

青海育成小麦 5 个主效矮秆基因的分子检测

徐晶晶¹, 蒋礼玲^{2,3}, 马晓岗², 宋 娇¹

(¹青海大学农牧学院, 西宁 810016; ²青海大学农林科学院/国家作物种质复份库/农业部作物基因资源与种质创新青海科学观测试验站, 西宁 810016; ³三江源生态与高原农牧业国家重点实验室, 西宁 810016)

摘要:为系统了解青海小麦矮秆基因的分布特点,并进一步为青海高原小麦的株高育种提供优异种质资源。本研究利用 5 个矮秆基因的特异性分子标记对 82 份青海小麦品种资源中的矮秆基因进行了检测,并对不同矮秆基因的降秆效应进行了分析。结果表明:82 份青海育成小麦品种中有 49 份材料至少含有一个矮秆基因,其中 *Rht-B1b* 的分布频率最高,约占参试材料的 28.0%,其次是分布频率为 23.2% 的 *Rht8* 基因,而矮秆基因 *Rht-D1b*、*Rht5* 以及 *Rht12* 的分布频率分别为 9.8%、13.4%、9.8%。在 49 份含有不同种类矮秆基因的材料中,其中 16 份材料同时含有 2 种及以上的矮秆基因,即 *Rht-B1b* 和 *Rht8*、*Rht-D1b* 和 *Rht8*、*Rht-B1b* 和 *Rht5*、*Rht-D1b* 和 *Rht5*、*Rht8* 和 *Rht5*、*Rht-B1b* 和 *Rht12*、*Rht5* 和 *Rht12*,并未发现同时含有矮秆基因 *Rht-B1b* 和 *Rht-D1b* 的品种;2 份材料分别含有 3 种矮秆基因,即 *Rht-B1b*、*Rht8*、*Rht12* 和 *Rht-B1b*、*Rht5*、*Rht8*;其余 31 份材料仅含有 1 种矮秆基因。82 份青海育成小麦材料中仅含有 *Rht-B1b* 的材料 11 份,平均株高为 86.2 cm,其降秆效应为 5.7%;只含有 *Rht-D1b* 的材料有 5 份,平均株高为 84.9 cm,其降秆效应为 7.1%;仅含有 *Rht8* 的材料有 9 份,平均株高为 88.6 cm,其降秆效应为 3.1%。因此,在青海育成小麦品种中,矮秆基因的降秆效应为 *Rht-D1b* > *Rht-B1b* > *Rht8*。

关键词:青海小麦;矮秆基因;分子标记;检测;分布频率

The Molecular Detection of Five Main Effect Dwarfing Genes in Qinghai Bred Wheat

XU Jing-jing¹, JIANG Li-ling^{2,3}, MA Xiao-gang², SONG jiao¹

(¹Qinghai University College of Agriculture and Animal Husbandry, Xining 810016; ²Qinghai Province Academy of Agriculture and Forestry/National Crop Germplasm Compound Library/Qinghai Research Station of Crop Gene Resource & Germplasm Enhancement, Ministry of Agriculture, Xining 810016; ³Ecological Farming and Animal Husbandry in The Key Laboratory of Three Rivers, Xining 810016)

Abstract: In order to understand the distribution characteristics of dwarf genes in Qinghai province and furtherly offer excellent germplasm resources of dwarfing breeding for Qinghai plateau wheat. 82 wheat varieties of Qinghai wheat were used to detect by five markers of dwarf genes. This study also analyzed the effect of different dwarf genes to reduce plant height. There were 49 bred wheats contained at least a dwarf gene in 82 Qinghai materials. Highest frequency of *Rht-B1b*, accounted for about 28.0% of the total materials. The second was *Rht8*, accounted for about 23.2% of the total materials. The distribution frequency of dwarf gene *Rht-D1b*, *Rht5* and *Rht12* was 9.8%, 13.4% and 9.8%, respectively. Including 16 materials contained two or more than 2 dwarf genes in 49 materials which contained different dwarf genes, namely *Rht-B1b* and *Rht8*, *Rht-D1b* and *Rht8*, *Rht-B1b* and *Rht5*, *Rht-D1b* and *Rht5*, *Rht8* and *Rht5*, *Rht-B1b* and *Rht12*, *Rht5* and *Rht12*. No varieties were found containig *Rht-B1b* and *Rht-D1b* genes at the same time in 82 Qinghai wheats. There were two varieties containing three dwarfing genes at the same time,

收稿日期:2016-09-12 修回日期:2016-10-17 网络出版日期:2017-04-18

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20170418.0917.004.html>

基金项目:青海省基础研究计划项目(2016-ZJ-773);青海高原特色冷冻作物优异种质创新与利用(2013BAD01B05-3);物种资源保护费项目(2016NWB023)

第一作者主要从事小麦分子育种。E-mail:3206847727@qq.com

通信作者:蒋礼玲,研究方向为作物分子育种与资源创新利用。E-mail:lilingjiang1015@126.com

马晓岗,研究方向为作物种质资源保护与利用。E-mail:mxg5988@sina.com

including one material contained *Rht-B1b*, *Rht8* and *Rht12* genes. Another one contained *Rht-B1b*, *Rht5* and *Rht8*. The rest of the 31 varieties each contained one dwarf gene. Their were 11 materials which only contained *Rht-B1b*, its average height was 86.2 cm, and what reduced the effect of plant height was 5.7%. Their were five materials which only contained *Rht-D1b*, its average height was 84.9 cm, and what reduced the effect of plant height was 7.1%. Only nine materials had dwarf gene *Rht8*, its average plant height was 88.6 cm, and what reduced the effect of plant height was 3.1%. Therefore, in the bred wheat varieties in Qinghai, the effect of reducing plant height of the three dwarf genes were *Rht-D1b* > *Rht-B1b* > *Rht8*.

Key words: Qinghai wheat; dwarfing gene; molecular markers; detection; distribution frequency

小麦株高是由基因型和环境共同决定的^[1-2],矮秆基因除了具有降秆作用外,也会影响植株的其他形态学性状,因此了解矮秆基因的特点以及对农艺性状造成的影响会大大有利于今后的育种研究。小麦株高过高会造成茎秆变细,风一吹容易出现倒伏现象,这对小麦的高产是很不利的,如果倒伏发生在灌浆期或者是灌浆早期,倒伏对产量造成的不利影响无疑是最大的。适当的降低株高可以使小麦茎秆粗壮,提高小麦的抗倒伏能力,从而提高小麦产量。然而株高并不是越低越好,在一定范围内与产量呈正相关,小麦过度矮小反而会使产量下降。因此,应当充分利用这些矮源基因获得一个株高与产量的理想值,从而进一步提高小麦产量。早在 20 世纪末全世界就已经开始推广矮化以及半矮化的小麦品种,世界小麦产量得到了较大提高,并且每年都有突破。目前虽然已经发现很多具有主效降秆作用的矮秆基因,但是在生产中利用最多的还是来自于农林 10 号的 *Rht-B1b*、*Rht-D1b* 以及赤小麦的 *Rht8*^[3-5]。一些已经发掘出来的矮秆基因在生产上的应用还比较少,因此,深入分析新型矮秆基因的遗传效应及实现矮秆基因的多元化利用,才能进一步提高小麦产量。

分子标记检测具有位点多、多态性高及方法简便等优点,被广泛用于矮秆基因定位和绘制遗传图谱中。M. H. Ellis 等^[6]开发的 STS 标记可快速、准确检测 *Rht-B1b* 和 *Rht-D1b* 这 2 个矮秆基因,V. Korzun 等^[7]和 A. J. Worland 等^[8]开发的 SSR 标记可快速鉴定矮秆基因 *Rht8*。J. R. Peng 等^[9]克隆了分别位于小麦 4BL 和 4DL 染色体上的 *Rht-B1b* 和 *Rht-D1b* 的同源基因。万平等^[10]开发了与 *Rht3* 基因紧密连锁的分子标记;A. X. Li 等^[11]开发了 *Rht-B1e* 基因的分子标记等。M. H. Ellis 等^[12]还获得与矮秆基因 *Rht4*、*Rht5*、*Rht8*、*Rht9*、*Rht12* 以及 *Rht13* 紧密连锁的分子标记。这些标记的准确性也得到了很多

学者的验证,例如杨松杰等^[13]、周阳等^[14]、唐娜等^[15]利用分子标记技术对我国小麦品种中的 *Rht-B1b*、*Rht-D1b* 和 *Rht8* 等矮秆基因的分布情况进行了检测,了解了不同的矮秆基因在我国的利用率。慕美财等^[16]在研究山东小麦矮秆基因的分布时发现 *Rht-D1b* 基因频率远高于 *Rht-B1b*。随着科技的不断发展和创新,分子标记在育种上取得了很大进步,虽然在矮化和半矮化育种方面也取得了不俗的进展,但是生产上利用较多和研究比较深入的矮秆基因十分有限,仅仅局限在最常见的主效矮秆基因上,缺乏对已经发掘出来的其他矮秆基因的充分利用和详细研究。除此之外,对新的矮秆种质资源缺乏筛选和创造,这可能就是造成矮化育种发展变缓的原因。为了提高矮化和半矮化育种效率,进一步实现增产,育种工作需要向未知领域进行深入研究,现在越来越多的研究人员把重心转移到克隆新的矮秆基因和开发新型的分子标记上,这对矮秆基因的多元化利用具有深远影响。

本研究利用 M. H. Ellis 等^[6,12]和 V. Korzun^[7]公布的矮秆基因分子标记对 82 份青海育成小麦品种中所含有的矮秆基因进行检测,分析不同矮秆基因在该批小麦中的分布特点,以期矮秆更高产新品种的培育提供指导。

1 材料与方法

1.1 材料

82 份青海育成小麦种质资源由青海大学和青海省农林科学院提供,供试材料相关信息见表 1,赤小麦、农林 10 号由国家种质复份库(青海)提供。

1.2 方法

1.2.1 田间株高调查 在 2015 年 3 月中旬和 2016 年 3 月中旬把 82 份青海小麦品种种植于青海大学试验田,每个品种种植 3 行,点播,株距约 10~15 cm,

表 1 82 份青海育成小麦品种

Table 1 82 bred wheat varieties in Qinghai

编号 Number	名称 Name	审定年份 Examine time	编号 Number	名称 Name	审定年份 Examine time
1	青春 415	1993/1/14	42	高原 932	1999/11/25
2	高原 466	未审定	43	香农 3 号	未审定
3	柴春 044	1988/12	44	民和 853	1998/3/2
4	新哲 9 号	1988/12	45	洋麦子	未审定
5	高原 V028	1998/3/2	46	ME-47	未审定
6	互麦 13 号	2000/12/25	47	高原 158	未审定
7	烟福 188	2004/2/19	48	高原 506	未审定
8	青春 524	未审定	49	铁普麦	未审定
9	高原 175	未审定	50	ME-45	未审定
10	柴春 901	1994/9/23	51	普冰 133	未审定
11	青春 570	1996/11/7	52	杨麦 16 号	未审定
12	互麦 15	2005/12/9	53	兰天(选系)	未审定
13	山早 901	2005/1/10	54	青春 41	未审定
14	兰天 3 号	2001/12/14	55	13 繁 516-2	未审定
15	高原 448	1999/11/25	56	13796	未审定
16	青春 38	2005/12/9	57	13799	未审定
17	民和 588	1999/11/25	58	13 繁 530	未审定
18	民和 665	2001/12/4	59	13 繁 516-1	未审定
19	高原 913	1998/3/2	60	青紫 1 号	未审定
20	墨引 2 号	2004/2/19	61	兰天 15	未审定
21	柴春 018	1988	62	乐麦 5 号	1998/3/2
22	高原 205	1998/3/2	63	高原 776	未审定
23	青春 587	2000/12/25	64	高原 115	2001/12/14
24	青春 39	2005/12/9	65	吉农 469	未审定
25	青农 469	未审定	66	墨引 1 号	2004/2/19
26	高原 368	未审定	67	阿勃	1963 年推广
27	通麦 1 号	2005/1/10	68	高原 338	1981/6/8
28	宁春 26	2003/1/22	69	乐麦 6 号	2004/2/19
29	宁春 811	未审定	70	张春 811	1994/12/1
30	高原 465	未审定	71	曹选 5 号	未审定
31	高原 314	2001/12/14	72	青春 40	2006/12/12
32	青春 144	2003/1/22	73	新麦繁 4	未审定
33	源卓 3 号	2005/12/9	74	兰考 906	2001/12/14
34	墨波 1 号	未审定	75	林农 20 号	未审定
35	高原 584	1999/11/25	76	宁春 4 号	未审定
36	青春 254	1996/11/6	77	青加 1 号	未审定
37	青春 952	2001/12/14	78	青加 2 号	未审定
38	青春 37	2005/1/10	79	90-1073	未审定
39	瀚海 304	1986	80	09098	未审定
40	柴春 236	1988/12	81	09101	未审定
41	高原 356	1994/11/30	82	高原 602	1987

行距 20 cm, 行长 2.0 m, 品种间间隔 50 cm, 避免混种。试验期间保持试验田水肥一致, 定期人为除草。待小麦灌浆后期测量小麦株高。每个材料随机取 10 株测量并进行统计学分析。

1.2.2 DNA 的提取 采用 CTAB^[17] 法并稍加改良提取小麦叶片总 DNA, 并用核酸浓度检测仪检测

DNA 浓度, 用去离子水溶解至 40 ~ 60 ng/ μ L, 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。

1.2.3 PCR 扩增 扩增矮秆基因 *Rht5*、*Rht8*、*Rht12*、*Rht-B1b* 和 *Rht-D1b* 参照 M. H. Ellis 等^[6,12] 和 V. Korzun 等^[7] 发表的引物序列, 检测矮秆基因 *Rht5*、*Rht8*、*Rht12*、*Rht-B1b* 和 *Rht-D1b* 所用引物见表 2, 所

有引物均由上海生工合成。PCR 扩增体系和扩增程序参照杨松杰等^[13]的研究。

Rht5、*Rht8*、*Rht12* 这 3 个矮秆基因用 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测,缓冲液采用 1 × TBE,电

泳 1 h 后,银染、显影并统计条带。*Rht-B1b* 和 *Rht-D1b* 矮秆基因的检测采用 1.5% 的琼脂糖凝胶,缓冲液采用 0.5 × TBE,120 V 电泳 40 min,凝胶成像仪下观察条带、照相并保存图片。

表 2 不同矮秆基因的分子标记及引物序列

Table 2 Molecular markers and its primer sequences of different dwarfing genes

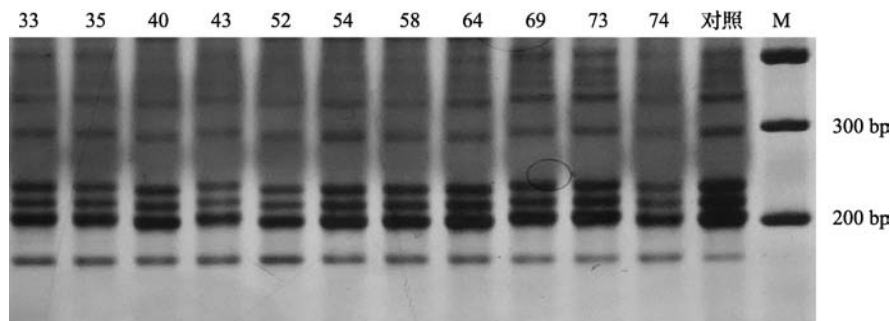
矮秆基因 Dwarf gene	分子标记 Molecular marker	引物序列 Primer sequence	片段长度 (bp) Fragment length	退火温度 (°C) Annealing temperature
<i>Rht-B1b</i>	<i>BF-MR1</i>	BF:GGTAGGGAGCGAGAGCGGAG MR1:CATCCCCATGGCCATCTCGAGCTA	237	63
<i>Rht-B1a</i>	<i>BF-WR1</i>	BF:GGTAGGGAGCGAGAGCGGAG WR1:CATCCCCATGGCCATCTCGAGCTC	237	63
<i>Rht-D1b</i>	<i>DF-MR2</i>	DF:CGCGCAATTATTGGCCAGAGATAG MR2:CCCCATGGCCATCTCGAGCTGCTA2	54	63
<i>Rht-D1a</i>	<i>DF2-WR2</i>	DF2:GGCAAGCAAAAGCTTCGCG WR2:GGCCATCTCGAGCTGCAC	264	63
<i>Rht5</i>	<i>BARC102</i>	F:GGAGAGGACCTGCTAAAATCGAAGACA R:GCGTTTACGGATCACTGTTGGAGA	200	52
<i>Rht8</i>	<i>Xgwm261</i>	F:CTCCCTGTACGCCTAAGGC R:CTCGCGCTACTAGCCATTG	192	55
<i>Rht12</i>	<i>WMC410</i>	F:CGCATAAACACCTTCGCTCTTCCACTC R:CGCATAAACACCTTCGCTCTTCCACTC	114	61

2 结果与分析

2.1 *Rht8* 基因的检测结果

本研究利用 V. Korzun 等^[7]开发的与 *Rht8* 矮秆基因连锁比较紧密的分子标记 *Xgwm261* 对 82 份青海育成小麦品种中的 *Rht8* 矮秆基因的分布进行检测,并选用含有矮秆基因 *Rht8* 的赤小麦作为对照。实验结果表明赤小麦在引物 *Xgwm261* 下能扩增出了 192 bp 的片段,82 份青海育成小麦品种中有 19 份材

料(高原 446、柴春 044、烟福 188 等)和对照赤小麦一样扩增出了 192 bp 的片段(图 1),说明有 19 份材料可能含有 *Rht8* 矮秆基因,在该批供试材料中所占的比例为 23.2%,可见矮秆基因 *Rht8* 的利用率较高。除此之外,还有一些材料在 *Xgwm261* 下扩增出了其他片段长度,说明在该位点还存在其他类型的等位变异。因此,即使有些材料在 *Xgwm261* 下可以扩增,也不能说明含有矮秆基因 *Rht8*,必须通过测序确定片段大小,才能最终确定是否含有矮秆基因 *Rht8*。



M:DNA Marker I;对照:赤小麦;33:源卓 3 号;35:高原 584;40:柴春 236;43:香农 3 号;
52:杨麦 16 号;54:青春 41;58:13 繁 530;64:高原 115;69:乐麦 6 号;73:新麦繁 4;74:兰考 906
M:DNA Marker I, Contrast: Akagomugi, 33: Yuanzhuo 3, 35: Gaoyuan 584, 40: Chachun 236, 43: Xiangnong 3,
52: Yang wheat 16, 54: Qingchun 41, 58: 13 Fan 530, 64: Gaoyuan 115, 69: Le wheat 6, 69: Xin wheat fan 4, 74: Lankao 906

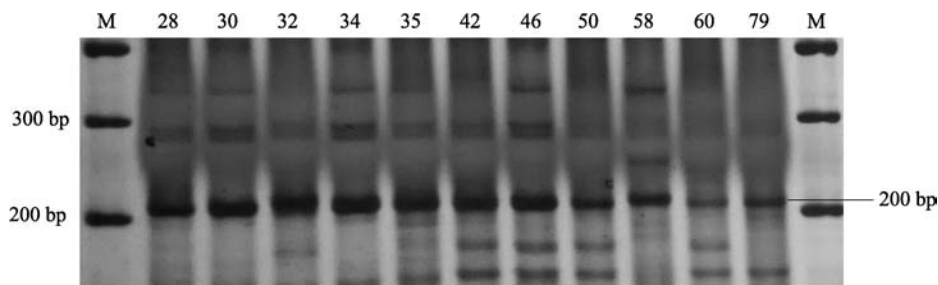
图 1 *Rht8* 基因的检测结果

Fig. 1 Detection result of dwarfing gene *Rht8*

2.2 *Rht5* 和 *Rht12* 基因的检测结果

参考 M. H. Ellis 等^[12]开发的分子标记,若含有 *Rht5* 矮秆基因,在 *BARC102* 位点可扩增出 200 bp 的片段,相反,在 *BARC102* 位点则无扩增产物出现。若含有 *Rht12* 矮秆基因,在 *WMC410* 位点可以扩增出 114 bp 的片段,相反,则在 *WMC410* 位点无扩增产物出现。本研究发现,82 份青海育成小麦品种中有 11 个材料(宁春 26、高原 465、青春 144、墨波 1 号等)在 *BARC102* 位点扩增出 200 bp 的片段(图 2),说明可能含有 *Rht5* 矮秆基因,约占该批供试材料的 13.4%,可

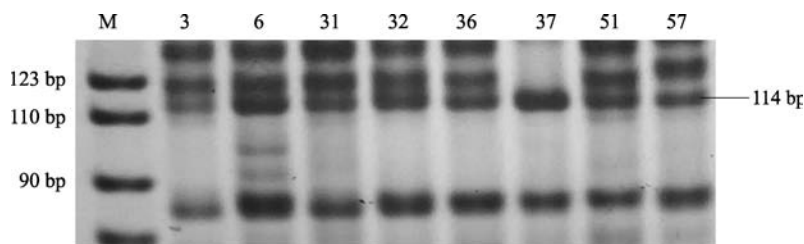
见 *Rht5* 矮秆基因的利用率较低。共有 8 份材料(柴春 044、互麦 13 号、高原 314、青春 144 等)在 *WMC410* 位点能扩增出 114 bp 的片段,说明可能含有 *Rht12* 矮秆基因(图 3),约占该批供试材料的 9.8%,说明矮秆基因 *Rht12* 的利用率偏低。矮秆基因 *Rht5* 和 *Rht12* 并不像 *Rht8*、*Rht-B1b* 和 *Rht-D1b* 一样在生产上的利用率特别高,本研究发现的 11 个含有 *Rht5* 矮秆基因的材料以及 8 个含有 *Rht12* 矮秆基因的材料可在今后的育种研究中进行一些深入研究,从而为培育高产稳产和抗倒伏小麦新品种提供原材料。



M: DNA Marker I; 28: 宁春 26; 30: 高原 465; 32: 青春 144; 34: 墨波 1 号; 35: 高原 584; 42: 高原 932; 46: ME-47; 50: ME-45; 58: 13 繁 530; 60: 青紫 1 号; 79: 90-1073
M: DNA Marker I; 28: Ningchun 26, 30: Gaoyuan 465, 32: Qingchun 144, 34: Mobo 1, 35: Gaoyuan 584, 42: Gaoyuan 932, 46: ME-47, 50: ME-45, 58: 13 Fan 530, 60: Qingzi 1, 79: 90-1073

图 2 *Rht5* 基因的分子标记检测结果

Fig. 2 Detection result of dwarfing gene *Rht5*



M: pBR322 DNA/Mspl; 3: 柴春 044; 6: 互麦 13; 31: 高原 314; 32: 青春 144; 36: 青春 254; 37: 青春 952; 51: 普冰 133; 57: 13799
M: pBR322 DNA/Mspl; 3: Chaichun 044, 6: Hu wheat 13, 31: Gaoyuan 314, 32: Qingchun 144, 36: Qingchun 254, 37: Qingchun 952, 51: Pubing 133, 57: 13799

图 3 *Rht12* 基因的分子标记检测结果

Fig. 3 Detection result of dwarfing gene *Rht12*

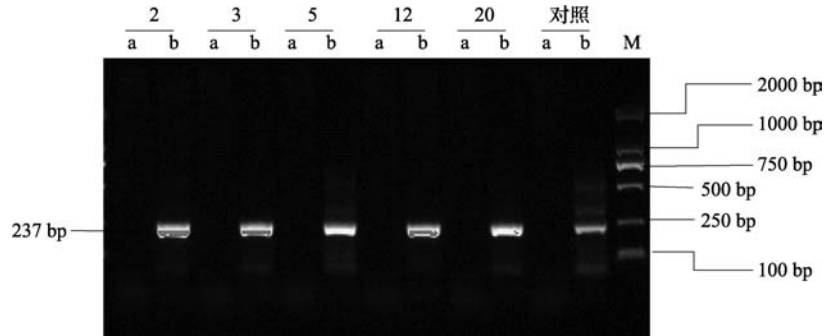
2.3 *Rht-B1b* 基因和 *Rht-D1b* 基因的检测结果

根据 M. H. Ellis 等^[6]设计的引物,检测矮秆基因 *Rht-B1b* 在 82 份青海育成小麦品种中的分布情况。若含有矮秆基因 *Rht-B1b*,在引物 BF-MR1 下可扩增出 237 bp 的片段,在引物 BF-WR1 下则无扩增产物。若不含矮秆基因 *Rht-B1b*,在引物 BF-MR1 下无扩增产物出现,而在引物 BF-WR1 下可扩增出 237 bp 的片段, *Rht-B1b* 基因有野生型和突变型两个位点,野生型的基因型为 *Rht-B1a* 表现为高秆,突变型的基因型为 *Rht-B1b*,表现为矮秆。两对互补引物 BF-MR1 和 BF-WR1 对同一个材料可以相互印证

以增加实验的准确性。本研究以含有 *Rht-B1b* 矮秆基因的农林 10 号作为阳性对照,以不含矮秆基因 *Rht-B1b* 的赤小麦作为阴性对照,扩增结果显示农林 10 号在 BF-MR1 下扩增出了 237 bp 的片段长度,在 BF-WR1 下无扩增产物出现,说明含有 *Rht-B1b* 矮秆基因。赤小麦在 BF-MR1 下无扩增产物出现,在 BF-WR1 下扩增出了 237 bp 的产物,说明不含 *Rht-B1b* 基因,实验结果与事实相符,准确可信。经过检测发现 82 份青海育成小麦材料其中有共 23 份(高原 446、柴春 044、高原 V028、互麦 15、墨引 2 号等)与对照农林 10 号一样在引物 BF-MR1 下扩增出

了 237 bp 的片段,说明这 23 份小麦材料含有 *Rht-B1b* 矮秆基因,如图 4 所示。含有矮秆基因 *Rht-B1b* 的材

料占该批材料的 28.0%,说明矮秆基因 *Rht-B1b* 在该 82 份青海育成小麦品种中的分布频率较高。



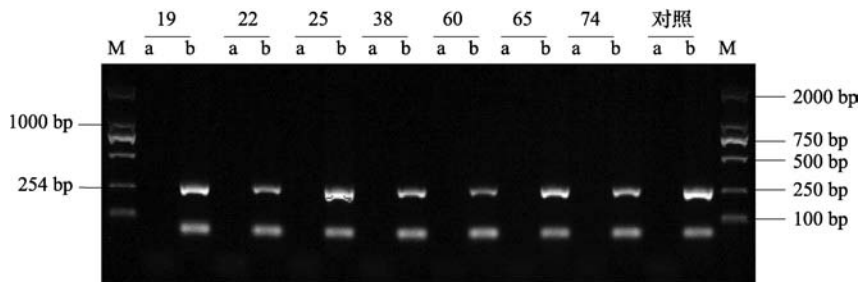
M: Marker D2000;对照:农林 10 号;2:高原 446;3:柴春 044;5:高原 V028;12:互麦 15;20:墨引 2 号;
a:*Rht-B1a* 基因特异性引物的 PCR 扩增产物;b:*Rht-B1b* 基因特异性引物的 PCR 扩增产物
M: Marker D2000, Contrast; Nonglin 10, 2: Gaoyuan 446, 3: Chaichun 044, 5: Gaoyuan V028, 12: Hu wheat 15, 20: Moyin 2,
a: PCR product amplified with the primer set BF-WR1 for the allele *Rht-B1a*,
b: PCR product amplified with the primer set BF-MR1 for the allele *Rht-D1b*

图 4 *Rht-B1b* 基因的检测结果

Fig. 4 Detection result of dwarfing gene *Rht-B1b*

根据 M. H. Ellis 等^[6]设计的引物,检测矮秆基因 *Rht-D1b* 在 82 份青海育成小麦品种中的分布。*Rht-D1b* 基因有野生型和突变型两个位点,野生型的基因型为 *Rht-D1a* 表现为高秆,突变型的基因型为 *Rht-D1b*,表现为矮秆。若含有矮秆基因 *Rht-D1b*,在引物 DF-MR2 下可扩增出 254 bp 的片段,在引物 DF-WR2 下则无扩增产物。若不含矮秆基因 *Rht-D1b*,在引物 DF-MR2 下无扩增产物出现,在引物 DF-WR2 下可扩增出 264 bp 的片段,同一个材料可以用这两对互补引物互相验证,以增加实验的准

确性和可信性。本研究用农林 10 号作为对照,扩增结果显示,农林 10 号在引物 DF-MR2 下扩增出了 254 bp 的产物,在引物 DF-WR2 下无扩增产物出现,说明农林 10 号含有 *Rht-D1b* 矮秆基因(图 5),实验结果与事实相符。经检测,82 份青海育成小麦材料中共有 8 份(高原 913、高原 205、青农 469、青春 37 等)在引物 DF-MR2 下扩增出了 254 bp 的片段,说明含有 *Rht-D1b* 基因。含有矮秆基因 *Rht-D1b* 的材料约占 82 份青海育成小麦品种的 9.8%,说明矮秆基因 *Rht-D1b* 的分布频率较低。



M: Marker D2000;对照:农林 10 号;19:高原 913;22:高原 205;25:青农 469;38:青春 37;60:蓝紫 1 号;65:吉农 469;
74:兰考 906;a:*Rht-D1a* 基因特异性引物的 PCR 扩增产物;b:*Rht-D1b* 基因特异性引物的 PCR 扩增产物
M: Marker D2000, Contrast; Nonglin 10, 19: Gaoyuan 913, 22: Gaoyuan 205, 25: Qingnong 469,
38: Qingchun 37, 60: Lanzi 1, 65: Jinong 469, 74: Lankao 906, a: PCR product amplified with the primer set DF2-WR2 for the allele *Rht-D1a*,
b: PCR product amplified with the primer set DF-MR2 for the allele *Rht-D1b*

图 5 *Rht-D1b* 基因的检测结果

Fig. 5 Detection result of dwarfing gene *Rht-D1b*

2.4 青海小麦矮秆基因的分布

82 份青海育成小麦品种中约有 60% 的材料至少含有一个矮秆基因,各个材料所含的矮秆基因详

见表 3,其中 *Rht-B1b* 的分布频率最高约占总材料的 28.0%,其次是 *Rht8* 基因,约占总材料的 23.2%。矮秆基因 *Rht-D1b*、*Rht5* 以及 *Rht12* 的分布频率分别

为9.8%、13.4%、9.8%。在含有矮秆基因的品种中,含有2个和2个以上矮秆基因的材料18个,占总材料的22.0%。有4个材料同时含有*Rht-B1b*和*Rht8*矮秆基因,2个材料同时含有*Rht-D1b*和*Rht8*矮秆基因,5个材料同时含有*Rht-B1b*和*Rht5*矮秆基因,2个材料同时含有*Rht8*和*Rht5*矮秆基因,有1个材料同时含有*Rht-D1b*和*Rht5*矮秆基因,1个材料同时含有矮秆基因*Rht-B1b*和*Rht12*,1个材

料同时含有矮秆基因*Rht5*和*Rht12*。有2个品种同时含有3个矮秆基因,其中一个品种同时含有*Rht-B1b*、*Rht8*、*Rht12*这3个矮秆基因,而另一个品种则同时含有*Rht-B1b*、*Rht5*、*Rht8*这3个矮秆基因。其余31个品种各含有1个矮秆基因。同时含有*Rht-B1b*和*Rht-D1b*的品种并没有在该批材料中发现。共发现了14种矮秆基因的组合类型,如图6所示。

表3 青海小麦矮秆基因的分子检测结果及株高

Table 3 Molecular tested results and their plant height of the dwarfing genes

编号 Number	品种名称 Material name	矮秆基因 Dwarf gene	株高(cm) Plant height	编号 Number	品种名称 Material name	矮秆基因 Dwarf gene	株高(cm) Plant height
1	青春415	—	93.8	42	高原932	<i>Rht-B1b</i> 、 <i>Rht5</i>	100.3
2	高原446	<i>Rht-B1b</i> 、 <i>Rht8</i>	78.5	43	香农3号	<i>Rht8</i>	87.9
3	柴春044	<i>Rht-B1b</i> 、 <i>Rht8</i> 、 <i>Rht12</i>	72.2	44	民和853	—	101.2
4	新哲9号	—	85.9	45	洋麦子	—	130.3
5	高原V028	<i>Rht-B1b</i>	89.9	46	ME-47	<i>Rht-B1b</i> 、 <i>Rht5</i>	80.6
6	互麦13号	<i>Rht12</i>	98.9	47	高原158	—	118.8
7	烟辐188	<i>Rht8</i>	68.9	48	高原506	<i>Rht-B1b</i>	95.1
8	青春524	—	70.3	49	铁普麦	—	102.5
9	高原175	—	119.6	50	ME-45	<i>Rht-B1b</i> 、 <i>Rht5</i>	78.7
10	柴春901	<i>Rht8</i>	78.1	51	普冰133	<i>Rht-B1b</i> 、 <i>Rht12</i>	69.7
11	青春570	—	94.2	52	杨麦16号	<i>Rht-B1b</i> 、 <i>Rht8</i>	75.4
12	互麦15	<i>Rht-B1b</i> 、 <i>Rht8</i>	89.5	53	兰天(选系)	—	97.0
13	山早901	—	100.0	54	青春41	<i>Rht8</i>	99.6
14	兰天3号	<i>Rht8</i>	74.3	55	13繁516-2	—	106.6
15	高原448	<i>Rht8</i>	80.4	56	13796	—	119.2
16	青春38	—	90.3	57	13799	<i>Rht12</i>	97.5
17	民和588	—	88.7	58	13繁530	<i>Rht8</i> 、 <i>Rht5</i>	99.3
18	民和665	—	91.1	59	13繁516-1	—	95.3
19	高原913	<i>Rht-D1b</i>	94.2	60	青紫1号	<i>Rht-D1b</i> 、 <i>Rht5</i>	80.8
20	墨引2号	<i>Rht-B1b</i>	86.9	61	兰天15	—	88.3
21	柴春018	—	102.4	62	乐麦5号	—	100.4
22	高原205	<i>Rht-D1b</i> 、 <i>Rht8</i>	63.6	63	高原776	—	96.7
23	青春587	<i>Rht8</i>	101.7	64	高原115	<i>Rht-B1b</i>	83.6
24	青春39	<i>Rht8</i>	108.2	65	吉农469	<i>Rht-D1b</i>	82.3
25	青农469	<i>Rht-D1b</i>	88.5	66	墨引1号	<i>Rht-B1b</i>	85.6
26	高原368	—	124.8	67	阿勃	—	118.0
27	通麦1号	—	120.3	68	高原338	<i>Rht-B1b</i>	86.0
28	宁春26	<i>Rht-B1b</i> 、 <i>Rht5</i>	84.1	69	乐麦6号	—	89.4
29	宁春811	—	87.5	70	张春811	—	81.0
30	高原465	<i>Rht-B1b</i> 、 <i>Rht8</i> 、 <i>Rht5</i>	78.3	71	曹选5号	—	110.9
31	高原314	<i>Rht12</i>	85.9	72	青春40	—	76.8
32	青春144	<i>Rht5</i> 、 <i>Rht12</i>	100.0	73	新麦繁4	<i>Rht-B1b</i>	92.6
33	源卓3号	<i>Rht8</i>	98.1	74	兰考906	<i>Rht-D1b</i> 、 <i>Rht8</i>	66.6
34	墨波1号	<i>Rht5</i>	82.8	75	林农20号	—	100.2
35	高原584	<i>Rht8</i> 、 <i>Rht5</i>	102.5	76	宁春4号	<i>Rht-D1b</i>	75.7
36	青春254	<i>Rht12</i>	68.6	77	青加1号	<i>Rht-B1b</i>	64.6
37	青春952	<i>Rht12</i>	104.8	78	青加2号	<i>Rht-B1b</i>	68.5
38	青春37	<i>Rht-D1b</i>	83.9	79	90-1073	<i>Rht-B1b</i> 、 <i>Rht5</i>	84.4
39	瀚海304	<i>Rht-B1b</i>	87.5	80	09098	<i>Rht-B1b</i>	107.7
40	柴春236	<i>Rht-B1b</i> 、 <i>Rht8</i>	78.2	81	09101	—	110.3
41	高原356	—	83.0	82	高原602	—	95.4

—表示不含矮秆基因

—indicates that there are no dwarf genes

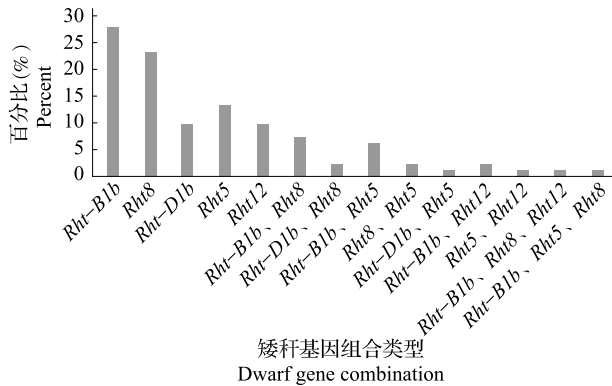


图 6 矮秆基因组合类型及其分布频率

Fig. 6 The combination and distribution of dwarfing genes

2.5 矮秆基因的株高分析以及降秆效应

对 82 份青海育成小麦品种株高进行统计学分析,发现其平均株高为 91.4 cm,各个材料的株高情况详见表 3,变异范围为 63.6 ~ 130.3 cm,53% 以上的小麦品种株高在 90 cm 以下,可见青海小麦株高普遍偏高。仅含有矮秆基因 *Rht-B1b* 的小麦品种 11 个,平均株高为 86.2 cm,变异范围为 64.6 ~ 107.7 cm, *Rht-B1b* 的降秆效应为 5.7%。只含有矮秆基因 *Rht-D1b* 的小麦品种有 5 个,平均株高为 84.9 cm,变异范围为 75.7 ~ 94.2 cm,矮秆基因 *Rht-D1b* 的降秆效应为 7.1%。仅含有矮秆基因 *Rht8* 的小麦品种有 9 个,其平均株高为 88.6 cm,变异范围为 68.9 ~ 108.2 cm, *Rht8* 的降秆效应为 3.1%。同时只含有矮秆基因 *Rht-B1b* 和 *Rht8* 的材料小麦品种共有 4 个,平均株高 80.4 cm,变异范围为 75.5 ~ 89.5 cm,这两个基因的累加降秆效应为 12%,降秆效应不太明显。由本研究可以看出矮秆基因的降秆效应为 *Rht-D1b* > *Rht-B1b* > *Rht8*。

3 讨论

作为五大主食之一的小麦养活了世界近 20 亿的人口,高产稳产一直是小麦育种亘古不变的话题^[18]。曾有研究表示,株高在一定范围内与产量呈正相关,超过了这个范围反而会对产量产生不利影响,于是才有了矮秆高产小麦品种的培育。矮秆小麦茎秆粗壮,耐风,抗倒伏,是实现小麦高产的重要手段^[19]。一些学者开发出了与不同矮秆基因连锁紧密的分子标记,并且对这些标记的准确性和可靠性做了大量研究和验证^[20-23]。与一些形态学调查和测定生化指标相比,分子标记具有的稳定性和不易受环境影响的优点越来越受全世界学者的青睐,育种研究的发展与分子标记也变得密不可分。

本研究利用分子标记技术对青海省 82 份育成小麦品种资源的主效矮秆基因进行了检测,充分了解了各个矮秆基因在青海省小麦材料中的分布情况以及利用率,以期矮秆更高产新品种的培育提供指导,最大化的改良青海小麦株高与产量问题。研究结果显示, *Rht-B1b* 基因的分布频率较高,而 *Rht-D1b* 基因的分布频率相较于矮秆基因 *Rht8* 和 *Rht-B1b* 来说相对偏低。本研究所得到的结论与国内许多研究结果基本一致。如梁丹等^[24]通过分子标记对 263 份 CIMMYT 材料含有的矮秆基因进行检测时发现 *Rht-B1b* 基因频率高于 *Rht-D1b*。同样张晓科^[25]和周阳^[26]在对陕西小麦矮秆基因的研究中发现含矮秆基因 *Rht-B1b* 的分布频率要比其他省高。张晓科^[25]的研究还发现, *Rht8* 基因同样也具有比较高的分布频率。周阳等^[14]利用分子标记对 *Rht8* 矮秆基因在中国主麦区近 30 年小麦主栽品种中的分布进行研究时发现近 42.3% 的品种含有 *Rht8* 矮秆基因,这个比例无疑是很高的。在本研究中含 *Rht8* 矮秆基因的材料占 82 份调查材料的比例为 23.2%,分布频率仅次于 *Rht-B1b*。这与很多学者的研究结果一致。但是其基因频率低于其他学者公布的 43.2%。其原因可能是:不同地区地理环境的不同,当地农业生产的要求不同,造成青海省育种所用矮源的不同;二是可能与青海麦区得天独厚的地理环境相关,在长期的自然选择和人为选择下,形成了适应于该麦区的矮秆基因组成。梁丹等^[24]所检测的 263 份 CIMMYT 材料中同时含有矮秆基因 *Rht-B1b* 和 *Rht-D1b* 的双矮秆基因型 (*Rht-B1b* + *Rht-D1b*) 共 12 个,占总数的 4.5%,这一双矮秆基因组合类型的分布频率很低。本研究中同时含有 *Rht-B1b* 和 *Rht-D1b* 的品种并没有在 82 份青海育成小麦材料中发现,得出的结论与梁丹等^[24]的结果基本一致。本研究发现从单一矮秆基因的降秆作用来看,其降秆效应为 *Rht-D1b* > *Rht-B1b* > *Rht8*,与国内外很多研究基本一致^[27-30]。本研究还发现在不含有上述 5 种矮秆基因的小麦品种中,青春 524 株高仅为 70.3 cm,低于含有矮秆基因的品种。造成上述现象的原因可能是所用的标记有限,只对常见的矮秆基因进行检测,这个品种中可能含有其他矮秆基因。孙树贵等^[31]对 67 份美国小麦品种株高及其含有的矮秆基因数量进行比较分析发现,共有 5 份材料 NE09L-108、Dup09L-plot-615、NIN09L-1、NIN09L-6 和 Hitch 不含矮秆基因,株高却低于 80 cm,与本研究得出的结论基本一致。

本研究显示在调查的82份青海育成小麦品种中约有60%的材料含有矮秆基因,其中矮秆基因*Rht-B1b*的分布频率最高,其次是矮秆基因*Rht8*,仅有8个材料含有*Rht-D1b*基因。在82份青海育成小麦品种中还发现11个含有矮秆基因*Rht5*的材料,8个含有矮秆基因*Rht12*的材料。对这些矮秆基因可进行深入研究、合理开发利用,以期为培育高产稳产和抗倒伏小麦新品种做铺垫。同时也要考虑基因累加对降低株高的影响,充分利用这些矮源基因来获得一个株高与产量的理想值,为矮秆更高产新品种的培育提供指导。

参考文献

- [1] Börner A, Plaschke E J, Korzun V, et al. The relationships between the dwarfing genes of wheat and rye [J]. *Euphytica*, 1996, 89(1):69-75
- [2] Worland A J, Petrovic S. The gibberellic acid insensitive dwarfing gene from the wheat variety Saitama 27 [J]. *Euphytica*, 1988, 38(1):55-63
- [3] Tang N, Jiang Y, He B R, et al. The effects of dwarfing genes (*Rht-B1b*, *Rht-D1b*, and *Rht8*) with different sensitivity to GA3 on the coleoptile length and plant height of wheat [J]. *Agr Sci China*, 2009, 8(9):1028-1038
- [4] Zhang X, Yang S, Zhou Y, et al. Distribution of the *Rht-B1b*, *Rht-D1b* and *Rht8* reduced height genes in autumn-sown Chinese wheats detected by molecular markers [J]. *Euphytica*, 2006, 152(1):109-116
- [5] 徐相波, 张爱民, 李新华, 等. 小麦矮源的利用和矮秆基因的研究进展 [J]. *核农学报*, 2011, 15(3):188-192
- [6] Ellis M H, Spielmeier W, Gale K R, et al. "Perfect" markers for the *Rht-B1b* and *Rht-D1b* dwarfing genes in wheat [J]. *Theor Appl Genet*, 2002, 105(6-7):1038-1042
- [7] Korzun V, Röder M S, Galan 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
- [8] 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(1):747-753
- [9] Peng J R, Richards D E, Hartley N H, et al. "Green revolution" genes encode mutant gibberellin response modulators [J]. *Nature*, 1999, 400:256-261
- [10] 万平, 周青文, 马正强, 等. 小麦矮秆基因 *Rht3* 的 RAPD 和 RFLP 标记分析 [J]. *遗传学报*, 2001, 28(11):1028-1033
- [11] Li A X, Yang W L, Guo X L, et al. Isolation of a gibberellin-insensitive dwarfing gene, *Rht-B1e*, and development of an allele-specific PCR marker [J]. *Mol Breed*, 2012, 30(3):1443-1451
- [12] Ellis M H, Rebetzke G J, Azanza F, et al. Molecular mapping of gibberellin-responsive dwarfing genes in bread wheat [J]. *Theor Appl Genet*, 2005, 111(3):423-430
- [13] 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
- [14] 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(6):810-814
- [15] 唐娜, 李博, 闵红, 等. 分子标记检测矮秆基因 *Rht-B1b*, *Rht-D1b* 和 *Rht8* 在我国小麦中的分布 [J]. *中国农业大学学报*, 2012, 17(4):21-26
- [16] 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
- [17] Sagha I-Marouf M A, Soliman K M, Gorgensen R A, et al. Ribosomal DNA spacer length polymorphism in barley: mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984, 81(24):8014-8018
- [18] 王述民, 张宗文. 世界粮食和农业植物遗传资源保护与利用现状 [J]. *植物遗传资源学报*, 2011, 12(3):325-338
- [19] 姚金保, 马鸿翔, 姚国才, 等. 小麦抗倒伏研究进展 [J]. *植物遗传资源学报*, 2013, 14(2):208-213
- [20] Chebotar S V, Korzun V N, Sivolap Y M. Allele distribution at locus *WMS261* marking the dwarfing gene *Rht8* in common wheat cultivars of Southern Ukraine [J]. *Russ J Genet*, 2001, 37(8):894-898
- [21] Divasuk M G, Bepalova L A, Vasilyev A V, et al. Reduced height genes and their importance in winter wheat cultivars grown in southern Russia [J]. *Euphytica*, 2013, 190(1):137-144
- [22] Knopf C, Becker H, Ebmeyer E, et al. Occurrence of three dwarfing *Rht* genes in German winter wheat varieties [J]. *Cereal Res Commun*, 2008, 36(4):553-560
- [23] Ganeva G, Korzun V, Landjeva S, et al. Identification, distribution and effects on agronomic traits of the semi-dwarfing *Rht* alleles in Bulgarian common wheat cultivars [J]. *Euphytica*, 2005, 145(3):305-315
- [24] 梁丹, 杨芳萍, 何中虎, 等. 利用 STS 标记检测 CIMMYT 小麦品种(系) L34/Yr18. *Rht-B1b* 和 *Rht-D1b* 基因的分布 [J]. *中国农业科学*, 2009, 42(1):17-27
- [25] 张晓科. 中国小麦矮秆基因和春化基因分布及小麦品质相关性状多重 PCR 体系建立 [R]. 北京: 中国农业科学院博士后研究报告, 2007
- [26] 周阳. 中国冬小麦产量潜力及重要农艺性状的遗传改良 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2005
- [27] Kertesz Z, Flinham J E, Gale M D. Effects of *Rht* dwarfing genes on wheat grain yield and its components under Eastern European conditions [J]. *Cereal Res Commun*, 1991, 19(3):297-304
- [28] Richards R A. The effect of dwarfing genes in spring wheat in dry environments. I. Agronomic characteristics [J]. *Crop Past Sci*, 1992, 43(3):517-527
- [29] Flinham J E, Börner Worland A J, Gale M D. Optimizing wheat grain yield; effects of *Rht* (gibberellin-insensitive dwarfing genes) [J]. *J Agric Sci*, 1997, 128(1):11-25
- [30] Guedira M, Brown-Guedira G, Sanford D V, et al. Distribution of genes in modern historic winter wheat cultivars from the Eastern and Central USA [J]. *Crop Sci*, 2010, 50(5):1811-1822
- [31] 孙树贵, 李艳丽, 鲁敏, 等. 67 份美国小麦品种矮秆基因分子标记检测 [J]. *麦类作物学报*, 2013, 33(6):1087-1092