

我国小麦主推品种穗发芽抗性鉴定 及相关分子标记的评价

孙果忠^{1,2}, 游光霞¹, 孙京燕², 张秀英¹, 武淑祯², 苑 菲¹, 王海波², 肖世和¹

(1. 中国农业科学院 作物科学研究所, 北京 100081; 2. 河北省农林科学院 遗传生理研究所, 河北 石家庄 050051)

摘要: 为了培育抗穗发芽品种, 对我国 10 个小麦主产省份的 75 个品种进行了穗发芽抗性鉴定, 同时利用 3 个分子标记 *Vp1B3*、*Xbarc310* 和 *Barc294* 对上述品种进行了分子检测。结果表明, 不同品种间穗发芽抗性存在明显差异。*Vp1* 基因的等位变异与穗发芽抗性关系不密切, *Vp1B3* 标记难以用于品种的穗发芽抗性筛选。主效 QTL (*QPhs-3AS*) 与种子休眠关系密切, *Xbarc310* 和 *Barc294* 可作为穗发芽抗性选择的重要参考, 且 *Barc294* 较 *Xbarc310* 的选择效果好。上述结果为抗穗发芽小麦品种的改良和推广提供了重要信息。

关键词: 小麦; 穗发芽; 分子标记

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2010)04-0006-06

Identification on Pre-harvest Sprouting Resistance and Evaluation to Related Molecular Markers in Chinese Wheat Cultivars

SUN Guo-zhong^{1,2}, YOU Guang-xia¹, SUN Jing-yan², ZHANG Xiu-ying¹,
WU Shu-zhen², YUAN Fei¹, WANG Hai-bo², XIAO Shi-he¹

(1. Institute of Crop Science, Chinese Academy of Agriculture Science, Beijing 100081, China;

2. Institute of Genetics and Physiology, Hebei Academy of Agriculture and Forestry
Sciences, Shijiazhuang 050051, China)

Abstract: Pre-harvest sprouting (PHS) in wheat is an important problem that results in significant economic loss to farmers. In this study, the PHS resistances of 76 Chinese wheat cultivars collected from ten wheat growing provinces were identified; Moreover, the distribution of three molecular markers *Vp1B3*, *Xbarc310* and *Barc294* associated with PHS resistance in the 75 cultivars was identified aimed to evaluate the efficiency of these markers in selecting genotypes with higher PHS resistances. The results indicated that there is significant difference of PHS resistances in above wheat cultivars. The allelic variations of *Vp1* gene are not associated with the PHS resistance; *Vp1B3* was non-specific and unsuitable for marker assisted selection (MAS) in breeding. The 3As QTL (*QPhs-3AS*) is a critical component of seed dormancy, *Xbarc310* and *Barc294* were specific and suitable for MAS. The usefulness of current information in wheat breeding is discussed.

Key words: Wheat; Pre-harvest sprouting; Molecular marker

小麦穗发芽(Pre-harvest sprouting, 简称 PHS)是指收获前遇到阴雨天气时籽粒在穗上发芽的现象, 是一种世界性的气候灾害。穗发芽不仅降低产量而且严重劣化品质和种用价值, 给生产者造成重大经济损失^[1,2]。在我国, 长江中下游、西南冬麦区和东

北春麦区是穗发芽危害频繁和严重的地区, 黄淮和北部冬麦区也时有发生, 受穗发芽危害的麦区约占全国小麦总面积的 83%^[3]。近年来, 在我国小麦主产区的河北、河南、山东、江苏、安徽、湖北和四川等省份的部分地区, 发生了多次严重的穗发芽, 给小麦

收稿日期: 2010-06-19

基金项目: 国家重点基础研究发展计划项目(2009CB118306); 中国农业科学院委托课题(nyeytx-03); 河北省财政专项(2009055001)

作者简介: 孙果忠(1973-), 男, 河北青县人, 副研究员, 博士, 主要从事小麦遗传育种研究。

通讯作者: 肖世和(1955-), 男, 四川广汉人, 研究员, 博士, 主要从事小麦遗传育种研究。

王海波(1960-), 男, 河北满城人, 研究员, 博士, 主要从事小麦遗传育种研究。

种植户带来重大损失。培育和推广抗穗发芽品种已经成为小麦生产上十分迫切的要求。

田间的穗发芽表现是基因型与环境互作的结果,涉及因素极其复杂,而且往往多个因素交织在一起,育种实践中难以把握。许多学者认为,种子的胚缺乏休眠性是导致小麦发生穗发芽的主要原因^[4]。在小麦育种中,种子休眠性被认为是一个最主要的抗穗发芽筛选标准,其他的抗性机制,如种皮的吸水性、颖片内的萌发抑制物等易受品种遗传背景和环境因素影响,难以利用^[5]。小麦种子的休眠是一个复杂的数量性状,既受种皮、胚和胚乳等遗传结构控制^[6,7],也受种子发育至后熟过程中的各种环境因素影响^[1,2]。利用分子标记辅助选择目标基因是培育抗穗发芽品种的重要途径。国内外学者利用不同的群体定位出了多个不同的休眠 QTL 位点^[8-16],但至今并没有在育种中成功应用的报道。研究表明,定位于 3AS 上的主效 QTL (*QPhs-3AS*) 与控制种子休眠密切相关^[12,15]。张海萍^[15]在 3AS 上鉴定出一个控制休眠的主效 QTL (*QPhs-3AS*),可解释的表型变异为 35.1%~43.7%,SSR 标记 *Barc294* 和 *Xbarc310* 与其紧密连锁。*Vp1* 基因是编码一个诱导和维持玉米种子休眠的种子专一性的转录因子^[17]。Yang 等^[18]根据小麦 *Vp1* 基因的保守序列开发了与穗发芽抗性相关的 STS 标记 *Vp1B3*,在抗穗发芽品种中扩增出 845 bp 或 569 bp 片段,在易穗发芽品种中扩增出 652 bp 片段。由于穗发芽抗性受多个位点控制,因此利用现有分子标记明确不同品种中的抗性遗传构成,并进行相关遗传位点的聚合,就有望培育出抗穗发芽

的品种。

本研究对我国 10 个小麦主产省份的 75 个品种进行了穗发芽抗性鉴定,同时利用国内学者报道的分子标记对上述品种进行了分子鉴定,旨在为小麦品种的遗传改良和推广应用提供参考。

1 材料和方法

1.1 试验材料及处理

以 75 份小麦品种为试材(表 2),选择标准是我国小麦各产区目前的主推品种和少数历史上推广面积较大的品种,地方品种永川白麦子为抗穗发芽对照。将上述材料的种子在培养皿中浸泡至露白后,于 2009 年 2 月 11 日采用“土里捂”的方法,种植在河北省农林科学院遗传生理研究所试验地(石家庄)。这些品种的抽穗期比正常秋播的品种晚 2~4 d,标记扬花期,在扬花 35 d 时收获成熟的穗子。

1.2 穗发芽抗性评价

剥取大小一致籽粒进行发芽率测定。籽粒先用自来水冲洗 5 次,然后腹沟朝下置于含双层湿润滤纸的培养皿内,50 粒/皿,2 个重复。盖上盖,以 parafilm 封口,25℃光照培养 3 d 后,以胚根突出种皮为萌发标准,统计每个品种的发芽情况。

1.3 穗发芽抗性相关分子标记的鉴定

利用 CTAB 法从幼苗叶片中提取基因组 DNA,根据文献[15,18]合成引物和 PCR 扩增反应(表 1)。*Vp1B3* 的 PCR 产物用 2.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测,*Barc294* 和 *Xbarc310* 的 PCR 产物用 6% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳检测。

表 1 穗发芽抗性标记的引物序列和 PCR 扩增

Tab.1 Sequence of primers and the PCR conditions for detection of molecular markers of PHS.

名称 Name	引物序列 Primer sequence	退火温度/℃ Ann. temp.	染色体 Chromosome	参考文献 Reference
<i>Vp1B3</i>	F: 5'-TGCTCCTTTCCCAATTGG-3' R: 5'-ACCCTCCTGCAGCTCATTG-3'	60	3BL	Yang 等 2007
<i>Xbarc310</i>	F: 5'-GGCGGCGCATGTGCACCTA-3' R: 5'-GCGTGGAAGCGACTAAATCAACT-3'	57	3AS	张海萍 2007
<i>Barc294</i>	F: 5'-ACGTCATCGAGCCCTTCTAT-3' R: 5'-AGAGACACGTTGCTACAAAGA-3'	50	3AS	

2 结果与分析

2.1 小麦品种的穗发芽抗性

对新收获的小麦籽粒进行皿上发芽实验。结果表明,不同省份间小麦品种的穗发芽抗性有一定差异,北京和河北的小麦品种穗发芽抗性较差,而河南和山东的品种穗发芽抗性较强;这可能与不同省份间的生态特性有关,北京与河北麦收时降雨年份较

少,因而育种上很少把穗发芽抗性做为选择标准。同一省份的小麦品种间的穗发芽抗性存在很大差异;如北京的中麦 11 与中麦 175,河北省的藁优 2018 与石麦 15,河南的郑麦 366 与郑麦 98 等。因此,同一生态区的抗穗发芽品种可以做为该地区抗穗发芽育种的亲本基础。红粒品种的穗发芽抗性一般较白粒品种强,但一些白皮品种的穗发芽抗性也很突出,如藁优 2018、郑麦 366 和小偃 54 等。

表 2 76 份小麦品种的穗发芽抗性和 3 个相关分子标记的评价

Tab.2 Evaluation on pre-harvest sprouting resistance of 76 cultivars and three related molecular markers

品 种 Cultivars	来源 Origin	粒色 Seed colour	发芽率/% Germination rate	分子标记 Molecular marker		
				<i>Xbarc310-3A</i>	<i>Barc294-3A</i>	<i>Vp1B3</i>
中麦 9 号 Zhongmai 9	北京 Beijing	白	56	N	N	652
中麦 12 Zhongmai 12		白	68	N	N	569
京 9428 Jing 9428		黄	56	Y	N	569
中麦 11 Zhongmai 11		白	36	N	N	569
中麦 175 Zhongmai 175	河北 Hebei	白	98	N	N	652
京冬 8 号 Jingdong 8		红	78	N	N	569
京 411 Jing 411		白	92	N	N	652
石 7012 Shi 7012		白	54	N	N	569
石 9306 Shi 9306		白	90	N	N	569
石 4185 Shi 4185		白	98	N	N	569
科农 199 Kenong 199		白	44	N	N	569
石新 616 Shixin 616		白	78	N	N	652
冀优 2018 Gaoyou 2018		白	10	N	Y	652
石 03-Y119 Shi03-Y119		白	80	N	N	569
邢麦 6 号 Xingmai 6		白	76	N	N	845
石家庄 8 号 Shijiazhuang 8		白	96	N	N	569
冀 5265 Ji 5265		白	60	N	N	569
沧 6002 Cang 6002		白	40	N	N	652
邯 4564 Han 4564		白	52	Y	N	569
师栾 02-1 Shiluan 02-1		白	42	N	N	569
邯 6172 Han 6172	河南 Henan	白	54	N	N	652
石麦 15 Shimai 15		白	100	N	N	569
金禾 9123 Jinhe 9123		白	82	N	N	569
冀城 8901 Gaocheng 8901		白	52	N	N	652
邯 7086 Han 7086		白	34	Y	N	652
石新 828 Shixin 828		白	30	N	N	652
郑麦 98 Zhengmai 98		黄	80	N	N	652
豫麦 50 Yumai 50		白	10	N	N	652
豫麦 66 Yumai 66		白	32	Y	N	569
豫麦 62 Yumai 62		白	52	N	N	652
豫麦 18 Yumai 18		白	66	N	N	652
综抗 58 Zongkang 58		白	14	N	N	569
郑麦 9023 Zhengmai 9023		白	36	N	N	569
周 98165 Zhou 98165		白	56	N	N	652
许科 1 号 Xuke 1		白	76	N	N	652
洛优 9909 Luoyou9909	山东 Shandong	白	18	N	N	569
新麦 18 Xinmai 18		白	44	N	N	652
豫麦 47 Yumai 47		白	12	Y	N	652
周麦 18 Zhoumai 18		白	64	N	N	652
兰考 8679 Lankao 8679		白	46	N	N	569
郑麦 366 Zhengmai 366		白	8	N	N	569
郑麦 004 Zhengmai 004		白	32	N	N	569
洛旱 7 号 Luohan 7		白	12	N	N	652
洛旱 2 号 Luohan 2		白	18	Y	N	569
洛旱 6 号 Luohan 6		白	10	N	N	652
周麦 20 Zhoumai 20		白	36	N	N	652
矮抗 58 Aikang 58		白	36	N	N	652
济麦 20 Jimai 20		白	14	N	N	569
烟农 19 Yannong19		白	50	N	N	569
泰山 23 Taishan 23		白	62	Y	N	569
鲁麦 22 Lumai 22		白	76	Y	N	652
鲁麦 15 Lumai 15		白	32	Y	N	569
济麦 22 Jimai 22		白	14	N	N	652
鲁麦 14 Lumai 14		白	66	N	N	569
徐州 21 Xuzhou21		白	58	N	N	569
鲁麦 23 Lumai 23		白	34	Y	N	652
济麦 19 Jimai 19		白	46	N	N	652

续表 2:

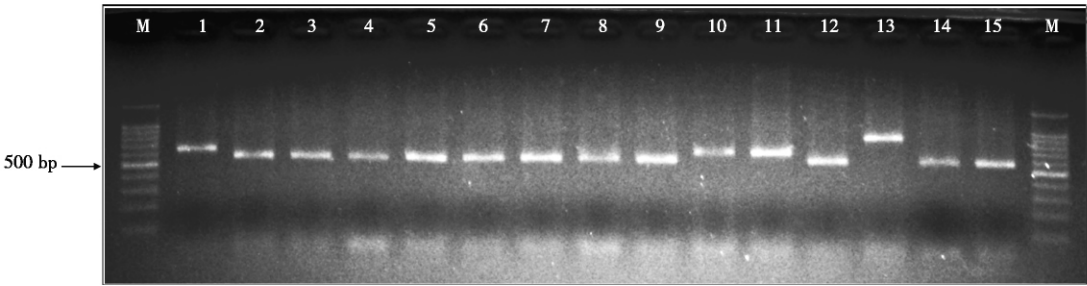
品 种 Cultivars	来源 Origin	粒 色 Seed colour	发芽率 / % Germination rate	分子标记 Molecular marker		
				<i>Xbarc310-3A</i>	<i>Barc294-3A</i>	<i>Vp1B3</i>
小偃 54 Xiaoyan 54	陕西	白	8	N	Y	569
小偃 22 Xiaoyan 22	Shanxi	白	56	N	N	845
小偃 6 号 Xiaoyan 6		白	10	N	N	652
西农 1376 Xinong 1376		白	26	N	N	652
西农 979 Xinong 979		白	22	N	N	569
扬麦 15 Yangmai 15	江苏	红	20	N	N	569
扬麦 13 Yangmai 13	Jiangsu	红	16	N	N	569
川麦 47 Chuanmai 47	四川	白	26	N	N	569
川麦 42 Chuanmai 42	Sichuan	红	24	N	N	569
绵麦 37 Mianmai 37		红	32	N	N	569
永川白麦子* Yongchuanbaimaizi*		白	0	Y	Y	845
晋麦 47 Jinmai 47	山西	白	26	N	N	569
临优 2069 Linyou 2069	Shanxi	白	18	N	N	652
临选 2035 Linxuan 2035		白	94	N	N	845
晋麦 73 Jinmai 73		白	54	N	N	569
皖麦 48 Wanmai 48	安徽	白	40	N	N	652
安农 91168 Annong 91168	Anhui	白	68	N	N	652
克旱 16 Kehan 16	黑龙江	红	6	N	N	569
克旱 21 Kehan 21	Heilongjiang	红	8	N	N	569

注: * . 永川白麦子为抗穗发芽品种对照 ,Y 和 N. 分别表示“有”和“无”目标片段。
Note: * . The positive control is PHS resistant Yongchuanbaimaizi; Y ,N. Have ,not have the target band ,respectively.

2.2 抗穗发芽相关的分子标记检测

利用 *Vp1B3* 标记对 76 份小麦品种进行检测 ,可扩增出 845 ,652 ,569 bp 3 种不同大小的 PCR 片段(图 1 表 2) ,表明在上述小麦品种中存在 3 种类型的 *Vp1* 基因等位变异 ,其频率分别为 5. 26% , 42. 11% 和 52. 63% 。 3 种 *Vp1* 基因等位变异类型品种的平均萌发率依次为 43. 11% , 45. 33% 和

45. 11% ; 同一 *Vp1* 基因等位变异类型中 ,品种间的穗发芽抗性差异明显 ,如 845 bp 的永川白麦子与临选 2035 ,652 bp 的冀优 2018 与中麦 175 ,569 bp 的小偃 54 与石麦 15(表 2) 。上述结果表明 ,*Vp1* 基因的等位变异与穗发芽抗性关系不密切 ,*Vp1B3* 标记难以用于品种的穗发芽抗性筛选。



1. 京 411; 2. 石 4185; 3. 石 7012; 4. 石 9306; 5. 邯 4564; 6. 师 02-4; 7. 石麦 15; 8. 金禾 9123; 9. 科农 199; 10. 石新 616; 11. 冀优 2018; 12. 石 03-Y119; 13. 邢麦 6 号; 14. 石家庄 8 号; 15. 冀 5265。
1. Jing 411; 2. Shi 4185; 3. Shi 7012; 4. Shi9306; 5. Han 4564; 6. Shiluan 02-4; 7. Shimai 15; 8. Jinhe 9123; 9. Kenong 199; 10. Shixin 616; 11. Gaoyou 2018; 12. Shi03-Y119; 13. Xingmai 6; 14. Shijiazhuang 8; 15. Ji 5265.

图 1 标记 *Vp1B3* 的 PCR 扩增结果

Fig. 1 The PCR fragments amplified with the marker *Vp1B3*

利用与 3AS 上的主效 QTL (*QPhs-3AS*) 紧密连锁的 SSR 标记 *Xbarc310* 进行检测 ,在京 9428、邯 4564、邯 7086、豫麦 66、豫麦 47、洛旱 2 号、泰山 23、鲁麦 22、鲁麦 15 和鲁麦 23 等 10 个品种中检测到了与永川白麦子相似的带型 ,占全部供试品种的 13. 15% (图 2) 。上述品种的萌发率均值为 31. 26% ,显著小于全部供试品种的萌发率均值

45% 。因此 SSR 标记 *Xbarc310* 可以做为穗发芽抗性选择的重要参考。

利用与 3AS 上的主效 QTL (*QPhs-3AS*) 紧密连锁的另一个 SSR 标记 *Barc294* 进行检测 ,在冀优 2018、小偃 54 上测到了与永川白麦子相似的带型 ,占全部供试品种的 2. 67% (图 3) 。这两个品种的平均萌发率为 9% ,极显著小于全部供试品种的萌

发率均值 45%。因此,SSR 标记 *Barc294* 可以用于 穗发芽抗性的分子标记辅助选择。



图 2 SSR 标记 *XBarc310* 的 PCR 扩增结果

Fig. 2 The PCR fragments amplified with the SSR marker *XBarc310*

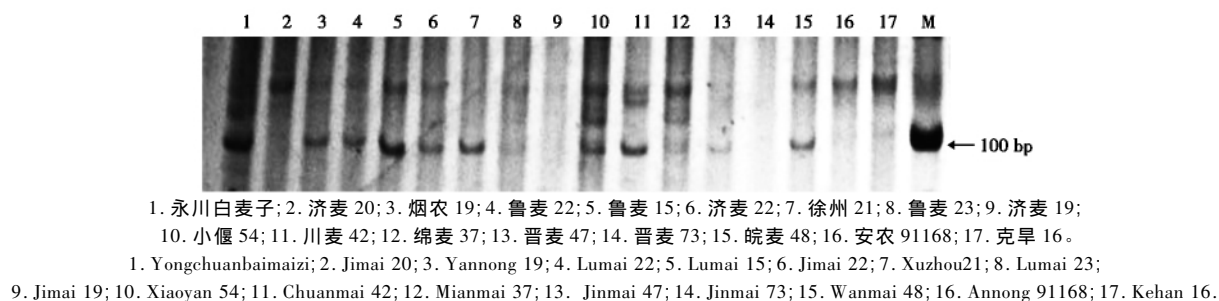


图 3 SSR 标记 *Barc294* 的 PCR 扩增结果

Fig. 3 The PCR fragments amplified with the SSR marker *Barc294*

3 讨论

3.1 小麦品种穗发芽抗性的评价

由于穗发芽受基因型与环境互作影响显著,如何快速准确的评价大量品种和后代材料的穗发芽抗性是育种家经常面临的问题。根据笔者前期的研究,无论种子或胚的萌发,易穗发芽基因型主要在 3 d 内完成,而抗穗发芽基因型则持续时间很长^[19]。本研究再次表明,处理 3 d 的种子萌发率可以很好的反映品种的穗发芽抗性;且该方法无需消毒,适宜对大量品种或后代材料进行快速筛选。本研究结果与冯继明等^[20]的报道一致。穗发芽抗性鉴定结果表明,现有主要推广品种中的郑麦 366、冀优 2018、小偃 6 号、小偃 54、洛旱 6 号和洛旱 7 号等抗性很好,这些品种可做为抗穗发芽育种的亲本。

3.2 小麦穗发芽抗性相关分子标记的有效性

开发小麦抗穗发芽的分子标记是近年来国内外的重点研究领域之一。目前,尚未见用分子标记辅助选择培育小麦抗穗发芽品种的报道。本研究中,利用 *Vp1B3* 功能标记检测 *VPI* 基因在小麦不同品种中的等位变异,表明该基因的等位变异与穗发芽抗性关系不密切,难以用于品种的穗发芽抗性筛选。这与张海萍等^[21]的报道一致。本研究进一步证实与 3AS 上的主效 QTL (*QPhs-3AS*) 紧密连锁的 SSR 标记 *Barc294-3A* 与穗发芽抗性密切相关,可用于穗发芽抗性的分子标记辅助选择。种子的休眠是一个

受遗传与环境互作的动态发育过程,品种的穗发芽抗性往往受多个遗传位点控制,单一的基因或 QTL 可能很难对调控休眠起决定作用。因此,进一步评价现有穗发芽抗性分子标记的有效性,并在现有抗穗发芽品种的基础上开展相关主效基因和 QTL 的聚合,将是培育抗穗发芽品种的重要途径。

参考文献:

- [1] Derera N F. Pre-harvest field sprouting in cereals [M]. USA, Florida: CRC Press, 1989.
- [2] 肖世和, 闫长生, 张海萍, 等. 小麦穗发芽研究 [M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2004.
- [3] Xiao S H, Zhang X Y, Yan C S, et al. Germplasm improvement for pre-harvest sprouting resistance in Chinese white-grained wheat: An overview of the current strategy [J]. Euphytica, 2002, 126: 35 - 38.
- [4] Gale M D, Lenton J R. Pre-harvest in wheat: a complex genetic and physiological problem affecting breadmaking quality in UK wheats [J]. Aspects of Applied Biology, 1987, 15: 115 - 124.
- [5] Gatford K T, Hearmden P, Ogonnaya F, et al. Novel resistance to pre-harvest sprouting in Australian wheat from the wild relative *Triticum tauschii* [J]. Euphytica, 2002, 126: 67 - 76.
- [6] Warner R L, Kudrna D A, Spaeth S C, et al. Dormancy in wheat-grain mutants of Chinese Spring wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. Grain Science Research, 2000, 10: 51 - 60.

- [7] 孙果忠,张秀英,肖世和.母体对小麦胚的ABA敏感性和种子休眠性的影响[J].麦类作物学报,2005,25(34):37-41.
- [8] Mares D,Mrva K,Cheong K,et al. A QTL located on chromosome 4A associated with dormancy in wheat- and red-grained wheats of diverse origin [J]. Theoretical and Applied Genetics 2005,111:1357-1364.
- [9] Mares D J,Mrva K,Tan M K,et al. Dormancy in white-grained wheat: Progress towards indentification of genes and molecular markers [J]. Euphytica,2002,126:47-53.
- [10] Kato K,Nakamura W,Tabiki T,et al. Detection of loci controlling seed dormancy in group 4 chromosomes of wheat and comparative mapping with rice and barley genome [J]. Theoretical and Applied Genetics,2001,102:980-985.
- [11] Osa M,Kato K,Mori M,et al. Mapping QTLs for seed dormancy and the *Vp1* homologue on chromosome 3A in wheat [J]. Theoretical and Applied Genetics,2003,106:1491-1496.
- [12] Mori M,Uchino N,Chono M,et al. Mapping QTLs for grain dormancy on wheat 3A and group 4 chromosomes, and their combined effect [J]. Theoretical and Applied Genetics 2005,110:1315-1323.
- [13] Mares D J,Mrva K. Mapping quantitative trait loci associated with variation in grain dormancy in Australian wheat [J]. Australian Journal of Agricultural Research, 2001,52:1257-1265.
- [14] Kottarachchi N S,Uchino N,Kato K,et al. Increased grain dormancy in white-grained wheat by introgression of preharvest sprouting tolerance QTLs [J]. Euphytica, 2006,152:421-428.
- [15] 张海萍.小麦种子休眠性的ABA反应蛋白分析及QTL定位[D].北京:中国农业科学院,2007.
- [16] Liu S B,Cai S B,Graybosch R,et al. Quantitative trait loci for resistance to pre-harvest sprouting in US hard white winter wheat Rio Blanco [J]. Theoretical and Applied Genetics 2008,117(5):691-699.
- [17] McCarty D R,Carson C B,Stinard P S,et al. Molecular analysis of viviparous-1: an abscisic acid insensitive mutant of maize [J]. Plant Cell,1989,1(5):523-532.
- [18] Yang Y,Zhao X L,Xia L Q,et al. Development and validation of a *Viviparous-1* STS marker for pre-harvest sprouting resistance in Chinese wheats [J]. Theoretical and Applied Genetics 2007,115:971-980.
- [19] 孙果忠.小麦胚的ABA敏感性及其与休眠基因表达的关系[D].北京:中国农业科学院,2004.
- [20] 冯继明,张海萍,常成,等.小麦重组自交系群体穗发芽抗性的鉴定方法与分析[J].安徽农业大学学报,2009,36(1):68-72.
- [21] 张海萍,常成,冯继明,等.小麦籽粒休眠 *Vp1-B1* 基因的等位变异检测与分离[J].分子植物育种,2009,7(2):297-302.