

## CIMMYT 新型人工合成小麦 *Pina* 和 *Pinb* 基因等位变异

李根英<sup>1,2,3</sup> 夏先春<sup>2</sup> 何中虎<sup>2,4,\*</sup> 孙其信<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 中国农业大学农学与生物技术学院, 北京 100094; <sup>2</sup> 中国农业科学院作物科学研究所, 国家小麦改良中心/国家农作物基因资源与基因改良重大科学工程, 北京 100081; <sup>3</sup> 山东省农业科学院作物研究所, 山东济南 250001; <sup>4</sup> 国际玉米小麦改良中心中国办事处, 北京 100081)

**摘要:** 六倍体人工合成小麦由硬粒小麦 (*Triticum turgidum* subsp. *durum*) 与粗山羊草 (*Aegilops tauschii* Coss.) 杂交产生, 是研究小麦进化过程中基因变异的重要材料。以国际玉米小麦改良中心 (CIMMYT) 提供的 57 份由野生二粒小麦 (*T. turgidum* subsp. *dicoccoides*) 与粗山羊草杂交产生的新型人工合成六倍体小麦为材料, 用单籽粒特性测定仪和 *Pina*、*Pinb* 特异性 PCR 引物对其籽粒硬度变异以及控制籽粒硬度的主效基因 *Pina* 和 *Pinb* 的分布情况进行了研究。结果表明, 这些材料的 SKCS 硬度值变异较大, 从 10.5 到 42.6, 其中 15–30 的占 78%。共有 *Pina-D1a*、*Pina-D1c*、*Pinb-D1h* 和 *Pinb-D1j* 4 种等位变异型, 基因型为 *Pina-D1a*/*Pinb-D1j* 的 8 个, 占 14%; 基因型为 *Pina-D1c*/*Pinb-D1h* 的 49 个, 占 86%。方差分析表明, 基因型 *Pina-D1a*/*Pinb-D1j* 与 *Pina-D1c*/*Pinb-D1h* 对籽粒硬度的影响差异不显著, 但父本粗山羊草和母本野生二粒小麦以及二者间的互作对籽粒硬度有显著影响, 说明除 *Pina* 和 *Pinb* 外, 还有其他微效基因影响籽粒硬度的形成。

**关键词:** 野生二粒小麦; 粗山羊草; 人工合成小麦; *Pina* 和 *Pinb*; 籽粒硬度

## Allelic Variations of Puroindoline a and Puroindoline b Genes in New Type of Synthetic Hexaploid Wheats from CIMMYT

LI Gen-Ying<sup>1,2,3</sup>, XIA Xian-Chun<sup>2</sup>, HE Zhong-Hu<sup>2,4,\*</sup>, and SUN Qi-Xin<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100094; <sup>2</sup> National Wheat Improvement Center/Institute of Crop Sciences/The National Key Facility for Crop Gene Resources and Genetic Improvement, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081; <sup>3</sup> Crop Research Institute, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan 250100, Shandong; <sup>4</sup> CIMMYT China Office, Beijing 100081, China)

**Abstract:** *Triticum dicoccoides* and *Aegilops tauschii* are important germplasm resources of rich genetic variability for improvement of hexaploid wheat (*T. aestivum*). This variability can be accessed by utilizing synthetic hexaploid wheat lines with genomes from *Ae. tauschii* and *T. dicoccoides*. Two methods can be employed to incorporate *Triticum dicoccoides* and *Aegilops tauschii* genes into a hexaploid wheat. One is the direct cross method of hybridization between *Ae. tauschii* and hexaploid wheat, another is an indirect method of synthetic hexaploids by crossing tetraploid wheat with *Ae. tauschii*. Genes from tetraploid wheat and *Aegilops tauschii* are then available via direct crossing of synthetic hexaploids to *T. aestivum*. The CIMMYT (International Maize and Wheat Improvement Center) has produced two types of synthetic hexaploids. One is the progeny of *T. turgidum* ssp. *durum* crossing with *Ae. tauschii*, another is the new type synthetic wheat which produced by crossing *Triticum dicoccoides* with *Aegilops tauschii*.

Grain hardness is a major factor influencing the end-use quality. Genes for grain hardness in common wheat reside on *Ha* locus of chromosome 5DS. The wild-type alleles (*Pina-D1a*, *Pinb-D1a*) determine soft endosperm, while the hard phenotypes result from mutations in either *Pina* or *Pinb*. In order to understand the evolution of genes for grain hardness, studies have focused on the wild relatives of common wheat, particularly on *Ae. tauschii*, the supposed donor of the D genome in common wheat. Puroindoline a in *Ae. tauschii* contained 99.3% amino acid sequence homology to the wheat cultivar 'Penawawa' and 90.5% amino acid sequence homology in puroindoline b. Among 50 *Ae. tauschii* accessions, four alleles of puroindoline a and four alleles of puroindoline b were identified, encoding two and three different proteins, respectively. However, the effect that these sequence polymorphisms may have on kernel texture is unknown, as no test method of texture has been developed for *Ae. tauschii*. The incorporation of *Ae. tauschii* into synthetic hexaploid facilitates

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目(2002CB101300)

作者简介: 李根英(1968–), 女, 副研究员, 主要从事小麦生物技术育种研究。

\* 通讯作者 (Corresponding author): 何中虎(1963–), 男, 研究员, 主要从事小麦遗传育种研究。Tel: 010-68918547; E-mail: zhhe@public3.bta.net.cn

Received(收稿日期): 2006-04-30; Accepted(接受日期): 2006-06-13.

the analysis of puroindoline sequence polymorphism and other genetic effects on kernel texture, using testing methods designed for hexaploid wheat, such as the Perten single kernel characterization system (SKCS). Analysis of synthetic hexaploid can also facilitate the analysis of the effect of the A and B genomes, contributed by the tetraploid wheat parent on kernel texture. Studies on *Ae. tauschii* and synthetic hexaploid wheat derived from hybridization of *T. turgidum* ssp. *durum* with *Ae. tauschii* demonstrated a number of novel *Pina* and *Pinb* sequences. However, none of these *Pina* and *Pinb* mutations produced a hard endosperm texture in synthetic wheat. To further understand the mechanism of grain hardness formation in *Ae. tauschii* and synthetic wheat, a total of 57 new type synthetic hexaploid lines derived from the crosses *T. dicoccoides* × *Ae. tauschii* were employed to evaluate the SKCS hardness and detect puroindoline alleles using gene specific PCR primers. Four allelic variations of *Pina* and *Pinb* were identified, i.e., *Pina-D1a*, *Pina-D1c*, *Pinb-D1h*, and *Pinb-D1j*. Eight lines were *Pina-D1a/Pinb-D1j* types, accounting for 14%, and 49 were *Pina-D1c/Pinb-D1h* types, accounting for 86%. Kernel texture differed significantly among the synthetic hexaploid lines, ranging from 10.5 to 42.6, with significant difference among the parental types, *T. dicoccoides* or *Ae. tauschii*. The interactions between parental genotypes had also a significant influence on kernel texture. These results indicated that there might be some genes besides *Ha* locus associated with the kernel texture.

**Keywords:** *Triticum dicoccoides*; *Aegilops tauschii*; Synthetic hexaploid wheat; *Pina* and *Pinb* alleles; Kernel texture

野生二粒小麦 (*Triticum dicoccoides*,  $2n = 4x = 28$ , AABB) 是普通小麦 (*T. aestivum*,  $2n = 6x = 42$ , AABBDD) 的二级基因源, 具有抗小麦条锈、叶锈和白粉病等优点, 且含有普通小麦中所不表达的稀有高分子量麦谷蛋白亚基, 并具有一定的耐盐、耐涝性, 在小麦育种中有着重要的应用潜力<sup>[1-2]</sup>。普通小麦的 D 基因组保留了其野生祖先粗山羊草的大部分遗传成分, 因此粗山羊草可以被看成是另一个扩展了的小麦基因库。小麦 D 基因组与粗山羊草的密切关系极大地减少了遗传重组的障碍, 可以将粗山羊草中的抗病、抗虫、优质以及优良的农艺性状导入目前栽培的普通小麦中<sup>[3]</sup>。将粗山羊草和二粒小麦中的基因导入六倍体小麦有两种途径, 一是直接与普通小麦杂交<sup>[4]</sup>; 二是首先将二粒小麦与粗山羊草杂交形成六倍体人工合成小麦, 然后普通小麦与人工合成小麦杂交<sup>[5]</sup>。国际玉米小麦改良中心 (CIMMYT) 已经创造了许多人工合成小麦, 分两大类, 一是硬粒小麦与粗山羊草的杂交后代, 二是野生或栽培二粒小麦与粗山羊草的杂交后代, 它们为研究基因的遗传变异性提供了方便。川麦 38 和川麦 42 就是以 CIMMYT 提供的人工合成小麦做亲本, 与普通小麦杂交、回交, 选育成的高产、抗条锈新品种。

人工合成小麦也是研究籽粒硬度形成机理的理想材料。籽粒硬度是影响普通小麦加工品质的重要性状之一, 控制小麦籽粒硬度的主效基因 (*Ha*) 位于 5D 染色体的短臂上, *Pina-D1*、*Pinb-D1* 和 *Gsp-1* 在 *Ha* 位点上紧密连锁, 野生型的 *Pina-D1a* 和 *Pinb-D1a* 形成软质麦, 其中任何一个基因发生突变都会导致籽粒质地变硬, 目前在普通小麦中发现的 5 个

*Pina* (*Pina-D1b*、*Pina-D1k*、*Pina-D1l*、*Pina-D1m* 和 *Pina-D1n*) 和 11 个 *Pinb* 等位变异类型 (*Pinb-D1b* ~ *g*、*Pinb-D1p* ~ *t*) 都导致籽粒质地变硬<sup>[6-8]</sup>。尽管 *Pina* 和 *Pinb* 是控制普通小麦籽粒硬度的主要遗传因素, 但软硬质小麦间有相当一部分籽粒硬度的差异并不是由 *Pina* 和 *Pinb* 等位基因的不同造成的。*Pina* 和 *Pinb* 基因可解释整个籽粒硬度遗传变异的 63% ~ 93%, 在 1A、2AL、3AS、5BL、2DL、6D 和 6DS 上都存在控制籽粒硬度的 QTL, 每个位点可解释籽粒硬度总变异的 3.0% ~ 8.4%<sup>[9-12]</sup>。

为了研究籽粒硬度的形成机制, 揭示籽粒硬度主效基因的起源和进化过程, 人们加强了对普通小麦野生近缘种中籽粒硬度基因的研究。粗山羊草 (*Aegilops tauschii*) 是目前公认的普通小麦 D 基因组的供体, 但普通小麦 D 染色体上的 *Ha* 位点比粗山羊草少 29 kb<sup>[13]</sup>。粗山羊草中的 *Pina* 基因与普通小麦品种 'Penawawa' 的氨基酸序列同源性为 99.3%, *Pinb* 的氨基酸序列同源性为 90.5%<sup>[14]</sup>。在粗山羊草中已经发现 *Pina-D1c*、*Pina-D1d*、*Pina-D1e*、*Pina-D1f* 和 *Pina-D1g* 5 个 *Pina* 基因的等位变异, 3 个 *Pinb* 等位基因变异 *Pinb-D1h*、*Pinb-D1i* 和 *Pinb-D1j*, 但因为缺少可用于测定粗山羊草籽粒硬度的方法, 这些多态性序列对籽粒质地的影响尚不清楚<sup>[15]</sup>。而人工合成小麦的籽粒硬度测定则较为容易, 是研究上述问题的良好材料。Gedey 等<sup>[16]</sup>以硬粒小麦 (*T. turgidum* subsp. *durum*) 与粗山羊草 (*Ae. tauschii*) 杂交产生的 75 份人工合成小麦为材料, 研究了 *Pina* 和 *Pinb* 等位基因的分布及其对籽粒硬度的影响, 发现了新的 *Pina* 和 *Pinb* 突变类型各 3 个,

即 *Pina-D1h*、*Pina-D1i*、*Pina-D1j* 和 *Pinb-D1m*、*Pinb-D1n*、*Pinb-D1o*，但与普通小麦中发现的等位变异不同，这些非野生型的等位变异类型并没有导致籽粒质地由软变硬。陈锋等<sup>[17]</sup>对来自 CIMMYT 的 176 份普通春小麦与人工合成小麦的杂交后代稳定品系进行了研究，发现硬质基因型均为 *Pina-D1b/Pinb-D1a*，软质基因型有 *Pina-D1a/Pinb-D1a*、*Pina-D1j/Pinb-D1i*、*Pina-D1a/Pinb-D1i* 和 *Pina-D1c/Pinb-D1h* 4 种类型，*Pina-D1j/Pinb-D1i* 是最常见的突变类型。但这 176 个品系的杂交组合中所用的人工合成小麦全部是由硬粒小麦 (*T. turgidum* subsp. *durum*) 与粗山羊草 (*Ae. tauschii*) 杂交产生的。野生二粒小麦与粗山羊草杂交产生的后代是 CIMMYT 创造的另外一类重要的人工合成小麦，在小麦育种中具有重要的利用价值，但目前还没有对这类人工合成小麦中籽粒硬度的分布、*Pina* 和 *Pinb* 基因的等位变异类型以及籽粒硬度形成机制的研究报道。本研究以这类人工合成小麦作为研究材料，考察其 *Pina* 和 *Pinb* 基因等位变异的类型，在测定籽粒 SKCS 硬度值的基础上，揭示 *Pina* 和 *Pinb* 等位基因变异和父本粗山羊草及母本野生二粒小麦对籽粒硬度的影响，为其在育种中的应用提供理论指导。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

57 份人工合成小麦的种子由 CIMMYT 提供，都是 21 个野生二粒小麦与 15 个粗山羊草的杂交后代，其组合见表 1。2005 年春在黑龙江省农业科学院实验农场播种扩繁，3 m 行长，单行种植，田间管理同其他育种试验。正常成熟后收获，人工脱粒，自然干燥。

### 1.2 方法

1.2.1 籽粒硬度测定 利用 Perten 4100 型单籽粒特性测定仪 (Single Kernel Characterization System, SKCS) 测定 300 粒样品的硬度值，同时记录籽粒千粒重和直径，并根据硬度值及其分布频率自动分级。

1.2.2 基因组 DNA 提取 基因组 DNA 的提取按 Lagudah 等<sup>[18]</sup>的方法，略有改动。DNA 提取液含 288 mol L<sup>-1</sup> NaCl、200 mmol L<sup>-1</sup> Tris-Cl (pH 8.0)、25 mmol L<sup>-1</sup> EDTA 和 0.5% SDS。用紫外分光光度计检测 DNA 浓度，-20℃ 下保存备用。

1.2.3 *Pina* 和 *Pinb* 基因全长序列扩增和测序 依据 Lillemo 等<sup>[14]</sup>报道的 *Pina* 和 *Pinb* 基因的上、下游序列，利用 DNAMAN 软件设计用于扩增 *Pina* 的上、下游引物 *Pina-DF* 和 *Pina-DR* 及 *Pinb* 的上、下游引物 *Pinb-DF* 和 *Pinb-DR*，引物序列为：

*Pina-DF*: 5'-CATCTATTTCATCTCCACCTGC-3'

*Pina-DR*: 5'-GTGACAGTTTATTAGCTACTC-3'

*Pinb-DF*: 5'-GAGCCTCAACCCATCTATTTCATC-3'

*Pinb-DR*: 5'-CAAGGCTGATTTTATTTCATAG-3'

PCR 扩增反应体积 50 μL，反应液组成为 1 × PCR 缓冲液 (含 1.5 μmol L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>)，dNTP (A、T、C、G) 各 250 μmol L<sup>-1</sup>，上、下游引物各 10 pmol L<sup>-1</sup>，200 ng 基因组 DNA，1 U *Taq* 酶 (大连宝生物公司)。反应程序为 94℃ 预变性 5 min；94℃ 变性 1 min，58℃ 退火 1 min，72℃ 延伸 2 min，共循环 35 次；72℃ 延伸 10 min。PCR 扩增产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳分离，溴化乙锭 (EB) 染色，凝胶成像系统扫描检查扩增产物的纯度和强度，回收 PCR 产物由奥科生物技术公司测序。

### 1.3 数据分析

应用 DNAMAN 序列分析软件，将测序结果与 GenBank 中已报道的 *Pina* 和 *Pinb* 等位基因进行序列比对和蛋白质结构分析。利用简单相关模型进行 SKCS 籽粒硬度值、粒重和粒径的相关分析，用 SAS 8.2 系统软件的共线性模型 (GLM) 进行 SKCS 硬度值的方差分析 (ANOVA)，应用 Duncan's 测验进行多重比较。

## 2 结果与分析

### 2.1 人工合成小麦的籽粒硬度分布及其籽粒性状

在 58 份材料中，有 3 份材料籽粒较瘪，达不到 SKCS 硬度仪测试的要求；此外，55 号材料经根尖压片鉴定，只有 28 条染色体，是野生二粒小麦自交株系。其余 54 个系的籽粒大且饱满，平均千粒重 41.8 g，其中最大的 52.1 g，最小的 34.9 g，平均粒径 2.9 mm，最大粒径 3.2 mm，最小粒径 2.7 mm (表 1)。54 份材料的籽粒硬度差异很大，其籽粒的 SKCS 硬度值最大 42.6，最小 10.5，平均 22.6，在 15~30 之间的占 78%，其分布频率见图 1。分析表明，SKCS 硬度值与籽粒千粒重及粒径的相关均未达显著水平，与 Gedye 等<sup>[16]</sup>的研究结果一致。

表 1 57 份 CIMMYT 人工合成小麦的籽粒性状及 puroindoline 等位基因分布  
Table 1 Kernel characters and puroindoline genes of 57 CIMMYT hexaploid synthetic wheat lines derived from *T. dicoccoides* × *Ae. tauschii*

编号 No.	亲本组合 Cross	<i>Pina-D1</i>	<i>Pinb-D1</i>	SKCS 值 SKCS value	粒径 Grain diameter (mm)	千粒重 1000-kernel weight (g)
1	CI9309/ <i>Ae. squarrosa</i> (1027)	c	h	15.3	2.9	42.0
2	PI347230/ <i>Ae. squarrosa</i> (1027)	c	h	12.8	3.0	43.8
3	PI94623/ <i>Ae. squarrosa</i> (1027)	c	h	19.5	2.9	41.7
4	PI94633/ <i>Ae. squarrosa</i> (1027)	c	h	16.4	3.1	45.9
5	P254169/ <i>Ae. squarrosa</i> (219)	c	h	23.2	2.9	41.6
6	CI3686/ <i>Ae. squarrosa</i> (309)	c	h	29.4	2.9	40.8
7	CI9309/ <i>Ae. squarrosa</i> (309)	c	h	19.5	2.8	37.2
8	PI225332/ <i>Ae. squarrosa</i> (309)	c	h	28.2	2.9	40.9
9	PI254152/ <i>Ae. squarrosa</i> (309)	c	h	25.0	2.9	41.8
10	PI352335/ <i>Ae. squarrosa</i> (309)	c	h	23.7	2.8	40.6
11	PI94666/ <i>Ae. squarrosa</i> (309)	c	h	15.6	3.0	42.6
12	PI225332/ <i>Ae. squarrosa</i> (372)	a	j	37.4	2.9	37.0
13	PI94625/ <i>Ae. squarrosa</i> (372)	c	h	12.8	2.7	37.1
14	CI7779/ <i>Ae. squarrosa</i> (385)	a	j	32.4	2.9	42.2
15	PI254152/ <i>Ae. squarrosa</i> (385)	c	h	11.6	2.8	39.2
16	PI306535/ <i>Ae. squarrosa</i> (385)	c	h	34.7	3.0	45.2
17	PI352335/ <i>Ae. squarrosa</i> (385)	c	h	10.5	3.1	49.4
18	PI94666/ <i>Ae. squarrosa</i> (385)	c	h	19.4	2.8	35.9
19	CI14822/ <i>Ae. squarrosa</i> (409)	c	h	24.7	2.9	42.3
20	CI3686/ <i>Ae. squarrosa</i> (409)	c	h	23.2	3.0	44.0
21	CI9309/ <i>Ae. squarrosa</i> (409)	c	h	21.9	2.9	40.8
22	PI94614/ <i>Ae. squarrosa</i> (409)	c	h	27.4	2.9	40.2
23	PI94624/ <i>Ae. squarrosa</i> (409)	c	h	17.5	3.0	44.3
24	TK98-506 H83-1631-1/ <i>Ae. squarrosa</i> (409)	c	h	25.1	3.0	43.2
25	CI14822/ <i>Ae. squarrosa</i> (454)	c	h	18.5	3.0	44.7
26	PI254152/ <i>Ae. squarrosa</i> (454)	c	h	22.6	2.9	44.1
27	PI347230/ <i>Ae. squarrosa</i> (454)	a	j	13.1	2.9	43.2
28	PI349046/ <i>Ae. squarrosa</i> (454)	c	h	24.1	2.8	37.3
29	PI94624/ <i>Ae. squarrosa</i> (454)	c	h	29.2	3.0	45.6
30	PI94633/ <i>Ae. squarrosa</i> (454)	a	j	22.2	2.8	39.0
31	PI94674/ <i>Ae. squarrosa</i> (454)	c	h	—	—	—
32	CI3686/ <i>Ae. squarrosa</i> (458)	a	j	19.9	2.9	40.7
33	PI254169/ <i>Ae. squarrosa</i> (458)	a	j	17.5	2.8	36.7
34	PI272533/ <i>Ae. squarrosa</i> (458)	c	h	20.6	3.2	52.1
35	PI94614/ <i>Ae. squarrosa</i> (458)	a	j	17.5	3.0	40.2
36	PI94633/ <i>Ae. squarrosa</i> (458)	c	h	26.8	3.0	43.7
37	CI14822/ <i>Ae. squarrosa</i> (498)	c	h	30.1	2.8	34.9
38	PI272533/ <i>Ae. squarrosa</i> (498)	c	h	—	—	—
39	PI347230/ <i>Ae. squarrosa</i> (498)	c	h	16.2	3.0	44.2
40	PI94614/ <i>Ae. squarrosa</i> (498)	a	j	20.6	2.9	39.6
41	PI94625/ <i>Ae. squarrosa</i> (502)	c	h	37.5	2.9	40.0
42	PI254157/ <i>Ae. squarrosa</i> (518)	c	h	15.1	2.8	40.7
43	PI272533/ <i>Ae. squarrosa</i> (518)	c	h	24.6	2.9	43.2
44	PI306535/ <i>Ae. squarrosa</i> (518)	c	h	21.2	2.8	40.8
45	PI349046/ <i>Ae. squarrosa</i> (518)	c	h	32.8	2.9	40.1
46	PI94624/ <i>Ae. squarrosa</i> (518)	c	h	26.4	2.9	41.8
47	PI225332/ <i>Ae. squarrosa</i> (700)	c	h	21.7	3.0	44.0
48	PI254157/ <i>Ae. squarrosa</i> (700)	c	h	22.0	2.9	41.5
49	PI254157/ <i>Ae. squarrosa</i> (879)	c	h	22.8	2.9	43.3
50	PI306535/ <i>Ae. squarrosa</i> (879)	c	h	23.6	2.8	41.1
51	PI347230/ <i>Ae. squarrosa</i> (879)	c	h	—	—	—
52	PI349046/ <i>Ae. squarrosa</i> (879)	c	h	24.4	2.9	43.1
53	TK98-56 H83-1631-1/ <i>Ae. squarrosa</i> (879)	c	h	19.8	2.9	40.8
54	PI225332/ <i>Ae. squarrosa</i> (895)	c	h	22.4	2.9	42.2
55	PI94623/ <i>Ae. squarrosa</i> (895)	c	h	22.1	3.0	45.2
56	PI94623/ <i>Ae. squarrosa</i> (897)	c	h	42.6	3.0	41.0
57	PI94661/ <i>Ae. squarrosa</i> (897)	c	h	15.5	3.0	42.5

SKCS: Single Kernel Characterization System.

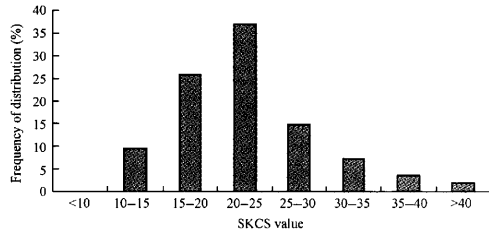


图1 54份 CIMMYT 人工合成小麦 SKCS 籽粒硬度的分布  
Fig.1 Distribution of SKCS hardness index in 54 CIMMYT synthetic wheats  
SKCS: Single Kernel Characterization System.

方差分析表明(表2),不同材料的 SKCS 硬度值差异极显著,母本和父本对 SKCS 硬度值都有显著影响,而且父本和母本间的互作也达到显著水平。为了进一步分析这一变异的原因,本研究按母本野生二粒小麦进行分组,母本 CI7779 后代的籽粒质地最硬,其籽粒 SKCS 值为 32.6,母本 PI347230 的 3 个

后代系的籽粒质地最软,其平均 SKCS 硬度值为 14.0。从表3可以看出,母本相同父本不同的材料间 SKCS 硬度值差异很大,其中 PI94625 的 2 个后代材料间 SKCS 值变化幅度最大(13~38),PI347230 的 3 个后代的变化幅度最小(13~16),说明不同父本对后代材料的籽粒质地具有显著影响。

表2 54份人工合成小麦的父母本对 SKCS 籽粒硬度影响的方差分析

Table 2 Analysis of variance (ANOVA) for the influence of the parents on the kernel texture in 54 synthetic hexaploid wheats

变异来源 Source of variance	自由度 df	平方和 SS	均方 MS	F 值 F value
总变异 Total	53	7329.25	138.29	2211.51**
野生二粒小麦 <i>T. dicoccoides</i>	20	3063.57	153.18	2449.65**
粗山羊草 <i>Ae. tauschii</i>	14	2915.26	208.23	3330.09**
野生二粒小麦 × 粗山羊草 <i>T. dicoccoides</i> × <i>Ae. tauschii</i>	19	1830.09	96.32	1540.37**
误差 Error	108	6.75	0.062	

\*\*表示差异达 0.01 显著水平。\*\* significant at the 0.01 probability level.

表3 不同野生二粒小麦(母本)后代品系的籽粒硬度及千粒重

Table 3 Kernel hardness, thousand-kernel weight (TKW) of the accessions derived from different female parents of *T. dicoccoides*

野生二粒小麦 <i>T. dicoccoides</i>	样品数 No. of samples	SKCS 值 SKCS value			千粒重 1000-kernel weight (g)
		平均值 Mean	SD	变幅 Range	
CI7779	1	32.4	18.2	—	42.2
PI94623	3	28.1	13.6	20-43	42.6
PI225332	4	27.4	12.2	22-37	40.9
PI349046	3	27.1	13.2	24-33	40.2
PI306535	3	26.5	13.6	21-35	42.4
PI94625	2	25.1	14.3	13-38	38.6
CI14822	3	24.4	15.1	19-31	40.6
PI94624	3	24.4	11.9	18-30	43.9
CI3686	3	24.2	12.8	20-30	41.8
PI272533	2	22.6	11.6	21-25	47.7
TK_98-56 H83-1631-1	2	22.4	14.9	20-26	42.0
PI94633	3	21.9	12.6	16-27	42.9
PI94614	3	21.8	12.1	18-28	40.0
PI254169	2	20.4	14.3	18-24	39.2
PI254157	3	20.0	13.6	15-23	41.8
PI254152	3	19.7	11.6	12-26	41.7
CI9309	3	18.8	13.8	15-22	40.0
PI94666	2	17.5	13.5	16-20	39.3
PI352335	2	17.1	13.8	11-24	45.0
PI94661	1	15.5	11.6	—	42.5
PI347230	3	14.0	12.2	13-16	43.7

SKCS: single kernel characterization system.

## 2.2 人工合成小麦中 *Pina* 和 *Pinb* 等位基因的分布

利用 *Pina* 和 *Pinb* 特异性引物对 57 份材料进行 PCR 扩增, 将得到特异性的 *Pina* 和 *Pinb* 产物(图 2) 测序后与已经发表的 *Pina* 和 *Pinb* 的等位变异相比较。共有 *Pina-D1a*、*Pina-D1c*、*Pinb-D1h* 和 *Pinb-D1j* 4 种等位变异类型, 其中基因型为 *Pina-D1a/Pinb-D1j* 的材料 8 个, 占 14%; 基因型为 *Pina-D1c/Pinb-D1h* 的 49 个, 占 86%。在一小部分材料中, 同一个粗山羊草的后代系出现了 *Pina* 和 *Pinb* 的等位变异类型分离现象, 如 *Ae. squarrosa* 372 的 2 个后代系中出现 *Pina-D1a/Pinb-D1j* 和 *Pina-D1c/Pinb-D1h* 2 种基因型; *Ae. squarrosa* 385 的 5 个后代系中有 4 个是

*Pina-D1c/Pinb-D1h* 类型, 一个是 *Pina-D1a/Pinb-D1j* 类型, *Ae. squarrosa* 458 的 4 个后代系中两种基因型各占一半, 而 *Ae. squarrosa* 498 的 4 个后代中, 1 个为 *Pina-D1a/Pinb-D1j* 类型, 3 个为 *Pina-D1c/Pinb-D1h* 类型。为了验证测序结果的正确性, 本试验再次对这些材料进行 DNA 的单粒提取, 每份材料用 3 粒种子, 并且将独立的 PCR 产物进行 3 次重复测序, 结果与先前的测序结果一致。如此高的杂合现象, 不可能是收获或脱粒造成的混杂, 而且本研究的 PCR 扩增及前人的研究都充分证明野生二粒小麦中不存在 *Pina* 和 *Pinb* 基因<sup>[6]</sup>, 因此这种等位基因的多态性不可能来自于母本野生二粒小麦, 只能说明粗山羊草中控制籽粒硬度的等位基因处于杂合状态。

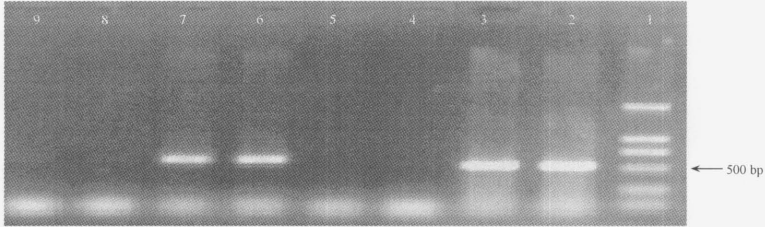


图 2 人工合成小麦中 *Pina* 和 *Pinb* 基因的 PCR 扩增

Fig.2 PCR amplification of *Pina* and *Pinb* from synthetic wheat

- 1: DL2000 marker; 2: 人工合成小麦, *Pina*; 3: 中国春缺体-四体 N5ATSD, *Pina*; 4: 中国春缺体-四体 N5DTS A, *Pina*; 5: 中国春缺体-四体 N5DTS B, *Pina*; 6: 人工合成小麦, *Pinb*; 7: 中国春缺体-四体 N5ATSD, *Pinb*; 8: 中国春缺体-四体 N5DTS A, *Pinb*; 9: 中国春缺体-四体 N5DTS B, *Pinb*。  
1: DL2000 marker; 2: synthetic wheat, *Pina*; 3: N5ATSD, *Pina*; 4: N5DTS A, *Pina*; 5: N5DTS B, *Pina*; 6: synthetic wheat, *Pinb*; 7: N5ATSD, *Pinb*; 8: N5DTS A, *Pinb*; 9: N5DTS B, *Pinb*。

## 2.3 *Pina* 和 *Pinb* 等位基因类型与籽粒硬度的关系

54 份人工合成小麦的籽粒硬度分布存在显著差异(表 4), 但控制这些籽粒硬度的基因型只有 *Pina-D1a/Pinb-D1j* 和 *Pina-D1c/Pinb-D1h* 两种, 基因型为 *Pina-D1a/Pinb-D1j* 的 8 个系的平均 SKCS 硬度值 23.1, 变幅为 13.1 ~ 37.4, 基因型为 *Pina-D1c/*

*Pinb-D1h* 的 46 个系的平均 SKCS 硬度值 22.6, 变幅为 10.5 ~ 42.6。t-检验表明, 两种基因型间籽粒硬度差异不显著 ( $P < 0.05$ ), 而在同一基因型内的不同材料间籽粒硬度值差异显著 ( $P < 0.001$ ), 说明除了 *Pina* 和 *Pinb* 基因外, 还有其他微效基因影响籽粒硬度的形成。

表 4 新型人工合成小麦同一 Puroindoline 基因型内籽粒硬度的方差分析  
Table 4 Analysis of variance for grain hardness within Puroindoline genotypes

变异来源 Source of variance	自由度 df	平方和 SS	均方 MS	F 值 F value
<i>Pina-D1c/Pinb-D1h</i>	45	5907.33	131.27	2063.30**
随机误差 Error	95	5.85	0.064	
<i>Pina-D1a/Pinb-D1j</i>	7	1421.66	203.09	3610.56**
随机误差 Error	16	0.90	0.056	

\*\* 表示差异达 0.01 显著水平。\*\* significant at the 0.01 probability level.

### 3 讨论

籽粒硬度在54份材料间差异显著,野生二粒小麦和粗山羊草及二者之间的互作对籽粒硬度有显著影响。同一野生二粒小麦与不同粗山羊草的后代籽粒硬度最大变幅达13~38,说明粗山羊草的D基因组对籽粒硬度具有重要影响。而在同一粗山羊草与不同野生二粒小麦的后代中,籽粒硬度差异也很显著,说明除了Pina和Pinb基因外,还有其他因素参与籽粒硬度的形成,这些变异可能与野生二粒小麦A和B基因组及粗山羊草D基因组上的微效基因有关。在普通六倍体小麦的研究中发现,有相当一部分的硬度差异并不是由Pina和Pinb等位基因的不同所造成的,Lillemo等<sup>[9]</sup>检测了9个软硬麦杂交组合后发现,Pina和Pinb基因可解释整个籽粒硬度遗传变异的75%~93%。Sourdille等<sup>[10]</sup>对软硬麦杂交产生的114个重组近交系进行QTL分析,主效基因(Ha)位于5DS上,可解释总变异的63.2%,4个微效基因分别位于2AL、2DL、5BL和6DS,每个微效基因方差占总方差的4.0%~5.7%。Perretant等<sup>[11]</sup>用187个小麦双单倍体系进行QTL分析,证实已标记的主效QTL在5DS上,两个微效QTL分别在1A和6D染色体上,分别占总变异的3.0%和5.5%。3AS也存在1个微效基因,可解释总变异的8.4%<sup>[12]</sup>。由此看来,微效基因分布较广,在1A、2AL、3AS、5BL、2DL、6D和6DS上都有发现,这些微效QTL的存在为籽粒硬度的品种改良提供了更为广阔的发展空间。

57份新型人工合成小麦中只发现了Pinb-Dlj和Pinb-Dlh两种Pinb基因的等位变异类型,方差分析表明籽粒硬度在这两种等位变异类型间差异不显著,可能与二者蛋白质结构的相似性有关。Pinb-Dlj与Pinb-Dlh的DNA序列相似性96.4%,有16个碱基的差异,其编码蛋白有7个位点的氨基酸组成不同,其中第65个氨基酸位于富色氨酸区域<sup>[15]</sup>,这一区域氨基酸的疏水性对于蛋白质的功能有重要影响。但通过对PINBh和PINBj蛋白的疏水性分析发现,这些氨基酸组成的不同并没有导致富色氨酸区域疏水性有很大的变化,这也是Pinb-Dlj与Pinb-Dlh两种等位基因的籽粒硬度差异不显著的原因。Massa等<sup>[15]</sup>曾在粗山羊草中发现了Pinb-Dlj类型,但由于获得粗山羊草的籽粒硬度非常困难,无法分析这一基因型对籽粒硬度的影响。Gedye等<sup>[16]</sup>在硬

粒小麦与粗山羊草的后代群体中发现两份材料拥有Pinb-Dlj,但因为材料份数太少,没有对这一等位变异与硬度关系进行分析。本研究中有8份Pinb-Dlj等位变异材料,其籽粒SKCS硬度值最大为37.4,最小为13.1。由于本实验没有发现野生型的Pinb-Dla,因此无法比较Pinb-Dlj与Pinb-Dla等位基因对籽粒硬度的影响。但Gedye等<sup>[16]</sup>研究表明,Pina-Dlc/Pinb-Dlh与野生型Pina-Dla/Pinb-Dla相比,其籽粒质地明显变软;而在本研究中Pina-Dla/Pinb-Dlj材料的平均SKCS值(23.1)仅略高于Pina-Dlc/Pinb-Dlh的材料(22.6)。

本文的研究材料是六倍体人工合成小麦,Pina和Pinb基因的表达背景与普通小麦非常相似,但试验结果表明这些含有非野生型Pina和Pinb基因材料,其籽粒仍全部表现为软质。而在普通小麦中除了野生型的Pina-Dla和Pinb-Dla外,所有Pina和Pinb的等位变异都导致籽粒质地由软变硬<sup>[6,9]</sup>,产生这一现象的原因尚在探索之中。最新研究<sup>[13]</sup>发现,D基因组上的Ha位点在普通小麦中比其祖先粗山羊草缺少29 kb,而且二者之间的DNA序列发生了一定程度的重排,目前尚不能确定粗山羊草及人工合成六倍体小麦的软质表型是否与这段DNA序列有关。

### 4 结论

新型人工合成小麦的籽粒硬度分布范围较大,母本野生二粒小麦、父本粗山羊草及二者之间的互作对其籽粒硬度具有显著的影响。籽粒硬度在Pina-Dla/Pinb-Dlj和Pina-Dlc/Pinb-Dlh 2种基因型间差异不显著,而在同一基因型内不同的材料间差异达显著水平,说明除了Pina和Pinb基因外,还有其他因素对这些新型人工合成小麦籽粒硬度的形成具有显著影响。

### References

- Nevo E. Genetic resources of wild emmer (*Triticum dicoccoides*) for wheat improvement: new and views. In: Li Z S, Xin Z Y eds. Proc 8th Int Wheat Symp. Beijing: China Agricultural Scien-Tech Press, 1995. pp 79-87
- Shi J-X(时津霞), Qiao Y-L(乔永利), Yang Q-W(杨庆文), He B-R(何蓓如), Ji W-Q(吉万全), Weng Y-J(翁跃进). Homology analysis of A and B genomes between wild emmer (*T. dicoccoides*) and common wheat (*T. aestivum*). *Acta Agron Sin* (作物学报), 2005, 31(6):723-729(in Chinese with English abstract)
- Mujeeb-Kazi A, Rosas V, Roldan S. Conservation of the genetic

- variation of *Triticum tauschii* (Coss.) Schmalh. (*Aegilops squarrosa* L.) in synthetic hexaploid wheats (*T. turgidum* L. s. lat. × *T. tauschii*;  $2n = 6x = 42$ , AABBDD) and its potential utilization for wheat improvement. *Genet Res Crop Evol*, 1996, 43:129-134
- [4] Cox T S, Sears R G, Bequette R K, Martin T J. Germplasm enhancement in winter wheat × *Triticum tauschii* backcross populations. *Crop Sci*, 1995, 35:913-919
- [5] Pflüger L A, D' Ovidio R, Margiotta B, Peña R, Mujeeb-Kazi A, Lafandra D. Characterisation of high- and low-molecular weight glutenin subunits associated to the D genome of *Aegilops tauschii* in a collection of synthetic hexaploid wheats. *Theor Appl Genet*, 2001, 103:1293-1301
- [6] Morris C F. Puroindolines: the molecular genetic basis of wheat grain hardness. *Plant Mol Biol*, 2002, 48:633-647
- [7] Chen F, He Z H, Xia X C, Lillemo M, Morris C F. A new puroindoline b mutation present in Chinese winter wheat cultivar Jingdong 11. *J Cereal Sci*, 2005, 42: 267-269
- [8] Chen F, He Z H, Xia X C, Xia L Q, Zhang X Y, Lillemo M, Morris C F. Molecular and biochemical characterization of puroindoline a and b alleles in Chinese landraces and historical cultivars. *Theor Appl Genet*, 2006, 112: 400-409
- [9] Lillemo M, Ringlund K. Impact of puroindoline-b alleles on the genetic variation for hardness in soft × hard wheat crosses. *Planu Breed*, 2002, 121:210-217
- [10] Sourdille P, Perretant M R, Charne G, Leroy P, Gautier M F, Joudrier P, Nelson J C, Sorrels M E, Bernard M. Linkage between RFLP markers and genes affecting kernel hardness in wheat. *Theor Appl Genet*, 1996, 93: 580-586
- [11] Perretant M R, Cadalen T, Charmet C, Sourdille P. QTL analysis of bread-making quality in wheat using a doubled haploid population. *Theor Appl Genet*, 2000, 100: 1168-1175
- [12] Campbell K G, Bergman C J, Gualberto D G, Anderson J A, Giroux M J, Hareland G, Fulcher R G, Sorrels M E, Finney P L. Quantitative trait loci associated with kernel traits in a soft × hard wheat cross. *Crop Sci*, 1999, 39: 1184-1195
- [13] Chantret N, Salse J, Sahot F, Rahman S, Bellec A, Laubin B, Dubois I, Dossat C, Sourdille P, Joudrier P, Gautier M F, Cattolico L, Beckert M, Aubourg S, Weissenbach J, Caboche M, Bernard M, Leroy P, Chalhoub B. Molecular basis of evolutionary events that shaped the hardness locus in diploid and polyploid wheat species (*Triticum* and *Aegilops*). *Plant Cell*, 2005, 17: 1033-1046
- [14] Lillemo M, Simeone M C, Morris C F. Analysis of puroindoline a and b sequences from *Triticum aestivum* cv. 'Penawawa' and related diploid taxa. *Euphytica*, 2002, 126: 321-331
- [15] Massa A N, Morris C F, Gill B S. Sequence diversity of puroindoline-a (*Pina-D1*), puroindoline-b (*Pinb-D1*) and the grain softness protein (*Csp-1*) genes in *Aegilops tauschii* Coss. *Crop Sci*, 2004, 44: 1808-1816
- [16] Gedye K R, Morris C F, Bettge A D. Determination and evaluation of the sequence and textural effects of the puroindoline a and puroindoline b genes in a population of synthetic hexaploid wheat. *Theor Appl Genet*, 2004, 109: 1597-1603
- [17] Chen F(陈锋), Xia X-C(夏先春), Wang D-S(王德森), Lillemo M, He Z-H(何中虎). Detection of allelic variation for puroindoline alleles in CIMMYT germplasm developed from synthetic wheat crossing with common wheats. *Sci Agric Sin*(中国农业科学), 2006, 39(3): 440-447(in Chinese with English abstract)
- [18] Lagudah E S, Appels R, McNeil D. The Nor-D3 locus of *Triticum tauschii*: natural variation and genetic linkage to markers on chromosome 5. *Genome*, 1991, 34: 387-395