和 AG 基因型在群体中属于优势基因型, 可能是由于这两个基因型受到较强的人为选择引起的, 这也正与目前品种的遗传改良及杂交育种的趋势相符。但是, 淀粉是受多基因调控的, 单基因的作用可能不足以成为造成淀粉含量差异的主要因素, 均有广泛的环境、品种、地区的差异, 具有较大的遗传异质性。通过关联分析发现, *SS IIa*-rs31 位点 CT 基因型与 TT 基因型在中/低支链淀粉含量中存在显著性差异( $P < 0.05$ ), 在高支链淀粉含量上差异并不显著( $P > 0.05$ ), 而且 CC 基因型个体支链淀粉含量显著高于 CT 基因型和 TT 基因型。*SBE IIa*-rs10 位点 GG 基因型的高支链淀粉含量显著低于 AA 基因型和 AG 基因型( $P <$

0.05); 而在中等支链淀粉含量和低支链淀粉含量中, AG 基因型显著高于 AA 基因型和 GG 基因型。根据以上分析, *SS IIa*-rs31 和 *SBE IIa*-rs10 两个位点突变可能是影响支链淀粉含量差异的主要因素。

#### 4.6 SNP 多态性关联分析总结与展望

SNP 多态性位点的发掘的最终目标是开发出基于 DNA 水平的 SNP 标记, 从而作为一种便捷、稳定的标记类型, 可以在任何遗传背景下快速、准确的鉴定其表型性状。关联分析在功能基因的验证上得到了很好的应用。由于植物的很多性状都属于数量性状, 由多个途径共同控制的, 很难通过转化的方法予以验证。例如著名的“黄金水稻”, 通过把控制类胡萝卜素合成的 4 个基因同时转入水稻, 才获得了能合成类胡萝卜素的黄金水稻。在对目的基因的代谢网络不清楚的情况下, 可以用关联分析技术来验证, 例如 Palaisa 对维生素 A 的两个限速酶基因 Y1 和 PSY2 在黄色玉米(含类胡萝卜素)和白色玉米(不含类胡萝卜素)中进行分析发现, Y1 基因是控制类胡萝卜素的关键基因, PSY2 则可能是假基因(Palaisa,2003)。SNP 多态性关联分析具有巨大的应用价值, 它可以明确目的基因与目标性状之间的内在关系, 还可以鉴定评价多个基因等。通过关联分析对大量等位基因分析, 不但有助于了解不同基因变异对基因功能的影响, 同时还可以通过基因变异发现最适合的等位基因, 为深入了解作物数量性状和数量性状的遗传改良提供一种新的方法。SNP 多态性关联分析技术虽然已有多项成功运用的报导, 但在植物上的应用还是相对较少, 在植物遗传领域具有巨大的应用价值和发展潜力。

#### 4.7 结论

在本研究中, 通过同源克隆, 获得 *SS IIa*、*SBE IIa* 和 *SBE IIb* 基因, 序列分析发现, 这三个基因有着丰富的核苷酸多态性。进行多态性分析, 挖掘出 90 个候选 SNP 位点, 并以淀粉含量不同的小麦品种(系)群体为材料, 通过时间飞行质谱法进行 SNP 验证。然后通过 SPSS 统计分析, 验证不同 SNP 位点与淀粉含量的相关性。结果表明, 所有位点与直链淀粉之间没有显著相关性, 而 *SS IIa*-rs31 和 *SBE IIa*-rs10 位点与支链淀粉含量之间存在显著相关性。以上结果表明, *SS IIa*-rs31 和 *SBE IIa*-rs10 位点与支链淀粉显性相关, 这两个位点可以作为 SNP 标记开发的候选基因位点, 为开展淀粉品质改良分子标记辅助选择育种提供了理论基础和物质基础。

## 参考文献

- [1]符文英, 陈俊. 稻米营养品质研究综述[J]. 海南大学学报: 自然科学版, 1997, 15(1): 67-70.
- [2]顾蕴洁, 王忠, 吴月萍. 小麦胚乳细胞的分离及其淀粉体的计数[J]. 植物生理学通讯, 1994, 30(3): 210-213.
- [3]郝岗平, 吴忠义, 陈茂盛, 等. 拟南芥基因位点的单核苷酸多态性 (SNP) 变化与抗旱表型的相应性[J]. 农业生物技术学报, 2004, 12(2): 122-131.
- [4]金玉红, 张开利, 张兴春, 等. 双波长法测定小麦及小麦芽中直链, 支链淀粉含量[J]. 中国粮油学报, 2009 (1): 137-140.
- [5]刘广田, 李保云, 梁荣奇, 等. 小麦品质遗传改良的目标和方法[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2003: 76.
- [6]任凤阳. 玉米自交系萌发特性的评价及 SNP 关联分析[D]. 山东农业大学, 2014
- [7]宋建民, 李保云, 尤明山, 等. 小麦淀粉粒束缚淀粉合成酶基因多态性的分子鉴定[J]. 遗传学报, 2004, 31(1): 81-86.
- [8]苏治军, 郝转芳, 谢传晓, 等. 玉米 dbf1 基因与耐旱相关性状的关联分析[J]. 植物遗传资源学报, 2010, 11(4): 474-478.
- [9]唐立群, 肖层林, 王伟平. SNP 分子标记的研究及其应用进展[J]. 中国农学通报, 2012, 12: 154-158.
- [10]汪连爱. 双光束双波长分光光度计测定稻米中直链淀粉的方法[J]. 粮食与饲料工业, 1999 (3): 45-46.
- [11]王芳. 淀粉合成相关基因近等基因系的构建及其对稻米蒸煮品质影响的初步研究[D]. 扬州大学, 2007.
- [12]王昊龙, 韩俊杰, 李卫华, 等. 抗性淀粉含量不同的小麦品种 (系) 淀粉分支酶 SBE II a 和 SBE II b 基因多态性分析[J]. 新疆农业科学, 2015, 52(6): 981-987.
- [13]卫波. 小麦抗旱相关基因 TaDREB1 的 SNP 标记开发与定位[D]. 西北农林科技大学, 2006.
- [14]吴玲, 付凤玲, 李晚忱, 等. 利用生物信息学方法进行基于表达序列标签的玉米单核苷酸多态性标记的开发[J]. 核农学报, 2010, 24(5): 968-972.
- [15]熊瑛, 李友军, 郭天财. 小麦淀粉合成相关酶的研究现状[J]. 河南科技大学学报 (农学版), 2004, 24 (2): 6-9.
- [16]姚玉莹. 水稻核心种质抗倒特性及其主要农艺性状的全基因组关联分析[D]. 华中农业大学, 2014.
- [17]张洪映, 毛新国, 景蕊莲等. 小麦 TaPK7 基因的单核苷酸多态性与抗旱性的关系[J]. 作物学报, 2008, 34 (9): 1537-1543.
- [18]朱彩梅, 张京. 大麦糯性相关基因 Wx 单核苷酸多态性分析[J]. 中国农业科学, 2010, 05: 889-898.
- [19]Abel G J W, Springer F, Willmitzer L, *et al.* Cloning and functional analysis of a cDNA encoding a novel 139 kDa starch synthase from potato (*Solanum tuberosum* L.) [J]. *The Plant Journal*, 1996, 10(6): 981-991.
- [20]Ainsworth C, Clark J, Balsdon J. Expression, organisation and structure of the genes encoding the waxy protein (granule-bound starch synthase) in wheat [J]. *Plant Molecular Biology*, 1993, 22(1): 67-82.
- [21]Ainsworth C, Clark J, Balsdon J. Expression, organisation and structure of the genes encoding the waxy protein (granule-bound starch synthase) in wheat [J]. *Plant Molecular Biology*, 1993, 22(1): 67-82.
- [22]Andersen J R, Schrag T, Melchinger A E, *et al.* Validation of Dwarf8 polymorphisms associated with flowering time in elite European inbred lines of maize (*Zea mays* L.) [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2005, 111(2): 206-217.
- [23]Aranzana María José, Kim Sung, Zhao Keyan, *et al.* Genome-wide association mapping in *Arabidopsis* identifies previously known flowering time and pathogen resistance genes [J]. *Plos genetics*, 2005, 1(5):

e60.

[24]Baba T, Nishihara M, Mizuno K, *et al.* Identification, cDNA cloning, and gene expression of soluble starch synthase in rice (*Oryza sativa* L.) immature seeds[J]. *Plant physiology*, 1993, 103(2): 565-573.

[25]Ball S, Guan H P, James M, *et al.* From glycogen to amylopectin:a model for the biogenesis of the starch granule[J].*Cell*,1996,86(3):349-352.

[26]Bao J S, Corke H, Sun M. Nucleotide diversity in starch synthase IIa and validation of single nucleotide polymorphisms in relation to starch gelatinization temperature and other physicochemical properties in rice (*Oryza sativa* L.)[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2006, 113(7): 1171-1183.

[27]Bechtel D B, Zayas I, Kaleikau L, *et al.* Size-distribution of wheat starch granules during endosperm development[J]. *Cereal Chemistry*, 1990, 67(1): 59-63.

[28]Beló A, Zheng P, Luck S, *et al.* Whole genome scan detects an allelic variant of *fad2* associated with increased oleic acid levels in maize[J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2008, 279(1): 1-10.

[29]Bhattacharya M, Smith AM, Ellis THN,*et al.* The wrinkled-seed character of pea described by Mendel is caused by a transposon-like insertion in a gene encoding starch-branching enzyme[J].*Cell*,1990,60(1):115-122.

[30]Blauth S L, Yao Y, Klucinec J D, *et al.* Identification of Mutator insertional mutants of starch-branching enzyme 2a in corn[J]. *Plant Physiology*, 2001, 125(3): 1396-1405.

[31]Bresolin N C, Li Z, Kosar-Hashemi B, Tetlow I J, Chatterjee M, Rahman S, Morell M K, Howitt C A. Characterization of disproportionating enzyme from wheat endosperm[J]. *Planta*, 2005, 224: 20–31

[332]Briarty L G, Hughes C E, Evers A D. The developing endosperm of wheat—a stereological analysis[J]. *Annals of Botany*, 1979, 44(6): 641-658.

[33]Briney A, Wilson R, Potter R H, *et al.* A PCR-based marker for selection of starch and potential noodle quality in wheat[J]. *Molecular Breeding*, 1998, 4(5): 427-433.

[34]Bryan G T,WU K S,Farall L.A single amino acid diference distinguishes resistant and susceptible alleles of the rice blast resistance gene *Pi-ta*.*Plant Cell*,2000,12(11):2033-2046.

[35]Buleon A, Colonna P, Planchot V, Ball S.Starch granules:structure and biosynthesis[J].*International Journal of Biological Macromolecules*,1998,23(2):85–112.

[36]Bundock P C, Henry R J. Single nucleotide polymorphism, haplotype diversity and recombination in the *Isa* gene of barley[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2004, 109(3): 543-551.

[37]Bundock P, Christopher J, Eggler P, *et al.* Single nucleotide polymorphisms in cytochrome P450 genes from barley[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2003, 106(4): 676-682.

[38]Burton R A, Jenner H, Carrangis L, Fahy B, Fincher G B, Hylton C, Laurie D A, Parker M, Waite D, Wegan S, Verhoeven T, Denyer K. Starch granule initiation and growth are altered in barley mutants that lack isoamylase activity[J]. *The Plant Journal*, 2002, 31: 97–112.

[39]Cheng H, Yang H, Zhang D, *et al.* Polymorphisms of soybean isoflavone synthase and flavanone 3-hydroxylase genes are associated with soybean mosaic virus resistance[J]. *Molecular breeding*, 2010, 25(1): 13-24.

[40]Cho R J, Mindrinos M, Richards D R, *et al.* Genome-wide mapping with biallelic markers in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Nature genetics*, 1999, 23(2): 203-207.

[41]Commuri P D, Keeling P L. Chain-length specificities of maize starch synthase I enzyme: studies of glucan affinity and catalytic properties[J]. *The Plant Journal*, 2001, 25(5): 475-486.

[42]Craig J, Lioyd J R, Tomlinson K, *et al.* Mutations in the gene encoding starch synthase II profoundly alter amylopectin structure in pea embryos [J]. *Plant Cell*, 1998, 10(3) : 413-426.

[43]Craig J, Lioyd J R, Tomlinson K, *et al.* Mutations in the gene encoding starch synthase II profoundly

- alter amylopectin structure in pea endosperm[J]. *The Plant Cell Online*, 1998, 10(3):413-426.
- [44]Crofts N, Abe K, Aihara S, *et al.* Lack of starch synthase IIIa and high expression of granule-bound starch synthase I synergistically increase the apparent amylose content in rice endosperm[J]. *Plant science*, 2012, 193: 62-69.
- [45]Davis G, Musket T, Melia-Hancock S, *et al.* The intermated B73 Mo17 genetic map: a community resource[C]//Maize Genet Conference Abstracts. 2001, 43: W15.
- [46]Delrue B, Fontaine T, Routier F, *et al.* Waxy *Chlamydomonas reinhardtii*: monocellular algal mutants defective in amylose biosynthesis and granule-bound starch synthase activity accumulate a structurally modified amylopectin[J]. *Journal of bacteriology*, 1992, 174(11): 3612-3620.
- [47]Denyer K, Johnson P, Zeeman S, *et al.* The control of amylose synthesis[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2001, 158(4): 479-487.
- [48]Dian W, Jiang H, Wu P. Evolution and expression analysis of starch synthase III and IV in rice[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2005, 56(412): 623-632.
- [49]Doehlert D C, Kuo T M, Felker F C. Enzymes of sucrose and hexose metabolism in developing kernels of two inbreds of maize[J]. *Plant physiology*, 1988, 86(4): 1013-1019.
- [50]Drenkard E, Richter B G, Rozen S, *et al.* A simple procedure for the analysis of single nucleotide polymorphisms facilitates map-based cloning in *Arabidopsis*[J]. *Plant physiology*, 2000, 124(4): 1483-1492.
- [51]Edwards A, Fulton D C, Hylton C M, *et al.* A combined reduction in activity of starch synthase II and III of potato has novel effects on the starch of tubers[J]. *The Plant Journal*, 1999, 17(3):251-261.
- [52]Evers A D, Lindley J. The particle-size distribution in wheat endosperm starch[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1977, 28(1): 98-102.
- [53]Evers A D. The size distribution among starch granules in wheat endosperm[J]. *Starch-Stärke*, 1973, 25(9): 303-304.
- [54]Fahrenkrug S C, Freking B A, Smith T P L, *et al.* Single nucleotide polymorphism (SNP) discovery in porcine expressed genes[J]. *Animal Genetics*, 2002, 33(3):186-195.
- [55]Flint-Garcia S A, Thornberry J M, Buckler E S. Structure of linkage disequilibrium in plants [J]. *Annual review of plant biology*, 2003, 54(1):357-374.
- [56]Flint-Garcia S A, Thuillet A C, Yu J, *et al.* Maize association population: a high-resolution platform for quantitative trait locus dissection[J]. *The Plant Journal*, 2005, 44(6): 1054-1064.
- [57]Flint-Garcia Sherry A, Thuillet Anne-Céline, Yu Jianming, *et al.* Maize association population: a high-resolution platform for quantitative trait locus dissection [J]. *The Plant journal: for cell and molecular biology*, 2005, 44(6): 1054-1064.
- [58]Frazer K A, Ballinger D G, Cox D R, *et al.* A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs[J]. *Nature*, 2007,449(7164), 851-861.
- [59]Gallant D J, Bouchet B, Baldwin P M. Microscopy of starch: evidence of a new level of granule organization[J]. *Carbohydrate polymers*, 1997, 32(3): 177-191.
- [60]Gao M, Chibbar R N. Molecular and biochemical characterization of soluble starch synthases in wheat kernels.In:Slinkard AE(ed) Proceedings of the 9th International Wheat Genetics Symposium. Vol.4[M].Saskatchewan:University Extension Press,1998:151-153.
- [61]Gao M, Fisher D K, Kim K N, *et al.* Independent genetic control of maize starch-branching enzymes IIa and IIb (isolation and characterization of a *Sbe2a* cDNA)[J]. *Plant Physiology*, 1997, 114(1): 69-78.
- [62]Gao M, Wanat J, Stinard P S, *et al.* Characterization of *dull1*, a maize gene coding for a novel starch synthase[J]. *The Plant Cell*, 1998, 10(3): 399-412.

- [63]Gibbs R A, Belmont J W, Hardenbol P, *et al.* The international hap map project [J]. *Nature*, 2003, 426(6968):789-796.
- [64]Godet M C, Tran V, Delag wMM. Molecular modeling of the specific interactions in amylose complexation by fatty acids[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 1993, 15:11-16.
- [65]Greenwell P, Schofield J D. A starch granule protein associated with endosperm softness in wheat[J]. *Cereal Chemistry*, 1986, 63(4): 379-380.
- [66]Guan H P, Preiss J. Differentiation of the properties of the branching isozymes from maize (*Zea mays*) [J]. *Plant Physiology*, 1993, 102(4): 1269-1273.
- [67]Guillet C C, Birolleau T C, Manicacci D, *et al.* Nucleotide diversity of the ZmPox3 maize peroxidase gene: Relationships between a MITE insertion in exon2 and variation in forage maize digestibility[J]. *Biomed central Genetics*, 2004, 5(1):19.
- [68]Hamada S, Ito Hiroyuki, Matsui Hirokazu, *et al.* The N-terminal region of the starch branching enzyme from *Phaseolus vulgaris* L. is essential for optimal catalysis and structural stability[J]. *Phytochemistry*, 2007, 68(10):1367-1375.
- [69]Hao D, Cheng H, Yin Z, *et al.* Identification of single nucleotide polymorphisms and haplotypes associated with yield and yield components in soybean (*Glycine max*) landraces across multiple environments[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2012, 124(3): 447-458.
- [70]Hayashi K, Hashimoto N, Daigen M, *et al.* Development of PCR-based SNP markers for rice blast resistance genes at the Piz locus[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2004, 108(7): 1212-1220.
- [71]Hizukuri S. Polymodal distribution of the chain lengths of amylopectins, and its significance[J]. *Carbohydrate research*, 1986, 147(2): 342-347.
- [72]Hizukuri S, Takeda Y, Maruta N, *et al.* Molecular structures of rice starch[J]. *Carbohydrate Research*, 1989, 189: 227-235.
- [73]Hurkman W J, McMue K F, Altenbach S B, *et al.* Effect of temperature on expression of genes encoding enzymes for starch biosyntheses in developing wheat endosperm[J]. *Plant Science*, 2003, 1-9.
- [74]Jane J, Chen Y Y, Lee L F, *et al.* Effects of amylopectin branch chain length and amylose content on the gelatinization and pasting properties of starch 1[J]. *Cereal chemistry*, 1999, 76(5): 629-637.
- [75]Jeong S C, Maroof S. Detection and genotyping of SNPs tightly linked to two disease resistance loci, Rsv1 and Rsv3, of soybean[J]. *Plant Breeding*, 2004, 123(4): 305-310.
- [76]José Useche F, Gao G., Hanafey M, *et al.* High-throughput identification, database storage and analysis of SNPs in EST sequences[J]. *Genome Informatics*, 2001, 12: 194-203.
- [77]Juliano B O. Polysaccharides, protein, and lipids of rice[J]. St Paul, MN: American Association of Cereal Chemists, 1985, 59-174.
- [78]Juliano B O. Rice: chemistry and technology[M]. St Paul, MN: American Association of Cereal Chemists, 1985, 1-16.
- [79]Keeling P L, Wood J R, Tyson R H, *et al.* Starch biosynthesis in developing wheat grain Evidence against the Direct Involvement of Triose Phosphates in the Metabolic Pathway[J]. *Plant Physiology*, 1988, 87(2): 311-319.
- [80]Kim K N, Fisher D K, Gao M, *et al.* Molecular cloning and characterization of the Amylose-Extender gene encoding starch branching enzyme IIB in maize[J]. *Plant molecular biology*, 1998, 38(6): 945-956.
- [81]Kossmann J, Abel G J W, Springer F, *et al.* Cloning and functional analysis of a cDNA encoding a starch synthase from potato (*Solanum tuberosum* L.) that is predominantly expressed in leaf tissue[J]. *Planta*, 1999, 208(4): 503-511.
- [82]Li Z, Rahman S, Kosar-Hashemi B, *et al.* Cloning and characterization of a gene encoding wheat starch

- synthase I[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1999, 98(8): 1208-1216.
- [83]McCue K F, Hurkman W J, Tanka C K, *et al.* Starch-branching enzymes Sbe1 and Sbe2 from wheat (*Triticum aestivum* cv. Cheyenne): Molecular characterization, development expression, and homoeologue assignment by differential PCR[J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2002, 20(2): 191-192.
- [84]Meyers B C, Tingey S V, Morgante M. Abundance, distribution, and transcriptional activity of repetitive elements in the maize genome[J]. *Genome Research*, 2001, 11(10): 1660-1676.
- [85]Mizuno K, Kobayashi E, Tachibana M, *et al.* Characterization of an Isoform of Rice Starch Branching Enzyme, RBE4, in Developing Seeds[J]. *Plant and Cell Physiology*, 2001, 42(4): 349-357.
- [86]Morell M K, Blennow A, Kosar-Hashemi B, *et al.* Differential expression and properties of starch branching enzyme isoforms in developing wheat endosperm[J]. *Plant Physiology*, 1997, 113(1): 201-208.
- [87]Morell M K, Rahman S, Abrahams S L, *et al.* The biochemistry and molecular biology of starch synthesis in cereals[J]. *Functional Plant Biology*, 1995, 22(4): 647-660.
- [88]Morrison W R. Starch lipids and how they relate to starch granule structure and functionality[J]. *Cereal Chemistry*, 1995, 40: 437-446.
- [89]Nakamura T, Yamamori M, Hirano H, *et al.* Identification of three Wx proteins in wheat (*Triticum aestivum* L.)[J]. *Biochemical genetics*, 1993, 31(1-2): 75-86.
- [90]Nakamura Y, Sakurai A, Inaba Y, *et al.* The fine structure of amylopectin in endosperm from Asian cultivated rice can be largely classified into two classes[J]. *Starch-Stärke*, 2002, 54(3-4): 117-131.
- [91]Nakamura Y. Towards a better understanding of the metabolic system for amylopectin biosynthesis in plants: rice endosperm as a model tissue[J]. *Plant and Cell Physiology*, 2002, 43(7): 718-725.
- [92]Nishi A, Nakamura Y, Tanaka N, *et al.* Biochemical and Genetic Analysis of the Effects of Amylose-Extender Mutation in Rice Endosperm[J]. *Plant Physiology*, 2001, 127(2): 459-472.
- [93]Palaisa K A, Morgante M, Williams M, *et al.* Contrasting effects of selection on sequence diversity and linkage disequilibrium at two phytoene synthase[J]. *The Plant Cell Online*, 2003, 15(8): 1795-1806.
- [94]Parker M L. The relationship between A-type and B-type starch granules in the developing endosperm of wheat[J]. *Journal of Cereal Science*, 1985, 3(4): 271-278.
- [95]Picoult-Newberg L, Ideker T E, Pohl M G, *et al.* Mining SNPs from EST databases[J]. *Genome Research*, 1999, 9(2): 167-174.
- [96]Ponomarenko J V, Merkulova T I, Vasiliev G V, *et al.* rSNP-Guild, a database system for analysis of transcription factor binding to target sequences: Application to SNPs and site-directed mutations[J]. *Nucleic Acids Research*, 2001, 29(1): 312-316.
- [97]Rafalski A. Applications of single nucleotide polymorphisms in crop genetics[J]. *Current opinion in plant biology*, 2002, 5(2): 94-100.
- [98]Rahman S. Genetic manipulation of starch properties in wheat[J]. *Chemistry in Australia*, 1994, 69(9): 517-518.
- [99]Rahman S, Kosar-Hashemi B, Samuel M S, *et al.* The major proteins of wheat endosperm starch granules[J]. *Functional Plant Biology*, 1995, 22(5): 793-803.
- [100]Rahman S, Li Z, Batey I, *et al.* Genetic alteration of starch functionality in wheat[J]. *Journal of Cereal Science*, 2000, 31(1): 91-110.
- [101]Rahman S, Regina A, Li Z, *et al.* Comparison of Starch-Branching Enzyme Genes Reveals Evolutionary Relationships Among Isoforms. Characterization of a Gene for Starch-Branching Enzyme IIa from the Wheat D Genome Donor *Aegilops tauschii*[J]. *Plant Physiology*, 2001, 125(3): 1314-1324.
- [102]Regina A, Bird A, Topping D, *et al.* High-amylose wheat generated by RNA interference improves indices of large-bowel health in rats[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United*

- States of America, 2006, 103(10): 3546-3551.
- [103]Regina A, Kosar-Hashemi B, Li Z, *et al.* Multiple isoforms of starch branching enzyme-I in wheat: lack of the major SBE-I isoform does not alter starch phenotype[J]. *Functional Plant Biology*, 2004, 31(6): 591-601.
- [104]Regina A, Bird A, Topping D, *et al.* High-amylose wheat generated by RNA interference improves indices of large-bowel health in rats[J]. *Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america*, 2006, 103(10): 3546-3551.
- [105]Remington D L, Thornsberry J M, Matsuoka Y, *et al.* Structure of linkage disequilibrium and phenotypic associations in the maize genome[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2001, 98(20): 11479-11484.
- [106]Riedelsheimer Christian, Lisec Jan, Czedik-Eysenberg Angelika, *et al.* Genome-wide association mapping of leaf metabolic profiles for dissecting complex traits in maize [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(23): 8872-8877.
- [107]Roldán I, Wattedled F, Mercedes L M, *et al.* The phenotype of soluble starch synthase IV defective mutants of *Arabidopsis thaliana* suggests a novel function of elongation enzymes in the control of starch granule formation[J]. *The Plant Journal*, 2007, 49(3): 492-504.
- [108]Roldán I, Wattedled F, Mercedes Lucas M, *et al.* The phenotype of soluble starch synthase IV defective mutants of *Arabidopsis thaliana* suggests a novel function of elongation enzymes in the control of starch granule formation[J]. *The Plant Journal*, 2007, 49(3): 492-504.
- [109]Rostoks N, Mudie S, Cardle L, *et al.* Genome-wide SNP discovery and linkage analysis in barley based on genes responsive to abiotic stress[J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2005, 274(5): 515-527.
- [110]Schofield J D, Greenwell P. Wheat starch granule proteins and their technological significance[J]. 1987.
- [111]Schwall G P, Safford R, Westcott R J, *et al.* Production of very-high-amylose potato starch by inhibition of SBE A and B[J]. *Nature biotechnology*, 2000, 18(5): 551-554.
- [112]Sestili F, Janni M, Doherty A, *et al.* Increasing the amylose content of durum wheat through silencing of the SBEIIa genes[J]. *BMC plant biology*, 2010, 10(1): 1-12
- [113]Shariflou M R, Sharp P J. A polymorphic microsatellite in the 3' end of 'Waxy' genes of wheat, *Triticum aestivum*[J]. *Plant Breeding*, 1999, 118(3): 275-277.
- [114]Smidansky E D, Clancy M, Meyer F D, *et al.* Enhanced ADP-glucose pyrophosphorylase activity in wheat endosperm increased seed yield [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2002, 99(3): 1724-1729.
- [115]Smith A M, Denyer K, Martin C R. What controls the amount and structure of starch in storage organs [J]. *Plant physiology*, 1995, 107(3): 673.
- [116]Sonneveld T, Tobutt K R, Robbins T P. Allele-specific PCR detection of sweet cherry self-incompatibility (S) alleles S1 to S16 using consensus and allele-specific primers[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2003, 107(6): 1059-1070.
- [117]Spielmeyer M, Ellis M H, Chandler P M. Semi-dwarf(sd-1), "green revolution" rice, contains a defective gibberellin 20-oxidase gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(13): 9043-9048.
- [118]Stark J R, Lynn A. Starch granules large and small[J]. *Transactions-Biochemical Society*, 1992.
- [119]Stinard P S, Robertson D S, Schnable P S. Genetic isolation, cloning, and analysis of a mutator-induced, dominant antimorph of the maize amylose extender1 locus[J]. *The Plant Cell*, 1993, 5(11): 1555-1566.
- [120]Sun C, Sathish P, Ahlandsberg S, *et al.* Identification of four starch-branching enzymes in barley

- endosperm: partial purification of forms I, IIa and IIb[J]. *New phytologist*, 1997, 137(2): 215-222.
- [121]Takeda Y, Guan H P, Preiss J. Branching of amylose by the branching isoenzymes of maize endosperm[J]. *Carbohydr Res*, 1993, 240: 253-263.
- [122]Tetlow I J. Understanding storage starch biosynthesis in plants: a means to quality improvement[J]. *Botany*, 2006, 84(8): 1167-1185.
- [123]Umemototo T, Aoki N. Single-nucleotide polymorphisms in rice starch synthase IIa that alter starch gelatinisation and starch association of the enzyme [J]. *Functional Plant Biology*, 2005, 32: 763-768.
- [124]Yamamori M, Nakamura T, Endo T R, *et al.* Waxy protein deficiency and chromosomal location of coding genes in common wheat[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1994, 89(2-3): 179-184.
- [125]Yamanouchi H, Nakamura Y. Organ specificity of isoforms of starch branching enzyme (Q-enzyme) in rice[J]. *Plant and Cell Physiology*, 1992, 33(7): 985-991.
- [126]Zhang X, Myers A M, James M G. Mutations affecting starch synthase III in *Arabidopsis* alter leaf starch structure and increase the rate of starch synthesis[J]. *Plant Physiology*, 2005, 138(2): 663-674.
- [127]Zhao X C, Batey I L, Sharp P J, *et al.* A single genetic locus associated with starch granule properties and noodle quality in wheat[J]. *Journal of Cereal Science*, 1998, 27(1): 7-13.
- [128]Zhu Y L, Song Q J, Hyten D L, *et al.* Single-nucleotide polymorphisms in soybean[J]. *Genetics*, 2003, 163(3): 1123-1134.

小麦淀粉合成关键酶基因 SNP 多态性及与淀粉合成的相关分析

附表 1 材料名称及来源

品种名称	品种来源	直链淀粉含量(%)	支链淀粉含量(%)	品种名称	品种来源	直链淀粉含量(%)	支链淀粉含量(%)
巴 09-502	内蒙	17.40	84.96	甘春 24	甘肃	16.30	65.76
03 单 09	新疆	19.94	59.41	甘春 9826	甘肃	20.18	66.91
巴 09-414	内蒙	17.75	86.48	黑引优 1 号	黑龙江	19.14	58.20
SD06-5	新疆	20.03	71.54	津 1305	天津	18.69	80.44
08 春引观 20	新疆	18.17	64.83	津 1308	天津	16.15	77.62
08 春引观 43	新疆	19.51	60.19	津 1313	天津	19.11	89.06
08 春引观 99	新疆	17.52	85.65	津 1315	天津	17.79	79.60
08 春引观 107	新疆	20.05	60.26	津强 5 号	天津	17.00	81.76
08 春引观 112	新疆	18.57	70.25	津强 6 号	天津	18.45	58.84
08 春引观 113	新疆	18.90	57.13	津选 1 号	天津	14.74	91.07
08 春引观 237	新疆	17.61	81.49	晋麦 14 号	山西	20.02	52.05
08 春引观 267	新疆	18.32	78.84	京麦 S18	北京	19.20	47.41
08 春引观 278	新疆	21.04	73.74	京麦 S19	北京	17.31	74.55
08 春引观 302	新疆	17.74	74.77	拉 1304	西藏	18.88	70.34
09 春引观 346	新疆	18.26	70.84	拉 1429	西藏	18.83	83.70
09 春引观 347	新疆	18.05	82.25	拉 1620	西藏	17.91	87.17
S46	甘肃	17.03	80.46	拉 2577	西藏	19.05	67.42
T3860	甘肃	17.23	81.69	辽春 10 号	辽宁	15.01	81.76
T2732	甘肃	18.80	87.23	龙麦 15	黑龙江	19.93	45.88
T3289	甘肃	17.43	68.11	龙麦 26	黑龙江	20.10	51.20
T157	甘肃	16.39	87.13	陇春 24	甘肃	15.53	91.40
T3862	甘肃	17.25	86.71	陇春 25	甘肃	18.54	84.80
T3584	甘肃	17.84	78.37	蒙 12DB122	内蒙	18.22	80.02
T3599	甘肃	17.04	86.27	蒙鉴 4 号	内蒙	18.32	79.98
T2563	甘肃	18.74	87.54	蒙鉴 6 号	内蒙	18.33	78.94
T3291	甘肃	15.84	87.88	蒙鉴 11 号	内蒙	17.71	89.91
T2688	甘肃	17.84	80.08	蒙麦 26 号	内蒙	19.62	55.79
T157	甘肃	17.06	81.66	蒙优 4 号	内蒙	19.44	60.56
T160	甘肃	19.35	47.00	墨 88-72	墨西哥	20.22	68.02
948-1	甘肃	15.40	82.96	内麦 19	内蒙古	19.25	69.99
948-2	甘肃	11.98	77.73	宁春 4 号	宁夏	16.74	78.75
948-3	甘肃	13.94	86.33	宁春 16 号	宁夏	17.44	83.30
948-5	甘肃	12.87	84.35	宁春 17 号	宁夏	17.84	72.97
948-6	甘肃	13.35	84.35	宁春 37 号	宁夏	18.32	89.02
948-7	甘肃	16.27	84.45	宁春 41 号	宁夏	17.47	74.77
948-8	甘肃	18.24	60.02	宁春 47 号	宁夏	19.01	86.81
948-9	甘肃	15.27	82.77	宁春 51 号	宁夏	18.10	79.13
948-10	甘肃	13.91	86.03	宁大 2010-3	宁夏	18.87	86.92
O302	武威	18.37	83.34	宁作 19	宁夏	17.83	83.40
CM195 选	北京	17.70	85.00	农麦 2 号	内蒙古	18.10	83.75
D68-20	甘肃	14.42	60.36	吐春 6 号	新疆	23.60	67.06

小麦淀粉合成关键酶基因 SNP 多态性及与淀粉合成的相关分析

G20	山东	17.95	85.45	武春 3 号	甘肃	15.06	84.96
H5336	内蒙	20.71	68.23	武春 8 号	甘肃	17.82	80.74
K297-2	武威	21.24	78.75	新春 5 号	新疆	18.25	64.14
LY3	新疆	19.02	64.17	新春 6 号	新疆	18.71	74.00
M65	墨西哥	18.07	78.09	新春 8 号	新疆	19.52	84.50
M143	墨西哥	17.98	82.25	新春 9 号	新疆	18.98	68.70
M150	墨西哥	16.31	78.32	新春 11 号	新疆	18.26	69.56
M165	墨西哥	17.49	76.57	新春 12 号	新疆	16.26	63.59
M171	墨西哥	19.53	84.45	新春 14 号	新疆	20.48	50.21
M174	墨西哥	16.70	65.54	新春 15 号	新疆	22.48	65.42
M175	墨西哥	25.12	51.73	新春 17 号	新疆	19.18	77.70
M190	墨西哥	17.83	79.22	新春 18 号	新疆	19.76	65.08
M191	墨西哥	14.88	89.48	新春 19 号	新疆	16.74	74.29
M221	墨西哥	19.51	76.38	新春 20 号	新疆	20.67	52.05
M262	墨西哥	19.66	57.63	新春 21 号	新疆	18.64	71.53
M378	墨西哥	20.09	64.69	新春 22 号	新疆	19.24	55.08
M410	墨西哥	17.06	89.59	新春 23 号	新疆	21.00	63.99
M457	墨西哥	18.06	83.98	新春 25 号	新疆	20.52	68.43
M416	墨西哥	18.24	89.70	新春 26 号	新疆	17.35	78.94
N175	宁夏	20.16	71.70	新春 27 号	新疆	20.13	59.92
NK-2	甘肃	17.78	58.77	新春 28 号	新疆	18.41	56.14
NS64	埃及	14.32	83.43	新春 29 号	新疆	19.57	59.78
NS149	埃及	17.10	84.45	新春 31 号	新疆	22.05	71.78
S09 元繁-2	天津	17.07	87.89	新春 32 号	新疆	19.24	70.96
X-3	武威	16.99	89.06	新春 35 号	新疆	19.46	72.05
X-5	武威	17.69	81.19	新春 36 号	新疆	20.60	50.34
X-17	武威	19.45	72.03	新春 37 号	新疆	17.72	59.48
Y20	加拿大	18.25	65.86	新春 38 号	新疆	13.04	78.56
阿春 2 号	新疆	19.31	70.76	新春 39 号	新疆	17.36	82.15
矮优 1 号	黑龙江	17.89	63.68	新春 41 号	新疆	18.67	67.86
安农 90202	安徽	17.26	79.04	野猫	加拿大	16.35	62.68
安农 9912	安徽	19.67	80.08	银 9903-25	宁夏	19.48	73.24
巴 02-509	内蒙	19.33	59.41	永 09Y	宁夏	20.36	70.50
巴 07-6767	内蒙	21.38	63.83	永 640	宁夏	17.62	77.51
巴春 6 号	新疆	16.98	85.86	永 2834	宁夏	20.30	54.36
巴丰 5 号	宁夏	18.18	74.68	永 2901	宁夏	18.80	66.61
波塔姆	墨西哥	19.64	55.38	永 3560	宁夏	18.82	81.49
昌春 6 号	新疆	21.25	57.41	永春 1937	福建	19.65	59.48
大头郎	新疆	22.92	53.64	永良 15	宁夏	20.20	50.75
阜春 1 号	新疆	15.20	86.44	中 8131	北京	17.06	79.97

附表 2 SNP 扩增引物

SNP ID	5' Forward Primer Sequence 3'	5' Reverse Primer Sequence 3'	5' Extended Primer Sequence 3'
sbe2aSNP-rs6_W1	ACGTTGGATGACTCAGGGCATTGTGGAAC	ACGTTGGATGTCCTGGTTTTGGGACAACCTC	CGCGGTTTCTCCCC
ss2a-rs68_W1	ACGTTGGATGTCCTCAACAAGCCACCTC	ACGTTGGATGAACGACGTTGCCACTTCGAG	CTCAACTCGGGCAGC
ss2a-rs44_W1	ACGTTGGATGGGACATTGACAGCGATGTTG	ACGTTGGATGAAGAGCCTTTGGGTTGGAG	GAAGGGTGCGGTCAT
ss2a-rs64_W1	ACGTTGGATGCTAAGGCTATCATTGGCGTG	ACGTTGGATGTTGAGGAAGAGCTGGATG	GCTAGCACCGCCGGT
sbe2bSNPrs-5_W1	ACGTTGGATGTGGTGTGTCTGTAGGTG	ACGTTGGATGCGTCAGGGATCATCACCTC	AGGTCATGCGCGGGG
sbe2bSNPrs-14_W1	ACGTTGGATGACATGCATATGACAGGAGAAG	ACGTTGGATGGCTACTCATGCCAACATGTG	CGCAATGATTTTGGTGC
sbe2aSNP-rs22_W1	ACGTTGGATGATCTGTTGCTTCCAAGGAGG	ACGTTGGATGAACCTTTGCCGTTGGAAGAG	GTTGGAAGAGTTTGTGG
ss2a-rs59_W1	ACGTTGGATGTTGGGAGTTGGCTTGTGAC	ACGTTGGATGCTGGAAGTAGTAAGAGCGTC	CGTCTTAAGTGAATCCC
sbe2aSNP-rs9_W1	ACGTTGGATGTGTACCTGCAGTCATTC	ACGTTGGATGACCACCGTGAAGTAATGTG	TGACGGTTGAATGGTTT
sbe2bSNPrs-16_W1	ACGTTGGATGTTCTTTCACCAAGTAGCCG	ACGTTGGATGATGAGGACAACCAAGCCAAG	CGTGAGCTCTATCAATCAA
ss2a-rs50_W1	ACGTTGGATGAGATGATCGGGCTCCTTTG	ACGTTGGATGACCACGTTTCATGACGTCTC	GGGCCAAAGTCCGGAATC
sbe2bSNPrs-23_W1	ACGTTGGATGCGTATCTCGAAACATGAGG	ACGTTGGATGAGCTACTACTCCAGTGAAG	tCCTTTTCAAACACGATCA
ss2a-rs5_W1	ACGTTGGATGCTACAAAACGCACGCGCTC	ACGTTGGATGACACCTCCGTCGCGAGCCGT	GGGCTCGCTCGTGTCAAGG
sbe2aSNP-rs16_W1	ACGTTGGATGTGTTCCAGATGGTGGTGTG	ACGTTGGATGCTCCTGCACTTACTTGAGGAG	GGTGGTGTGGTTTTGACTA
ss2a-rs58_W1	ACGTTGGATGAGGTGGTCTTGGAGATGTTG	ACGTTGGATGAAGTGAAGCCTGCAGTACC	CTGCAGTACCATAACACGATG
ss2a-rs31_W1	ACGTTGGATGGATTCCGAGCTACCATTTT	ACGTTGGATGAGACCACGAAATTTGAGCCG	CCTAAGCTACCATTTCCATCAG
sbe2aSNP-rs2_W1	ACGTTGGATGATCCTTGCATTTTGCAGGCG	ACGTTGGATGTGCCAAGTCGTCGCTCTC	CCTCCCTCCCTGGAGAGGCCG
sbe2aSNP-rs13_W1	ACGTTGGATGATTTACTGGAACTATGGCG	ACGTTGGATGGAATTAGATCGTTGACCAGC	GATAGTTGACCAGCATCAAGTA
sbe2bSNPrs-9_W1	ACGTTGGATGAAGACACGAGCAGAAATGGAC	ACGTTGGATGTGCTGTCCATTTCCCGGTG	CAGAAGAATGCGTAATTTCTCCC
sbe2aSNP-rs21_W1	ACGTTGGATGAAATGATCAGGCTTGTACC	ACGTTGGATGGGATGCCAAACTCATTTCC	CTTGGCACCATGGGTTTAGGTGG
sbe2aSNP-rs18_W1	ACGTTGGATGCACAGGCAAAGTGACGAATC	ACGTTGGATGTACACACTTCTCAAGCCACC	GGGTTTAGGGTGTGCACAATATC
ss2a-rs22_W1	ACGTTGGATGTCACCGAGATGAACGGCA	ACGTTGGATGAGCCCGTGTCTTTGGTCG	CACGCCCGGTAGATTTGTCTC
ss2a-rs2_W1	ACGTTGGATGATGTCGTCGGCGGTGCGGT	ACGTTGGATGTCGCCCGCTGCGTGATCT	CAGACGCTCCTTCTCGCGCTCGC
sbe2bSNPrs-7_W1	ACGTTGGATGTATGTGTGCCACAGTTCGTC	ACGTTGGATGCCATCTGTAGGCTTGTTC	CTGCTTGTTCATCATCAATGAATG
sbe2bSNPrs-15_W1	ACGTTGGATGAAACTTCAGGGATGAGGTGC	ACGTTGGATGGTATGAGTGTCTTGGATTG	TTCCAAGAATTAAGACTTGGATA
ss2a-rs61_W1	ACGTTGGATGCCATGCTTATATCGATGGAG	ACGTTGGATGCCCCATAAATGTCTTCTG	GAGGTGATTTGTGTTCATTGACGC
ss2a-rs60_W1	ACGTTGGATGGGCTAGACTTTGATGATCTG	ACGTTGGATGCCCTGTGACCACAACCTAAG	GGATCATTTCTCAATATCATCAAAAT
sbe2aSNP-rs11_W1	ACGTTGGATGCTGTTCTGTTAATCTGTTC	ACGTTGGATGTTCTTCAAGCCACCATCTCG	ACACTATTCTATTCTTATGCAAGTATT
sbe2bSNPrs-12_W1	ACGTTGGATGACTAGCAGTCTAACTGTGCC	ACGTTGGATGATGCCTCCTTCGTGTTTATC	GGTGCCTTAATGGATCAAAAACAGATA
ss2a-rs18_W1	ACGTTGGATGATCCCGTCAAGACGCTCGAT	ACGTTGGATGTTCACTCGTGGACGGG	GGGAACGCCCGGAAGGTGGCGCGCCG
sbe2aSNP-rs20_W1	ACGTTGGATGCTAAGCTCTCTTGTGCAAG	ACGTTGGATGATGCCACGATCAATGCGAAG	ATATTTATGATTTATGCTCTGGATAG
ss2a-rs65_W2	ACGTTGGATGTCAACACCGACATCATCCAC	ACGTTGGATGATGAAGGTGCTGCCGAGTT	GGGCTTGTGAGGAA
ss2a-rs1_W2	ACGTTGGATGATGTCGTCGGCGGTGCGGT	ACGTTGGATGTCGCCCGCTGCGTGATCT	AGAGCGGAGGAAGGA
sbe2aSNP-rs14_W2	ACGTTGGATGTGCTACTGATGTTGATGCGG	ACGTTGGATGCCAATGGATACAGCATCAGG	AGATCGTTGACCAGCAT
ss2a-rs21_W2	ACGTTGGATGGCCCGTCCACCGAGTATGA	ACGTTGGATGAGCCCGTGTCTTTGGTCG	CACGAGTATGAACGGCA
sbe2aSNP-rs24_W2	ACGTTGGATGTTTTGACTACCGTGTGGG	ACGTTGGATGAGGGTGGACAATGAAAAGGC	ACCTTGTACTTCCCAGGC
ss2a-rs28_W2	ACGTTGGATGAACAAAGCTAACGTGCGCTC	ACGTTGGATGTGATGGAATGGTAGTGCG	GGACGAGCATAGCCGAGG
sbe2aSNP-rs17_W2	ACGTTGGATGTGTTCCAGATGGTGGTGTG	ACGTTGGATGCTCCTGCACTTACTTGAGGAG	TGTTGGTTTTGACTACCGC
sbe2bSNPrs-2_W2	ACGTTGGATGCGGCATTCGAGTTTCCGC	ACGTTGGATGATGGGACTGCAGTCCAC	CCCCCGACGCGCCGGCCCA
ss2a-rs45_W2	ACGTTGGATGACCTGAAGTAAGAAGGGTG	ACGTTGGATGAAGGTCTTCTGTACAGCGG	ATCTTGAAGAAGCTCCAAA

小麦淀粉合成关键酶基因 SNP 多态性及与淀粉合成的相关分析

sbe2aSNP-rs25_W2	ACGTTGGATGCATTGGACAATTGGCTGGG	ACGTTGGATGATCCACCAAAGAGTGCATCG	GAGAGTGCATCGTCAGAGTC
ss2a-rs48_W2	ACGTTGGATGCTGGGCTGTTGCAGATGATG	ACGTTGGATGACCACGTTTCATGACGTTCTC	TCCGGAATCATGGTCTGGTG
ss2a-rs53_W2	ACGTTGGATGGCTCGAATCACTCATAAGAAC	ACGTTGGATGTGCTCTCTCTTTGCCAAAGC	GGAGTTGTGTTGCATAGGTGG
ss2a-rs26_W2	ACGTTGGATGACCAAAGACAGCGGGCTGC	ACGTTGGATGGGCGACGTTAGCTTGTITTT	CCTACGTCGACCCAGAACAGAG
sbe2aSNP-rs10_W2	ACGTTGGATGACATTACTTCCACGGTGGTC	ACGTTGGATGCTACATACTTCCCACTCCC	ACCTTATGTGGGATTCTCGTCT
sbe2bSNPrs-20_W2	ACGTTGGATGACGATGAAGCTTGGGAGATG	ACGTTGGATGGCTTGATCGTGACTTTCAGC	GGGGCTAACAAACAGAAGGTGG
sbe2aSNP-rs5_W2	ACGTTGGATGAGATAATCAGGAGCAAACGG	ACGTTGGATGTTCCACAATGCCTGAGTC	TGGGACTGCAGAGAACTTCAAT
sbe2bSNPrs-10_W2	ACGTTGGATGAAGACACGAGCAGAAATGGAC	ACGTTGGATGTGCTGTCCATTCCCGGTG	GTAAGAGGGAGAAATTACGCATT
sbe2bSNPrs-21_W2	ACGTTGGATGATCACAATGGGCTAGGAGG	ACGTTGGATGTTAATCTCACCAGGATGCC	GACCGAACTCATTCCATAAAGT
sbe2aSNP-rs8_W2	ACGTTGGATGGTTTGCTCTATTGATGCAG	ACGTTGGATGATCCATCAGCGTTGTTAGGG	GATCCGCGTTGTTAGGGAGGAAAA
sbe2bSNPrs-11_W2	ACGTTGGATGATACGAGATTGACCCAACGC	ACGTTGGATGGAAAGCGAAGCATAACCGATAC	CAGACCGATACTCAAGATGGTACTT
ss2a-rs6_W2	ACGTTGGATGTCGTGTGCAAGGCTGCACT	ACGTTGGATGACCCTCGCTCTCTCTTCC	ACGAAGCGCACGGCTCGGACGGAG
ss2a-rs39_W2	ACGTTGGATGGGCTCAAATTCGTGGTCTC	ACGTTGGATGCCCTTCTTCAGTTCAGGTTTC	CCCCGCTGCTCCCAGGCTGGACATTG
sbe2bSNPrs-4_W3	ACGTTGGATGGGTGTGGTGATGCTGTAGG	ACGTTGGATGCGTCAGGGATCATCACCTC	CAGAACCTCCGACGC
ss2a-rs14_W3	ACGTTGGATGCGAGATCAGCTCACGAATTG	ACGTTGGATGTCGCGATCGAGCGTCTTGA	CTTGACGGGATCCCT
ss2a-rs55_W3	ACGTTGGATGAGGTGGTCTTGAGATGTTG	ACGTTGGATGAGCCTGCAGTACCATAACAC	GATGTTGCGGGTGCT
sbe2aSNP-rs15_W3	ACGTTGGATGAAAATGTTTCAGGTACAGTG	ACGTTGGATGATGCAGGCGTAGTCAAAAC	AGGTCAGTGAATGCC
ss2a-rs67_W3	ACGTTGGATGAGCTCTTCTCAACAAGCCC	ACGTTGGATGAACGACGTTGCCACTTCGAG	TCAACAAGCCACCTCC
ss2a-rs32_W3	ACGTTGGATGTTCCATCAGTGACAAGCGG	ACGTTGGATGAGACCACGAAATTTGAGCCG	ACGTCGTTGTCCAGC
sbe2bSNPrs-18_W3	ACGTTGGATGGGTGGCTAGAGGAGTATAAG	ACGTTGGATGACTTGTAAATCCATGATGGG	CGATGGCGCGACCTCCA
sbe2aSNP-rs4_W3	ACGTTGGATGAGATATCGAGGAGCAAACGG	ACGTTGGATGTTCCACAATGCCTGAGTC	GGGACTGCAGAGAAACTT
ss2a-rs27_W3	ACGTTGGATGCATCCGTCGACCCAGAACA	ACGTTGGATGCGAGGCGACGTTAGCTTTGT	CTTGTGTTTCACCGTTCAC
ss2a-rs69_W3	ACGTTGGATGTCTCATGCCCTCCCGGTT	ACGTTGGATGCGTAGGCCATGGCGTAGAG	GAGTTTCGAGCCGTGCGGG
sbe2aSNP-rs7_W3	ACGTTGGATGGAGAATTCGTGCTGCTATTG	ACGTTGGATGTACTCGGGTAAATCCAAG	GGTCTTCCAATCCACCTTCA
ss2a-rs12_W3	ACGTTGGATGGGAAGAAGGACGCGAGGGT	ACGTTGGATGACGAACCAACTACCTTGGTG	GGAGTGC GCGGGGCTGCCTC
ss2a-rs49_W3	ACGTTGGATGAGATGATCGGGGCTCCTTTG	ACGTTGGATGACCACGTTTCATGACGTTCTC	ATCCTTGAACATCACCAGAA
sbe2bSNPrs-13_W3	ACGTTGGATGACTGTAGTCCATGTGGTTG	ACGTTGGATGTTTGGCAGAAAAATCTCCC	TAACTGTTTTCAGAATGACCT
sbe2aSNP-rs23_W3	ACGTTGGATGGAGCACCAGTATGTTTCACG	ACGTTGGATGAGCTATTGCTCCAGTGAAG	CTATGATCACCTTATCTTCTC
sbe2bSNPrs-19_W3	ACGTTGGATGTGCTGCGCTCTAATTTAGG	ACGTTGGATGAACGACCCATCTACATCAG	GAAGCTACCATGAATATTTGG
ss2a-rs47_W3	ACGTTGGATGAAGACCTTTGGGACTTCAAG	ACGTTGGATGATCATCTGCAACAGCCAGC	GGGACTTCAAGAAATACATTGG
sbe2bSNPrs-22_W3	ACGTTGGATGTATGACAGAGTTGATCAGG	ACGTTGGATGATGGCGATTCAACCTCACAG	CACCATATTTTCTCAAGATGC
sbe2bSNPrs-6_W3	ACGTTGGATGTCCATCGACGGTCCCGTTC	ACGTTGGATGGGTAATACAGTAGTATATG	TTACCTACCTTCAGATCATCAGA
ss2a-rs62_W3	ACGTTGGATGCCATGCTTATATCGATGGAG	ACGTTGGATGCCCCATAAATGTCTTCTG	GATTGTGTGTTTCATTGACGCTCCT
ss2a-rs43_W3	ACGTTGGATGGGACATTGACAGCGATGTTG	ACGTTGGATGAAGAGCCTTTGGGTTGGAG	GTGGTTTTGGAGCTTCTTCGACGA
ss2a-rs30_W4	ACGTTGGATGAACAAAGCTAACGTCGCCTC	ACGTTGGATGTGATGGAATGGTAGTGCG	GCCGAGGTCGTGGCT
ss2a-rs24_W4	ACGTTGGATGGTGAGAAACAATCTACCGGC	ACGTTGGATGTGGTACTCTGTTCTGGGTCG	GCGCGCTGCGGGTG
ss2a-rs10_W4	ACGTTGGATGCGCCCGGGAAGAAGGAC	ACGTTGGATGACGCGACCCCGACGACAT	GAAGAAGGACGCGAGG
ss2a-rs42_W4	ACGTTGGATGAATTCGTGGTCTCGGCTTC	ACGTTGGATGTTGGAGCTTCTTCGACGATG	CACAGCGATGTTGAACC
ss2a-rs16_W4	ACGTTGGATGATCCCGTCAAGACGCTCGAT	ACGTTGGATGTTCATACTCGGTGGACGGG	TCGCGACCGCGGGAAGG
sbe2aSNP-rs1_W4	ACGTTGGATGTCCGCGCGACTCTCGGTGT	ACGTTGGATGAGGAGCAGCGACGGCAAGT	CGCGGGCCGCGCTCGGAG
sbe2bSNPrs-17_W4	ACGTTGGATGATGCAAGATGGTGGCTAGAG	ACGTTGGATGGGTATACATCATGGAGGTC	CCCCGGTCGCGCCATCGAA
sbe2aSNP-rs19_W4	ACGTTGGATGCCCTAACAAATAGAAGGTGG	ACGTTGGATGGTCTTGTCCACCACTAGTGC	GAAGTGGCTTGAGAAGTG

小麦淀粉合成关键酶基因 SNP 多态性及与淀粉合成的相关分析

---

sbe2aSNP-rs12_W4	ACGTTGGATGATTTACTGGGAACATGGCG	ACGTTGGATGTTAGATCGTTGACCAGCATC	TTGACCAGCATCAAGTAAAC
ss2a-rs52_W4	ACGTTGGATGGGGAGAACGTCATGAACGTG	ACGTTGGATGGAAGAGGTAATGTCCATGCC	GGGCTCGTCGTGGCTGCTGA
ss2a-rs54_W4	ACGTTGGATGGTGTTCATAGGTGGTCTTG	ACGTTGGATGCCATAACACGATGTCCTCTC	AGGTGGTCTTGAGATGTTG
sbe2bSNPrs-8_W4	ACGTTGGATGGTCTTCAGAGACAAATCAGG	ACGTTGGATGGCGTAATTTCCCTCGTAG	AATGATCTTTGTCCATTCTG
ss2a-rs66_W4	ACGTTGGATGTCAACACCGACATCATCCAC	ACGTTGGATGATGAAGGTGCTGCCCGAGTT	CGATGCTGGAGGTGGGCTTGT
sbe2aSNP-rs3_W4	ACGTTGGATGAGATATCGAGGAGCAAACGG	ACGTTGGATGTTCCACAATGCCCTGAGTC	CTGAAGATTGAAGTTTCTCTGC
ss2a-rs4_W4	ACGTTGGATGTCCCGGGAGATCACGCA	ACGTTGGATGACGGCGCCAGTGCAGCCT	ATGACGGCCCGCGTGGGGTG
sbe2bSNPrs-3_W4	ACGTTGGATGCGGCATTCGAGTTTCCGC	ACGTTGGATGATGGCGACTGCAGCTCCAC	GGCTTCCCGCCGGATCGAGGAG

---

## 作者简介

韩俊杰, 男, 生于 1989 年 10 月, 籍贯河南开封。2013 年毕业于石河子大学农学院, 获农学学士学位。同年考取石河子大学农学院作物遗传育种专业研究生, 师从李卫华教授, 研究方向为植物重要农艺性状克隆与功能研究。

### 在学期间主要参与的研究项目

参与了国家自然科学基金资助项目《小麦淀粉合成关键酶基因克隆及特异性分子标记的开发与验证》(31260357) 的研究工作。主持自治区研究生创新项目《小麦淀粉合成酶 SS II a 基因 SNP 多态性及与淀粉合成的相关分析》的研究工作。

### 在学期间发表的文章

- [1] 韩俊杰, 王昊龙, 李淼淼, 南富波, 李卫华. 小麦淀粉合成酶 SS II a 基因克隆及生物学分析[J]. 麦类作物学报, 2015, 35(7): 903-909.
- [2] 韩俊杰, 王昊龙, 蔡曼, 李咏, 李卫华. 基于小麦淀粉合成酶 SS II a 氨基酸序列的生物进化分析[J]. 石河子大学学报: 自然科学版, 2015, 33(4): 405-409.
- [3] 韩俊杰, 王昊龙, 蔡曼, 李咏, 李卫华. 小麦淀粉合成相关酶 SS II a、SBE II a 和 SBE II b 基因表达序列多态性及对淀粉含量的影响[J]. 西北农业学报, (2016 年第五期出版)
- [4] 韩俊杰, 王昊龙, 蔡曼, 李咏, 李卫华. 关联分析及其在不同分子标记中的应用[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(2):13-17.
- [5] 王昊龙, 韩俊杰, 李淼淼, 南富波, 李卫华. 功能标记的开发及在禾谷类作物中的应用[J]. 核农学报, 2014, 11:1963-1971.
- [6] 王昊龙, 韩俊杰, 李卫华. 不同抗性淀粉含量小麦品种(系)淀粉分支酶 *SBE II a* 和 *SBE II b* 基因多态性分析. 新疆农业科学, (2015 年第七期出版)
- [7] 王昊龙, 韩俊杰, 李卫华, 刘伟. 不同抗性淀粉含量的小麦品种(系) *SBE II a* 基因启动子序列分析[J]. 石河子大学学报(自然科学版), 2015, 1:60-66.
- [8] 南富波, 李淼淼, 王昊龙, 韩俊杰, 刘伟, 李卫华. 小麦 *SBE II b* 基因的克隆及其与 PDS 基因串联 VIGS 载体的构建[J]. 石河子大学学报(自然科学版), 2014, 1:1-5.

## 致 谢

此论文是在导师李卫华教授和刘伟副教授悉心指导下完成的，三年来，论文最初的开题、实验设计到论文的撰写及修改等过程，导师都倾注了大量的心血和汗水，导师清晰的科研思路、严谨的治学态度、耐心的教导以及对小麦育种事业执着的追求时刻鼓舞着我。导师宽厚待人的风格和谆谆的教诲使我受益终生。值此论文完成之际，我谨向李老师和刘老师表达最衷心的感谢！师恩深重，将永远铭刻于心。

感谢实验室李艳军老师在实验仪器操作和具体实验处理中给予的指导。同时感谢孙杰、齐军仓、和孔广超教授，以及李诚、李春艳、刘峰、刘永昌、薛飞和李召锋老师在实验中提供的帮助。

感谢师兄李淼淼、南富波、王昊龙；师妹李咏、蔡曼、林静在生活和实验中给予的帮助。同时感谢汤丽魁、耿文超、林立昊、李会会、张润琪等研究生在试验中默契的配合。

尤其感谢一直支持我的家人，在我求学的7年来，任由我自由的追逐自己的梦想，是你们默默的支持和无私的付出，才使我顺顺利利走到现在。

最后，向论文评阅和答辩委员会的所有专家及在论文完成过程中提供帮助的所有人员表示我衷心的感谢！

追梦的道路上，捡自己喜欢的石头，粉上自己想要的颜色，只要我还年轻，我就会去拼搏！

韩俊杰  
2016年6月

## 石河子大学硕士研究生学位论文

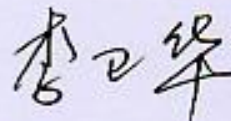
## 导师评阅表

研究生姓名	韩俊杰	学制	三年
专业	作物遗传育种	研究方向	植物重要农艺性状基因克隆与功能研究

## 学术评语:

韩俊杰同学的毕业论文“小麦淀粉合成关键酶基因SNP多态性及与淀粉合成的相关分析”，通过同源克隆的方法获得小麦淀粉合成关键酶基因*SS IIa*、*SBE IIa*和*SBE IIb*的开放阅读框，共挖掘出90个SNP位点，通过时间飞行质谱法检测；并以淀粉含量不同的小麦品种（系）群体为材料，进行SNP关联分析，筛选出*SS IIa*-rs31和*SBE IIa*-rs10位点与支链淀粉含量显著相关，这两个可作为SNP标记开发的候选基因位点，为开展淀粉品质改良分子标记辅助选择育种提供了理论基础，具有重要的实践意义。

该论文结构和研究方法合理，选题具有新颖性，研究工作密切结合小麦品质改良；工作量大，内容充实，实验数据准确，论文写作逻辑清晰，实验结论真实可靠。

指导教师签字: 

2016年5月30日