

河南小麦新品种的春化基因型鉴定

张江花, 高曼霞, 许海霞, 陈 锋, 崔党群

(河南农业大学农学院/河南省粮食作物协同创新中心, 郑州 450002)

摘要: 为了了解河南省最新培育小麦品种春化基因的等位变异状况, 本研究利用分子标记技术对河南省新培育的 50 份冬小麦新品系(种)的春化基因 *Vrn-A1*、*Vrn-B1*、*Vrn-D1* 和 *Vrn-B3* 位点的等位变异组成进行了鉴定和分析。结果表明, 所有参试小麦品种的 *Vrn-B3* 位点基因型均表现为隐性, 48 份小麦品种的 *Vrn-A1* 和 *Vrn-B1* 位点基因为隐性, 42 份小麦品种的 *Vrn-D1* 位点基因为隐性, 说明隐性基因在河南小麦中占据主导地位。其中, 豫农 2019、豫农 2020、豫农 2071、国麦 301、平安 08-8、百农 69、国麦 3698、08 漂 33 共 8 个小麦品种的 *Vrn-D1* 位点基因均为显性的 *Vrn-D1a* 类型。小麦品系豫农 2053 和豫农 3052 的 *Vrn-A1* 和 *Vrn-B1* 位点的春化基因均表现为缺失, 进一步研究表明, 这 2 份小麦新品系仍能正常开花, 但开花期比对照周麦 18 分别晚 1d 和 2d, 因此 *Vrn-A1* 和 *Vrn-B1* 并非小麦开花的必需基因。本研究将为黄淮海区广适、高产小麦新品种的选育和推广提供参考。

关键词: 普通小麦; 春化基因; 开花期; 等位变异

Allelic Variation of the Vernalization Genes in Henan New Bread Wheat Cultivars

ZHANG Jiang-hua, GAO Man-xia, XU Hai-xia, CHEN Feng, CUI Dang-qun

(Agronomy College/Collaborative Innovation Center of Grain Crops, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002)

Abstract: A total of 50 bread wheat cultivars or advanced lines from Henan province were used to identify allelic variation of vernalization response genes at the *Vrn-A1*, *Vrn-B1*, *Vrn-D1*, and *Vrn-B3* loci. The results showed that all wheat cultivars surveyed possessed recessive alleles at the *Vrn-B3* locus, and 48 cultivars possessed recessive alleles at the *Vrn-A1* and *Vrn-B1* loci, and 42 cultivars possessed recessive alleles at the *Vrn-D1* locus. It suggested that recessive alleles were the most prevalent at the *Vrn-A1*, *Vrn-B1*, *Vrn-D1*, and *Vrn-B3* loci in Henan bread wheat cultivars surveyed. Wheat cultivars with dominant vernalization genes at the *Vrn-D1* locus included 8 cultivars of Yunong 2019, Yunong 2020, Yunong 2071, Guomai 301, Ping'an 08-8, Bainong 69, Tunmai 3698, and 08 Luo 33. Two new lines Yunong 3052 and Yunong 2053, developed in Henan Agricultural University, showed the deletions of both *Vrn-A1* and *Vrn-B1* genes. However, these two cultivars still could normally flower in field but they flowered two-days later than Zhoumai 18. It suggested that *Vrn-A1* and *Vrn-B1* genes were not necessary for bread wheat flowering. This study could provide useful information for screening high-yield and wide-adaptability wheat cultivars in Chinese wheat breeding program.

Key words: bread wheat; vernalization gene; flowering time; allelic variation

春化是小麦品种的重要生长发育特性, 决定着小麦的发育进度、生长习性和生态类型, 也决定着小麦品种的种植布局和栽培措施。目前, 关于小麦春

化作用的分子调控机制研究已经取得了很大进展。小麦春化发育特性是由多基因调控的复杂生理过程。目前报道的对小麦春化特性起重要作用的基因

收稿日期: 2013-12-09 修回日期: 2013-12-26 网络出版日期: 2014-08-07

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20140807.1105.028.html>

基金项目: 国家“973”发展规划(2014CB138105); 教育部新世纪人才支持计划项目(NCET-13-0776); 河南省高校科技创新人才项目(2012HASTIT007)

第一作者主要从事小麦遗传育种研究。E-mail: jianghua628@163.com

通信作者: 陈锋, 主要从事小麦分子育种研究。E-mail: chf0088@gmail.com

主要有 4 个位点 *Vrn-A1*、*Vrn-B1*、*Vrn-D1* 和 *Vrn-B3*^[1-3],这 4 个基因位点分别位于小麦的 5A、5B、5D 染色体的长臂上和 7B 染色体的短臂上^[1]。其中 *Vrn-A1*、*Vrn-B1* 和 *Vrn-D1* 统称为 *VRN1*。研究表明,春化基因 *VRN1* 是决定小麦春化进程的主要基因之一^[4-5]。当这 3 个基因中有任何一个为显性时,小麦的发育特性为春性;若这 3 个基因全为隐性,小麦的发育特性为冬性^[1-2,6]。不同位点的春化基因对春化作用的效应不同,显性等位变异 *Vrn-A1* 的春性效应最强,并且对 *Vrn-B1* 和 *Vrn-D1* 位点基因具有上位性效应^[1-2,6-7]; *Vrn-B1* 和 *Vrn-D1* 的春化效应较弱,两者之间未发现上位作用^[2]。进一步研究表明,春化基因 *VRN1* 的编码区在冬、春性小麦品种间无差异,而在其启动子或第一内含子区域存在较大差异,这些差异是导致小麦不同春化特性的主要内因^[8-9]。在春性小麦品种中, *Vrn-A1* 基因的启动子区域存在 2 种显性等位变异类型,即 *Vrn-A1a* (存在插入变异) 和 *Vrn-A1b* (存在约 20 bp 的缺失)。但 *Vrn-B1* 和 *Vrn-D1* 基因的启动子区域在冬性品种间无差异。春性小麦品种的 *VRN1* 基因第一内含子中往往有大片段的缺失,这也是决定小麦品种春化特

性的重要调控区域。

春化基因决定小麦全生育周期长短的 70% ~ 75%^[7]。到目前为止,小麦 4 个主要春化位点 (*Vrn-A1*、*Vrn-B1*、*Vrn-D1*、*Vrn-B3*) 的基因已经被克隆, D. Fu 等^[9] 和 L. Yan 等^[10-11] 根据 *Vrn-A1*、*Vrn-B1*、*Vrn-D1* 和 *Vrn-B3* 这 4 个位点的序列差异,开发了 STS 标记,可用于小麦品种的春化基因检测以及冬春性检测。黄淮冬麦区属于我国 10 大麦区之一^[12],常年种植面积和总产分别占全国的 58.5% 和 67.6% 左右,是我国最大的小麦主产区,在全国小麦生产中占有举足轻重的地位。黄淮麦区种植的小麦品种主要为弱春性和半冬性类型^[13],本研究选用河南省最新培育的小麦品种,利用已经开发的分子标记对其春化基因的等位变异进行检测,并分析春化基因型和小麦开花期的关系,以期对黄淮麦区广适、高产小麦新品种的选育提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

选用河南省近 2 年培育的 50 份小麦新品种 (系) (表 1),其中 18 份为收集的近 2 年参加河南省

表 1 参试河南小麦新品种名称及其春化基因型

Table 1 Wheat cultivars surveyed and their vernalization response alleles and flowering days

名称 Name	春化基因型 Vernalization genotypes				开花天数(d) Flowering days	名称 Name	春化基因型 Vernalization genotypes				开花天数(d) Flowering days
豫农 1017	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	<i>vrn-B3</i>	206	豫农 2068	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	<i>vrn-B3</i>	206
豫农 1018	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	<i>vrn-B3</i>	205	豫农 2019	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>Vrn-D1</i>	<i>vrn-B3</i>	204
豫农 1034	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	<i>vrn-B3</i>	205	豫农 2020	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>Vrn-D1</i>	<i>vrn-B3</i>	204
豫农 1053	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	<i>vrn-B3</i>	206	豫农 2071	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>Vrn-D1</i>	<i>vrn-B3</i>	204
豫农 1070	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	<i>vrn-B3</i>	205	豫农 2032	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	<i>vrn-B3</i>	206
豫农 1085	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	<i>vrn-B3</i>	205	豫农 2017	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	<i>vrn-B3</i>	206
豫农 1279	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	<i>vrn-B3</i>	206	豫农 2053	Null	Null	<i>vrn-D1</i>	<i>vrn-B3</i>	207
豫农 1107	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	<i>vrn-B3</i>	205	国麦 301	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>Vrn-D1</i>	<i>vrn-B3</i>	204
豫农 1125	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	<i>vrn-B3</i>	206	天禾 3 号	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	<i>vrn-B3</i>	205
豫农 1126	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	<i>vrn-B3</i>	205	平安 08-8	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>Vrn-D1</i>	<i>vrn-B3</i>	205
豫农 1131	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	<i>vrn-B3</i>	205	中新 78	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	<i>vrn-B3</i>	204
豫农 1141	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	<i>vrn-B3</i>	206	濮农 1 号	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	<i>vrn-B3</i>	206
豫农 1162	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	<i>vrn-B3</i>	205	锦麦 8 号	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	<i>vrn-B3</i>	205
豫农 1173	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	<i>vrn-B3</i>	205	百农 69	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>Vrn-D1</i>	<i>vrn-B3</i>	204
豫农 3047	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	<i>vrn-B3</i>	206	囤麦 3698	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>Vrn-D1</i>	<i>vrn-B3</i>	203
豫农 3028	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	<i>vrn-B3</i>	205	周麦 18	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	<i>vrn-B3</i>	206
豫农 2257	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	<i>vrn-B3</i>	206	濮育 1 号	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	<i>vrn-B3</i>	205
豫农 2258	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	<i>vrn-B3</i>	206	亿麦 6 号	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	<i>vrn-B3</i>	205
豫农 3287	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	<i>vrn-B3</i>	206	粮丰 998	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	<i>vrn-B3</i>	208
豫农 3052	Null	Null	<i>vrn-D1</i>	<i>vrn-B3</i>	208	长河 24	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	<i>vrn-B3</i>	204
豫农 3053	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	<i>vrn-B3</i>	206	08 漯 33	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>Vrn-D1</i>	<i>vrn-B3</i>	206
豫农 3084	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	<i>vrn-B3</i>	205	郑麦 0856	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	<i>vrn-B3</i>	204
豫农 3022	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	<i>vrn-B3</i>	206	豫农 4023	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	<i>vrn-B3</i>	205
豫农 3023	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	<i>vrn-B3</i>	204	豫农 211	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	<i>vrn-B3</i>	205
豫农 2064	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	<i>vrn-B3</i>	205	豫农 279	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	<i>vrn-B3</i>	206

区域试验的冬水组小麦新品种(系),32份为河南农业大学以黄淮麦区小麦主要品种为骨干亲本培育的苗头新品系,不同品系之间没有明显亲缘关系。2009-2010年,于河南农业大学郑州科教园区种植所有材料,四周设置保护行,随机区组试验设计,3次重复。每份材料12行(一个小区),行长10 m,行间距20 cm。常规田间管理。待小麦品种抽穗后,所有参试材料均进行开花期的调查。

1.2 DNA 提取

参照 F. Chen 等^[14]小麦单子粒基因组 DNA 提取方法,提取参试小麦品系的基因组 DNA(各3份)后,经1%琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计进行质量和浓度检测后,将DNA定量稀释至工作液浓度

50 ng/μL,置于-20℃保存备用。

1.3 PCR 扩增

PCR反应体系为25 μL,总体积中含10×Taq buffer 2.5 μL,dNTP mix(10 mmol/L)0.5 μL,引物0.5 μL,Taq DNA聚合酶(2.5 U/μL)0.4 μL,模板DNA 2.0 μL,ddH₂O定容至25 μL。PCR反应条件为94℃预变性5 min;94℃变性30 s,50~62℃退火30 s,72℃延伸30~90 s,35个循环;72℃延伸10 min(表2)。引物VRN1AF/VRN1-INT1R的扩增产物用2%的琼脂糖凝胶电泳检测,120V电压下电泳40~60 min。其他引物的扩增产物用1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测,150 V电压电泳30~40 min。缓冲体系为1×TAE溶液,溴化乙锭染色,凝胶成像系统扫描成像,统计结果。

表2 检测普通小麦春化基因型所需引物及其扩增条件

Table 2 Primers and PCR conditions of specific primers for identification of vernalization genes in bread wheat cultivars

位点	等位基因	引物名称	序列	扩增长度(bp)	退火温度(℃)	参考文献
Locus	Allele	Primer name	Sequence(5'-3')	Expected band size	Annealing temperature	Reference
<i>Vrn-A1</i>	<i>Vrn-A1a</i>	VRN1AF	GAAAGGAAAAATTCTGCTCG	965/876	50	[8]
	<i>Vrn-A1b</i>	VRN1-INT1R	GCAGGAAATCGAAATCGAAG	714		[8]
	<i>Vrn-A1c</i>			734		
	<i>vrn-A1</i>			734		
	<i>Vrn-A1c</i>	Intr1/A/F2	AGCCTCCACGGTTTGAAAGTAA	1170	57	[9]
		Intr1/A/R3	AAGTAAGACAACACGAATGTGAGA			[9]
	<i>vrn-A1</i>	Intr1/C/F	GCACTCCTAACCCTAACC	1068	59	[9]
		Intr1/AB/R	TCATCCATCATCAAGGCAAA			[9]
<i>Vrn-B1</i>	<i>Vrn-B1</i>	Intr1/B/F	CAAGTGGAACGGTTAGGACA	709	58	[9]
		Intr1/B/R3	CTCATGCCAAAAATTGAAGATGA			[9]
	<i>vrn-B1</i>	Intr1/B/F	CAAGTGGAACGGTTAGGACA	1149	58	[9]
		Intr1/B/R4	CAAATGAAAAGGAATGAGAGCA			[9]
<i>Vrn-D1</i>	<i>Vrn-D1</i>	Intr1/D/F	GTTGCTGCGCTCATCAAATCC	1671	61	[9]
		Intr1/D/R3	GGTCACTGGTGGTCTGTGC			[9]
	<i>vrn-D1</i>	Intr1/D/F	GTTGCTGCGCTCATCAAATCC	997	59	[9]
		Intr1/D/R4	AAATGAAAAGGAACGAGAGCG			[9]
<i>Vrn-B3</i>	<i>Vrn-B3</i>	VRN4-B-INS-F	CATAATGCCAAGCCGGTGAGTAC	1200	62	[11]
		VRN4-B-INS-R	ATGTCTGCCAATTAGCTAGC			[11]
	<i>vrn-B3</i>	VRN4-B-NOINS-F	ATGCTTTGCTTGCCATCC	1140	60	[11]
		VRN4-B-NOINS-R	CTATCCCTACCGCCATTAG			[11]

1.4 春化基因的 STS 引物选择及其等位变异类型判定

引物VRN1AF/VRN1-INT1R检测*Vrn-A1*启动子区的变异,扩增到965 bp和876 bp 2条带的基因型为*Vrn-A1a*;仅扩增到714 bp条带的基因型为*Vrn-A1b*;显性变异*Vrn-A1c*和隐性*vrn-A1*均可扩增

到734 bp的条带。引物Intr1/A/F2和Intr1/A/R3检测*Vrn-A1*第1内含子区域的大片段缺失,扩增产物为1170 bp,基因型为*Vrn-A1c*;引物Intr1/C/F和Intr1/AB/R检测*Vrn-A1*第1内含子区域无大片段缺失,扩增产物为1068 bp,基因型为*vrn-A1*,这2对引物扩增结果互补。

引物 Intr1/B/F 和 Intr1/B/R3、Intr1/B/F 和 Intr1/B/R4 检测 *Vrn-B1* 第 1 内含子区域的变异,存在大片段缺失时,引物 Intr1/B/F 和 Intr1/B/R3 可扩增到 709 bp 的条带,基因型为显性的 *Vrn-B1*;不存在大片段缺失时,引物 Intr1/B/F 和 Intr1/B/R4 可扩增到 1149 bp 的条带,基因型为隐性的 *vrn-B1*,这 2 对引物扩增结果互补。

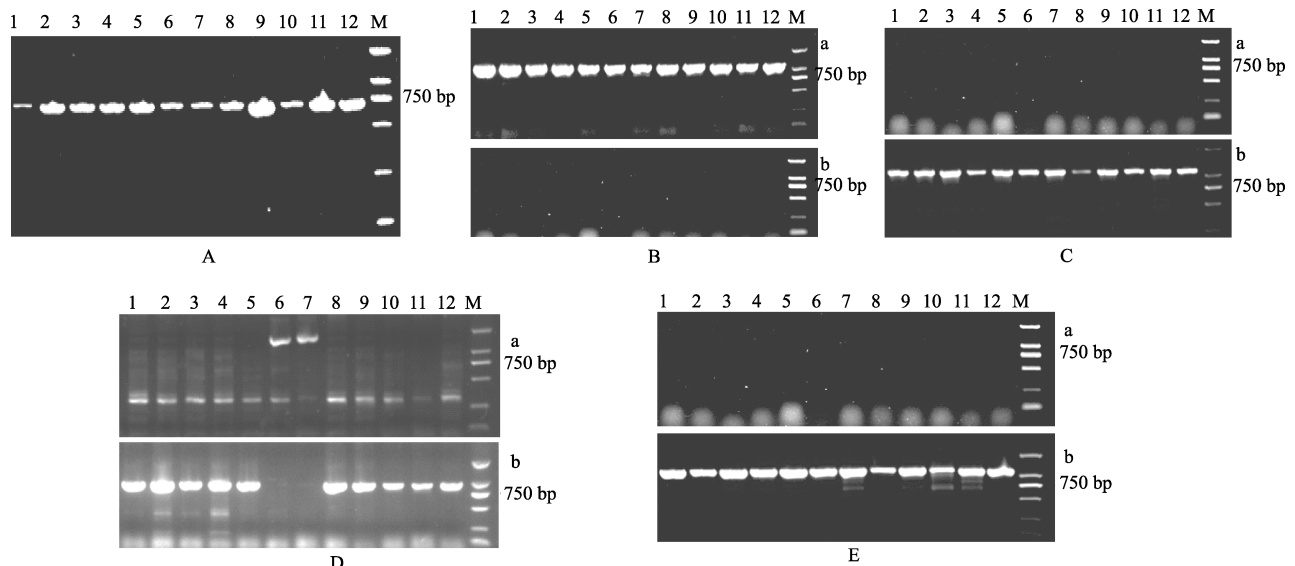
引物 Intr1/D/F 和 Intr1/D/R3、Intr1/D/F 和 Intr1/D/R4 检测 *Vrn-D1* 第 1 内含子区域的变异,存在大片段缺失时,引物 Intr1/D/F 和 Intr1/D/R3 可扩增出 1671 bp 的条带,基因型为显性的 *Vrn-D1*;不存在大片段缺失时,引物 Intr1/D/F 和 Intr1/D/R4 可扩增到 997 bp 的条带,基因型为隐性的 *vrn-D1*,这 2 对引物的扩增结果互补。

Vrn-B3 位点的显性和隐性等位变异可用引物 VRN4-B-INS-F 和 VRN4-B-INS-R、VRN4-B-NOINS-F 和 VRN4-B-NOINS-R 检测,扩增条带为 1200 bp 时,为显性等位变异 *Vrn-B3*;扩增条带为 1140 bp 时,为隐性等位变异 *vrn-B3*。

2 结果与分析

2.1 春化基因位点的分子检测结果

针对参试的 50 份材料,利用第 1 对引物 VRN1AF 和 VRN1-INT1R 进行检测,结果表明,除了豫农 3052 和豫农 2053 外,其余 48 份均扩增出了 734 bp 的条带,没有扩增出 965/876 bp 和 714 bp 的条带(图 1A),说明这 48 份材料均不携带显性等位变异 *Vrn-A1a* 和 *Vrn-A1b*,推测其可能携带显性等位变异 *Vrn-A1c* 或隐性等位变异 *vrn-A1*。利用第 2 对引物 Intr1/C/F 与 Intr1/AB/R 进一步检测表明,除了豫农 3052 和豫农 2053 没扩增出目标带外,余下的 48 份材料以及对照中国春均扩增出了 1086 bp 特异条带(图 1B-a);而利用第 3 对引物 Intr1/A/F2 与 Intr1/A/R3 进行检测时发现,参试的 50 份材料都没有扩增出 1170 bp 的特异条带(图 1B-b);以上检测结果说明除了豫农 3052 和豫农 2053 外,其他 48 份材料的 *Vrn-A1* 位点的第 1 内含子区域没有缺失,即不存在显性等位变异 *Vrn-A1c*,均携带隐性等位变异 *vrn-A1*。



A:引物对 VRN1AF 和 VRN1-INT1R 扩增结果;B:互补引物对 Intr1/C/F 和 Intr1/AB/R(a)以及引物对 Intr1/A/F2 和 Intr1/A/R3(b)扩增结果;C:互补引物对 Intr1/B/F 和 Intr1/B/R3(a)以及引物对 Intr1/B/F 和 Intr1/B/R4(b)扩增结果;D:互补引物对 Intr1/D/F 和 Intr1/D/R3(a)以及引物对 Intr1/D/F 和 Intr1/D/R4(b)扩增结果;E:互补引物对 VRN4-B-INS-F 和 VRN4-B-INS-R(a)以及引物对 VRN4-B-NOINS-F 和 VRN4-B-NOINS-R(b)扩增结果;1:豫农 1279;2:长河 24;3:濮农 1 号;4:郑麦 0856;5:周麦 18;6:国麦 301;7:

豫农 2020;8:豫农 2032;9:豫农 2064;10:豫农 2068;11:豫农 2257;12:豫农 2258;M:DL 2000

A:PCR amplification with primers VRN1AF and VRN1-INT1R,B:PCR amplification with primer set Intr1/C/F and Intr1/AB/R(a)and primer set Intr1/A/F2 and Intr1/A/R3(b),C:PCR amplification with primer set Intr1/B/F and Intr1/B/R3 (a) and primer set Intr1/B/F and Intr1/B/R4(b),

D:PCR amplification with primer set Intr1/D/F and Intr1/D/R3(a) and primer set Intr1/D/F and Intr1/D/R4(b),E:PCR amplification with primer set VRN4-B-INS-F and VRN4-B-INS-R(a) and primer set VRN4-B-NOINS-F and VRN4-B-NOINS-R(b),

1: Yunong 1279,2:Changhe 24,3:Punong 1,4:Zhengmai 0856,5:Zhoumai 18,6:Guomai 301,7:Yunong 2020,

8:Yunong 2032,9:Yunong 2064,10:Yunong 2068,11:Yunong 2257,12:Yunong 2258,M:DL 2000

图 1 利用分子标记检测参试小麦品种的春化基因型

Fig. 1 Identification of vernalization response genes in bread wheat cultivars surveyed by molecular markers

利用引物 Intrl/B/F 和 Intrl/B/R3 在参试材料中都没扩增出 709 bp 的特异条带(图 1C-a);利用引物 Intrl/B/F 和 Intrl/B/R4 进行检测时,除了豫农 3052 和豫农 2053 没扩增出目标带外,其他的均扩增出 1149 bp 的片段,表明参试的其余 48 份材料均携带隐性等位变异 *vrn-B1*(图 1C-b)。

利用引物 Intrl/D/F 和 Intrl/D/R3 进行检测发现,豫农 2019、豫农 2020、豫农 2071、国麦 301、平安 08-8、百农 69、国麦 3698、08 漂 33 等 8 份材料和对照中国春均扩增出 1671 bp 的特异条带,推断其含显性等位变异 *Vrn-D1*(图 1D-a);利用引物 Intrl/D/F 和 Intrl/D/R4 进行检测,其余 42 份材料扩增出 997 bp 的片段,推断这些材料含隐性等位变异 *vrn-D1*(图 1D-b)。

利用引物 VRN4-B-INS-F 和 VRN4-B-INS-R 进行检测时,所有参试材料都没扩增出 1200 bp 的条带(图 1E-a);利用引物对 VRN4-B-NOINS-F 和 VRN4-B-NOINS-R 进行检测时,所有参试材料均扩增出了 1140 bp 的条带,说明这些材料均含有隐性等位变异 *vrn-B3*(图 1E-b)。

2.2 春化基因型组合的分布及其与开花时间的关系

对不同品种间的春化基因型组合分析发现,参试小麦品种(系)在 *Vrn-A1*、*Vrn-B1*、*Vrn-D1* 和 *Vrn-B3* 4 个春化基因位点共有 3 种基因型组合,分别为 *vrn-A1/vrn-B1/vrn-D1/vrn-B3*、*vrn-A1/vrn-B1/Vrn-D1/vrn-B3* 和 *A1-null/B1-null/vrn-D1/vrn-B3*,其分布频率分别为 78%、18% 和 4%(表 3),表明在河南小麦新品系中,隐性基因型组合 *vrn-A1/vrn-B1/vrn-D1/vrn-B3* 是最为常见的类型。进一步分析不同基因型组合间的开花时间发现,拥有 *A1-null/B1-null/vrn-D1/vrn-B3* 基因型组合的小麦品种开花时间比拥有隐性基因型组合 *vrn-A1/vrn-B1/vrn-D1/vrn-B3* 的小麦品种晚 2.1d,表明 *Vrn-A1* 和 *Vrn-B1* 基因的缺失造成了小麦开花时间的延迟,这与先前研究中的小麦开花时间与 *Vrn-1* 基因表达量成正比的结果相一致^[11]。同时也表明,*Vrn-A1* 和 *Vrn-B1* 基因并不是小麦开花所必需的基因,这与 A. Chen 等^[15]利用 TILLING 技术对春化基因突变体筛选后的研究结果相一致。另外,本研究还发现,在 D 组拥有显性位点的春化基因型组合 *vrn-A1/vrn-B1/Vrn-D1/vrn-B3* 的小麦品种开花时间比拥有隐性基因型组合 *vrn-A1/vrn-B1/vrn-D1/vrn-B3* 的小麦品种开花时间提前了 0.8d,表明 *Vrn-D1* 位点为显性能够在一定程度上改变普通小麦的

冬春性,从而造成开花时间的提前。

表 3 不同春化作用基因型的开花时间比较

Table 3 Comparison of flowering days of bread wheat cultivars with different allelic combinations of vernalization response genes

基因型 Genotype	样品数 Sample number	频率(%) Frequency	开花天数(d) Flowering days
<i>vrn-A1/vrn-B1/Vrn-D1/vrn-B3</i>	9	18	204.2
<i>vrn-A1/vrn-B1/vrn-D1/vrn-B3</i>	39	78	205.4
<i>A1-null/B1-null/vrn-D1/vrn-B3</i>	2	4	207.5
总计 Total	50	100	205.3

3 讨论

河南省是我国目前最大的小麦种植省份,在我国小麦生产中占有举足轻重的地位。河南小麦品种基本都是冬小麦,而冬小麦品种需要经过一定时间的春化处理才能正常开花和抽穗。先前研究已经表明^[5,8-9],冬小麦开花主要受不同位点上的春化基因(*Vrn-1*、*Vrn-2* 和 *Vrn-3*)所调控。本试验对来自河南省的冬小麦品种春化基因型组合及其与开花时间的关系进行了研究,依据开花期的早晚来分析春化基因不同基因型组合的效应。从检测结果来看,参试材料中没有检测到显性等位变异 *Vrn-A1* 和 *Vrn-B1*,说明这些小麦品种(系)春化特性可能主要受显性基因 *Vrn-D1* 的调控。X. K. Zhang 等^[16]和张晶等^[17]对黄淮冬麦区小麦品种的春化基因型频率的检测结果为 *Vrn-D1* (93.3%) > *Vrn-B1* (6.7%) > *Vrn-A1* (0%) 和 *Vrn-B3* (0%),说明在黄淮冬麦区中显性等位变异 *Vrn-D1* 的分布频率占主导,这与本研究春化基因型组合的分布结果相一致。

本试验所选用的所有河南农业大学科教园区种植的小麦品种(系),经田间冬春性记载分析均为冬性。豫农 2019、豫农 2020、豫农 2071、国麦 301、平安 08-8、百农 69、国麦 3698、08 漂 33 与中国春春化基因的检测结果相同,理论应为春性品种。但是这与实际记载分析结果不符,这可能主要是因为小麦开花时间除了受 *Vrn-1* 对 *Vrn-3* 基因位点影响外,还受到其他多个基因以及环境条件的影响。已有研究表明,显性等位变异 *Vrn-A1* 对春化作用最不敏感,其次是 *Vrn-B1*,*Vrn-D1* 则对春化作用最为敏感^[18],

Vrn-A1 对 *Vrn-B1* 和 *Vrn-D1* 具有上位效应^[6]。同时,随着对春化基因研究的逐步深入,发现还可能存在有 *Vrn-4* 等春化基因,另外,春化和光周期基因的拷贝数对开花时间也具有重要影响^[19]。因此,本试验中的环境条件尽管一致,并采用了 3 次重复以消除环境效应的影响,但在其他影响小麦开花的基因位点可能存在着较大差异,因而导致了 8 个材料虽然基因型与中国春一致但最终表现型却不符的现象。所以,在利用分子标记对小麦冬春性进行分析的过程中,还要考虑到其他基因以及基因拷贝数所带来的影响,这样才能科学而准确地反映小麦品种的冬春性。

参考文献

- [1] 姜莹, 黄林周, 胡银岗. 中国小麦地方品种春化基因的分布及其与冬春性的关系 [J]. 中国农业科学, 2010, 43 (13): 2619-2632
- [2] Iqbal M, Shahzad A, Ahmed I. Allelic variation at the *Vrn-A1*, *Vrn-B1*, *Vrn-D1*, *Vrn-B3* and *Ppd-D1a* loci of Pakistani spring wheat cultivars. [J]. Electron J Biotech, 2011, 14: 1-8
- [3] 曹霞, 王亮, 冯毅, 等. 新疆小麦品种春化和光周期主要基因的组成分析 [J]. 麦类作物学报, 2010, 30 (4): 601-606
- [4] Trevakis B, Bagnall D J, Ellis M H, et al. MADS box genes control vernalization-induced flowering in cereals [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100 (22): 13099-13104
- [5] Yan L, Loukoianov A, Tranquilli G, et al. Positional cloning of the wheat vernalization gene *VRN1* [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100 (10): 6263-6268
- [6] Pugsley A F. A genetic analysis of the spring-winter habit of growth in wheat [J]. Aust J Agric Res, 1971, 22: 21-31
- [7] 张志红, 张晓科, 孙道杰, 等. 春化和光周期基因在陕西小麦品种中的分布 [J]. 麦类作物学报, 2009, 29 (3): 401-408
- [8] Yan L, Loukoianov A, Blechl A, et al. The wheat *VRN2* gene is a flowering repressor down-regulated by vernalization [J]. Science, 2004, 303: 1640-1644
- [9] Fu D, Szűcs P, Yan L, et al. Large deletions within the *VRN-1* first intron are associated with spring growth habit in barley and wheat [J]. Mol Genet Genomics, 2005, 273: 54-65
- [10] Yan L, Helguera M, Kato K, et al. Allelic variation at the *VRN1* promoter region in polyploid wheat [J]. Theor Appl Genet, 2004, 109: 1677-1686
- [11] Yan L, Fu D, Li C, et al. The wheat and barley vernalization gene *VRN3* is an orthologue of *FT* [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103 (51): 19581-19586
- [12] 杨宗渠, 尹钧, 周冉, 等. 黄淮麦区不同小麦基因型的春化发育特性研究 [J]. 麦类作物学报, 2006, 26 (2): 82-85
- [13] 庄巧生. 中国小麦品种改良及系谱分析 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2003: 100-105
- [14] Chen F, Xu H X, Zhang F Y, et al. Physical mapping of *puroindoline b-2* genes and molecular characterization of a novel variant in durum wheat (*Triticum turgidum* L.) [J]. Mol Breeding, 2011, 28: 153-161
- [15] Chen A, Dubcovsky J. Wheat *TILLING* mutants show that the vernalization gene *VRN1* down-regulates the flowering repressor *VRN2* in leaves but is not essential for flowering [J]. PLoS Genet, 2012, 8: e1003134
- [16] Zhang X K, Xiao Y G, Hang Y Z, et al. Allelic variation at the vernalization genes *Vrn-A1*, *Vrn-B1*, *Vrn-D1*, and *Vrn-B3* in Chinese wheat cultivars and their association with growth habit [J]. Crop Sci, 2008, 48: 458-471
- [17] 张晶, 吴锁伟, 刘秉华, 等. 黄淮冬麦区小麦冬、春性改良及分子标记辅助选择技术初探 [J]. 作物学报, 2010, 36 (3): 385-390
- [18] Yan M M, Wei G C, Pan X H, et al. A method suitable for extracting genomic DNA from animal and plant modified CTAB method [J]. Agric Sci Tech, 2008, 9 (2): 39-41
- [19] Diaz A, Zikhali M, Turner A S, et al. Copy number variation affecting the *photoperiod-B1* and *vernalization-A1* genes is associated with altered flowering time in wheat (*Triticum aestivum*) [J]. PLoS ONE, 2012, 7: e33234

欢迎订阅 2015 年《植物分类与资源学报》

《植物分类与资源学报》(原刊名《云南植物研究》)创刊于 1979 年,是由中国科学院主管、中国科学院昆明植物研究所及中国植物学会承办的全国性自然科学学术期刊。为“中国科学引文数据库来源期刊(CSCD)”、“中文核心期刊要目总览(2011 版)来源期刊”、“中国科技论文统计源期刊”及“中国科技核心期刊”等。

主要刊登以以下内容为主的原创性论文、简报和综述(以约稿为主):(1) 广义植物系统学相关学科:植物分类学、系统学、命名法、系统发生、植物区系和生物地理学;(2) 植物多样性保护及植物资源的可持续性利用:植物分子生物学、植物生理、植物生态学、植物化学及民族植物学;(3) 植物资源管理和监测;(4) 农业、林业、园艺及药用植物资源利用与保护。研究对象以野生植物为主,兼顾引种驯化后的野生物种;分布地以中国及喜马拉雅地区为主,兼顾其他地区。

双月刊,单月 25 日出版,每期 30 元,邮发代号:64-11,若在邮局漏订的读者可直接与编辑部联系订阅。

地址:(650201) 云南昆明市蓝黑路 132 号中国科学院昆明植物研究所

电话(传真): 0871-5223032

网址: <http://journal.kib.ac.cn>

E-mail: bianji@mail.kib.ac.cn linnana@mail.kib.ac.cn