

小麦春化突变系 T128 的获得及变异分析

刘东军¹, 张宏纪¹, 郭长虹², 孙光祖¹, 孙 岩¹, 郭怡璠¹, 刘文林¹

(1. 黑龙江省农业科学院 作物育种研究所, 黑龙江 哈尔滨 150086; 2. 哈尔滨师范大学 分子细胞遗传与遗传育种黑龙江重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150075)

摘要:春小麦龙辐 10 号外源基因转化后代中发现了变异植株, 并选育出弱冬习性的突变系 T128。为了明确 T128 的突变机理, 利用特异标记检测了龙辐 10 号和突变系 T128 的春化基因。结果表明: 龙辐 10 号和 T128 的春化基因分别是 *Vrn-A1a*、*vrn-B1*、*vrn-D1*、*vrn-B3* 和 *vrn-A1*、*Vrn-B1*、*vrn-D1*、*vrn-B3*。龙辐 10 号具有显性基因 *Vrn-A1a*, 而突变系 T128 的显性基因为 *Vrn-B1*, 致使突变系 T128 变为弱冬习性, 生长发育时期延迟, 表明外源基因转化过程可以导致基因变异。

关键词:小麦; 春化突变系; 春化基因; 非目标性状变异

中图分类号: S512

文献标识码: A

文章编号: 1002-2767(2013)07-0001-04

春化是作物苗期经历低温阶段能够促进其开花结实的过程。根据春化特性可以将小麦分为春性小麦和冬性小麦, 春性小麦仅需短时间或不需要春化作用, 而冬性小麦必需经过春化作用才能正常结实。春化作用对小麦生产影响很大, 未经春化过程甚至会导致小麦绝产, 因此, 研究春化特性对小麦的生长发育, 引种和育种等都有重要的意义。

春化特性受小麦自身春化基因控制。目前, 已经发现的小麦春化基因有 4 个, 分别是 *Vrn1*, *Vrn2*, *Vrn3* 和 *Vrn4*。*Vrn1* 是一个促进开花的基因, YAN 等在二倍体小麦中已经成功克隆 *Vrn1* 基因^[1]。在普通小麦中, *Vrn1* 基因有 3 个等位基因, 分别位于小麦的 5A, 5B 和 5D 染色体上, 分别命名为 *Vrn-A1*, *Vrn-B1* 和 *Vrn-D1*^[2]。当 *Vrn-A1*, *Vrn-B1* 和 *Vrn-D1* 均为显性时, 品种的春化发育特性为春性。3 个显性等位基因具有累加效应, 显性基因效应作用强弱为 *Vrn-A1* > *Vrn-B1* > *Vrn-D1*, 当 *Vrn-A1*, *Vrn-B1* 和 *Vrn-D1* 为隐性时, 品种的春化发育特性为半冬性到强冬性^[3]。*Vrn-A1* 对 *Vrn-B1* 和 *Vrn-D1* 基因具有上位性效应, 对小麦的春化特性具有决定性作用, 而且 *Vrn-A1* 基因由于启动子区域的插入, 启动子区域的缺失以及第一个内含子内大片段缺失导致 3 个显性等位变异, 分别命名为 *Vrn-A1a*, *Vrn-A1b* 和

Vrn-A1c^[2]。*Vrn-A1* 位点的变异是导致小麦生长特性差异的主要原因。

Vrn2 是一个抑制开花的基因, 受春化作用的抑制, *Vrn2* 基因的缺失或突变会导致冬性小麦转变为春性小麦^[2,4]。*Vrn3* 是拟南芥 [*Flowering Locust (FT)*] 基因在小麦和大麦中的同源基因^[5], 位于 7B 染色体上, 命名为 *Vrn-B3*, 已经被成功克隆^[6]。*Vrn-B3* 基因受春化作用诱导促进小麦开花。*Vrn4* 基因位于小麦 5D 染色体上, 命名为 *Vrn-D4*^[7], 研究相对较少。*Vrn1* 和 *Vrn3* 基因受春化和长日照条件诱导, 能促进小麦生殖生长发育, 对其研究较深入。Zhang 对中国育成的小麦品种的研究发现, 冬性小麦的春化基因均为隐性基因 *vrn-A1*, *vrn-B1*, *vrn-D1* 和 *vrn-B3*, 春性小麦中的 4 个春化基因中至少含有 1 个显性基因。*Vrn1* 基因对小麦习性作用的强弱依次为 *Vrn-A1* > *Vrn-B1* > *Vrn-D1*, *Vrn-B3* 和 *Vrn-A1* 组合的小麦抽穗期较早^[8]。目前, *Vrn-A1*, *Vrn-B1*, *Vrn-D1* 和 *Vrn-B3* 基因已经被成功开发标记并应用于小麦习性的检测^[9]。

该研究在利用花粉管通道法对小麦龙辐 10 号的转基因过程中, 在未成功转化的小麦后代中发现变异植株, 在后代群体中选育出了突变系 T128, 为了明确导致突变体 T128 农艺性状变异的原因, 对其春化基因型进行了分析。

1 材料与方法

1.1 材料

供试小麦材料为龙辐 10 号、突变系 T128、中国春和辽春 10 号, 后两者为对照。

1.2 方法

1.2.1 突变系的获得 在小麦龙辐 10 号开花 30 min 后, 削去柱头, 将含有小麦优质蛋白亚基基因 (HMW-GS1Dx5+1Dy10) 的质粒滴在子房上,

收稿日期: 2013-04-02

基金项目: 国家 863 课题资助项目 (2012AA1012-1)

第一作者简介: 刘东军 (1978-), 男, 陕西省富平县人, 硕士, 助理研究员, 从事小麦辐射与生物技术研究。E-mail: dongdong415@126.com。

通讯作者: 张宏纪 (1969-), 男, 黑龙江省抚远县人, 博士, 研究员, 从事小麦辐射与生物技术研究。E-mail: fumai@163.com。

套袋保湿。在种植的后代中出现了变异植株,按系谱法选育出突变系 T128,记录突变系 T128 的生长习性、播种期、三叶期、拔节期、抽穗期等生长发育时期。

1.2.2 春化实验 将突变系 T128 催芽后放于 4℃ 冰箱中,春化 16 d 后,同对照龙辐 10 号和未春化突变系 T128 种植于黑龙江省农业科学院盆栽场。调查龙辐 10 号, T128(春化)和 T128(未

春化)的生长习性、发育时期。

(1)突变系的春化基因分析。采用 CTAB 法提取小麦基因组 DNA^[10]。该研究采用 Yan^[1,2,6]和 Fu^[9]等开发的春化基因特异标记来研究突变系 T128 的变异。将已知基因型的小麦中国春(*vrn-A1*, *vrn-B1*, *Vrn-D1*, *vrn-B3*)和辽春 10(*Vrn-A1a*, *Vrn-B1*, *Vrn-D1*, *Vrn-B3*)作为对照。

表 1 小麦春化基因引物序列及扩增长度

Table 1 Primer and amplification length for wheat vernalization genes

位点 Locus	等位基因 Allele	引物 Primer	序列 Sequence	长度/bp Fragment length
VRN-A1	<i>Vrn-A1a</i>	VRNA1F	GAAAGGAAAAATTCTGCTCG	965/876
		VRN1-INT1R	GCAGGAAATCGAAATCGAAG	
	<i>Vrn-A1b</i> *	引物同 <i>Vrn-A1a</i>		714
	<i>Vrn-A1c</i> *	引物同 <i>Vrn-A1a</i>		734
	<i>vrn-A1</i> *	引物同 <i>Vrn-A1a</i>		734
	<i>Vrn-A1c</i>	Intrl/A/F2	AGCCTCCACGGTTTGAAAGTAA	1170
		Intrl/A/R3	AAGTAAGACAACACGAATGTGAGA	
	<i>vrn-A1</i>	Intrl/C/F	GCACTCCTAACCCTAACC	1068
		Intrl/AB/R	TCATCCATCATCAAGGCAAA	
VRN-B1	<i>Vrn-B1</i>	Intrl/B/F	CAAGTGGAACGGTTAGGACA	709
		Intrl/B/R3	CTCATGCCAAAAATTGAAGATGA	
	<i>vrn-B1</i>	Intrl/B/F	CAAGTGGAACGGTTAGGACA	1149
		Intrl/B/R4	CAAATGAAAAGGAATGAGAGCA	
VRN-D1	<i>Vrn-D1</i>	Intrl/D/F	GTTGTCTGCCTCATCAAATCC	1671
		Intrl/D/R3	GGTCACTGGTGGTCTGTGC	
	<i>vrn-D1</i>	Intrl/D/F	GTTGTCTGCCTCATCAAATCC	997
		Intrl/D/R4	AAATGAAAAGGAACGAGAGCG	
VRN-B3	<i>Vrn-B3</i>	VRN4-B-INS-F	CATAATGCCAAGCCGGTGAGTAC	1200
		VRN4-B-INS-R	ATGTCTGCCAATTAGCTAGC	
	<i>vrn-B3</i>	VRN4-B-NOINS-F	ATGCTTTCGCTTGCCATCC	1140
		VRN4-B-NOINS-R	CTATCCCTACCGCCATTAG	

PCR 反应体系为 20 μL 。总体积中含 2 μL 10 \times 缓冲液, 1.5 μL (25 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$) MgCl_2 , 0.2 μL (5 U) *rTaq* DNA 聚合酶, 1.6 μL (2.5 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$) dNTP, 每条引物 1 μL (10 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$), 其中 *Vrn-B1* 和 *Vrn-D1* 采用双引物 PCR, 40~60 ng 模板 DNA。PCR 反应程序为 94℃ 预变性 3 min; 94℃ 变性 40 s, 55℃ 退火 40 s, 72℃ 延伸 90 s, 35 个循环; 最后 72℃ 延伸 10 min。PCR 扩增产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶, 以 120 V 恒压电泳分离, EB 染色, 凝胶成像系统进行照相分析。

2 结果与分析

2.1 小麦突变系 T128 生长发育时期调查及春化试验

通过 2 a 田间调查, 突变系 T128 苗期习性为匍匐, 而龙辐 10 号为直立。此外, 龙辐 10 号和突变系 T128 的生育期主要差异在拔节期。年度之间出现的生长发育时期差异可能是由于年度之间气候不同造成的。突变系 T128 的拔节期比龙辐 10 号晚



图 1 龙辐 10 号及其突变系 T128 苗期习性

Fig. 1 Growth habits of Longfu10 and mutant line T128

1. 未春化的突变系 T128; 2. 龙辐 10 号; 3. 春化 16 d 的 T128

1. Mutant line T128 of non-vernalization; 2. Longfu10; 3. Mutant line T128 after vernalization 16 days

12 d, 在春化试验中, 春化突变系 T128 在拔节期比龙辐 10 号晚 5 d, 但是比未春化突变系 T128 提前 8 d, 因此, 推断突变系 T128 是个春化突变系。

表 2 突变系 T128 和龙辐 10 号的生长习性 & 发育时期调查
Table 2 Investigation of growth habits and development stage on mutant line T128 and Longfu10

试验材料 Material	三叶期		拔节期		抽穗期		苗期习性 Growth habit	
	Three leaves stage		Jointing stage		Heading date		of seedling stage	
	2011	2012	2011	2012	2011	2012	2011	2012
龙辐 10Longfu 10 T128	17	15	40	43	74	62	直立	直立
春化的 T128	18	16	52	55	87	76	匍匐	匍匐
Vernalizated T128	—	15	—	47	—	69	匍匐	匍匐

2.2 小麦突变系 T128 及龙辐 10 号的春化基因型分析

在普通小麦 *Vrn-A1* 基因位点中,有 3 个显性和 1 个隐性等位变异,在引物 VRNA1F 和 VRN1-INT1R 的检测结果中,*Vrn-A1a* 有 965 和 876 bp 两个条带,*Vrn-A1b* 有 714 bp 的条带,*Vrn-A1c* 和 *vrn-A1* 有 734 bp 的条带。如图 2-A 所示,辽春 10 号和龙辐 10 号结果有 2 个条带,突变系 T128 和中国春检测出 734 bp 的条带。因

此,龙辐 10 号在该位点基因为显性 *Vrn-A1a*,突变系 T128 可能为 *Vrn-A1c* 或 *vrn-A1*,需要进一步分析。在引物 Intr1/A/F2 和 Intr1/A/R3 的检测中,*Vrn-A1c* 有 1 170 bp 的条带,在引物 Intr1/C/F 和 Intr1/AB/R 的检测中,*vrn-A1* 有 1 068 bp 的条带。如图 2-B 所示,中国春和突变系 T128 都扩增出 1 068 bp 的条带,因此,突变系 T128 在该位点等位基因为 *vrn-A1*。

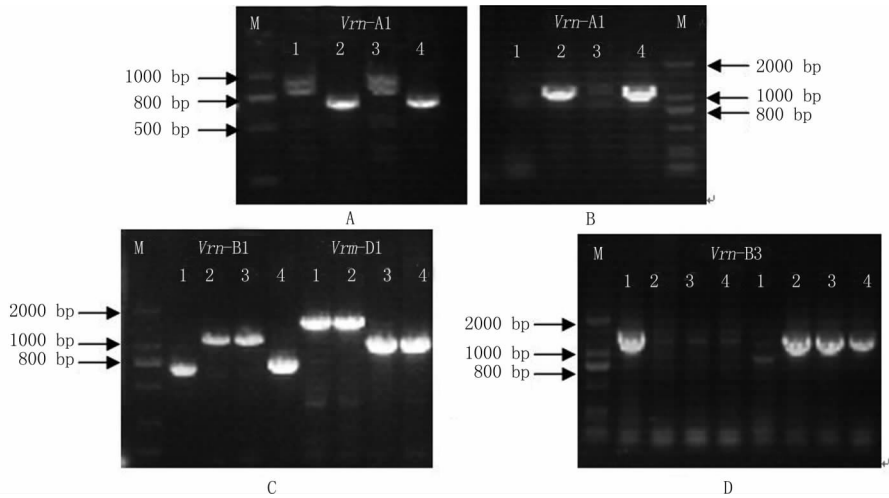


图 2 龙辐 10 号及其突变系 T128 的春化基因组成分析

Fig. 2 Combination of vernalization genes in Longfu 10 and mutant line T128

图中 1,2,3,4 分别代表辽春 10 号、中国春、龙辐 10 号和 T128;A 和 B 图是 *Vrn-A1* 的基因型扩增图谱;C 图是 *Vrn-B1* 和 *Vrn-D1* 的扩增图谱;D 图是 *Vrn-B3* 的扩增图谱

1,2,3,4 represent of Liaochun10,China spring,Longfu10,T128;A and B are amplification result of *Vrn-A1*;C is amplification result of *Vrn-B1* and *Vrn-D1*;D is amplification result of *Vrn-B3*

在引物 Intr1/B/F 和 Intr1/B/R3,Intr1/B/F 和 Intr1/B/R4 检测 *Vrn-B1* 基因型结果中(见图 2-C),龙辐 10 号和中国春有 1 149 bp 的条带,突变系 T128 与辽春 10 号有 709 bp 的条带。所以,龙辐 10 号在该位点的基因型为隐性 *vrn-B1*,突变系 T128 为显性 *Vrn-B1*。

在引物 Intr1/D/F 和 Intr1/D/R3,Intr1/D/F 和 Intr1/D/R4 检测 *Vrn-D1* 基因结果中(见图 2-C),突变系 T128 和龙辐 10 号有 997 bp 的基因片段,辽春 10 号和中国春有 1 671 bp 条带。因此,突变系 T128 和龙辐 10 号在该位点的基因型为隐性 *vrn-D1*。

在引物 *Vrn4-B-ins-F* 和 *Vrn4-B-INS-R*,VRN4-B-NOINS-F 和 VRN4-B-NOINS-R 分别检测 *Vrn-B3* 基因结果中,突变系 T128、龙辐 10 号与中国春扩增出 1 140 bp 的条带,辽春 10 号扩增出 1 200 bp 的片段。因此,突变系 T128 和龙辐 10 在该位点的基因型为隐性 *vrn-B3*(见图 2)。

综上所述,龙辐 10 号的春化基因型组合为 *Vrn-A1a*,*vrn-B1*,*vrn-D1*,*vrn-B3*,突变系 T128 为 *vrn-A1*,*Vrn-B1*,*vrn-D1*,*vrn-B3*。龙辐 10 号具有显性基因 *Vrn-A1a*,突变系 T128 具有显性基因 *Vrn-B1*,这可能是导致苗期习性 & 生长发育时期延迟的原因。

3 结论与讨论

转基因的日益成熟使农作物的定向改良成为一种新的育种技术,并且在抗病虫害、抗除草剂及抗旱等多个方面取得了巨大成就。在转基因过程中,利用生物技术手段对目标性状进行选择,对于优良品系的定向改良快捷有效,而对非目标性状的研究及未成功转化的植株后代少有研究。近年来,多个育种家在转基因过程中发现非目标性状的变异。袁红旭在对水稻转几丁质酶基因抗纹枯病的研究中发现,转基因水稻除抗纹枯病有显著提高外,还存在穗粒数和千粒重两个非目标性状的变异,认为外源基因导入引起非目标性状的变异^[11]。孙岩以小麦转 HMW-GS1Dx5+1Dy10 基因获得的 1Ax1 和 1Ax2 * 近等基因系 08K 860(HWM-GS 组成为 1,7+9,5+10)和 08K 871(HWM-GS 亚基组成为 2*,7+9,5+10),也是转基因过程中导致的非目标性状的变异^[12]。郭建夫采用基因枪法将 4 个抗真菌性病害基因导入超级稻恢复系 E32 中,转基因株系除了产生抗病性等目标性状的变异外,还发生生育期、植株形态、谷粒外观及产量性状等非目标农艺性状变异,并证实了作物在转基因过程中会出现一些非目标性状变异,或者出现一些受体和供体不具有的农艺性状^[13]。该研究在利用花粉管通道法对春小麦龙辐 10 进行转基因过程中,发现未成功导入目标基因的后代中有发生变异的植株,并对这种变异进行了分析,研究表明突变系 T128 的春化基因型发生了变化,非目标性状变异是目的基因还是基因转化过程中的环境因素导致的,还需要进一步研究。

参考文献:

[1] Yan L, Loukoianov A, Tranquilli G. Positional cloning of

the wheat vernalization gene *VRN1*[J]. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. ,2003,100(10):6263-6268.

[2] Yan L, Helguera M, Kato K. Allelic variation at the *VRN-1* promoter region in polyploid wheat[J]. Theor. Appl. Genet. ,2004,109(8):1677-1686.

[3] 袁秀云. 普通小麦春化基因的克隆及表达特性分析[D]. 郑州:河南农业大学,2009:3-8.

[4] Distelfeld A, Li C, Dubcovsky J. Regulation of flowering in temperate cereals[J]. Curr. Opin. Plant Biol. ,2009,12(2):178-184.

[5] Dubcovsky J, Loukoianov A, Fu D. Effect of photoperiod on the regulation of wheat vernalization genes *VRN1* and *VRN2*[J]. Plant Mol. Biol. ,2006,60(4):469-480.

[6] Yan L, Fu D, Li C. The wheat and barley vernalization gene *VRN3* is an orthologue of *FT*[J]. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. ,2006,103(51):19581-19586.

[7] Yoshida T, Nishida H, Zhu J. *Vrn-D4* is a vernalization gene located on the centromeric region of chromosome 5D in hexaploid wheat [J]. Theor. Appl. Genet. ,2010,120(3):543-552.

[8] Zhang X K, Xiao Y G, Zhang Y. Allelic Variation at the Vernalization Genes and in Chinese Wheat Cultivars and Their Association with Growth Habit[J]. Crop Science, 2008,48(2):458.

[9] Fu D, Szucs P, Yan L. Large deletions within the first intron in *VRN-1* are associated with spring growth habit in barley and wheat[J]. Mol. Genet. Genomics, 2005,273(1):54-65.

[10] 孙岩,尹静,王广金,等. 小麦抗秆锈突变系龙辐 03D51 的筛选及其抗病性的遗传分析与 RAPD 标记[J]. 核农学报, 2007,21(2):121-123.

[11] 袁红旭,刘晚荷,刘月廉,等. 转几丁质酶基因水稻抗纹枯病性及农艺性状遗传特性[J]. 南方农业学报,2012(2):151-154.

[12] 孙岩,张宏纪,王广金,等. 小麦转 1Ax1 和 1Ax2 * 近等基因性状差异的研究[J]. 核农学报 2012(4):643-647.

[13] 郭建夫,黄永相,彭贤力,等. 基因枪法转化水稻 E32 后代非目标农艺性状变异的研究[J]. 热带亚热带植物学报, 2007(4):284-289.

Obtaining and Variation Analysis of Vernalization Mutant Line T128 of Wheat

LIU Dong-jun¹, ZHANG Hong-ji¹, GUO Chang-hong², SUN Guang-zu¹, SUN Yan¹, GUO Yi-fan¹, LIU Wen-lin¹

(1. Crop Breeding Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150086; 2. Key Laboratory of Molecular and Cytogenetic Heilongjiang Province, Harbin Normal University, Harbin, Heilongjiang 150025)

Abstract: Agronomic trait variation was found in the offsprings of genetic transformation in wheat Longfu 10, and mutant line T128 with medium winteriness was bred. In order to determine mutation mechanism, vernalization genes of Longfu 10 and mutant line T128 were tested by designed mark. The result showed that vernalization genes type of Longfu10 were *Vrn-A1a*, *vrn-B1*, *vrn-D1* and *vrn-B3*, that of mutant line T128 were *vrn-A1*, *Vrn-B1*, *vrn-D1* and *vrn-B3*. Longfu 10 had dominant gene *Vrn-A1a*, dominant gene of mutant line T128 was *Vrn-B1*. It induced medium winteriness of mutant line T128, delayed developmental stage. The research considered that genetic transformation induces variation of non-target agronomic traits.

Key words: wheat; vernalization mutant line; vernalization gene; variation of non-target agronomic traits

(该文作者还有杨淑萍、闫文义和王广金,单位为黑龙江省农业科学院)