

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2013.00029

圆锥小麦四排穗性状基因的遗传及分子标记分析

张瑞奇 王秀娥 陈佩度*

南京农业大学 / 作物遗传与种质创新国家重点实验室 / 细胞遗传研究所, 江苏南京 210095

摘 要: 四排穗(four-rowed spike, FRS)性状是超数小穗(supernumerary spikelets, SS)性状的一种类型, 表现为在一个穗轴节片上近垂直地着生 2 个无柄小穗, 从而增加了小穗数和穗粒数, 对提高产量有一定的潜力。为了解圆锥小麦 0880 FRS 性状的遗传特征, 将 0880 与正常穗(normal spike, NS)圆锥小麦 0879 杂交, 构建了遗传群体, 并对 0880 (FRS) × 0879 (NS)与 0879 (NS) × 0880 (FRS) F_1 、 F_2 及 $F_{2:3}$ 植株的穗部性状进行了调查。结果显示, 正反交组合的 F_1 植株均表现为正常穗, F_2 群体中正常穗与四排穗符合 3 : 1 的分离比例, 表明 0880 的四排穗性状由隐性单基因控制, 将该基因定名为 *frs1*; 细胞质对 *frs1* 无显著影响。采用已定位于普通小麦 A 组与 B 组的 SSR 分子标记并结合混合分组分析法(BSA), 筛选出 32 个在双亲及 F_2 单株构建的四排穗型池和正常穗型池都具有多态性的 SSR 分子标记, 利用 JoinMap4.0 软件构建了与 *frs1* 连锁的 2A 染色体 11 个 SSR 分子标记遗传图谱, 其中 SSR 标记 *Xwmc598* 和 *Xwmc522* 位于 *frs1* 基因两侧, 与该基因的遗传距离分别为 4.0 cM 和 2.4 cM。利用 2A 染色体缺失系对这 11 个 SSR 进行物理定位, *Xwmc598* 和 *Xwmc522* 均被定位在 2A 染色体短臂 FL 0~0.78 区域。本研究的结果为 *frs1* 基因的精细定位及分子标记辅助选择奠定了基础。

关键词: 圆锥小麦; 超数小穗; 四排穗; 基因定位

Inheritance and Mapping of Gene Controlling Four-Rowed Spike in Tetraploid Wheat (*Triticum turgidum* L.)

ZHANG Rui-Qi, WANG Xiu-E, and CHEN Pei-Du*

National Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement / Cytogenetics Institute, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

Abstract: In hexaploid wheat and tetraploid wheat the spike normally bears one spikelet per rachis node, and the appearance of supernumerary spikelets is rare. The morphological characteristic of four-rowed spikes (FRS) is one type of the supernumerary spikelets traits, presenting as two spikelets per rachis node. Thus, the grain yield of FRS plants can be enhanced because the numbers of spikelets and seeds of FRS are increased. To understand the genetic basis of FRS trait, the tetraploid FRS cultivar 0880 was crossed reciprocally to normal-spike (NS) cultivar 0879. The phenotypic evaluation of F_1 , F_2 , and $F_{2:3}$ generations was conducted under greenhouse condition. The results indicated that all F_1 plants of the reciprocal crosses showed normal spike, indicating that the FRS trait was recessive to normal spike. In the reciprocal F_2 populations, the ratios of normal spike to four-rowed spike were 3:1 according to Chi-square test. This indicates that FRS trait is controlled by a recessive allele without cytoplasm effect, and the data from reciprocal crosses could be pooled. This single recessive allele of the FRS trait was designated *frs1*. A total of 600 SSR markers located on A and B genomes of common wheat were used to amplify the 0880, 0879, four-rowed pool, and normal-spike pool. Among them, 32 SSR markers showed polymorphism between the four-rowed-spike pool and the normal-spike pool. Eleven markers were identified to be linked with the *frs1* locus in a genetic map of chromosome 2A. Markers *Xwmc598* and *Xwmc522* were located on both sides of *frs1* with genetic distances of 4.0 cM and 2.4 cM, respectively. The placement of flanking microsatellite loci into chromosome deletion bin 2AS5 (FL 0–0.78) delimited the physical location of *frs1* to this region. This map provides a basis for fine mapping of *frs1* and marker-assisted selection of FRS trait.

Keywords: *T. turgidum*; Four-rowed spike; Supernumerary spikelet; Genetic mapping

本研究由南京农业大学青年科技创新基金项目(KJ2011002)资助。

* 通讯作者(Corresponding author): 陈佩度, E-mail: pdchen@njau.edu.cn, Tel: 025-84396026

第一作者联系方式: E-mail: zrq@njau.edu.cn

Received(收稿日期): 2012-05-29; Accepted(接受日期): 2012-08-15; Published online(网络出版日期): 2012-10-08.

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20121008.1258.009.html>

小穗是禾本科植物花序的构成基础,由2个苞片包围着一个或多个小花组成。小穗在花序轴上的不同排列方式直接影响小穗数目,从而影响产量。因此,对禾本科植物花序建成分子机制的深入研究不仅有助于了解植物花序发育的分子生物学基础,而且能够应用于作物的产量改良。

普通小麦及其亲缘种四倍体小麦正常的花序是每一个穗轴节片上着生一个小穗,具有超数小穗(supernumerary spikelets, SS)的变异类型并不多见,主要有3种情况:其一,在穗轴节片上重叠着生无柄小穗,形成复小穗(sessile addition spikelets at a rachis node);其二,在穗轴节片上近垂直着生2个无柄小穗形成四排穗(four-rowed spikes, FRS);其三,主穗轴节片上形成枝穗轴,并着生多个小穗,即分枝穗(ramified spikes, RS)^[1]。

在玉米和水稻中,对穗部形态发育有关的突变体已进行了深入研究,并克隆出一些关键基因,如玉米的 *barren stalk1* (*ba1*)^[2] 基因和水稻的 *lax panicle* (*lax*) 基因^[3]。这些基因主要影响小穗原基的初始分化,进而改变花序形态。另外一些基因,如玉米的 *branched silkless1* (*bd1*)^[4] 和水稻的 *frizzy panicle* (*fzp*)^[5] 则是通过调控小穗向小花发育的转化进程改变花序形态,进而影响小穗数目。序列分析发现这些已克隆的基因具有一些共同的调控元件,如 helix-loop-helix 转录因子, ERF 转录因子及 AP2-like MADS box 转录因子等^[6]。目前,还未从小麦族中克隆到超数小穗性状相关基因,控制小麦超数小穗的分子机制也不清楚。

研究表明,普通小麦及四倍体小麦中的超数小穗性状均为隐性性状,且一些控制超数小穗性状基因的表达受环境因子的影响;在六倍体小麦中,超数小穗性状由1对、2对或3对基因控制,这些基因主要位于普通小麦的2A及2D染色体上^[7-10]。另外, Sears^[11]发现普通小麦中国春缺2A或2D的缺体-四体亦表现超数小穗性状,且抑制此性状产生的基因位于2AL和2DS染色体上。因此推断,普通小麦的2A和2D染色体携带调控穗部形态发育的相关基因。在四倍体圆锥小麦中,超数小穗类型主要有FRS和RS两种类型。Klingworth等^[10]利用细胞学方法,将控制圆锥小麦RS性状的主基因定位于2A染色体的短臂上,一个微效基因定位于2B染色体上,同时证明普通小麦的2D染色体还携带一个抑制穗分枝的基因。但是有关圆锥小麦FRS性状的遗传及染色

体定位方面的研究还未见报道。

本研究用具有四排穗性状的圆锥小麦0880与正常穗类型的圆锥小麦0879杂交构建的F₂和F_{2:3}分离群体,通过分析分离群体的穗部性状及构建分子连锁图谱,以期明确控制圆锥小麦0880FRS性状基因的遗传特性及其所在的染色体位置。

1 材料与方法

1.1 材料

圆锥小麦0879呈正常穗型(图1-a),表现为主穗轴每个节片上着生1个小穗(图1-d)。圆锥小麦0880具有稳定的四排穗性状(图1-b),表现为在穗的中下部,主穗轴每个节片上近垂直着生2个无柄小穗(图1-d),俯视每周由4个小穗(图1-c)组成,故称为四排穗。0879及0880均由南京农业大学细胞遗传研究所保存。普通小麦中国春缺体-四体N2AT2B、端二体DT2AS及2A染色体缺失系2AS5(FL 0~0.78)与2AL1(FL 0~0.85)^[11],从美国堪萨斯州立大学引进,由南京农业大学细胞遗传研究所保存。

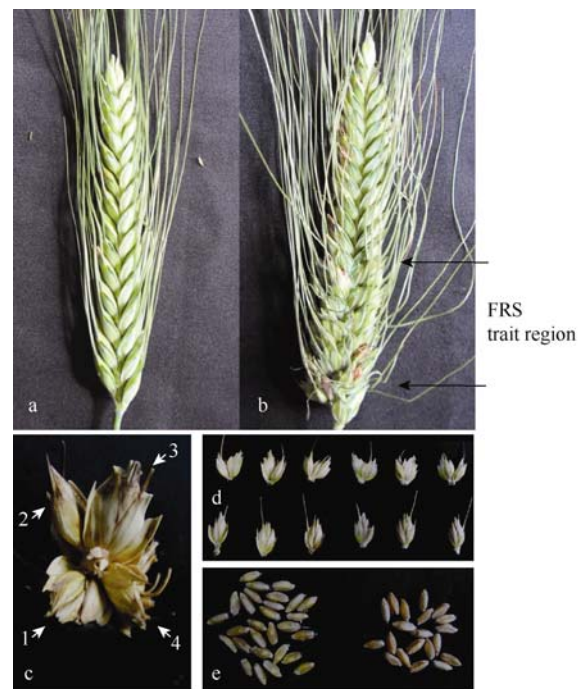


图1 四倍体小麦正常穗(NS)和四排穗(FRS)的形态特征
Fig. 1 Morphological characteristics of normal spike (NS) and four-rowed spike (FRS) in tetraploid wheat
a: 0879 (NS)全穗; b: 0880 (FRS)全穗; c: FRS 俯视形态, 每周有4个小穗; d: FRS(上排)和NS(下排)区域的小穗着生方式, 显示一个穗轴节片分别着生2个和1个小穗; e: FRS(左)和NS(右)籽粒。
a: spike of 0879 (NS), b: spike of 0880 (FRS); c: the overlooking of FRS region, showing a lap with four spikelets; d: the growth mode of a spikelet, showing the rachis with two spikelets in FRS region (upper row) and the rachis with one spikelet NS region (lower row); e: the seeds of FRS (left) and NS region (right).

1.2 群体构建

由 0880 (FRS) × 0879 (NS) 构建的 F_2 群体包含 200 个单株, 由 0879 (NS) × 0880 (FRS) 构建的 F_2 群体包含 171 个单株。 $F_{2.3}$ 株系由 F_2 单株衍生而成, 每个株系种植 20 个单株, 根据 $F_{2.3}$ 株系穗部形态的表型, 推断 F_2 控制穗部性状的基因型是纯合还是杂合。另外, 以 0879 为轮回亲本, 0880 为供体亲本, 经过回交和农艺性状选择, 培育出除穗部性状以外其他性状均一致的近等基因系(图 2), 其中 NIL-1 为正常穗, NIL-2 为四排穗。

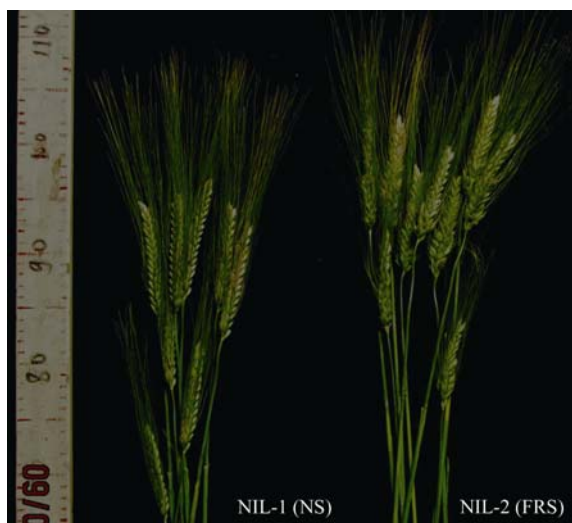


图 2 近等基因系 NIL-1 (NS) 及 NIL-2 (FRS) 穗部形态
Fig. 2 Morphological traits of spikes in NIL-1 (NS) and NIL-2 (FRS) lines

1.3 材料种植

由于圆锥小麦 0879、0880 冬性强, 在南京地区不能正常成熟, 且后期赤霉病危害严重, 因此, 将所有材料于 2010—2011 及 2011—2012 年种植于南京农业大学江浦试验农场的塑料大棚内。播种期为每年的 11 月 5 至 10 日, 行长 1.0 m, 行距 20 cm, 每行播 10 粒, 二叶一心期间苗, 每行保留长势一致的 6 株(株距 16 cm)。每个近等系材料种植 6 行, 3 次重复。塑料大棚在冬季气温较低时, 棚内外环境隔离, 以提升棚内的温度, 提高材料的生长速度; 在气温较高的 3 月中旬至成熟, 打开大棚两侧通风降温, 同时避免雨水对材料的影响, 减少赤霉病危害。种植于塑料大棚的 F_2 、 $F_{2.3}$ 及近等基因系均正常成熟, 病害轻, 穗部表型易于观察。

1.4 分子标记分析

采用 CTAB 法^[13]提取亲本和 F_2 群体单株的基因组 DNA。利用分布于小麦 A 基因组和 B 基因组的

600 个 SSR 标记, 扫描亲本 0880 和 0879 DNA 间的多态性; 根据 $F_{2.3}$ 家系的鉴定结果, 从 F_2 代分离群体中选取 10 株四排穗型单株和 10 株正常穗型单株的 DNA, 等量混合建立四排穗型池和正常穗型池, 用混合分组分析法(bulked segregant analysis, BSA)筛选与控制四排穗性状基因连锁的分子标记。从 GrainGenes 网站(<http://wheat.pw.usda.gov/GG2/index.shtml>)下载序列信息, 引物由上海英骏生物技术有限公司合成。

将筛选出的多态性引物对正反交 F_2 群体的共计 371 个单株 DNA 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系 10 μ L, 含 20 ng 模板 DNA, 1× buffer 1 μ L, 1.5 mmol L⁻¹ MgCl₂, 200 mmol L⁻¹ dNTP, 左右引物终浓度各为 0.2 μ mol L⁻¹, 0.5 U Taq DNA 聚合酶。PCR 反应程序为, 94℃ 变性 3 min; 然后 94℃ 30 s, 50~65℃(根据不同引物的退火温度)复性 50 s, 72℃ 1.0 min, 34 个循环; 最后 72℃ 延伸 10 min; 10℃ 保存。扩增产物经 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 硝酸银染色。

1.5 数据分析

用 SAS8.0 软件统计分析, 用 JoinMap4.0 软件构建分子遗传图谱。

2 结果与分析

2.1 四倍体小麦 0880 四排穗性状的遗传分析

正反交组合 F_1 代穗部性状均表现为正常穗, 表明 0880 的 FRS 性状由隐性基因控制。0880×0879 和 0879×0880 的 2 年 F_2 群体出现 NS 和 FRS 的性状分离, 且卡方测验结果表明, 在正反交群体中的分离比例均符合 3 : 1 (表 1)。表明圆锥小麦 0880 的 FRS 性状由隐性单基因(命名为 *frs1*)控制, 且可能不存在细胞质互作。因此, 可以将正反交组合的 F_2 单株合并, 进行卡方测验。结果表明, 正常穗与四排穗的分离仍符合由 1 对隐性基因控制的分离比例(表 1)。

2.2 SSR 分子遗传图谱构建及缺失系定位

利用分布于普通小麦 A 基因组和 B 基因组的 600 个 SSR 标记扫描圆锥小麦 0880 和 0879 的基因组 DNA, 其中 139 个(A 基因组 79 个和 B 基因组 60 个)为多态性标记, 且电泳效果较好, 多态性比例为 23%。有 32 个 SSR 标记在 BSA 分析中呈现多态性, 其中 11 个与 *frs1* 基因连锁(图 3-A), 并在群体中均符合 1 : 2 : 1 的分离规律。标记 *Xwmc598* 和 *Xwmc522* 位于 *frs1* 基因的两侧, 与该基因的遗传距离分别为 4.0 cM 和 2.4 cM。对比 Somers 等^[14]发表

表 1 四排穗(FRS)与正常穗(NS)小麦正反交 F₂ 群体中穗性状的分离
Table 1 Segregation of spike types in F₂ populations derived from reciprocal crosses between four-rowed spike (FRS) and normal spike (NS) tetraploid wheat

群体 Population	F ₂ 单株 No. of plants	穗型 Spike type		实际比值 Observed ratio	期望比例 Expected ratio	χ^2	P
		NS	FRS				
0880×0879 F ₂	200	152	48	3.17:1	3:1	0.327	0.50–0.70
0879×0880 F ₂	171	125	46	2.72:1	3:1	0.236	0.50–0.70
总计 Total	371	277	94	2.95:1	3:1	0.022	0.90–0.95

的 SSR 分子遗传图谱,证实这 11 个 SSR 标记构建的连锁群属于 2A 染色体,且本研究中连锁标记的顺序与 Somers 等^[14]发表的 2A 染色体遗传图谱具有一致性。利用中国春及其 2A 染色体缺失系对 11 个 SSR 标记进行物理定位,将 *frs1* 基因两侧的 SSR 标记 *Xwmc598* 和 *Xwmc522* 均定位于 2A 染色体短臂区域 FL 0~0.78,推测 *frs1* 基因亦可能位于该区域(图 3-B)。

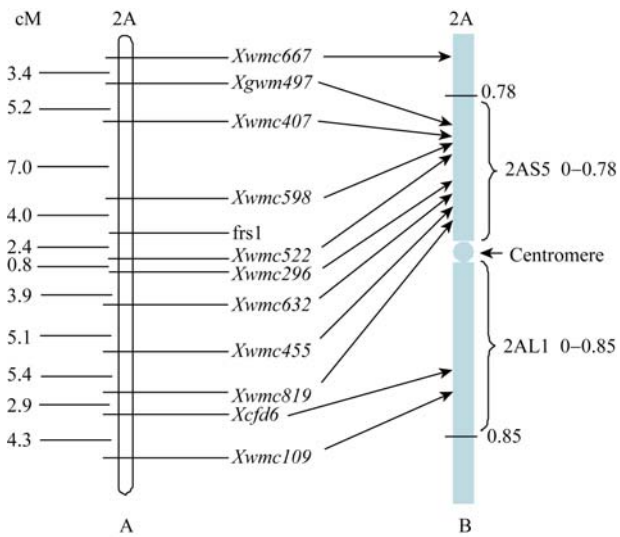


图 3 四排穗控制基因 *frs1* 分子遗传图谱(A)和物理图谱(B)
Fig. 3 Linkage (A) and physical bin (B) maps of *frs1* gene controlling four-rowed spike

A 图的左侧数据表示两标记之间的遗传距离(cM);
B 图的右侧标注为片段长度。

Kosambi map distances (cM) are shown on the left side of map A.
Fragment lengths are shown on the right of map B.

2.3 FRS 性状对穗粒数的影响分析

在稀植条件下(株距 16 cm),近等基因系 NIL-1 和 NIL-2 的株高、每株有效穗数、穗长及千粒重没有显著差异,但二者的每穗粒数及每穗粒重差异显著,具有 FRS 性状的显著高于具有正常穗的(表 2)。说明 FRS 性状并未增加有效穗数和千粒重,而是通过增加小穗数而使库容量增强。

3 讨论

Klingworth 等^[15]研究发现,圆锥小麦 RS 是质量-数量性状,其主效基因 *Rs* 位于 2AS;在其分离后代中有遗传稳定的 FRS 株系,但他认为是 RS 性状受环境影响的结果。闫晓华^[16]在穗分枝材料分 33 与中国春构建的分离群体也发现了四排穗单株,但将其作为正常穗处理,把控制分 33 的穗分枝基因 *Rs* 定位于 2AS,一个抑制基因定位于 2DS。Dobrovolskaya 等^[7]将控制普通小麦“multirow spike”(MRS)性状的基因 *Mrs1* 定位于 2DS 0.47~1.00 区间。本研究表明,圆锥小麦 0880 的 FRS 性状由遗传稳定的隐性单基因 *frs1* 控制,该基因位于 2AS 0~0.78 区间。尽管本研究的四排穗性状与前人研究的穗部形态有所不同,但我们仍推测 *frs1* 与 *Rs* 及 *Mrs1* 可能具有同源关系。

在大麦及黑麦等普通小麦的近缘物种中也发现了超数小穗现象。黑麦中一个穗分枝突变体的控制基因 *mol* 被定位于 2RS^[7]。相似的是,控制大麦中一个超数小穗突变体(分支穗)的基因 *brc1* 被定位于 2HS^[17],由于黑麦 2RS、大麦 2HS 与小麦 2AS、2DS 具有部分同源关系,且 *mol*、*brc1*、*Mrs1* 与 *frs1* 引起的表型变异都是超数小穗性状,因此,我们推测这些基因可能隶属于小麦族中一个调控小穗发育的基因家族。Rossini 等^[17]利用比较基因组学方法,发现与大麦 *brc1* 紧密连锁的 RFLP 标记序列信息与水稻第 7 染色体上的 *Fzp* (*Frizzy panicle*)位点高度同源。水稻中的 *Fzp* 基因及玉米中与其同源的 *Bd1* (*Branched silkiessi*)基因均编码 ERF 转录因子,调控小穗发育转向小花发育的进程。突变体 *fzp* 与突变体 *bd1* 通过修改小穗分生组织的发育规律,从而导致多小穗性状的产生。根据上述信息,通过比较基因组学的方法,我们将进一步开发 EST-STS 标记,精细定位 *frs1* 基因。

根据我们几年的观察,在 RIL 群体中,家系间

表 2 近等系 NIL-1 和 NIL-2 主要农艺性状
Table 2 Agronomic characters in NIL-1 and NIL-2 lines

近等系 Line	株高 Plant height (cm)	每株有效穗数 No. of panicles per plant	穗长 Spike length (cm)	穗粒数 No. of grains per spike	穗粒重 Grain weight per spike (g)	千粒重 1000-grain weight (g)
NIL-1 NS	99.4 a	9.3 a	10.9 a	40.8 a	1.84 a	42.5 a
NIL-2 FRS	98.9 a	9.8 a	10.8 a	52.3 b	2.16 b	41.9 a

不同字母的值表示在同一遗传背景内性状差异达 5% 显著水平。

Values followed by different letters are significantly different at 5% probability level within a genetic background.

有无 FRS 性状的表现比较稳定, 但 FRS 小穗的数目年度间却有一定的变化, 表明环境对 FRS 性状有一定的影响。而本研究在表型性状分析时, 只考虑了 FRS 性状的有无, 而未考虑其小穗数目的多少, 因此, 所定位的 *frs1* 可能只是一个主效基因位点, 有关 FRS 性状微效基因的情况还有待进一步分析。

小麦穗部形态结构直接影响穗粒数, 进而影响产量。圆锥小麦 FRS 性状通过额外增加小穗数, 提高每穗穗粒数(表 2), 从而增强库容量。由于四排穗区域一个穗轴节片上的 2 个小穗所结的籽粒大小没有显著的差异(图 1-e), 推测这 2 个小穗可能具有相同的营养竞争能力。因此, 利用具有 FRS 性状的遗传资源进行小麦产量的改良可能具有一定的意义。由于本研究是在稀植条件下对农艺性状进行考察的, 在正常的播种密度下是否 FRS 还能提高穗粒数和穗粒重, 以及对群体穗数有无负效应, 还需要进一步研究。另外, 控制 FRS 的基因在普通小麦背景中的效应也需要深入探讨。

4 结论

四倍体圆锥小麦 0880 的四排穗性状由隐性基因 *frs1* 控制, 且无细胞质效应。该基因位于 2A 染色短臂 2AS5 (FL 0~0.78) 区间。获得与 *frs1* 连锁的 11 个 SSR 标记, 并构建了分子标记连锁图, 为利用该基因进行产量性状改良的分子标记辅助选择及进一步精细定位 *frs1* 基因奠定了基础。

References

- [1] Yang X-Q(杨先泉), Ren Z-L(任正隆). Discussion on classification and inheritance of multispiket wheat resources. *Southwest China J Agric Sci* (西南农业学报), 1999, 12(2): 112-119 (in English with Chinese abstract)
- [2] Gallavotti A, Zhao Q, Kyojuka J, Meeley R B, Ritter M K, Doebley J F, Pe M E, Schmidt R J. The role of *barren stalk1* in the architecture of maize. *Nature*, 2004, 432: 630-635
- [3] Komatsu K, Maekawa M, Ujiie S, Satake Y, Furutani I, Okamoto H, Shimamoto K, Kyojuka J. *LAX* and *SPA*: major regulators of shoot branching in rice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 11765-11770
- [4] Chuck G, Muszynski M, Kellogg E, Hake S, Schmidt R J. The control of spikelet meristem identity by the *branched silkless1* gene in maize. *Science*, 2002, 298: 1238-1241
- [5] Komatsu M, Chujo A, Nagato Y, Shimamoto K, Kyojuka J. *FRIZZY PANICLE* is required to prevent the formation of axillary meristems and to establish Xoral meristem identity in rice spikelets. *Development*, 2003, 130: 3841-3850
- [6] Chuck G, Meeley R B, Hake S. The control of maize spikelet meristem fate by the *APETALA2*-like gene indeterminate *spikelet1*. *Gene Dev*, 1998, 12: 1145-1154
- [7] Dobrovolskaya O, Martinek P, Voylovkov A V, Korzun V, Roeder M S, Boerner A. Microsatellite mapping of genes that determine supernumerary spikelets in wheat (*T. aestivum*) and rye (*S. cereale*). *Theor Appl Genet*, 2009, 119: 867-874
- [8] Peng Z S, Yen C, Yang J L. Chromosomal location of genes for supernumerary spikelet in bread wheat. *Euphytica*, 1998, 103: 109-114
- [9] Pennell A L, Halloran G M. Inheritance of supernumerary spikelets in wheat. *Euphytica*, 1983, 32: 767-776
- [10] Klindworth D L, Williams N D, Joppa L R. Chromosomal location of genes for supernumerary spikelets in tetraploid wheat. *Genome*, 1990, 33: 515-520
- [11] Sears E R. The aneuploids of common wheat. University of Missouri, Columbia, Mo, 1954. pp 3-58
- [12] Endo T R, Gill B S. The deletion stocks of common wheat. *J Hered*, 1996, 87: 295-307
- [13] Saghai-Marooof M A, Soliman K M, Jorgensen R A, Allard R W. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984, 81: 8014-8018
- [14] Somers D J, Isaac P, Edwards K. A high-density wheat microsatellite consensus map for bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor Appl Genet*, 2004, 109: 1105-1114
- [15] Klindworth D L, Williams N D, Joppa L R. Inheritance of supernumerary spikelets in a tetraploid wheat cross. *Genome*, 1990, 33: 509-514
- [16] Yan X-H(闫晓华). Chromosome Location of Genes for Ramified Spikelet in Bread Wheat and the Cloning Gene of *ramosa2*. MS Thesis of Northwest Sci-Tech University, 2007 (in Chinese with English abstract)
- [17] Rossini L, Vecchietti A, Nicoloso L, Stein N, Franzago S, Salami F, Pozzi C. Candidate genes for barley mutants involved in plant architecture: an in silico approach. *Theor Appl Genet*, 2006, 112: 1073-1085