

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2010.00385

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

张 晶¹ 吴锁伟¹ 刘秉华¹ 宋梅芳² 周 朋¹ 郭春燕³ 詹克慧³
王山荭¹ 杨 丽¹ 董 冬¹ 于立强⁴ 李辉利⁴ 周 阳^{1,*} 杨建平^{1,*}

¹ 中国农业科学院作物科学研究所 / 农作物基因资源与基因改良重大科学工程, 北京 100081; ² 山东省农业科学院蔬菜研究所, 山东济南 250100; ³ 河南农业大学农学院, 河南郑州 450002; ⁴ 河北省赵县农业科学研究所, 河北石家庄 051530

摘 要: 通过对小麦品种石麦 12 春化特性的遗传和分子标记研究, 探索黄淮冬麦区小麦冬、春性改良途径和分子标记辅助选择技术。石麦 12 与冬性品种石家庄 8 号杂交后代 $F_{2:3}$ 株系中的春性株系、冬春性分离株系、冬性株系的分离比例符合 1 : 2 : 1, 表明石麦 12 具有一个显性春化基因, 经已知春化基因的基因特异性标记鉴定为 *Vrn-D1*。利用 *Vrn-D1* 的基因特异性标记对上述 $F_{2:3}$ 株系进行冬、春性鉴定的结果与表型鉴定结果一致, 说明该分子标记可用于小麦冬、春性改良中对 *Vrn-D1* 的辅助选择。在高海拔、长日照地区夏播是小麦冬、春性表型鉴定的一个快速、简便途径。

关键词: 小麦育种; 春化基因; 分子标记

Genetic Improvement of Wheat Growth Habit and Its Molecular Marker-Assisted Selection in Yellow and Huai River Reaches

ZHANG Jing¹, WU Suo-Wei¹, LIU Bing-Hua¹, SONG Mei-Fang², ZHOU Peng¹, GUO Chun-Yan³, ZHAN Ke-Hui³, WANG Shan-Hong¹, YANG Li¹, DONG Dong¹, YU Li-Qiang⁴, LI Hui-Li⁴, ZHOU Yang^{1,*}, and YANG Jian-Ping^{1,*}

¹ Key Facility for Crop Gene Resources and Genetic Improvement / Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China; ² Vegetable Research Institute, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan 250100, China; ³ College of Agronomy, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China; ⁴ Zhaoxian Agricultural Research Institute of Hebei Province, Shijiazhuang 051530, China

Abstract: The vernalization gene in wheat cultivar Shimai 12 (*Triticum aestivum* L.) was investigated to find a more efficient way for the improvement of growth habit of wheat cultivars grown in Yellow and Huai River Reaches. In the $F_{2:3}$ lines derived from the cross between Shimai 12 and Shijiazhuang 8 (a winter wheat cultivar), the ratio of the spring, segregating, and winter lines was in accordance to 1:2:1 based on chi-square test, showing that the spring growth habit of Shimai 12 was determined by single dominant gene, which was identified as *Vrn-D1* by gene-specific markers. The *Vrn-D1* gene-specific marker was further used to genotype the $F_{2:3}$ lines, and the results were consistent with phenotyping, verifying the available utilization of the marker assisted selection for *Vrn-D1* in breeding programs. Besides, summer sowing in high altitude and cool area proved to be a cost-saving and efficient method for wheat growth habit identification.

Keywords: Wheat breeding; Vernalization gene; Molecular marker

黄淮冬麦区是我国最大的小麦产区, 也是南方秋播春麦区向北部冬麦区的过渡地带, 其北部种植的小麦品种一般为半冬性品种和冬性品种, 而南部则既有半冬性品种和冬性品种, 也有春性品种。随着全球气候变暖, 黄淮冬麦区暖冬出现的频率逐渐

增加^[1-2], 在遇到冬前积温偏高或早春气温回升过快时, 春性品种往往因提前拔节而遭受严重冻害^[3-4], 而冬性和半冬性品种由于春化阶段较长, 拔节较晚, 一般不易遭受冻害。因此, 选育和推广冬性、半冬性品种是该麦区避免或减少冻害的重要措施之一。

本研究由国家高科技研究发展计划(863 计划)项目(2006AA10Z1F2)和国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目(2009CB118300)资助。

* 通讯作者(Corresponding authors): 周阳, E-mail: zhouyang@mail.caas.net.cn, Tel: 010-82108628; 杨建平, E-mail: yangjianping@caas.net.cn, Tel: 010-82105859

第一作者联系方式: E-mail: disear009@hotmail.com

Received(收稿日期): 2009-10-09; Accepted(接受日期): 2010-01-08.

近年来春化基因的研究取得重要进展,为小麦冬、春性改良提供了理论指导和技术支持^[5]。现已报道的小麦春化基因有 *VRN-A1*(*Vrn1*)、*VRN-B1*(*Vrn2*)、*VRN-D1*(*Vrn3*)、*VRN4*(*Vrn4*)和 *VRN-B3*(*Vrn5*)^[6-10],其中,*VRN-A1*、*VRN-B1*、*VRN-D1*和 *VRN-B3* 分别被定位在 5A、5B、5D 和 7B 染色体上^[11-16]。*VRN-A1* 位点有 3 个显性等位变异,即 *Vrn-A1a*、*Vrn-A1b* 和 *Vrn-A1c*。春性为显性性状,小麦品种只要含有任何一个显性春化基因即表现为春性。一般认为,冬性为野生型,春性为突变型。春化基因形成的机制有两种,一种是内含子中发生了一个大片段缺失^[17],另一种是启动子部位发生了重复片段的插入或核苷酸突变^[18]。*Vrn-A1* 是在 *vrn-A1* 第一个内含子中发生了一个 5 504 bp 的缺失(*Vrn-A1c*),或在启动子区域发生了一个折叠元件的插入或两个核苷酸的突变(*Vrn-A1a* 或 *Vrn-A1b*)^[18]; *Vrn-B1* 是在 *vrn-B1* 的第一个内含子中发生了一个 6 850 bp 的缺失; *Vrn-D1* 是在其对应的隐性基因的第一个内含子中发生了一个 4 235 bp 的缺失^[17]。目前,*VRN-A1*、*VRN-B1*、*VRN-D1* 和 *VRN-B3* 已被克隆,相关的分子标记也已经开发出来,使小麦春化基因的分子鉴定和分子标记辅助选择成为可能。

石麦12是河北省2002年审定的小麦品种,曾在黄淮冬麦区北片的冀中南地区种植。该品种在夏季播种可正常抽穗,属典型的春性品种。本研究对石麦12的春化基因及其遗传进行研究,并利用分子标记对冬、春性进行辅助选择,旨在为黄淮冬麦区小麦冬、春性遗传改良提供理论和方法的借鉴。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试材料为石麦12、冬性品种石家庄8号及其杂交后代 F_2 单株。辽春10号同时具有 *Vrn-A1a*、*Vrn-B1*、*Vrn-D1* 和 *Vrn-B3* 显性春化基因^[6],因此,在利用分子标记对上述春化基因进行检测时,以该品种为对照。

1.2 冬、春性表型鉴定

2007年6月,将404个来自于石麦12与冬性品种石家庄8号杂交后代的 F_2 单株播种在河北沽源(41°40' N, 115°42' E, 海拔1 500 m左右),每个单株种植一行,行长1 m,行距30 cm,每行播种60粒,每20行种植一亲本,石麦12与石家庄8号交替种植。同年8月下旬和9月上旬分别记载抽穗情况。

沽源位于河北省北部,地处内蒙古高原南端,6~8月日平均气温17℃左右,平均日照长度15 h以上,夏播小麦生长良好。该地区夏播小麦生育期内完全不具备小麦春化所需要的低温,只有春性品种才能正常抽穗,同时一直处于长日照条件下,避免了光敏感品种和光不敏感品种由于日照长度不同造成的抽穗期差异,因此,在该地区夏季播种可以对小麦品种的冬、春性进行准确的表型鉴定。

1.3 基因组DNA提取及PCR扩增

采用CTAB法^[19]分别提取冬性、春性植株基因组DNA,并经0.8%琼脂糖凝胶电泳检测DNA纯度。*VRN-A1*、*VRN-B1*、*VRN-D1*和 *VRN-B3* 基因位点上不同等位变异的9对特异扩增引物序列同已有报道^[6],均是根据基因序列本身设计的基因特异性扩增引物,其中,*VRN-A1* 基因位点引物 VRN1AF 和 VRN1-INT1R 是检测该基因位点启动子区域等位变异的一对特异引物, Intr1/A/F2 和 Intr1/A/R3 以及 Intr1/C/F 和 Intr1/AB/R 是检测该基因位点内含子区域大片段缺失的两对引物。*VRN-B1* 基因位点引物 Intr1/B/F 和 Intr1/B/R3 以及 Intr1/B/F 和 Intr1/B/R4 是检测该基因位点内含子区域等位变异的两对相互印证的引物。*VRN-D1* 和 *VRN-B3* 基因位点引物的设计也是基于此原理。本实验优化了其中6对引物的退火温度(表1)。所有引物均由北京奥科生物技术有限责任公司合成。

PCR扩增体系为20 μ L,含模板DNA 40~60 ng, 10 \times buffer 2 μ L, Ex Taq DNA 聚合酶1 U (宝生物工程大连有限公司),上、下游引物(10 μ mol L⁻¹)各1 μ L, dNTP (10 μ mol L⁻¹) 0.5 μ L。PCR在Biometra T-GRADIENT (Biometra, Göttingen, Germany)上进行,反应程序为94℃预变性5 min; 94℃变性30 s, 50~60℃(表1)退火30 s, 72℃延伸60~100 s(表1), 30个循环; 72℃延伸10 min, 4℃保存。

PCR扩增产物经1%琼脂糖凝胶电泳分离,缓冲体系为1 \times TAE溶液,120 V电压电泳30 min, EB染色,在Bio-Rad Universal Hood II Gel Doc XR System 成像系统(Bio-Rad Laboratories, Milan, Italy)上紫外扫描成像并存入计算机。

2 结果与分析

2.1 冬、春性表型鉴定及遗传分析

夏播时,石麦12正常抽穗,表现为春性;石家庄8号不抽穗,表现为冬性;404个 $F_{2,3}$ 株系中,88

表 1 *VRN-A1*、*VRN-B1*、*VRN-D1* 和 *VRN-B3* 位点不同等位变异 PCR 扩增的引物序列、片段大小及退火温度
Table 1 Primer sequences, size of PCR products, and PCR conditions for detecting alleles at *VRN-A1*, *VRN-B1*, *VRN-D1*, and *VRN-B3* loci

基因位点 Locus	等位变异 Allele	引物 Primer	引物序列 Primer sequence (5'-3')	扩增片段长度 Fragment size (bp)	退火温度 Annealing temp. ()	延伸时间 Extending time (s)	参考文献 Reference
<i>VRN-A1</i>	<i>Vrn-A1a</i>	VRN1AF	GAAAGGAAAAATTCT GCTCG	965+876	50	60	Yan et al. [18] (2004)
	<i>Vrn-A1b</i>	VRN1-INT1R	GCAGGAAATCGAAAT CGAAG	714			
	<i>Vrn-A1c</i>			734			
	<i>vrn-A1</i>			734			
	<i>Vrn-A1c</i>	<u>Intr1/A/F2</u>	AGCCTCCACGGTTTG AAAGTAA	1170	58	70	Fu et al. [17] (2005)
		<u>Intr1/A/R3</u>	AAGTAAGACAACACG AATGTGAGA				
	<i>vrn-A1</i>	Intr1/C/F	GCACTCCTAACCCAC TAACC	1068	58	65	Fu et al. [17] (2005)
		Intr1/AB/R	TCATCCATCATCAAG GCAAA				
	<i>VRN-B1</i>	<i>Vrn-B1</i>	<u>Intr1/B/F</u>	709	60	60	Fu et al. [17] (2005)
			<u>Intr1/B/R3</u>				
<i>VRN-B1</i>	<i>Vrn-B1</i>	<u>Intr1/B/F</u>	CTCATGCCAAAAATT GAAGATGA	1149	60	70	Fu et al. [17] (2005)
		<u>Intr1/B/R4</u>	CAAGTGGAACGGTTA GGACA				
	<i>vrn-B1</i>	<u>Intr1/B/F</u>	CAAATGAAAAGGAAT GAGAGCA				Fu et al. [17] (2005)
		<u>Intr1/D/R3</u>	GTTGTCTGCCTCATC AAATCC	1671	59	100	
	<i>VRN-D1</i>	<i>Vrn-D1</i>	<u>Intr1/D/F</u>				Fu et al. [17] (2005)
			<u>Intr1/D/R3</u>				
	<i>vrn-D1</i>	<u>Intr1/D/F</u>	GGTCACTGGTGGTCT GTGC	997	57	60	Fu et al. [17] (2005)
		<u>Intr1/D/R4</u>	GTTGTCTGCCTCATC AAATCC				
	<i>VRN-B3</i>	<i>Vrn-B3</i>	<u>VRN4-B-INS-F</u>	1200	59	70	Yan et al. [16] (2006)
		<u>VRN4-B-INS-R</u>	CATAATGCCAAGCCG GTGAGTAC				
<i>VRN-B3</i>	<i>vrn-B3</i>	VRN4-B-NOINS-F	ATGCTCTGCCAATTAG CTAGC	1140	57	70	Yan et al. [16] (2006)
		VRN4-B-NOINS-R	ATGCTTTCGCTTGCC ATCC				
			CTATCCCTACCGGCC ATTAG				

本试验优化退火温度的引物用下画线标示。
Primers with optimized annealing temperatures are underlined.

个株系正常抽穗, 为春性; 209 个株系部分植株抽穗, 表现为冬、春性分离; 107 个株系不抽穗, 为冬性。经 χ^2 检测, 表型为春性、冬春性分离及冬性的株系符合 1 2 1 的分离比例($\chi^2 = 2.27, \chi^2_{0.01, 2} = 9.21$), 说明石麦 12 含 1 个显性春化基因(表 2)。

表 2 石麦 12 春化基因的遗传分析
Table 2 Genetic analysis of vernalization gene in Shimai 12

亲本或组合 Parents and cross	春性 Spring	冬、春分离 Segregating	冬性 Winter	总数 Total
石麦 12 Shimai 12	20	0	0	20
石家庄 8 号 Shijiazhuang 8	0	0	20	20
F _{2:3} 株系 F _{2:3} lines	88	209	107	404

$\chi^2 = 2.27, \chi^2_{0.01, 2} = 9.21.$

2.2 春化基因的分子检测

2.2.1 *VRN-A1* 基因位点 利用 VRN1AF 和 VRN1-INT1R 引物检测 *VRN-A1* 的启动子区域, 结果石家庄 8 号和石麦 12 均扩增出大小为 734 bp 的片段(图 1 泳道 1 和 2), 符合隐性 *vrn-A1* 和显性 *Vrn-A1c* 等位变异对应的片段。用引物 Intr1/A/F2 和 Intr1/A/R3 对 *Vrn-A1* 位点的第一个内含子区域进行检测, 结果两亲本均未扩增出 *Vrn-A1c* 对应的 1 170 bp 的片段(图 1 泳道 4 和 5), 说明两个亲本均不具有 *Vrn-A1c*。最后用引物 Intr1/C/F 和 Intr1/AB/R 对 *Vrn-A1* 位点的第一个内含子区域进行检测, 两亲本均扩增出隐性 *vrn-A1* 等位变异对应的 1 068 bp 片段(图 1 泳道 7 和 8), 说明两个亲本均携带隐性基因 *vrn-A1*。

辽春 10 号扩增出 *Vrn-A1a* 对应的 965 bp + 876 bp 片段及 *vrn-A1* 对应的 1 068 bp 片段, 未出现 *Vrn-A1c* 对应的 1 170 bp 片段(图 1)。说明辽春 10 号在 *VRN-A1* 位点上启动子位置有 *Vrn-A1a* 对应的插入片段, 在第一个内含子位置无缺失片段。

2.2.2 *VRN-B1* 基因位点 用 Intr1/B/F、Intr1/B/R3 和 Intr1/B/F、Intr1/B/R4 两对引物分别对 *VRN-B1* 位点进行检测, 石家庄 8 号和石麦 12 均未扩增出 *Vrn-B1* 对应的 709 bp 片段, 但扩增出 *vrn-B1* 对应的 1 149 bp 片段(图 2), 说明两个亲本均具有 *vrn-B1*; 辽春 10 号扩增出 *Vrn-B1* 对应的 709 bp 的片段, 未扩增出 *vrn-B1* 对应的 1 149 bp 片段(图 2)。

2.2.3 *VRN-D1* 基因位点 用 Intr1/D/F、Intr1/D/R3 和 Intr1/D/F、Intr1/D/R4 两对引物分别对 *VRN-D1* 位点进行检测, 石家庄 8 号未扩增出 *Vrn-D1*

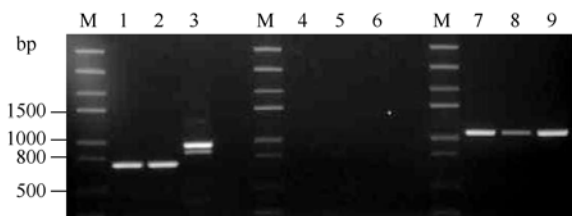


图 1 *VRN-A1* 基因位点的 PCR 检测

Fig. 1 Results of PCR amplification at *VRN-A1* locus

M: DNA marker; 1, 4, 7: 石家庄 8 号; 2, 5, 8: 石麦 12; 3, 6, 9: 辽春 10 号。1, 2, 3 泳道为引物 VRN1AF 和 VRN1-INT1R 扩增产物; 4, 5, 6 泳道为引物 Intr1/A/F2 和 Intr1/A/R3 扩增产物; 7, 8, 9 泳道为引物 Intr1/C/F 和 Intr1/AB/R 扩增产物。

M: DNA marker; Lanes 1, 4, and 7: Shijiazhuang 8; lanes 2, 5, and 8: Shimai 12; lanes 3, 6, and 9: Liaochun 10. Lanes 1, 2, and 3 were loaded with the amplification products by VRN1AF and VRN1-INT1R; lanes 4, 5, and 6 were loaded with the amplification products by Intr1/A/F2 and Intr1/A/R3; lanes 7, 8, and 9 were loaded with the amplification products by Intr1/C/F and Intr1/AB/R.

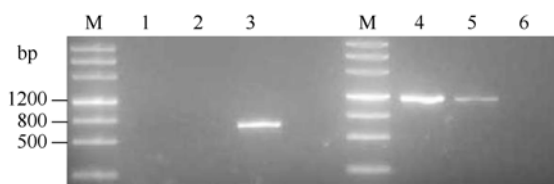


图 2 *VRN-B1* 基因位点的 PCR 检测

Fig. 2 Results of PCR amplification at *VRN-B1* locus

M: DNA marker; 1, 4: 石家庄 8 号; 2, 5: 石麦 12; 3, 6: 辽春 10 号。1, 2, 3 泳道为引物 Intr1/B/F 和 Intr1/B/R3 扩增产物; 4, 5, 6 泳道为引物 Intr1/B/F 和 Intr1/B/R4 扩增产物。

M: DNA marker; Lanes 1 and 4: Shijiazhuang 8; lanes 2 and 5: Shimai 12; Lanes 3 and 6: Liaochun 10. Lanes 1, 2, and 3 were loaded with the amplification products by Intr1/B/F and Intr1/B/R3; lanes 4, 5, and 6 were loaded with the amplification products by Intr1/B/F and Intr1/B/R4.

对应的 1 671 bp 的片段, 扩增出 *vrn-D1* 对应的 997 bp 的片段(图 3), 说明石家庄 8 号具有 *vrn-D1*; 石麦 12 和辽春 10 号均扩增出 *Vrn-D1* 对应的 1 671 bp 的片段, 未扩增出 *vrn-D1* 对应的 997 bp 的片段(图 3), 说明石麦 12 和辽春 10 号均具有显性等位变异 *Vrn-D1*。

2.2.4 *VRN-B3* 基因位点 用 VRN4-B-INS-F、VRN4-B-INS-R 和 VRN4-B-NOINS-F、VRN4-B-NOINS-R 两对引物分别对 *VRN-B3* 位点进行检测, 石家庄 8 号和石麦 12 均未扩增出 *Vrn-B3* 对应的 1 200 bp 片段, 但均扩增出 *vrn-B3* 对应的 1 140 bp 片段(图 4), 说明两个亲本均具有 *vrn-B3*; 辽春 10 号仅扩增出 *Vrn-B3* 对应的 1 200 bp 片段(图 4)。

2.3 $F_{2:3}$ 株系 *VRN-D1* 基因位点的 PCR 检测

鉴于杂交组合亲本之一石麦 12 在 *VRN-D1* 位点为显性等位变异, 仅用 Intr1/D/F、Intr1/D/R3 和 Intr1/D/F、Intr1/D/R4 两对引物分别对石麦 12 和石

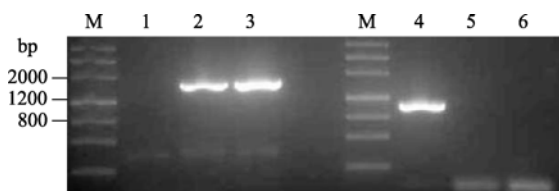


图 3 *VRN-D1* 基因位点的 PCR 检测

Fig. 3 Results of PCR amplification at *VRN-D1* locus

M: DNA marker; 1, 4: 石家庄 8 号; 2, 5: 石麦 12; 3, 6: 辽春 10 号。1, 2, 3 泳道为引物 Intr1/D/F 和 Intr1/D/R3 扩增产物; 4, 5, 6 泳道为引物 Intr1/D/F 和 Intr1/D/R4 扩增产物。

M: DNA marker; Lanes 1 and 4: Shijiazhuang 8; lanes 2 and 5: Shimai 12; lanes 3 and 6: Liaochun 10. Lanes 1, 2, and 3 were loaded with the amplification products by Intr1/D/F and Intr1/D/R3; lanes 4, 5, and 6 were loaded with the amplification products by Intr1/D/F and Intr1/D/R4.

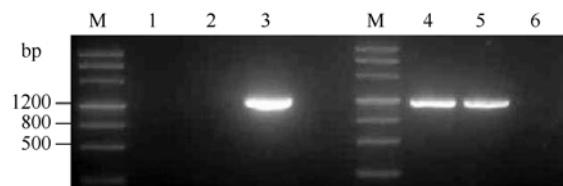


图 4 *VRN-B3* 基因位点的 PCR 检测

Fig. 4 Results of PCR amplification at *VRN-B3* locus

M: DNA marker; 1, 4: 石家庄 8 号; 2, 5: 石麦 12; 3, 6: 辽春 10 号。1, 2, 3 泳道为引物 VRN4-B-INS-F 和 VRN4-B-INS-R 扩增产物; 4, 5, 6 泳道为引物 VRN4-B-NOINS-F 和 VRN4-B-NOINS-R 扩增产物。

M: DNA marker; lanes 1 and 4: Shijiazhuang 8; lanes 2 and 5: Shimai 12; lanes 3 and 6: Liaochun 10. Lanes 1, 2, and 3 were loaded with the amplification products by VRN4-B-INS-F and VRN4-B-INS-R; lanes 4, 5, and 6 were loaded with the amplification products by VRN4-B-NOINS-F and VRN4-B-NOINS-R.

家庄 8 号杂交后代 $F_{2:3}$ 的 50 个春性株系和 50 个冬性株系进行 *VRN-D1* 位点检测, 春性株系均扩增出 *Vrn-D1* 对应的 1 671 bp 片段, 但未扩增出 *vrn-D1* 对应的 997 bp 片段; 冬性株系均未扩增出 *Vrn-D1* 对应的 1 671 bp 片段, 而扩增出 *vrn-D1* 对应的 997 bp 片段(图 5)。说明石麦 12 和石家庄 8 号杂交后代 $F_{2:3}$ 的春性株系均具有显性等位变异 *Vrn-D1*, 而冬性株系均具有隐性等位变异 *vrn-D1*。

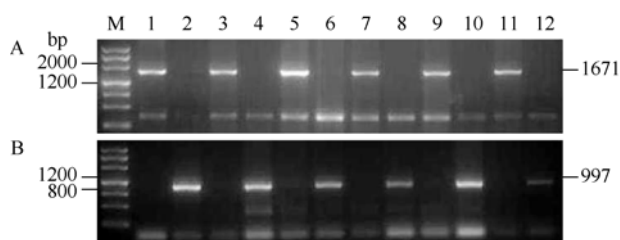


图 5 $F_{2:3}$ 株系 *VRN-D1* 基因位点的 PCR 检测

Fig. 5 Results of PCR amplification of $F_{2:3}$ lines at *VRN-D1* locus

A: 引物 Intr1/D/F 和 Intr1/D/R3 扩增产物; B: 引物 Intr1/D/F 和 Intr1/D/R4 扩增产物。M: DNA marker; 1: 石麦 12; 2: 石家庄 8 号; 3, 5, 7, 9, 11: $F_{2:3}$ 春性株系; 4, 6, 8, 10, 12: $F_{2:3}$ 冬性株系。

A: amplified products by primers Intr1/D/F and Intr1/D/R3; B: amplified products by primers Intr1/D/F and Intr1/D/R4. M: DNA marker; 1: Shimai 12; 2: Shijiazhuang 8; 3, 5, 7, 9, 11: spring lines from $F_{2:3}$; 4, 6, 8, 10, 12: winter lines from $F_{2:3}$.

3 讨论

3.1 冬、春性的表型鉴定和选择

在黄淮冬麦区, 通常根据小麦越冬前和春季返青前幼苗生长习性对冬、春性进行判断, 匍匐的幼苗一般被认为是冬性, 半匍匐者为半冬性, 直立者为春性, 这对于大量育种材料冬、春性的初步筛选是可行的, 但准确性较差, 易造成误判。春季分期播种是鉴别小麦品种冬、春性的有效方法, 但其工作量较大, 通常只适用于少量育成品系的鉴定, 并且周期较长, 第二年才能得到对上一年收获材料的鉴定结果。通过夏播鉴定冬、春性, 当年秋播前即可得到结果, 达到及时对冬、春性材料进行取舍的目的。为了对大量的分离世代材料分单株进行冬、春性鉴定, 作者采用了夏季穗穴种植法, 对当年收获的单株进行编号, 每个单株取一个穗子, 无需脱粒即可整穗播种, 每穗种植一穴, 分穴记载抽穗情况, 抽穗者为春性株, 反之为冬性株。

值得提出的是, 要选择海拔较高的地区夏播, 因为这些地区夏季冷凉, 小麦生长正常, 便于对品种的鉴定, 反之, 在低海拔地区夏播, 往往由于高

温、病、虫害重, 小麦生长不正常, 不利于对品种的鉴定。

3.2 冬、春性的分子鉴定和分子标记辅助选择

遗传分析和表型鉴定表明石麦 12 携带一个显性春化基因, 经基因特异性分子标记鉴定为 *Vrn-D1*。同时, 分离群体表型鉴定与分子标记鉴定结果一致, 说明 *Vrn-D1* 的基因特异性标记可用于 *Vrn-D1* 的检测及小麦冬、春性改良中对 *Vrn-D1* 的分子标记辅助选择。Zhang 等^[6]对黄淮冬麦区 86 个小麦品种春化基因的鉴定结果表明, 93.3% 的春性品种具有 *Vrn-D1* 基因, 因此 *Vrn-D1* 的分子标记辅助选择技术在该麦区小麦冬、春性改良中具有重要利用价值。

一般认为, 在已知春化基因中 *Vrn-A1* 的春化效应最强, 具有该基因的品种不需要经过任何春化阶段即可正常抽穗, 而 *Vrn-B1*, *Vrn-D1* 和 *Vrn4* 春化效应较弱, 具有这些春化基因的品种仍然需要经过一定阶段的春化^[20]。石麦 12 虽然只具有 *Vrn-D1* 春化基因, 却表现出典型的强春性品种的特征, 笔者连续 3 年在不同季节、不同纬度、不同海拔地区播种, 该品种都能正常抽穗。Sun 等^[21]对 221 个具有 *Vrn-D1* 的小麦品种鉴定表明, 春性品种占 41.1%, 半冬性品种占 58.4%。说明在具有 *Vrn-D1* 的小麦品种不同遗传背景下, 该基因的春化效应存在较大差异。目前, 在 *VRN-A1* 位点已经发现 3 个显性等位变异, 在 *VRN-D1* 位点是否也存在显性等位变异, 这些等位变异是否对春化效应有影响, 值得进一步研究。

3.3 冬、春性的遗传改良

在黄淮冬麦区北部一般只适宜半冬性和冬性品种种植, 服务于这一地区的育种应在早世代及时淘汰春性株。在育种实践中, 可以采取夏播对单株进行冬、春性鉴定, 也可通过春化基因分子标记辅助选择技术。冬、春杂交是小麦育种中常用的方法, 由于春性是显性, 因此, 在早期分离世代应多选单株, 然后通过夏播或分子标记辅助选择技术进行冬、春性鉴定, 及时淘汰春性株。

在黄淮冬麦区南部, 则以半冬性、春性品种为主。近年来, 由于春性品种出现冻害的频率较高, 半冬性品种种植面积有扩大趋势。因此, 该地区今后的小麦育种也应重点放在半冬性品种的选育上。同时, 为了满足生产上不同茬口的种植需要, 兼顾春性、早熟品种的选育。

小麦品种的抗寒性与品种的冬、春性有关, 冬性、半冬性品种的抗寒性一般好于春性品种, 但冬

性、半冬性品种中也有抗寒性较差的品种, 春性品种中也有抗寒性较好的品种, 因此, 在进行冬、春性选择的同时, 也要重视对品种抗寒性的鉴定和选择。

4 结论

石麦12携带显性春化基因 *Vrn-D1*。已报道的 *Vrn-D1* 的基因特异性标记可用于 *Vrn-D1* 的检测及小麦冬、春性改良中对 *Vrn-D1* 的分子标记辅助选择。在高海拔、长日照地区夏播是进行小麦冬、春性表型鉴定的快速、简便途径。

References

- [1] Zhai P M, Chao Q C, Zou X K. Progress in China's climate change study in the 20th century. *J Geogr Sci*, 2004, 14(suppl): 3-11
- [2] Shi P-J(史培军), Wang J-A(王静爱), Xie Y(谢云), Wang P(王平), Zhou W-G(周武光). A preliminary study on the climatic change, natural disasters of agriculture and grain yield in China in the past 15 years. *J Nat Resour* (自然资源学报), 1997, 12(3): 197-203 (in Chinese with English abstract)
- [3] Yang Z-Q(杨宗渠), Yin J(尹钧), Zhou R(周冉), Li J-C(李金才). Study on vernalization character of different genotypes of wheat from Huanghuai wheat production area. *J Triticeae Crops* (麦类作物学报), 2006, 26(2): 82-85 (in Chinese with English abstract)
- [4] Li M-S(李茂松), Wang D-L(王道龙), Zhang Q(张强), Chi Y-G(迟永刚), Wang C-Y(王春艳), Kiribuchi C O, Yoshida H. Cold damage of autumn sown wheat in Huang-Huai-Hai River reaches in 2004-2005 growing season. *J Nat Disasters* (自然灾害学报), 2005, 14(4): 51-55 (in Chinese)
- [5] Distelfeld A, Li C, Dubcovsky J. Regulation of flowering in temperate cereals. *Curr Opin Plant Biol*, 2009, 12: 1-7
- [6] Zhang X K, Xiao Y G, Zhang Y, Xia X C, Dubcovsky J, He Z H. 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. *Crop Sci*, 2008, 48: 458-470
- [7] Trevaskis B, Hemming M N, Dennis E S, Peacock J. The molecular basis of vernalization-induced flowering in cereals. *Trends Plant Sci*, 2007, 12: 352-357
- [8] Greenup A, Peacock W J, Dennis E S, Trevaskis B. The molecular biology of seasonal flowering-responses in Arabidopsis and the cereals. *Ann Bot* (Lond), 2009, 103: 1165-1172
- [9] Dubcovsky J, Loukoianov A, Fu D L, Valarik M, Sanchez A, Yan L L. Effect of photoperiod on the regulation of wheat vernalization genes *VRN1* and *VRN2*. *Plant Mol Biol*, 2006, 60: 469-480
- [10] Yan L L, Loukoianov A, Tranquilli G, Helguera M, Fahima T, Dubcovsky J. Positional cloning of the wheat vernalization gene *VRN1*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 6263-6368
- [11] Dubcovsky J, Lijavetzky D, Appendino L, Tranquilli G. Comparative RFLP mapping of *Triticum monococcum* genes controlling vernalization requirement. *Theor Appl Genet*, 1998, 97: 968-975
- [12] Law C N, Worland A J, Giorgi B. The genetic control of ear-emergence time by chromosomes 5A and 5D of wheat. *Heredity*, 1975, 36: 49-58
- [13] Galiba G, Quarrie S A, Sutka J, Morgounov A, Snape J W. RFLP mapping of the vernalization (*Vrn1*) and frost resistance (*Frl*) genes on chromosome 5A of wheat. *Theor Appl Genet*, 1995, 90: 1174-1179
- [14] Iwaki K, Nishida J, Yanagisawa T, Yoshida H, Kato K. Genetic analysis of *Vrn-B1* for vernalization requirement by using linked dCAPS markers in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor Appl Genet*, 2002, 104: 571-576
- [15] Barrett B, Bayram M, Kidwell K. Identifying AFLP and microsatellite markers for vernalization response gene *Vrn-B1* in hexaploid wheat using reciprocal mapping populations. *Plant Breed*, 2002, 121: 400-406
- [16] Yan L L, Fu D L, Li C, Blechl A, Tranquilli G, Bonafede M, Sanchez A, Valarik M, Yasuda S, Dubcovsky J. The wheat and barley vernalization gene *VRN3* is an orthologue of *FT*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 19581-19586
- [17] Fu D L, Szucs P, Yan L L, Helguera M, Skinner J S, Zitzewitz J V, Hayes P M, Dubcovsky J. Large deletions within the first intron in *VRN-1* are associated with spring growth habit in barley and wheat. *Mol Genet Genomics*, 2005, 273: 54-65
- [18] Yan L L, Helguera M, Kato K, Fukuyama S, Sherman J, Dubcovsky J. Allelic variation at the *VRN-1* promoter region in polyploidy wheat. *Theor Appl Genet*, 2004, 109: 1677-1686
- [19] Chen D H, Ronald P C. A rapid DNA miniprep method suitable for AFLP and other PCR applications. *Plant Mol Biol Rep*, 1999, 17: 53-57
- [20] Pugsley A T. The impact of plant physiology on Australian wheat breeding. *Euphytica*, 1983, 32: 743-748
- [21] Sun Q M, Zhou R H, Gao L F, Zhao G Y, Jia J Z. The characterization and geographical distribution of the genes responsible for vernalization requirement in Chinese bread wheat. *J Integr Plant Biol*, 2009, 51: 423-432