

小麦矮秆圆粒突变体的鉴定与分析

陆燕, 赵天祥, 刘国祥, 贾继增, 孔秀英

(中国农业科学院作物科学研究所/国家农作物基因资源与基因改良重大科学工程/
农业部作物基因资源与种质创制重点实验室, 北京 100081)

摘要:小麦的子粒形态性状和株高与小麦的产量密切相关,是育种的重要选择目标性状。本研究通过对小麦品种偃展1号(YZ1)EMS突变体W98的农艺性状的调查与分析,发现W98的株高只有24 cm,而野生型YZ1的株高是73 cm。突变体株高的变异是由每个节间长度变短造成的,而非节间数目减少所致。相关分析表明矮秆与圆粒性状呈显著相关。利用高秆长粒的墨西哥品种10th12与突变体W98配制杂交组合,获得1544个 $F_{2:3}$ 单株(株系),通过对分离群体的遗传分析,发现圆粒性状是由1对不完全显性基因控制的。赤霉素(GA)与油菜素内酯(BR)激素敏感性试验表明:野生型和突变体都对GA处理不敏感;不同浓度BR的展叶试验表明野生型对BR不敏感,而突变体W98对BR敏感。

关键词:小麦;EMS;矮秆圆粒突变体;赤霉素;油菜素内酯

Identification and Analysis of the Dwarf-Spherical Grain Mutant W98

LU Yan, ZHAO Tian-xiang, LIU Guo-xiang, JIA Ji-zeng, KONG Xiu-ying

(Key Laboratory of Crop Gene Resources and Germplasm Enhancement, Ministry of Agriculture/National
Key Facility for Crop Gene Resources and Genetic Improvement/Institute of Crop Sciences,
Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081)

Abstract:Wheat grain morphology and plant height are important target traits in wheat breeding history and they are significantly correlation with wheat yield performance. In this study, the wheat dwarf-spherical grain mutant W98 identified from Yanzhan1 EMS (ethylmethyl sulfide) mutant library was analyzed. The results showed that the plant height of the mutant W98 was 24 cm, whereas the wild type YZ1 was 73 cm. W98 reduced plant height by decreasing the length between internodes, not reducing of the number of nodes. Correlation analysis showed that the two traits-dwarf and spherical grain were significantly correlated. Genetic analysis indicated that the spherical grain phenotype was controlled by a single incompletely dominant gene by using 1544 $F_{2:3}$ progenies generated from the cross of the long grain Mexico synthetic hexaploid wheat 10th12 with the mutant W98. Sensitivity test of GA and BR indicated that both of the wild type and the mutant were not sensitive to GA, while the mutant was sensitive to BR and the wild type was not by using the wheat leaf unrolling assay with different BR concentrations.

Key words:wheat;EMS;dwarf-spherical grain mutant;GA;BR

小麦子粒形态性状包括子粒大小和形状,它们分别与小麦的千粒重和磨粉品质密切相关;株高性状对小麦的产量有重要的影响,因此子粒形态性状和株高是小麦育种的重要选择目标性状,发掘控制它们的基因及其优异等位变异基因,对小麦的遗传改良具有重要意义。小麦子粒形态性状在小麦属

(*Triticum*)中存在着广泛的变异。印度圆粒小麦(*T. sphaerococcum*, BBA^aA^aDD)与依斯帕汗小麦(*T. ispahanicum*, BBA^aA^a)是粒形表型上的两种极端类型,后者的长度是前者的两倍,但它们的宽度几乎相同。乌拉尔图小麦(*T. urartu*, A^aA^a)与辛斯卡娅小麦(*T. sinskajae*, A^mA^m)是子粒大小表型上的两种极

收稿日期:2013-05-27 修回日期:2013-06-23 网络出版日期:2013-12-19

URL:<http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20131219.1309.024.html>

基金项目:转基因生物新品种培育重大专项(2013ZX08009-001-001-005)

第一作者主要从事小麦基因资源研究。E-mail:luyan198753880@sina.com

通信作者:孔秀英,主要从事小麦基因资源研究。E-mail:kongxiuying@caas.cn

端类型,后者宽度是前者的近两倍。小麦在驯化过程中,子粒形状发生了变化,即由细而长的原始子粒(长宽比 = 2.63)向现代品种短而宽的子粒(长宽比 = 1.78)改变^[1]。印度圆粒小麦株高为 60 ~ 90 cm,茎秆不粗但坚韧,抗倒伏力强;叶片短,上举挺直;密穗,子粒圆形而小,千粒重 25 g 左右,一般为半硬质,有的蛋白质含量达 20% 以上。矮秆和圆粒是印度圆粒小麦的两个重要特点,圆粒性状是由 *sl* 基因控制,是半合子无效的隐性基因,位于染色体 3D 上^[2]。

与自然突变体相比,人工突变体具有变异种类丰富、突变体间背景较为相似等优点。常用的诱变方法有物理和化学的方法。EMS(甲基磺酸乙酯)是一种烷化剂,EMS 诱变是产生突变体的重要途径,所产生的突变主要为单碱基突变。在人工诱变的突变体中,研究者们鉴定了一些矮秆圆粒突变体,由于它们都具有矮秆和圆粒的特点,因此被称为类印度圆粒突变体(sphaerococcoid mutant),目前已在四倍体小麦^[3-5]、六倍体小麦^[6-10]中获得。1988 年 Melink^[10]通过化学诱变剂处理普通小麦品种 Saratovskaya29 和 Skala 获得了 3 个独立的类印度圆粒小麦的圆粒突变体,其中一个为印度圆粒小麦基因 *sl* 的等位基因。1998 年 O. I. Maystrenko 等^[11]根据单体分析的结果将这 3 个独立的圆粒突变体基因命名为 *S1*、*S2*、*S3*,它们分别位于小麦的 3D、3B、3A 染色体。2000 年 E. Salina 等^[12]对 *S1*、*S2*、*S3* 进行遗传作图,*S1* 距两侧最近的分子标记 *Xgwm456* 和 *Xgdm72* 的距离分别为 2.9 cM 和 8.0 cM;*S2* 与着丝粒区域的 2 个分子标记 *Xgwm566* 和 *Xgwm845* 紧密连锁;*S3* 距两侧最近的分子标记 *Xgwm2* 和 *Xgwm720* 的距离分别为 5.1 cM 和 6.6 cM。

本研究以矮秆圆粒突变体 W98 及其野生型偃展 1 号(ZY1)和长粒品种 10th12 为材料,对其农艺性状、遗传方式、种子的发芽率、赤霉素以及油菜素内酯的敏感性进行了调查和分析,研究结果可为圆粒基因的克隆奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

矮秆圆粒突变体 W98 是从本实验室自己构建的小麦偃展 1 号 EMS 诱变突变体库中获得的一个突变体;高秆长粒品种 10th12 是本所景蕊莲课题组提供的一个从 CMMITY 引进的小麦品种。2008—2009 年将材料种植于北京网室和温室,并配制杂交

组合,2010 年春播种 F_1 ,2010 年和 2011 年秋季在河南新乡试验基地播种 F_2 和 F_3 群体。按常规方法对亲本及杂交后代材料进行农艺性状调查与分析。

1.2 突变体表型分析

收获亲本及其 F_2 单株,并对其农艺性状进行考种。粒形性状的考种,每个单株随机选取 30 粒完整的种子,分成 3 组,测量每组子粒的长和宽,求平均值后即为该单株的粒长与粒宽。用米尺测量亲本及 F_2 的株高并记录,分别测量亲本的各个节间长并记录。

1.3 种子发芽率检测试验

分别取 W98 和 YZ1 号种子 100 粒,放在培养皿中于 25 °C 温箱中培养,培养后第 7 天统计发芽率,设 3 次重复。

1.4 GA 处理

将萌发的种子播种于 10 cm 的培养皿中,浇适量的 50 mg/L GA_3 溶液并保湿,对照加入等量的水,然后将其置于 20 °C 黑暗条件下生长,以后隔日分别补入 GA_3 溶液和水各 15 mL,出苗 7 ~ 10 d 后观察幼苗形态并测量株高。该试验处理的种子为突变体 W98、野生型 YZ1、 GA_3 敏感的中国春,3 次重复。

1.5 BR 处理

将材料在 25 °C 黑暗条件下处理 6 d,去掉叶尖 1.5 cm 长度,取下面的 1.5 cm 长度叶片片段在 10 mL 含有不同浓度 BR 的蒸馏水中培养(浓度分别为 0 μ mol/L、0.0002 μ mol/L、0.002 μ mol/L、0.02 μ mol/L、0.2 μ mol/L、2 μ mol/L),处理在避光条件下进行。每个浓度至少含有 6 个叶片片段,分别取自 6 个单株,每个处理重复 3 次,在 0 h、24 h、48 h、72 h 时分别照相,叶片宽度用 ImageJ 软件测量。展叶率的计算参考 D. Gasperini 等^[13]的方法,展叶率 = $[(W_{ij}/W_{0j}) - (W_{i0} - W_{00})]$, W_{ij} 表示时间 i 处理 j 时的叶片平均宽度, W_{0j} 表示相同处理在时间 0 时叶片平均宽度, W_{i0} 表示水对照在时间 i 时的平均叶片宽度, W_{00} 表示水对照在时间 0 时的平均叶片宽度。统计分析使用软件为 SPSS13.0。

2 结果与分析

2.1 突变体 W98 及其野生型偃展 1 号的农艺性状分析

野生型偃展 1 号(YZ1)和突变体 W98 的农艺性状调查与分析表明,突变体在株高、分蘖、穗长、小穗数、穗粒数、千粒重、粒形性状上与野生型偃展 1 号相比差异都达到了极显著水平,而抽穗期没有明

显差异(表 1)。W98 的一个显著的特点是植株很矮,与野生型偃展 1 号相比,W98 表现出 49 cm 的降秆效应(图 1a)。节间分析表明野生型与突变体的节间数目相同,突变体的株高降低是由每个节间长

度减少造成的(图 1 c)。突变体 W98 的另一个显著特征是子粒小而圆,千粒重很低(图 1 b),野生型和突变体子粒的长宽比分别为 1.98 和 1.23,千粒重分别为 47.68 g 和 23.28 g。

表 1 野生型 YZ1 和突变体 W98 农艺性状调查与分析(北京)

Table 1 Investigation and analysis of agronomic traits between the wild type YZ1 and the mutant W98 (Beijing)										
材料	株高 (cm)	分蘖数	穗形	穗长 (cm)	小穗数	穗粒数	千粒重 (g)	粒形 (长/宽)	抽穗期 (d)	成熟期 (d)
Material	PH	Tiller	SS	SL	SN	GNS	TGW	GS (L/W)	Heading	Maturity
YZ1	73 ± 0.90	8 ± 0.44	纺锤形	10 ± 0.20	23 ± 0.49	59 ± 1.33	47.68 ± 0.53	1.98 ± 0.09	195	241
W98	24 ± 0.50 **	6 ± 0.28 **	密穗形	5.6 ± 0.12 **	19 ± 0.82 **	30 ± 1.23 **	23.28 ± 0.26 **	1.23 ± 0.02 **	196	244

** 表示差异极显著 ($P < 0.01$), * 表示差异显著 ($P < 0.05$)
** indicates significant difference ($P < 0.01$), * indicates significant difference ($P < 0.05$)

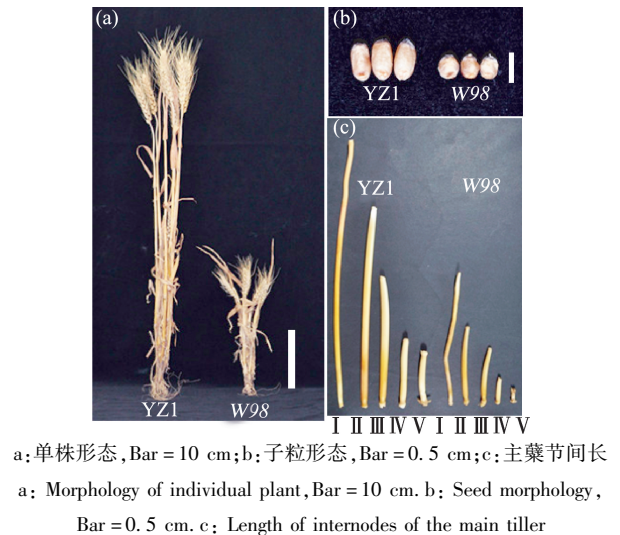


图 1 突变体 W98 及其野生型偃展 1 号的形态特点
Fig. 1 Morphology of the dwarf-spherical mutant W98 and its wild type YZ1

2.2 遗传分析

对 F₂ 分离群体单株以及亲本子粒的长宽比和株高进行考种,为了便于考察 F₂ 的分离情况,绘制了长宽比以及株高的频率分布直方图(图 2)。粒形性状呈现了一个明显的双峰分布,表明粒形是由 1 对基因控制的。根据 F₁ 子粒的长宽比和株高介于双亲中间的表型,说明该突变体圆粒性状是由单个不完全显性基因控制的。在 1544 株 F₂ 群体中,908 个单株呈现圆粒到中间类型的表型,636 个单株呈现野生型的表型,圆粒与长粒的分离比为 1.43:1,不符合 3:1 的比例 ($\chi^2 = 215.89, P < 0.01$),粒形双峰分布出现了明显的偏分离现象。随后,对突变体和野生型发芽率进行调查。发芽试验结果统计表明,W98 和 YZ1 的发芽率分别为 20% 和 77%。为了确保发芽试验的准确性,对田间突变体与野生型

的出苗率进行调查,结果与水培的发芽试验相符合。F₂ 粒形比例不符合 3:1,存在偏分离的现象,我们推测这可能是由于圆粒种子发芽率低或配子传递率不同所致。

10th12 与 W98 F₂ 株高没有呈现特别明显的双峰分布。由于圆粒与株高两个性状呈显著相关($r = 0.700, P < 0.01$),因此选择圆粒性状作为基因定位的目标性状。

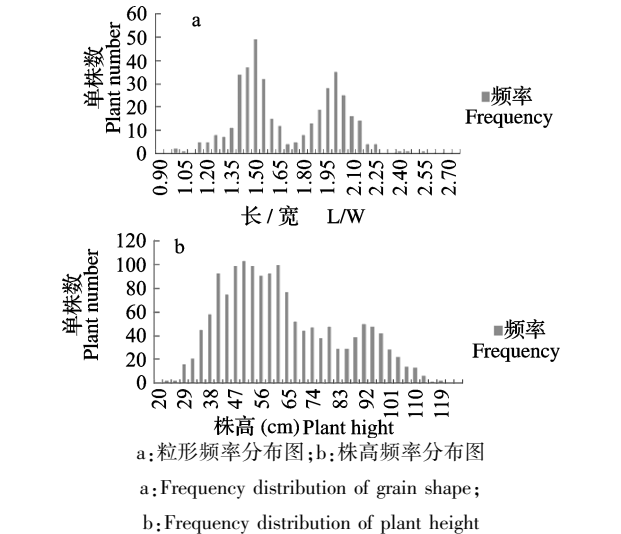


图 2 10th12 × W98 F₂ 子粒形态与株高性状频率分布图
Fig. 2 Frequency distribution of grain shape and plant height in 10th12 × W98 F₂ population

2.3 GA 处理

GA 处理 2 周后,观察并测量突变体、野生型以及中国春植株的高度(图 3)。中国春 GA 处理与清水对照植株高度有极显著差异 ($P < 0.01$),野生型与突变体 GA 处理和水对照植株高度无显著差异 ($P > 0.05$),野生型和突变体为 GA 不敏感型。



+ : GA 处理; - : 对照; CS: 中国春
+ : GA treatment, - : Contrast, CS: Chinese spring

图 3 GA 处理后幼苗的形态

Fig. 3 Seedling morphology after GA treatment

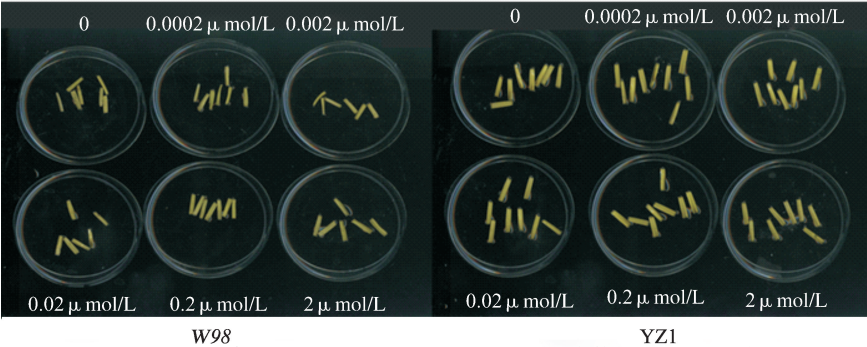


图 4 不同浓度 BR 处理 72 h 后野生型和突变体叶片展叶反应

Fig. 4 Leaf unrolling response of the wild type (YZ1) and the mutant (W98) after 72 h incubation in different BR concentrations

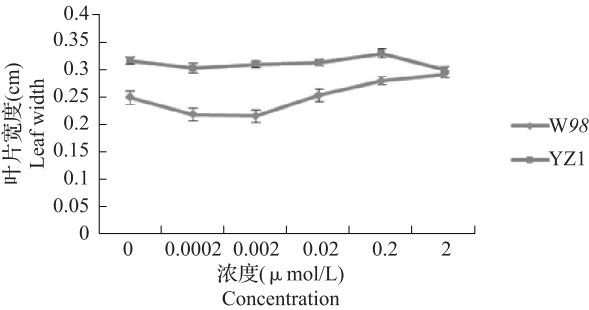


图 5 不同浓度 BR 处理 72 h 后野生型与突变体的叶片宽度
Fig. 5 Leaf width of the wild type and the mutant after 72 h incubation in different BR concentrations

为了更准确地研究突变体 BR 处理反应的敏感性,利用 D. Gasperini 等^[13]修正过的展叶率计算公式:展叶率 = $[(W_{ij}/W_{0j}) - (W_{i0} - W_{00})]$,分析 BR 处理对叶片宽度的影响,72 h 后叶片展开情况如图 6。结果表明 YZ1 展叶率在各个浓度 BR 处理下无明显变化,突变体 W98 的展叶率在浓度 0.2 μmol/L 与 2 μmol/L 的 BR 中明显增加,这个结果与上述叶片宽度分析结果相一致,再一次证明突变体 W98 对 BR 处理是敏感的。

2.4 BR 处理

对突变体及其野生型材料进行 BR 处理的卷叶试验,每隔 24 h 拍照记录 1 次,72 h 后叶片展叶反应见图 4。

对野生型 YZ1 与突变体 W98 不同浓度 BR 处理 72 h 以后的叶片宽度进行了统计分析,结果表明各浓度 BR 及与对照处理条件下,野生型叶片宽度间的差异不显著 ($P > 0.05$),突变体在 0.0002 μmol/L、0.002 μmol/L、0.02 μmol/L 3 个浓度 BR 处理下,叶片的宽度与不含 BR 水处理下叶片宽度之间差异不显著 ($P > 0.05$),而在 0.2 μmol/L 和 2 μmol/L 浓度 BR 处理后叶片宽度与对照差异有统计学意义 ($P < 0.05$),如图 5,因此,突变体 W98 对 BR 是敏感的。

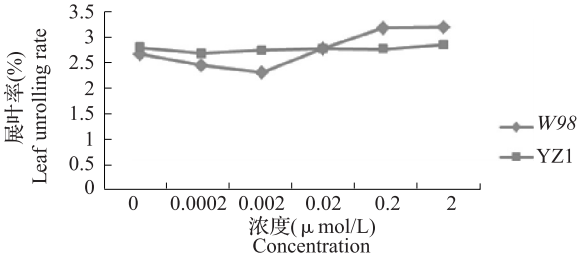


图 6 不同浓度 BR 处理 72 h 后野生型与突变体的展叶率
Fig. 6 Leaf unrolling rate of YZ1 and W98 leaf segments after 72 h in different BR concentrations

3 讨论

突变体 W98 有两个明显的特点:矮秆和圆粒。与印度圆粒小麦相比,两者的子粒都是小而圆,千粒重低,23 ~ 25 g,但 W98 株高更矮,不足 30 cm,而印度圆粒小麦的株高在 60 ~ 90 cm。遗传分析表明 W98 的圆粒性状是由 1 个不完全显性基因控制的,而印度圆粒小麦是由 1 对隐性基因控制的,由此可见 W98 与印度圆粒小麦在株高和遗传方式上是不同的。由于 W98 突变体的圆粒和矮秆两个性状是

显著相关的,它们是否为同一基因控制还有待进一步的深入研究。

BR 是重要的植物激素,它主要是通过调控细胞的分裂与分化促进植物各组织器官的生长。除此之外,BR 还参与了植株的形态建成、微管束分化、育性、开花、衰老、光形态建成以及对生物与非生物胁迫的抗性反应^[14]。BR 相关突变体一般都表现为植株矮化、叶片暗绿、叶片直立等特点。前人研究表明,BR 对植株的节间的伸长具有重要的调节作用,如水稻 BR 突变体 *d2* 和 *d11* 是通过第 2 节间的变短,使植株变矮,子粒变短的^[15-16]; *brd1-1* 和 *brd1-2* 突变体只有第 1 个节间能伸长,叶片严重畸形,花少且不育^[17]; *brd2* 突变体通过减少第 2~4 节间的长度使植株变矮,叶片直立、叶鞘稍微有点畸形,育性很差^[18]。本研究鉴定了一个对 BR 处理敏感的突变体 W98,植株不足 30 cm,矮秆、密穗、圆粒、叶片直立。突变体 W98 株高变矮是由每个节间变短所致,卷叶试验表明 W98 对 BR 是敏感的,因此本研究推测突变体株高降低和子粒变短可能与 BR 合成或信号传导途径上的基因发生突变有关。

参考文献

- [1] Gegas V C, Nazari A, Griffiths S, et al. A genetic framework for grain size and shape variation in wheat [J]. *Plant Cell*, 2010, 22: 1046-1056
- [2] Sears. The sphaerococcum gene in wheat [J]. *Genetics*, 1947, 32: 102-103
- [3] Bozzini A. Sphaerococcoid, a radiation-induced mutation in *Triticum durum* Desf. [M]//FAO/IAEA. Use of induced mutations in plant breeding. London: Pergamon Press, 1965: 375-383
- [4] Schmidt J W, Johnson V A. Inheritance of the sphaerococcum effect in tetraploid wheat [J]. *Wheat Inf Serv*, 1966, 22: 5-6
- [5] Gupta N, Swaminathan M S. An induced sphaerococcoid mutant in *Triticum dicoccum* [J]. *Curr Sci*, 1967, 36: 19
- [6] Zschege C. Evidence of gene dosage effects in *Triticum aestivum*

- [J]. *Wheat Inf Serv*, 1963, 15: 16-17
- [7] Schmidt J W, Weibel D E, Johnson V A. Inheritance of an incompletely dominant character in common wheat simulating *Triticum sphaerococcum* [J]. *Crop Sci*, 1963, 3: 261-264
- [8] Zoz N N. Sphaerococcoid mutants induced by chemical mutagenes in common wheat *Triticum aestivum* L. [M]//Zoz N N, Rapoport I A. Teoriya Khimicheskogo mutagenезa (in Russian). Moscow: Nauka Publ, 1971: 122-124
- [9] Georgiev S. EMS-induced mutants of the sphaerococcum type in *T. aestivum* L. [J]. *Genetics and Plant Breeding*, 1976, 9: 218-227
- [10] Melnik. Genetic analysis of sphaerococcoid mutants of common wheat *Triticum aestivum* L. [M]//Yanchenko V I. Seleksiya selskokhoziystvennykh kultur v Altayskom Krae (in Russian). Novosibirsk: So Vaskhnil, 1988: 59-70
- [11] Maystrenko O I, Laikova L I, Arbuzova V S, et al. The chromosomal location of the *S1*, *S2* and *S3* genes of induced sphaerococcoid mutations in common wheat [C]. EWAC Newsletter Proceeding 10th EWAC meeting, Italy: University of Tuscia, 1998: 127-130
- [12] Salina E, Börner A, Leonova I, et al. Microsatellite mapping of the induced sphaerococcoid mutation genes in *Triticum aestivum* [J]. *Theor Appl Genet*, 2000, 100: 686-689
- [13] Gasperini D, Greenland A, Hedden P, et al. Genetic and physiological analysis of *Rht8* in bread wheat: an alternative source of semi-dwarfism with a reduced sensitivity to brassinosteroids [J]. *J Exp Bot*, 2012, 63 (12): 4419-4436
- [14] Gudesblat G E, Russinova E. Plants grow on brassinosteroids [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2011, 14 (5): 530-537
- [15] Hong Z, Ueguchi-Tanaka M, Umemura K, et al. A rice brassinosteroid-deficient mutant, *ebisu dwarf (d2)*, is caused by a loss of function of a new member of cytochrome P450 [J]. *Plant Cell*, 2003, 15: 2900-2910
- [16] Tanabe S, Ashikari M, Fujioka S, et al. A novel cytochrome P450 is implicated in brassinosteroid biosynthesis via the characterization of a rice dwarf mutant, *dwarf11*, with reduced seed length [J]. *Plant Cell*, 2005, 17: 776-790
- [17] Hong Z, Ueguchi-Tanaka M, Shimizu-Sato S, et al. Loss-of-function of a rice brassinosteroid biosynthetic enzyme, C-6 oxidase, prevents the organized arrangement and polar elongation of cells in the leaves and stem [J]. *Plant J*, 2002, 32: 495-508
- [18] Hong Z, Ueguchi-Tanaka M, Fujioka S, et al. The Rice brassinosteroid-deficient *dwarf2* mutant, defective in the rice homolog of *Arabidopsis diminuto/dwarf1*, is rescued by the endogenously accumulated alternative bioactive brassinosteroid, *dolichosterone* [J]. *Plant Cell*, 2005, 17 (8): 2243-2254