

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2009.00844

# 小麦糯性基因的多重 PCR 分子鉴定

卢龙斗<sup>1</sup>, 侯彩玲<sup>1</sup>, 陈龙<sup>2</sup>, 殷贵鸿<sup>3</sup>, 邓传良<sup>1</sup>, 高武军<sup>1</sup>, 杨绪勤<sup>1</sup>, 谭光轩<sup>2</sup>

1. 河南师范大学生命科学学院, 新乡 453007;
2. 河南省周口师范学院生命科学系, 周口 466000;
3. 河南省周口市农业科学院, 周口 466001

**摘要:** 采用多重 PCR 的方法, 对其反应条件进行优化, 以获得用于小麦糯性(Wx)基因分析的稳定 PCR 体系。应用两对引物, 分别扩增小麦 *Wx-A1*、*Wx-B1*、*Wx-D1* 基因, 目的片段大小分别为: 230 bp/265 bp、854 bp 和 204 bp。经反复验证, 结果准确可靠, 重复性好, 成本低, 可以在同一 PCR 反应体系中对 3 个 Wx 基因进行同时筛选鉴定。该体系可用于 Wx 蛋白基因的分子标记辅助选择, 可以提高小麦淀粉品质评价和糯麦选育的效率。

**关键词:** 小麦; Wx 基因; 多重 PCR; 分子标记辅助选择

## Molecular identification on Waxy genes in wheat using multiple-PCR

LU Long-Dou<sup>1</sup>, HOU Cai-Ling<sup>1</sup>, CHEN Long<sup>2</sup>, YIN Gui-Hong<sup>3</sup>, DENG Chuan-Liang<sup>1</sup>, GAO Wu-Jun<sup>1</sup>, YANG Xu-Qin<sup>1</sup>, TAN Guang-Xuan<sup>2</sup>

1. College of Life Science, Henan Normal University, Xinxian 453007, China;
2. Department of Life Science, Zhoukou Normal University, Henan Province Zhoukou 466000, China;
3. Zhoukou Institute of Agricultural Science, Henan Province Zhoukou 466001, China

**Abstract:** Multiple-PCR was conducted to establish a stable PCR system for identifying the three Wx genes in wheat. Two pairs of primers were employed to amplify *Wx-A1*, *Wx-B1*, and *Wx-D1* genes of wheat, with the target sequences of 230 bp/265 bp, 854 bp, and 204 bp, respectively. The results showed that *Wx-A1*, *Wx-B1*, and *Wx-D1* can be detected simultaneously in a single reaction. This method proved to be repeatable and low cost for evaluation of wheat quality properties in breeding program. This multiple-PCR technique can be efficiently used in marker-assisted selection for Wx genes, which will improve selection procedure for waxy wheat.

**Keywords:** wheat; Wx gene; multiple-PCR; molecular marker-assisted selection

普通小麦(*Triticum aestivum* L.)中淀粉粒束缚态淀粉合成酶 (Granules-bound starch synthase, GBSS), 是淀粉合成过程中的关键酶, 又称蜡质蛋白或 Wx 蛋白, 含有 Wx-A1、Wx-B1 和 Wx-D1 3 个亚基, 分别由 *Wx-A1*、*Wx-B1* 和 *Wx-D1* 3 个基因编码<sup>[1, 2]</sup>, 这 3 个基因分别位于 7AS、4AL 和 7DS 染色体

上<sup>[3, 4]</sup>。后来发现这 3 种 Wx 蛋白亚基均出现了缺失类型, 从而把野生型等位基因称为 *Wx-A1a*、*Wx-B1a* 和 *Wx-D1a*。对应的缺失型等位基因称为 *Wx-A1b*、*Wx-B1b* 和 *Wx-D1b*。Wx 蛋白控制籽粒中直链淀粉的合成, 单个亚基或全部 Wx 蛋白的缺失均会影响小麦籽粒的直链淀粉含量。缺失一个或两个 Wx 蛋白亚基,

收稿日期: 2008-12-23; 修回日期: 2009-04-05

基金项目: 河南省重点科技攻关项目(编号: 072102120011)资助

作者简介: 卢龙斗(1954-), 男, 博士, 教授, 硕士生导师, 研究方向: 植物遗传学。Tel: 0373-3326341; E-mail: lld5910@yahoo.com

称为部分糯小麦, 3 种  $Wx$  蛋白亚基全部缺失的小麦籽粒直链淀粉含量极低, 称为全糯小麦。

近年来, 随着育种学家对小麦淀粉合成相关基因遗传变异分子机制认识的不断深入,  $Wx$  蛋白的野生型及突变基因已被相继克隆<sup>[5-9]</sup>, 特别是 Murai 等<sup>[5]</sup>分离和识别了六倍体小麦的 3 个  $Wx$  基因, 以及 Vrinten 等<sup>[6]</sup>分析了这 3 个基因在 DNA 序列上的特点, 极大地促进了  $Wx$  基因分子标记技术的发展。目前, 国内外已开发了多种  $Wx$  基因的分子标记成功用于分子标记辅助育种<sup>[10-17]</sup>, 但还有很多不足, 如部分标记为显性标记不能区分杂合体, 从而不能应用于高代的选择, 部分 PCR 扩增产物必须用聚丙烯酰胺凝胶电泳观察等。Nakamura 等<sup>[18]</sup>根据 3 个  $Wx$  基因的已知序列分别获得了  $Wx-A1$  和  $Wx-D1$  位点的共显性标记, 及  $Wx-B1$  位点的显性标记。他们还尝试了多重 PCR 反应, 利用毛细电泳同时检测  $Wx-B1$  和  $Wx-D1$  位点的缺失, 为鉴定部分糯性小麦的  $Wx$  基因型提供了快速、简便的方法。Shariflou 等<sup>[19]</sup>报道了能同时鉴定 3 个位点的 PCR 标记, 但  $Wx-B1$  位点仍是显性标记, 他们还得到一个与  $Wx-B1$  连锁的共显性 SSR 标记。张晓科等<sup>[20]</sup>利用三对引物建立了小麦糯性基因检测的多重 PCR 体系, 但仍存在条带模糊不清, 电泳难以分离等问题, 给分子标记辅助选择带来诸多不便。本研究利用已经报道  $Wx-A1$ 、 $Wx-D1$  基因的 SSR<sup>[21]</sup>和  $Wx-B1$  基因的 MAG267<sup>[22]</sup>特异分子标记, 通过摸索 PCR 反应组分和循环参数对多重 PCR 反应结果的影响, 对已知基因型的品种进行检测, 并在  $Wx$  蛋白单向 SDS-PAGE 上进行了验证, 建立一次反应能够同时鉴定  $Wx-A1$ 、 $Wx-D1$  和  $Wx-B1$  基因的多重 PCR 反应体系, 旨在为  $Wx$  基因鉴定筛选提供快速高效的分子标记辅助选择方法, 从而提高小麦淀粉品质评价和糯小麦的选育效率。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 供试材料

供试小麦材料见表 1。中国春(CS)、糯麦 1902 由中国农大刘广田先生惠赠; 关东 107、江苏白火麦由中国农科院殷贵鸿博士惠赠; 其余各品种均来自河南省周口市农科院。

遗传分析群体为矮抗 58 × 糯麦 1902 的  $F_2$  群体, 共 73 个单株。亲本矮抗 58 的 3 种  $Wx$  蛋白均为野生型, 糯麦 1902 为糯小麦。

表 1 10 个小麦品种  $Wx$  蛋白基因型组成

品种	糯性基因		
	$Wx-A1$	$Wx-B1$	$Wx-D1$
中国春	$Wx-A1a$	$Wx-B1a$	$Wx-D1a$
糯麦 1902	$Wx-A1b$	$Wx-B1b$	$Wx-D1b$
关东 107	$Wx-A1b$	$Wx-B1b$	$Wx-D1a$
江苏白火麦	$Wx-A1a$	$Wx-B1a$	$Wx-D1b$
豫麦 47	$Wx-A1a$	$Wx-B1b$	$Wx-D1a$
矮抗 58	$Wx-A1a$	$Wx-B1a$	$Wx-D1a$
周麦 18	$Wx-A1a$	$Wx-B1a$	$Wx-D1a$
周麦 9823	$Wx-A1a$	$Wx-B1a$	$Wx-D1a$
新麦 19	$Wx-A1a$	$Wx-B1a$	$Wx-D1a$
新麦 208	$Wx-A1a$	$Wx-B1a$	$Wx-D1a$

注: “a”: 表示野生型; “b”: 表示突变型。

#### 1.1.2 多重 PCR 所用的引物

本体系涉及 3 个基因的标记, 其引物序列和 PCR 预期扩增条带的大小列于表 2。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 DNA 提取

对照品种及群体各单株的 DNA 提取按 CTAB 法<sup>[23]</sup>, 略有修改。

#### 1.2.2 多重 PCR 扩增及电泳检测

25  $\mu$ L 含 1 × buffer (10 mmol/L Tris-HCl pH 8.3, 50 mmol/L KCl); 2.0 mmol/L  $MgCl_2$ ; 800  $\mu$ mol/L dNTP; SSR 引物为 0.1  $\mu$ mol/L~0.11  $\mu$ mol/L, MAG267 引物为 0.1  $\mu$ mol/L~0.09  $\mu$ mol/L, 引物之比为 1~1.22; 模板 DNA 200 ng; *Taq* DNA 聚合酶 1 U。扩增参数: 95 预变性 3 min; 然后 94 变性 1 min, 58 复性 1 min, 72 延伸 1 min, 6 个循环; 再进行 94 变性 1 min, 58 复性 50 s, 72 延伸 30 s, 26 个循环; 最后 72 延伸 6 min。电泳检测: 扩增产物中加入 2  $\mu$ L 加样缓冲液, 取 10  $\mu$ L 在含有溴化乙锭的 2.0% 琼脂糖凝胶上电泳分离, 缓冲体系为 1×TAE 溶液, 130 V 电泳 45 min, 紫外灯下观察并照相。为保证结果的稳定性和可靠性, 每份材料重复扩增 3 次以上。

#### 1.2.3 $Wx$ 蛋白单向 SDS-PAGE 检测

从半粒成熟小麦种子中提取  $Wx$  蛋白, 加入变

表 2 基因引物序列及其扩增片段大小

引物	引物序列(5' 3')正向/反向	扩增片段大小(bp)	基因/位点	参考文献
SSR	CGCTCCCTGAAGAGAGAAAGAA ATAGGCACAACCCCTAAC	230/265 204/-	<i>Wx-A1a/b</i> <i>Wx-D1a/b</i>	[21]
MAG267	TCTTTTCGTCGCTCAACATTC AACTTGTCTTGCGGG	854/-	<i>Wx-B1a/b</i>	[22]

性剂, 采用浓缩胶浓度 4.5%, 分离胶浓度 15% 进行 SDS-PAGE 检测。参照姚大年等 [24] 及王子宁等 [25] 实验方法, 略有改进。

## 2 结果与分析

### 2.1 多重 PCR 检测结果分析

检测 10 个材料的结果显示(图 1A): (1) 糯麦 1902 和关东 107 两个材料扩增出约 230 bp 的条带, 而其余 8 个材料扩增出了 265 bp 的条带; (2) 糯麦 1902、关东 107 和豫麦 47 三个品种未扩增出 854 bp 的条带, 而其余 7 个品种产生了 854 bp 的条带; (3) 糯麦 1902 和江苏白火麦两个材料未扩增出 204 bp 的条带, 而其余 8 个品种产生了 204 bp 的条带。

### 2.2 SDS-PAGE 分析已知亚基组成的小麦品种的 Wx 蛋白组成

以牛血清蛋白 66.4 kDa 为标准, 利用 SDS-PAGE 方法对已知基因型的中国春(CS)、糯麦 1902、关东 107、江苏白火麦、豫麦 47、矮抗 58、周麦 18、周麦 9823、新麦 19 和新麦 208 等 10 个品种进行了分析(图 1B)。结果显示: 对照品种中国春、矮抗 58、周麦 18、周麦 9823、新麦 19 和新麦 208 显示出 62.8

kDa、58.7 kDa 和 56.7 kDa 的 3 条蛋白带, 3 个亚基均不缺失, 为野生型。糯麦 1902 没有任何 Wx 蛋白带, 缺失 3 个 Wx 蛋白亚基。关东 107 只显示 Wx-D1 蛋白带, 缺失 Wx-A1 和 Wx-B1 蛋白。江苏白火麦显示 Wx-A1 和 Wx-B1 蛋白带, 缺失 Wx-D1 蛋白。豫麦 47 显示 Wx-A1 和 Wx-D1 蛋白带, 缺 Wx-B1 蛋白。

### 2.3 多重 PCR 方法对 F<sub>2</sub> 分离群体的检测

用多重 PCR 体系对组合矮抗 58 × 糯麦 1902 的 F<sub>2</sub> 分离群体中的 73 株个体进行了筛选(部分结果见图 2)。得到了全部 8 种 Wx 基因型(表 3), 野生型 A\_B\_D\_ 型

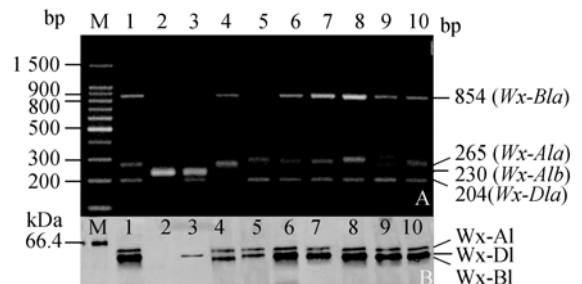


图 1 3 种 Wx 蛋白亚基基因标记多重 PCR 琼脂糖凝胶电泳图谱(A)及 10 种小麦 Wx 蛋白 SDS-PAGE 电泳图谱(B) M(A): DL100 Marker; M(B): 蛋白质分子量标准(66.4 kDa); 1: 中国春; 2: 糯麦 1902; 3: 关东 107; 4: 江苏白火麦; 5: 豫麦 47; 6: 矮抗 58; 7: 周麦 18; 8: 周麦 9823; 9: 新麦 19; 10: 新麦 208。

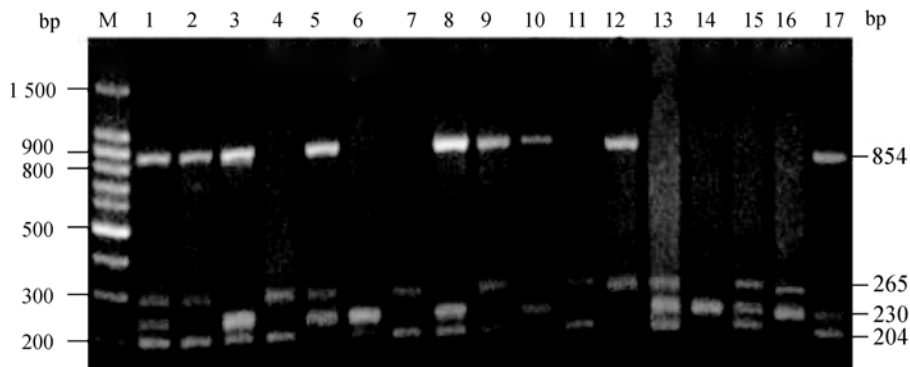


图 2 矮抗 58 与糯麦 1902 的 F<sub>2</sub> 群体部分单株 Wx 基因检测结果

2, 9: A\_B\_D\_ 型; 1: AaB\_D\_ 型; 14: aabbdd 型; 6: aabbD\_ 型; 3, 8, 17: aaB\_D\_ 型; 12: A\_B\_dd 型; 5: AaB\_dd 型; 4, 7, 11: A\_bbD\_ 型; 13, 15: Aabbd\_ 型; 16: Aabdd 型; 10: aaB\_dd 型。

表 3 对矮抗 58 × 糯麦 1902 杂种 F<sub>2</sub> 群体的鉴定结果

基因型	SSR 引物检测 (bp)	MAG267 引物检测(bp)	双引物检测(bp)	Wx 蛋白缺失类型
<i>A_B_D_</i>	265 或 265/230; 204	854	265 或 265/230; 854; 204	—
<i>aaB_D_</i>	230; 204	854	230; 854; 204	Wx-A1
<i>A_bbD_</i>	265 或 265/230; 204	—	265 或 265/230; 204	Wx-B1
<i>A_B_dd</i>	265 或 265/230	854	265 或 265/230; 854	Wx-D1
<i>A_bbdd</i>	265 或 265/230	—	265 或 265/230	Wx-B1、 Wx-D1
<i>aaB_dd</i>	230	854	854	Wx-A1、 Wx-D1
<i>aabbD_</i>	230; 204	—	854	Wx-A1、 Wx-B1
<i>aabbdd</i>	230	—	230	Wx-A1、 Wx-B1、 Wx-D1

56 株；单缺型*aaB\_D\_* 3 株、*A\_bbD\_* 6 株、*A\_B\_dd* 2 株；双缺型*A\_bbdd* 2 株、*aaB\_dd* 2 株、*aabbD\_* 1 株；全糯型*aabbdd* 1 株。其中*A\_bbdd*、*aaB\_dd*和*aabbdd* 3 种类型在自然界中不存在<sup>[12]</sup>。这一结果与单引物检测及蛋白检测结果一致。

3 讨论

3.1 多重 PCR 检测方法的可行性

*Wx-A1*、*Wx-D1* 基因的SSR标记在*Wx-A1* 位点呈共显性<sup>[26]</sup>，在*Wx-A1a*和*Wx-A1b*位点分别扩增出 265 bp和约 230 bp的特异性条带，可以检测*Wx-A1* 位点的纯合与杂合基因型。该标记在*Wx-D1* 位点呈显性，在*Wx-D1a*位点可扩出约 204 bp的条带，而在*Wx-D1b*位点没有 204 bp特异性条带的出现。*Wx-B1* 位点的标记MAG267 是*Wx-B1* 基因的显性标记<sup>[22]</sup>，在*Wx-B1a*位点能够扩增出 854 bp的条带，而在*Wx-B1b*位点不能扩增出该条带。图 1A 表明：糯麦 1902、关东 107 的*Wx-A1* 位点为*Wx-A1b*等位基因，推测缺失Wx-A1 蛋白亚基，而其余 8 个材料在该位点为*Wx-A1a*等位基因，推测含Wx-A1 蛋白亚基；糯麦 1902、关东 107、豫麦 47 的*Wx-B1* 位点为*Wx-B1b*等位基因，推测缺失Wx-B1 蛋白亚基，而其余 7 个材料在该位点为*Wx-B1a*等位基因，推测含Wx-B1 蛋白亚基；糯麦 1902、江苏白火麦*Wx-D1* 位点为 *Wx-D1b*等位基因，推测缺失Wx-D1 蛋白亚基，相反，其余 8 个材料被推断为含该蛋白亚基。

小麦种子胚乳Wx蛋白(平均分子量 60 kDa)可分为 3 个亚基：Wx-A1(62.8 kDa)，Wx-D1(58.7 kDa)和Wx-B1(56.7 kDa)<sup>[22]</sup>，分别由*Wx-A1*、*Wx-D1* 和*Wx-B1* 3 个基因编码，基因为显性时，可从电泳图谱上检测到该蛋白亚基，基因缺失时，电泳图谱上看

不到该蛋白亚基。图 1B 表明：糯麦 1902 缺失 3 个 Wx 蛋白亚基；关东 107 缺失 Wx-A1 和 Wx-B1 蛋白；江苏白火麦缺失 Wx-D1 蛋白；豫麦 47 缺失 Wx-B1 蛋白。可以看出(图 1:A, B)，在供试材料中，由多重 PCR 检测结果推断出的糯蛋白亚基组成与 SDS-PAGE 电泳的结果是一致的。而且用本体系对矮抗 58 ×糯麦 1902 杂种 F<sub>2</sub> 分离群体的检测结果也与单引物和蛋白鉴定的结果一致。说明本多重 PCR 体系是完全可行的。且经多次 PCR 验证结果稳定可靠，可以用于在同一反应体系中对 3 个 Wx 基因进行同时筛选鉴定。

3.2 多重 PCR 检测方法的优势及缺点

本研究在常规PCR反应体系上，利用Shariflou等<sup>[21]</sup>设计的*Wx-A1* 与*Wx-D1* 位点和刘迎春等<sup>[22]</sup>设计的*Wx-B1* 位点的引物组合，构建了糯小麦多重PCR 体系，与Nakamura等<sup>[18]</sup>、Shariflou等<sup>[19]</sup>和张晓科等<sup>[20]</sup>开发的糯小麦多重PCR体系相比，用的引物少，扩增的条带数量减少，条带之间的差异增大，采用一般的琼脂糖凝胶和电泳仪就容易分辨扩增条带，这表明本体系在小麦淀粉品质评价和糯麦选育中有很大的应用价值。但本体系涉及 3 个基因的标记，只有*Wx-A1* 位点的标记为共显性，在分离后代鉴定中存在一定的局限性，不能区分*Wx-B1* 和*Wx-D1* 位点是显性纯合还是杂合。事实上，在本体系的构建过程中，一开始选用刘迎春等<sup>[17]</sup>开发的*Wx-D1* 位点的共显性标记MAG269，但经很多多次重复扩增都未得到理想的效果。最近Nakamura等<sup>[28]</sup>已开发出 *Wx-B1* 的共显性标记，如能开发出 3 个 Wx 位点均为共显性标记的多重 PCR 的方法，在育种实践中将具有更大的利用价值。



## 参考文献(References):

- [1] Yamamori M, Nakamura T, Endo TR, Nagamine T. Waxy protein deficiency and chromosomal location of coding genes in common wheat. *Theor Appl Genet*, 1994, 89(2-3): 179-184.
- [2] Yamamori M, Nakamura T, Kuroda A. Variations in the content of starch-granule bound protein among several Japanese cultivars of common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Euphytica*, 1992, 64(3): 215-219. [\[DOI\]](#)
- [3] Nakamura T, Yamamori M, Hirano H, Hidaka S. Identification of three Wx proteins in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Biochem Genet*, 1993, 31(1-2): 75-86. [\[DOI\]](#)
- [4] Yamamori M, Endo TR. Variation of starch granule proteins and chromosome mapping of their coding genes in common wheat. *Theor Appl Genet*, 1996, 93(1-2): 275-281. [\[DOI\]](#)
- [5] Murai J, Taira T, Ohta D. Isolation and characterization of the three Waxy genes encoding the granule-bound starch synthase in hexaploid wheat. *Gene*, 1999, 234(1): 71-79. [\[DOI\]](#)
- [6] Vrinten P, Nakamura T, Yamamori M. Molecular characterization of waxy mutations in wheat. *Mol Gen Genet*, 1999, 261(3): 463-471. [\[DOI\]](#)
- [7] Yan L, Bhavé M, Fairclough R, Konik C, Rahman S, Appels R. The genes encoding granule-bound starch synthases at the waxy loci of the A, B, and D progenitors of common wheat. *Genome*, 2000, 43(2): 264-272. [\[DOI\]](#)
- [8] Yan L, Bhavé M. Sequences of the waxy loci of wheat: utility in analysis of waxy proteins and developing molecular markers. *Biochem Genet*, 2000, 38(11-12): 391-411. [\[DOI\]](#)
- [9] Monari AM, Simeone MC, Urbano M, Margiotta B, Lafiandra D. Molecular characterization of new waxy mutants identified in bread and durum wheat. *Theor Appl Genet*, 2005, 110(8): 1481-1489. [\[DOI\]](#)
- [10] Shariflou MR, Hassani ME, Sharp PJ. A PCR-based DNA marker for detection of mutant and normal alleles of the Wx-D1 gene of wheat. *Plant Breed*, 2001, 120(2): 121-124. [\[DOI\]](#)
- [11] McLauchlan A, Ogonnaya FC, Hollingsworth B, Carter M, Gale KR, Henry RJ, Holton TA, Morell MK, Rampling LR, Sharp PJ, Shariflou MR, Jones MGK, Appels R. Development of robust PCR-based DNA markers for each homoeo-allele of granule-bound starch synthase and their application in wheat breeding programs. *Aust J Agric Res*, 2001, 52(12): 1409-1416. [\[DOI\]](#)
- [12] 梁荣奇, 张义荣, 刘守斌, 李保云, 谷丹, 唐朝晖, 刘广田. 利用 Wx 基因分子标记辅助选择培育糯性小麦. *遗传学报*, 2001, 28(9): 856-863.
- [13] 梁荣奇, 张义荣, 姚大年, 李保云, 尤明山, 刘广田. 小麦淀粉品质改良的综合标记辅助选择体系的建立. *中国农业科学*, 2002, 35(3): 245-249.
- [14] 梁荣奇, 张义荣, 唐朝晖, 刘守斌, 李保云, 尤明山, 刘广田. 利用 Wx 基因分子标记辅助选择培育面条专用优质小麦. *农业生物技术学报*, 2001, 9(3): 269-273.
- [15] 宋建民, 李保云, 尤明山, 梁荣奇, 常成, 刘守斌, 唐朝晖, 刘广田. 小麦淀粉粒束淀粉合成酶基因多态性的分子鉴定. *遗传学报*, 2004, 31(1): 81-86.
- [16] 任丽娟, 蔡士宾, 马鸿翔, 张旭, 周森平. 用一个 SSR 标记快速检测小麦杂种后代 Waxy 基因型. *麦类作物学报*, 2004, 24(3): 9-12.
- [17] 刘迎春, 朱惠兰, 程顺和, 马正强. 小麦 Wx-A1 和 Wx-D1 位点的 PCR 分子标记. *麦类作物学报*, 2005, 25(1): 1-5.
- [18] Nakamura T, Vrinten P, Saito M, Konda M. Rapid classification of partial waxy wheats using PCR-based markers. *Genome*, 2002, 45(6): 1150-1156. [\[DOI\]](#)
- [19] Shariflou MR, Hassani ME, Good G, Sharp PJ. Tightly linked DNA markers for the waxy loci in bread wheat. Tenth International Wheat Genetics Symposium, 2003, 2: 831-834.
- [20] 张晓科, 夏先春, 王忠伟, 万映秀, 张平治, 何心尧, 杨燕, 何中虎. 小麦品质性状分子标记多重 PCR 体系的建立. *作物学报*, 2007, 33(10): 1703-1710.
- [21] Shariflou MR, Sharp PJ. A polymorphic microsatellite in the 3' end of 'waxy' genes of wheat, *Triticum aestivum*. *Plant Breed*, 1999, 118(3): 275-277. [\[DOI\]](#)
- [22] 刘迎春. 小麦 Wx 基因分子标记及其应用[学位论文]. 南京农业大学, 2004.
- [23] Saghai-Marouf MA, Soliman KM, Jorgensen RA, Allard RW. Ribosomal DNA spacer length polymorphisms in barley: mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984, 81(24): 8014-8018. [\[DOI\]](#)
- [24] 姚大年, 王新望, 刘志勇, 刘广田. 小麦品种 Waxy 蛋白的鉴定和筛选. *农业生物技术学报*, 1999, 7(1): 1-9.
- [25] 王子宁, 郭北海, 李洪杰, 张艳敏, 温之雨. 多倍体麦类作物 Wx 蛋白检测的 SDS-PAGE 方法. *遗传*, 2000, 22(3): 169-171.
- [26] 余春梅, 陈佩度. 普通小麦(*T. aestivum* L.) Waxy 蛋白种质资源研究. *南京农业大学学报*, 2003, 26(3): 1-6.
- [27] Zhao XC, Sharp PJ. An improved 1D-SDS-PAGE method for the identification of three bread wheat 'waxy' proteins. *J Cereal Sci*, 1996, 23(2): 191-193. [\[DOI\]](#)
- [28] Saito M, Vrinten P, Ishikawa G, Graybosch R, Nakamura T. A novel codominant marker for selection of the null Wx-B1 allele in wheat breeding programs. *Mol Breed*, 2009, 23: 209-217. [\[DOI\]](#)