

小麦新品种百农矮抗 58 及其亲本矮秆基因的检测

王 刚, 胡铁柱, 李小军, 董 娜, 冯素伟, 李 淦, 张立琳, 茹振钢*

(河南科技学院 小麦研究中心, 河南 新乡 453003)

摘要: 为探索百农矮抗 58 小麦所含的矮秆基因及其来源, 应用赤霉素反应和分子标记检测了百农矮抗 58 及其亲本周麦 11、豫麦 49 号、郑州 8960 的矮秆基因。结果表明: 郑州 8960 为赤霉素敏感型, 其他 3 个品种对赤霉素不敏感; 分子标记检测显示, 矮抗 58、豫麦 49 号、郑州 8960 携带 *Rht-D1b* 基因, 周麦 11 携带 *Rht-B1b* 基因, 4 个品种均没有扩增出 *Rht8* 基因的 192 bp 标准带。

关键词: 小麦; 百农矮抗 58; 矮秆基因; 分子标记

中图分类号: S512.1 文献标志码: A 文章编号: 1004-3268(2012)09-0022-04

Detection of Dwarfing Genes in Wheat Variety AK58 and Its Parents

WANG Gang, HU Tie-zhu, LI Xiao-jun, DONG Na, FENG Su-wei, LI Gan,
ZHANG Li-lin, RU Zhen-gang*

(Wheat Research Center, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang 453003, China)

Abstract: In order to explore the source of dwarfing genes in wheat variety AK58, AK58 and its parents Zhoumai 11, Yumai 49 and Zhengzhou 8960 were analyzed by means of gibberellic acid (GA3) reaction and STS markers. The results indicated that Zhengzhou 8960 was sensitive to GA3 and other cultivars were insensitive. Molecular marker confirmed that *Rht-D1b* was detected in AK58, Yumai 49 and Zhengzhou 8960, *Rht-B1b* was present in Zhoumai 11, while no *Rht8* gene was found in above 4 varieties.

Key words: wheat; AK58; dwarfing genes; molecular marker

小麦是我国重要的粮食作物, 在人口增长、耕地减少、水资源不足等因素的制约下, 充分提高其产量潜力是小麦育种的永恒目标。自 20 世纪 60 年代起, 世界范围内掀起了小麦矮秆育种的高潮, 使小麦的单产大幅度提高, 为世界粮食安全作出了重大贡献, 至今应用矮秆基因降低株高、提高抗倒伏性仍是小麦超高产育种的主要育种策略, 因此, 对小麦矮秆基因的研究尤其重要。小麦株高的遗传比较复杂, 受多条染色体上的主效基因和微效基因共同控制^[1-2]。截至目前, 已鉴定并命名了 25 个主效基因^[3], 但由于受不良遗传连锁因素影响, 只有少数几个矮秆基因能够应用于小麦育种, 其中应用最为广泛的是来源于日本的 2 个矮源-赤小麦 (Akagomugi, *Rht8* 或 *Rht9*) 和农林 10 号 (Norin10, *Rht-*

B1b 和 *Rht-D1b*)^[4], 利用农林 10 号和赤小麦的 *Rht1*、*Rht2*、*Rht8* 或 *Rht9* 矮秆基因^[5-7] 已经育成了占世界上约 90% 以上的矮秆和半矮秆品种。

百农矮抗 58 是河南科技学院小麦中心培育出的高产多抗广适小麦新品种, 其系谱为周 11//豫麦 49 号/郑州 8960, 株高 70 cm 左右, 高抗倒伏, 是黄淮麦区的主要推广品种, 至 2011 年累计种植面积超过 733.3 万 hm^2 。鉴于 *Rht-B1b*、*Rht-D1b*、*Rht8* 及其不同基因组合在黄淮麦区小麦中的广泛分布, 为明确百农矮抗 58 所携带的矮秆基因及其来源, 本研究应用相应分子标记和赤霉素反应检测百农矮抗 58 及其亲本矮秆基因, 以期小麦产量潜力的进一步挖掘和株高的遗传改良提供依据。

收稿日期: 2012-03-06

基金项目: 国家“十二五”科技支撑计划项目 (2011BAD07B02); 河南省科技攻关计划项目 (102102110032)

作者简介: 王 刚 (1985-), 男, 河南南阳人, 在读硕士研究生, 研究方向: 小麦雄性不育机理及其杂种优势。

* 通讯作者: 茹振钢 (1958-), 男, 河南沁阳人, 教授, 主要从事作物遗传育种的研究和教学工作。E-mail: tiezhuh@163.com

1 材料和方法

1.1 供试材料

小麦品种百农矮抗58、周麦11、豫麦49号和郑州8960,均由河南科技学院小麦中心提供。

1.2 幼苗赤霉素(GA₃)反应

试验参考唐娜的方法^[8],每个品种选用2个直径约10 cm、铺有吸水纸的培养皿,每个培养皿中分别播入20~30粒种子,每皿中加入50 mg/L的GA₃,另一皿中加入同样体积的蒸馏水作为对照。将培养皿放置室温下(约24℃)进行发芽,7~10 d后根据GA₃处理与对照间的幼苗高度差异,确定品种对GA₃的敏感型。

1.3 矮秆基因的分子检测

用CTAB法提取小麦的幼嫩叶片^[9]。利用Ellis等^[10]设计的STS分子标记,参考杨松杰等^[7]和Korzun等^[11]报道的微卫星标记,对百农矮抗58及其亲本进行扩增鉴定。引物由北京鼎国昌盛生物技术有限公司合成。引物序列如下:

NH-BF.2;5'-TCTCCTCCCTCCCCACCCAAG-3';

WR1.2;5'-CCATGGCCATCTCGAGCTGC-3';

DF;5'-CGCGCAATTATTGGCCAGAGATAG-3';

DF2;5'-GGCAAGCAAAAGCTTCGCG-3';

MR1;5'-CATCCCCATGGCCATCTCGAGCTA-3';

MR2;5'-CCCCATGGCCATCTCGAGCTGCTA-3';

WR2;5'-GGCCATCTCGAGCTGCAC-3';

Xgwm261 Primer A; 5'-CTCCCTGTACGCCTAAGGC-3';

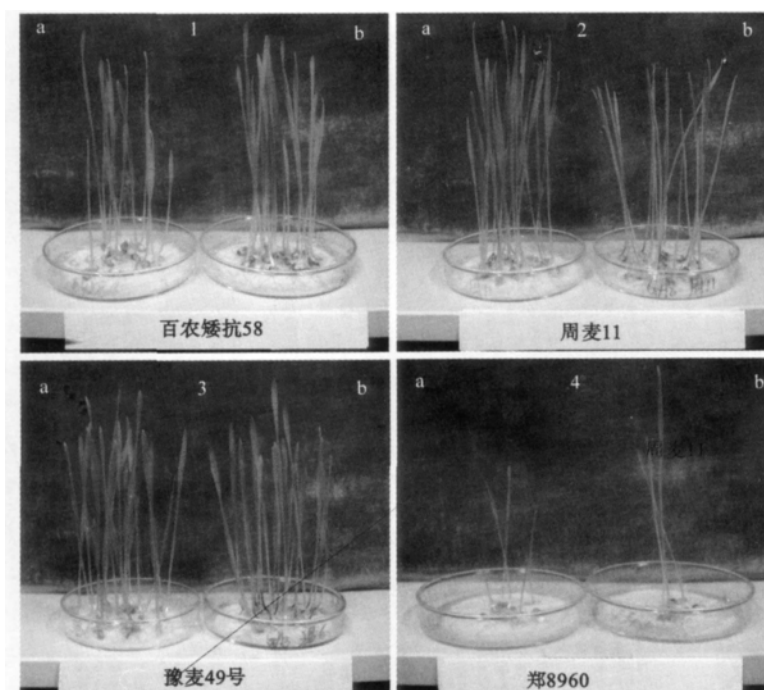
Primer B; 5'-CTCGCGCTACTAGCCATTG-3'。

PCR反应体系(20 μL)包括:10 mmol/L的dNTP 0.4 μL,10×Buffer 2 μL,2 mol/L的引物各2 μL,DNA模板50~100 ng,DNA聚合酶1 U,用ddH₂O补足至20 μL。加1滴石蜡油覆盖,反应在Biometra公司的TPfoessional Standard上进行。反应程序为:94℃ 5 min;94℃ 50 s,63~55℃ 40 s,72℃ 50 s,35个循环;72℃ 10 min;16℃保存。其中,STS标记引物的退火温度为63℃,扩增产物在2%的琼脂糖凝胶上检测;微卫星标记引物的退火温度为55℃,扩增产物在8%聚丙烯酰胺凝胶上检测。

2 结果与分析

2.1 GA₃反应

供试品种用GA₃处理8 d左右,分别与对照的株高进行比较(图1)。结果表明:百农矮抗58、周麦11和豫麦49号株高均无明显差异;郑州8960与上述3品种株高有明差异。表明矮抗58、周麦11和豫麦49号对赤霉素不敏感,而郑州8960对表现GA₃反应敏感,据此推断郑州8960可能含有*Rht8*矮秆基因。



1. 百农矮抗58;2. 周麦11;3. 豫麦49号;4. 郑州8960; a. 对照; b. 处理

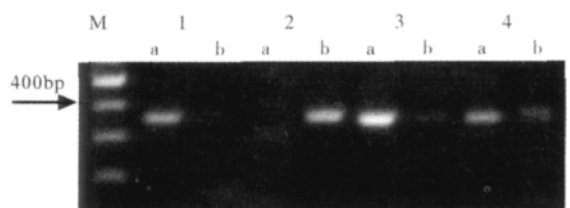
图1 供试品种株高的赤霉素敏感反应

2.2 *Rht-B1b* 基因的检测结果

利用Ellis等^[10]和杨松杰等^[7]设计的引物,以

NH-BF.2和WR1.2引物组合可以扩增出1条约400 bp的条带,用来鉴定小麦品种中是否含有矮秆

基因 *Rht-B1b* 的野生型 (Wt) *Rht-B1a*; NH-BF. 2 和 MR1 引物组合可以扩增出 1 条 400 bp 的条带, 用来鉴定小麦品种中是否含有矮秆基因 *Rht-B1b* 的突变型 (Mu) *Rht-B1b*; 即同一个品种 2 对引物 PCR 产物互补出现, 可以相互验证。如图 2 所示, NH-BF. 2 和 WR1. 2 引物组合在矮抗 58、豫麦 49 号和郑州 8960 中均能扩增出 1 条约 400 bp 的目标带; 而在 NH-BF. 2 和 MR1 引物组合下无此条带。而周麦 11 仅在 NH-BF. 2 和 MR1 组合下扩增出 1 条约 400 bp 的目标带, 说明其携带 *Rht-B1b* 基因。

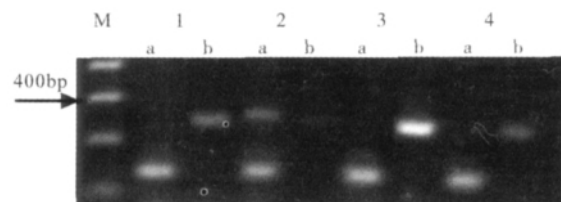


M. 250 bp Marker; 1. 百农矮抗 58; 2. 周麦 11; 3. 豫麦 49 号; 4. 郑州 8960; a. *Rht-B1a* 基因的 PCR 扩增片段; b. *Rht-B1b* 基因的 PCR 扩增片段

图 2 *Rht-B1b* 基因的分子标记检测结果

2.3 *Rht-D1b* 基因的检测结果

利用 DF2 和 WR2 引物组合可以扩增出 1 条约 264 bp 的条带, 用来鉴定小麦品种中是否含有矮秆基因 *Rht-D1b* 的野生型 *Rht-D1a*; DF 和 MR2 引物组合可以扩增出 1 条约 254 bp 的条带, 用来鉴定小麦品种中是否含有矮秆基因 *Rht-D1b* 的突变型 *Rht-D1b*。如图 3 所示, 百农矮抗 58、豫麦 49 号和郑州 8960 在 DF 和 MR2 引物组合下可以扩增出 1 条约 254 bp 的条带, 说明其携带 *Rht-D1b* 矮秆基因, 而周麦 11 没有此特征带。

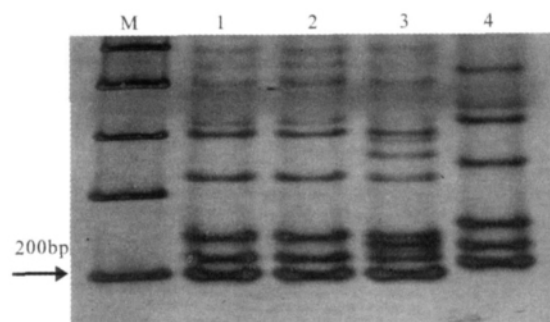


M. 250 bp DNA ladder; 1. 百农矮抗 58; 2. 周麦 11; 3. 豫麦 49 号; 4. 郑州 8960; a. *Rht-D1a* 基因特异性引物的 PCR 扩增片段; b. *Rht-D1b* 基因特异性引物的 PCR 扩增片段

图 3 *Rht-D1b* 基因的分子标记检测结果

2.4 *Rht8* 基因的检测结果

如图 4 所示, 微卫星引物 Xgwm261 在 4 个品种中均没有扩增出 192 bp 的标准片段。百农矮抗 58、周麦 11、豫麦 49 号扩增出的目标条带为 200 bp, 郑州 8960 扩增出的目标条带约为 204 bp, 为 Xgwm261 位点的等位变异类型。



M. 100 bp DNA ladder; 1. 百农矮抗 58; 2. 周麦 11; 3. 豫麦 49 号; 4. 郑州 8960

图 4 4 个供试品种 Xgwm261 引物 PCR 扩增结果

表 1 百农矮抗 58 及其亲本 *Rht-B1b*、*Rht-D1b*、*Rht8* 矮秆基因的分子检测及 GA_3 检测结果

品种	<i>Rht-B1b</i>		<i>Rht-D1b</i>		<i>Rht8</i> 192 bp	GA_3
	Mu	Wt	Mu	Wt		
百农矮抗 58	—	+	+	—	—	I
周麦 11	+	—	—	+	—	I
豫麦 49 号	—	+	+	—	—	I
郑 8960	—	+	+	—	—	S

注: + 表示有扩增产物, — 表示无扩增产物。

3 结论与讨论

我国利用含矮秆基因的小麦资源已育成并推广了多个矮秆品种(系), 在提高抗倒性和收获指数、适应现代高产栽培措施方面取得了较好的成效。以往多采用赤霉素敏感性试验和系谱分析法对小麦矮秆基因进行鉴定^[12-14], 促进了矮化育种进展, 但对于多个矮秆基因等复杂情况, 鉴定结果有异议。近年来, 利用分子标记检测技术对小麦矮秆基因的鉴定和筛选取得了丰硕成果。Korzun 等^[11]报道, 与 *Rht8* 基因紧密连锁的微卫星标记 Xgwm261 (0.6cM) 被定位在小麦 2D 染色体短臂上, Xgwm261 等位变异 192 bp 的 PCR 扩增片段可以作为 *Rht8* 的分子标记。Ellis 等^[10]设计了可以准确鉴定 *Rht-B1b* 和 *Rht-D1b* 基因的 STS 引物。周阳等^[15]对 163 份中国小麦主产区小麦主栽品种运用微卫星标记 Xgwm261 进行 *Rht8* 矮秆基因的鉴定, 同时结合系谱分析加以验证。结果表明, 在明确品种系谱关系的情况下, 可以利用微卫星 Xgwm261 标记对品种 *Rht8* 基因进行鉴定和筛选。杨松杰^[16]对我国主要麦区 432 份主栽品种和高代品系的研究表明, 在系谱关系明确的情况下, 微卫星 Xgwm261 和 *Rht-D1b* 基因的分子标记可以分别用于对 *Rht8* 基因和 *Rht-D1b* 基因的鉴定以及育种世代该基因型的筛选。杨松杰等^[7]对 Ellis 等^[10]检测 *Rht1* 基因位点的 STS 标记作了部分修改, 使其可鉴别野生型

(*Rht-B1a*)和突变型(*Rht-B1b*),利用该标记对中国主要麦区239份品种(系)矮秆基因进行检测,结果表明,*Rht-B1b*(*Rht1*)和*Rht-D1b*(*Rht2*)在分子标记辅助育种中有较高的利用价值。本研究结果表明,周麦11和豫麦49号分别携带*Rht-B1b*和*Rht-D1b*基因,这与杨松杰等^[16]和慕美财^[17]的结果一致,也证明了该分子标记用于该矮秆基因分析的有效性。

Rht1(*Rht-B1b*)和*Rht2*(*Rht-D1b*)基因对GA₃反应表现为不敏感,*Rht8*基因是GA₃反应敏感类型。根据试验结果,只有郑州8960表现GA₃特征反应型,携带*Rht8*基因,其他3个品种均不出现特征反应型。而分子标记分析显示,矮抗58等4个品种均没有扩增出192 bp的*Rht8*基因特异带。Worland等^[18]对分布在不同国家和地区的小麦研究发现,Xgwm261标记有174、165、194、192、195、197、202、196、205、201、203、210、204、207、215 bp等15种不同等位变异类型的扩增条带,我国有165、192、194、196、201、202、203、204和205等位变异类型。百农矮抗58等4个品种没有扩增出192 bp的*Rht8*基因标准片段,可能是这4个品种在该位点发生了变异,而郑州8960属于非功能性变异,不影响*Rht8*基因的表达;也可能是在不同遗传背景下,矮秆基因组合对GA₃的反应不同。

百农矮抗58与豫麦49号所含的矮秆基因相同,但豫麦49号的株高比百农矮抗58高10 cm左右,这也证实尽管株高受矮秆基因的控制,但遗传背景对株高亦有显著影响。至于不同矮秆基因受遗传背景影响的程度和模式,需要进一步研究。

参考文献:

- [1] Bonjean A P, Augus W J. The world wheat book-A history of wheat breeding intercept[M]. New York: Londres-paris, 2001:179-186.
- [2] Borner A, Plaschke J, Korzun V, et al. The relationships between the dwarfing genes of wheat and rye[J]. Euphytica, 1996, 89: 69-75.
- [3] 孙希平. 小麦株高基因的分子标记[D]. 太原: 山西农业大学, 2001.
- [4] 赵和. 小麦矮秆基因研究和利用进展[J]. 河北农业科学, 2004, 8(4): 96-99.
- [5] Ahmad M, Sorrells M E. Distribution of microsatellite alleles linked to *Rht8* dwarfing genes in wheat[J]. Euphytica, 2002, 123: 235-240.
- [6] Das M K, Carver B F, Xu X Y, et al. Covariation for microsatellite marker alleles associated with *Rht8* and coleoptile length in winter wheat[J]. Crop Science, 2004, 44: 1187-1194.
- [7] 杨松杰, 张晓科, 何中虎, 等. 用 STS 标记检测矮秆基因 *Rht-B1b* 和 *Rht-D1b* 在中国小麦中的分布[J]. 中国农业科学, 2006, 39(8): 1680-1688.
- [8] 唐娜, 姜莹, 何蓓如, 等. 赤霉素敏感性不同矮秆基因对小麦胚芽鞘长度和株高的效应[J]. 中国农业科学, 2009, 42(11): 3774-3784.
- [9] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual [M]. New York: Cold Spring Harbour, 1989.
- [10] Ellis M H, Spielmeier W, Gale R, et al. Perfect markers for the *Rht-B1b* and *Rht-D1b* dwarfing genes in wheat[J]. Theor Appl Genet, 2002, 105: 1038-1042.
- [11] Korzun V, Roder M S, Ganai M W, et al. Genetic analysis of the dwarfing gene (*Rht8*) in wheat. Part I. Molecular mapping of *Rht8* on the short arm of chromosome 2D of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. Theor Appl Genet, 1998, 96: 1104-1109.
- [12] 贾继增, 丁寿康, 李月华, 等. 中国小麦的主要矮秆基因及矮源的研究[J]. 中国农业科学, 1992, 25(1): 1-5.
- [13] 郭保宏. 利用分子标记进行植物基因定位和检测[J]. 作物品种资源, 1996(1): 29-31.
- [14] 郭保宏, 宋春华, 贾继增. 我国小麦品种的 *Rht1*、*Rht2* 矮秆基因鉴定及分布研究[J]. 中国农业科学, 1997, 30(5): 56-60.
- [15] 周阳, 何中虎, 张改生, 等. 用微卫星标记鉴定中国小麦品种中 *Rht8* 矮秆基因的分布[J]. 作物学报, 2003, 29(2): 810-814.
- [16] 杨松杰. 我国小麦品种(系)矮秆基因的分子检测[J]. 新疆农业大学学报, 2004, 20(2): 17-20.
- [17] 慕美财, 刘勇, 郭小丽, 等. 山东小麦品种中矮秆基因 *Rht-B1b*、*Rht-D1b* 分布的分子鉴定[J]. 分子植物育种, 2005, 3(4): 473-478.
- [18] Worland A J, Sayers E J, Korzun V. Allelic variation at the dwarfing gene *Rht8* locus and its significance in international breeding programmes [J]. Euphytica, 2001, 119: 155-159.