

小麦抗穗发芽分子生物学研究进展

杨燕^{1,2}, 张春利^{1,3}, 何中虎^{1,4}, 陈新民¹, 于卓³, 夏兰芹^{1*}

(¹中国农业科学院作物科学研究所/国家小麦改良中心, 北京 100081; ²内蒙古农业大学农学院, 呼和浩特, 010010; ³黑龙江省农业科学院作物育种研究所, 哈尔滨, 150086; ⁴国际玉米小麦改良中心中国办事处, 北京 100081)

摘要: 穗发芽严重影响品质和产量。种子自身休眠特性、 α -淀粉酶活性、 α -淀粉酶抑制剂、迟熟 α -淀粉酶活性、种皮颜色、颖壳抑制物以及穗部形态等, 均是影响小麦穗发芽的重要因素, 其中对籽粒休眠特性和 α -淀粉酶活性的研究较为深入。位于第三染色体组上 *R* 基因、休眠基因以及 4AL 上的 *Phs* 基因均与小麦穗发芽抗性密切相关。已开发出一些与穗发芽抗性相关的分子标记, 其中位于第三染色体群的三重 *R* 基因和位于 3B 染色体的 STS 标记 *Vp1B3*, 以及位于 3A 染色体的主效 QTL 位点 QPhs.ccsu-3A.1 均可直接用于穗发芽抗性的筛选。本文对以上内容进行了详细论述, 并就开展小麦穗发芽抗性研究工作的思路进行了讨论。
关键词: 小麦; 穗发芽; 分子标记

Progress on molecular biology of resistance to pre-harvest sprouting in wheat

YANG Yan^{1,2}, Zhang Chunli^{1,3}, HE Zhong-hu^{1,4}, YU Zhuo², CHEN Xin-min¹, XIA Lan-qin^{1*}

(¹Institute of Crop Sciences/National Wheat Improvement Center, Chinese Academy of Agricultural Science, No. 12 Zhongguancun South Street, Beijing 100081, China; ²Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot, 010010; ³Heilongjiang Academy of Agricultural Science; ⁴CIMMYT China Office, Beijing 100081, China;)

Summary: Pre-harvest sprouting (PHS) lead to great yield losses and degraded grain quality. Many factors, such as dormancy, α -amylase activity, α -amylase inhibitor, late maturity α -amylase (LMA), grain color, coat-imposed inhibitor and spike character have great effects on PHS, among which the roles of dormancy and α -amylase activity had been thoroughly investigated. PHS tolerance is controlled by several genes like *R* and *Vp-1* genes on group 3 chromosomes, and *Phs* gene on 4AL. Molecular markers for PHS tolerance, such as *Vp1B3* located on

收稿日期:

基金项目: 国家重点基础研究发展规划 (2001CB111300) 和 948 重大国际农业科技合作项目 (2006G-2)

作者简介: 杨燕 (1976-), 女, 内蒙古鄂尔多斯市人, 在读博士, 研究方向为小麦遗传育种。通讯作者: 夏兰芹, E-mail: xialanqin@yahoo.com。

3BL and major QTLs QPhs.ccsu-3A.1 on 3A, have been developed, which can be directly used for selection of PHS tolerance. Progress on PHS were reviewed and the possible ways of improving PHS tolerance were discussed.

Key words: Bread wheat; Pre-harvest sprouting; Molecular markers

穗发芽是指小麦在收获前遇到阴雨或在潮湿环境下的穗上发芽^[1]。它是一种世界性灾害,严重影响小麦品质和产量。小麦穗发芽引起籽粒内部发生一系列的生化反应,特别是一些碳水化合物降解酶、蛋白水解酶等酶活性升高,降解胚和胚乳中的贮藏物质,极大地降低小麦的产量和加工品质^[2]。

日本、英国、德国、瑞典、美国、加拿大、巴西、澳大利亚等国均受穗发芽危害,加拿大和澳大利亚尤为严重^[3,4,5]。据Derera(1989)报道,1973-1984年,澳大利亚平均每年有7%的小麦受穗发芽危害,最严重的1984年,穗发芽危害程度高达20%^[6]。我国长江流域、西南地区 and 东北春麦区经常遭受穗发芽危害,北部冬麦区大部分白粒小麦品种也对穗发芽高度敏感,收获期遇雨极易引起穗发芽,据报道,1992年仅陕西关中地区小麦穗发芽就造成减产达 4×10^9 吨以上,直接经济损失2.6亿元。京津冀地区1995和2001年穗发芽严重,造成巨大经济损失,导致部分地区改种红粒品种。因此,如何控制小麦成熟期穗发芽,已成为小麦品种改良的重大课题,是目前国际小麦育种和生产中急待解决的难题,也是我国小麦育种的重要目标。本文对小麦穗发芽的鉴定方法、抗性机制、遗传和分子标记等内容进行了综述。

1. 研究方法

小麦穗发芽的鉴定方法概括起来有3种,即种子发芽试验、穗发芽试验和酶活性测定。除发芽率以外,鉴定指标还包括形态指标,如穗型、芒型等性状,生化指标如 α -淀粉酶活性、对外源脱落酸反应、面粉降落值等。种子发芽试验是在穗发芽抗性的敏感时期即蜡熟期取样,用手工剥粒,测定籽粒的发芽率^[7]。但这只能反映小麦籽粒的休眠情况,不能反映小麦穗发芽总体抗性。小麦穗发芽实验一般在开花后25、30或35天前后进行,7天后检查穗上发芽率。常用的方法包括沙子、发芽纸、塑料袋保湿、纱布保湿、模拟降雨,这些方法都能较好地鉴定出不同品种的穗发芽抗性差异。其中,塑料袋保湿法结果与田间较为一致,且简便易行,适合于对育种材料的大规模筛选^[7]。

测定 α -淀粉酶活性方法,主要包括浊度测定法、二硝基水杨酸法、底物染色法(凝胶扩

散法)、酶联免疫吸附测定法^[8]、降落值法(FN)和黏度参数法(RVA)。浊度测定法是利用比浊法原理进行 α -淀粉酶测定,其优点是操作简便快速,缺点是测定结果易受 β -淀粉酶的干扰^[9]。二硝基水杨酸法则是利用3,5-二硝基水杨酸与还原糖如葡萄糖、麦芽糖等反应后其产物的浓度和吸光值呈线性关系的特点来测定 α -淀粉酶的活性^[10]。底物染色法,即利用 α -淀粉酶催化底物降解,从而释放出带有蓝色反应产物的特性,然后可直接通过目视或比色计检测颜色的深浅^[11]。酶联免疫吸附测定法是免疫技术的一种,对收获前发生穗发芽的籽粒和含有迟熟 α -淀粉酶(LMA)基因的籽粒中所合成的高等电点的 α -淀粉酶同工酶的检测具有专一性,且是目前大批量鉴定LMA最为理想的方法。另外,穗发芽抗性不同的品种其籽粒对外源ABA的敏感性亦不同,因而也可用籽粒对ABA的反应来鉴定穗发芽的抗性。降落值法(FN)是目前国际上测定小麦 α -淀粉酶的常用方法,以内源淀粉作为底物,反映淀粉受到淀粉酶降解后其黏度下降的程度,是多种降解酶的综合反映, FN法能够全面反映小麦穗发芽后的损害程度。RVA就是快速粘度分析仪(Rapid Visco Analyser)的缩写。由于受穗发芽损害的小麦籽粒中 α -淀粉酶活性的急剧增加,导致RVA峰值黏度的降低,所以黏度参数变化可以反映穗发芽的损害程度。用RVA进行测试所需的样品用量小,通常仅为3-4克,且速度较快。

总的来说,不同的穗发芽鉴定方法各有优缺点。尽管样品的处理方法各异,但其实质是尽量模仿小麦成熟时的田间气候条件或是针对其某一抗性机制,获得可靠的穗发芽抗性信息,因而适合于遗传研究。而在生产中需要的是具有综合抗性的品种,所以目前多采用整穗发芽法、FN测定法或RVA测定法来衡量小麦穗发芽的综合抗性,并以此对育种材料进行大规模鉴定和筛选。

2. 小麦穗发芽抗性的生化机制

不同小麦品种具有不同的穗发芽抗性机制^[16]。小麦穗发芽受多基因控制,穗形态特征及生理生化特性,如种子休眠特性、 α -淀粉酶活性、 α -淀粉酶抑制剂、迟熟 α -淀粉酶活性、穗部结构及种皮颜色、颖壳抑制物等,均对穗发芽有明显影响^[12, 13, 14, 15]。

2.1 籽粒休眠特性

品种的休眠期与穗发芽率呈显著的负相关^[3]。一般情况下红粒小麦比白粒小麦具有更强的穗发芽抗性。控制种皮颜色的*R*基因是一个转录调节因子,它通过调节控制类黄酮合成的几个基因的表达而影响籽粒的休眠性,从而影响穗发芽抗性^[17]。

种子内源激素赤霉素（GA）和脱落酸（ABA）对种子休眠起着重要作用。GA能够促进胚乳中储藏物代谢，可以解除种子休眠，从而诱发种子萌发。研究拟南芥GA突变体发现，可以通过增加胚对GA的敏感性来降低GA缺陷突变体的休眠，表明GA可能直接参与了打破自发休眠的过程^[18]。ABA能阻止小麦籽粒胚萌发，并保持胚的正常发育。休眠和无休眠种子胚中ABA含量差异很小，表明它对休眠的影响是通过胚对外源ABA的敏感性反映出来的^[19]。用ABA处理烟草种子后，玉米黄素环氧酶过量表达，休眠加强。通过反义RNA技术敲除这个基因后，烟草后代休眠性变弱^[18]。一般情况下，ABA在未成熟胚中大量存在，在小麦籽粒增大和储藏物积累过程中，ABA含量最高^[20]。外源ABA能明显抑制与萌发后储藏物降解有关酶的活性，如 α -淀粉酶、麦芽糖酶、异柠檬酸裂解酶、核糖核酸酶^[6]。籽粒内源ABA的含量和萌发能力呈负相关，成熟时的ABA含量与休眠性相一致。休眠在某种程度上可解释为GA含量不足或过量，而ABA的作用与GA是相反的。GA和ABA在种子萌发过程中存在互作，ABA可以直接干预GA的合成而抑制萌发，如ABA抑制SbGA20ox 基因的表达^[22]。GA可以促进水解酶的分泌，而ABA则起抑制作用。 α -淀粉酶合成能力不同的基因型对GA的依赖性也不同，GA依赖性的丧失导致籽粒中GA含量的增加或者籽粒在未成熟时萌发，而籽粒中ABA的含量较低时也能导致籽粒过早萌发；施用ABA可以抑制GA的作用，并且能触发 α -淀粉酶抑制蛋白和其它一些淀粉酶抑制蛋白的合成。ABA可以影响禾谷类籽粒糊粉层中酶的转录，在阻碍 α -淀粉酶积累的同时抑制了GA控制的相关转录，萌发后的大麦种子在水分胁迫下，胚乳中的ABA含量也会升高，并且诱导了 α -淀粉酶抑制因子产生^[23]。利用ABA处理休眠和无休眠小麦品种的胚，通过双向电泳-质谱技术比较其蛋白质表达，发现休眠的小麦胚中共有18个ABA反应型蛋白点的表达存在显著差异^[21]，从蛋白角度证明ABA促进种子休眠。

2.2 α -淀粉酶活性

在小麦籽粒形成过程中，随着营养物质的积累， α -淀粉酶也随之合成^[29]。籽粒中的 α -淀粉酶同工酶（ α -AMY）的种类及在籽粒中分布的位置不同。 α -AMY 2对储藏物质分解能力较弱，分布于籽粒形成初期时外果皮及种皮内；而在籽粒形成后期，分布于胚乳中活性较高的 α -AMY 1在适宜的外界条件下，能活跃分解胚乳中的储藏物质，供给籽粒发芽。 α -AMY 1随籽粒成熟度的增加而增多，随着水分的散失、籽粒干燥，ABA水平降低， α -淀粉酶合成的障碍因子得以解除，使 α -AMY 1积累。 α -淀粉酶活性值与种子萌发率显著正相关($r=0.973$)，因而认为抗穗发芽的主要机理是低 α -淀粉酶活性。 α -淀粉酶受两个主效互补基因控制，低 α -淀粉酶为显性，高 α -淀粉酶为隐性^[12]； α -淀粉酶活性低的品种抗穗发芽，反之易穗发

芽^[12]。由此可见穗发芽的进程和结果与内源 α -淀粉酶活性的提高密切相关，抑制或降低内源 α -淀粉酶活性是解决小麦穗发芽问题的关键。收获前降雨时，如种子内具有抑制或推迟 α -淀粉酶合成的因素显然有利于防御穗发芽，所以寻找这一基因并将其导入小麦，将会降低穗发芽的发生。麦类作物胚乳中存在一种蛋白，可抑制 α -淀粉酶活性，称为 α -淀粉酶抑制蛋白(ASI)。在大麦、小麦、黑麦等作物中都存在，它通过抑制各种 α -淀粉酶的合成或活性来阻止籽粒发芽，麦类ASI就是通过与 α -淀粉酶作用形成复合物的方式来使其失活，从而控制穗发芽^[29]。

迟熟 α -淀粉酶(LMA)是指籽粒发育后期在没有发生穗发芽的条件下所合成的一系列 α -淀粉酶同工酶，主要是具有高等电点(pI)、受位于第六部分同源群染色体长臂上的*Amy-1*基因控制的一系列同工酶^[29]。LMA是在糊粉层中合成然后释放到临近的胚乳中去，其合成与受赤霉素(GA)调控的一些水解酶的增加有关，其表达存在基因和环境的互作效应^[29, 32]，有些品种的LMA可在所有环境下表达，而另外一些品种的LMA仅在籽粒发育中期经历一段冷处理后才得以表达^[33]。LMA不同于在籽粒发育早期在果皮中合成的那些 α -淀粉酶，而是在籽粒成熟后期合成的一类新酶。它的合成机制与发芽期间的 α -淀粉酶亦有所不同，但其种类与发芽期间合成的高pI的 α -淀粉酶同属受*Amy*-基因控制的 α -淀粉酶同工酶。LMA在成熟籽粒中的表达位置也不同于发芽籽粒中 α -淀粉酶，LMA活性平均分配在成熟籽粒两端，而萌芽籽粒中 α -淀粉酶活性主要分布在种子近胚端^[30]。目前可以用ELISA抗体试剂盒来快速测定高等电点同工酶的活性。另外半矮秆基因的存在降低了LMA的表达，而矮秆基因(*Rht3*)^[31]或双矮秆基因(*Rht1+Rht2*)的存在使得LMA的表达完全被抑制^[32]；具有1BL/1RS易位的基因型其LMA不表达^[32]。

2.3 穗及籽粒特征

颖壳表面茸毛及其张开角度等形态因素主要影响籽粒发芽前的物理吸水过程。颖壳中的水溶性抑制物，对小麦籽粒发芽有抑制作用^[33]。酚类物质有抑制穗发芽作用^[35]，粗山羊草颖壳中的发芽抑制物质有酚类化合物等物质，受位于2D染色体上的隐性单基因控制，它们有两种作用方式，一是直接作用于生长激素，二是间接与ABA互作^[34]。

2.4 环境因素的影响

温度是休眠变化的主要调节因素。种子发育期间，26℃以上的高温能降低籽粒休眠程度或者丧失休眠，而15℃以下的低温，会使品种的休眠程度加深^[36]。随着成熟度的提高，籽粒萌发所需的温度升高，至成熟收获时温度达20℃，多数小麦易造成穗发芽，而休眠水平高的品种则萌发缓慢或受抑制^[37]。

水分对小麦种子的休眠性及萌发有重要调控作用。种子含水量和吸水速率是决定穗发芽的重要因素之一。吸水膨胀一方面使小麦种皮软化,增加了种皮的通透性;同时,水分还可以把细胞质从凝胶状态转化为溶胶状态,使代谢加强,并且在一系列酶的作用下,使胚乳中的储藏物质逐渐转化为可溶性物质,提供小麦发芽所需的营养物质。小麦收获前籽粒成熟后期的降雨量及发生的时间对穗发芽影响很大,不同品种对降雨的敏感时间不同。这主要是由品种的穗发芽危险期和最高发芽率来决定的,因此只要该品种在田间能安全渡过穗发芽危险期,即使该品种的最高发芽率较高,也不会发生穗发芽。

3. 小麦穗发芽抗性的分子生物学研究

3.1 与穗发芽抗性相关基因的研究

通过比较基因组学方法来研究与小麦穗发芽抗性相关的基因,已经引起人们的高度重视。目前已经鉴定出控制种子休眠性和与穗发芽抗性相关的候选基因有*ABI3*、*FUS3*以及*LEC1*等,这些基因都具有双重功效,既抑制萌发又促进与胚成熟有关的过程^[38],而且这几个基因都编码一个含高度保守的B₃区段的氨基酸序列,该保守域最早在玉米*Vp-1*的转录因子中发现^[39]。*Vp-1*的突变体导致玉米的胚未脱离母体时就提前萌发,同时发现*Vp-1*转录因子抑制基因编码水解酶,如抑制与发芽相关的水解酶的活性,并且参与调控成熟胚向穗发芽的转变。缺体分析表明,*ABI3*、*FUS3*和*LEC1*三个基因都能产生与穗发芽相关的转录物,*ABI3*和*FUS3*促进发芽基因的活性,同时也延长其它与穗发芽抗性相关的候选基因在发育胚中的表达。在发育的玉米籽粒中,*ABI3*和*FUS3*基因编码的蛋白有几个保守区域,表现出高度同源性,并调节*Vp-1*基因的表达。*Vp-1*突变体的表现型与*ABI3*的突变体相似,包括种子对ABA的敏感性以及在种子成熟期间未成熟胚顶端分生组织的活性,这些都表明*ABI3*和*FUS3*蛋白在拟南芥和玉米中具有相同的功能^[24, 27, 38]。另外,*LEC1*,*FUS3*和其它的一些蛋白相互作用将会提高穗发芽抗性。随着对*ABI3*、*FUS3*和*LEC1*等这些穗发芽抗性候选基因的功能分析,将进一步揭示小麦穗发芽抗性的分子机制。

在影响小麦穗发芽的众多基因中,*Vp-1*是调节胚发育,促进胚成熟和休眠的主要转录调节因子。*Vp-1*的同源序列已经定位在小麦第三染色体的长臂上^[24]。在研究强休眠品种Minamino和非休眠品种Tozan中*Vp-1*基因的表达时,发现成熟胚中Minamino的*Vp-1*的表达量大于Tozan^[25]。以成熟期的小麦胚为材料,分析*Vp-1*的转录结构,发现每个同源基因都会产生一套不同大小的转录本,原因是转录后前体mRNA发生了不正确的剪接,导致无法编码

全长VP1 蛋白，从而表现对穗发芽敏感^[25]。通过比较普通六倍体小麦和四倍体小麦及其野生近缘物种中*Vp-1* 转录产物，发现它们都存在*Vp-1* 转录后的错误剪接，不能编码全长的VP1 蛋白，从而表现对穗发芽敏感，而且它们的转录本结构相似，说明普通小麦*Vp-1* 转录本的非正常剪切是由其近缘种遗传而来的，也就是说*Vp-1* 的非正常表达在普通小麦出现之前就已形成^[26]。燕麦*Vp-1* 只形成一种转录本，把燕麦*Vp-1* cDNA转入到小麦中，转基因小麦穗发芽程度明显降低^[27]。根据*Vp-1* 序列中跨越五个内含子的B₃区段设计引物，对两个CIMMYT 人工合成六倍体小麦进行RT-PCR反应，结果发现这两个合成小麦之间存在不同的剪切模式，从而进一步证明了*Vp-1* 在转录时不同的剪切方式是导致品种间穗发芽抗性差异的重要因素之一，同时，还分析了三个*Vp-1* 同源基因，每个基因都产生一套大小不同的mRNA，这些mRNA在转录时都有不正确的剪切发生^[28]。

3.2 分子标记

小麦的穗发芽抗性是由多基因控制的复杂性状，同时受环境因素的影响较大。穗发芽的分子标记开发是近年来国内外研究的重点领域之一，将主要结果汇总于表 1。Flintham等(1990)用Bezostaya替换Hobbit的全套染色体置换系，发现穗发芽抗性与4D和7B染色体有关^[40]。Anderson等(1993)找到8个与穗发芽关联的基因组区域，定位出了10个与穗发芽抗性有关的RFLP标记，其中Xcn1. bcd1434和Xcn1. cdo431在1AS染色体上，Xcn1. cdo64在2AS染色体上，Xcn1. Wg996a和Xcn1. bcd120a在2AL染色体上，Xcn1. bcd450在5DL染色体上，Xcn1. cdo545在4AL染色体上，Xcn1. bcd450在5DL染色体上，Xcn1. bcd426在6BL染色体上^[41]。Roy等(1999)利用STMS (Sequence-tagged Microsatellites) 标记在6BS染色体上定位了1个控制穗发芽的主效基因，与Cwmc104标记紧密连锁；利用STS (Sequence-tagged site) 标记在7DL染色体上还定位了1个控制穗发芽的主效基因，与Xmst101标记紧密连锁^[42]。Zanetti等(2000)以 α -淀粉酶和降落值为衡量穗发芽的指标，分别发现了12和13个与穗发芽有关的QTL位点。Mares等(2005)应用不同的群体将控制种子休眠性状的QTL定位于4A染色体上^[43]。

Flintham 等(2000)用一组红粒和白粒的近等基因系来研究休眠性与R基因的相关性，结果表明，R基因是一种控制红粒色的三重基因，位于第三部分同源群染色体的长臂端，也就是说A、B和D染色体组中都含有R基因位点，它控制种皮的颜色，属于母性遗传^[44]。不同来源的R基因具有对休眠性和籽粒颜色的双重效应，把这种差异解释为在胚中还存在一个与休眠性有密切关系的主效基因*Phs*，后来这个基因被定位于4AL上，是影响休眠和后熟水平的基因位点^[45]。Himi等(2005)证明了R基因能促进类黄酮基因的转录，在白粒品种中，由

于R基因没有表达而使类黄酮基因的表达降低^[17]。R基因位点和休眠基因紧密连锁，所以在小麦穗发芽抗性品种选育中，R基因所控制的种皮颜色可作为一个穗发芽抗性的标记来应用。但是这个标记不能应用于白粒小麦穗发芽抗性的标记辅助育种。

Ulrike等(2005)以随机选择的75份来自ITMI作图群体的RILs为试材，在6DL上发现一主效QTL^[46]。但由于小麦穗发芽抗性是一复杂性状，受基因型与环境互作影响较大，因此其可靠性有待进一步验证。KulWal等(2005)在3AL上发现一个与穗发芽抗性相关的主效QTL位点QPhs.ccsu-3A.1，在六个不同的环境中可以解释表型变异的78.03%^[47]。

此外，还有许多穗发芽抗性的QTL被定位到不同的染色体区段上，包括4BS上的Hd、5AL上的BI和6BL上的B2等位点所控制的芒性，2DL上的C位点控制的穗型^[6]，2B和

表1 目前已报道与小麦穗发芽抗性相关的分子标记

Table 1 Summary of the markers for resistance to sprouting damage in wheat

标记类型	标记	标记性状	染色体	文献
基因	三重 R 基因	种皮颜色	3A、3B、3D	Flintham (2000 年)
基因	Phs	休眠	4A	Flintham (2002 年)
STS	Vp1B3	休眠	3B	杨燕 (2006, 待发表)
QTL	Psr115-Ger	休眠	4A	Flintham(2002)
QTL	ATPased-psr903b	休眠	3A	Ulrike (2005 年)
QTL	Gwm774	休眠	6D	Ulrike (2005 年)
QTL	gwm397,gwm269,barc170	休眠	4A	Mares (2005 年)
QTL	Cdo545	休眠	4A	Atsushi (2002)
STS	MST101	穗发芽抗性	7D	Roy (1999 年)
STMS	WMC104	穗发芽抗性	6B	Roy (1999 年)
QTL	QPhs.ccsu-3A.1	穗发芽抗性	3A	KulWal(2005)
QTL	bcd402b-ksuf8a	穗发芽抗性	4A	Ulrike (2005 年)
QTL	Hd	芒性	4B	Derera (1989)
QTL	BI	芒性	5A	Derera (1989)
QTL	B ₂	芒性	6B	Derera (1989)
QTL	..	表皮蜡质	2B	King (2000)
QTL	..	表皮蜡质	2D	King (2000)
QTL	..	穗型	2D	Derera(1989)
QTL	..	淀粉酶活性	4B、4D	Flintham (1997)

“..”表示该类型标记未命名

2D位点上发现的控制上表皮蜡质的位点^[48]，以及在4B和4D短臂上发现的矮秆基因位点，均与降低淀粉酶活性相关^[49]。虽然控制小麦芒性、穗型、株高和籽粒表皮蜡质的标记与穗发芽抗性相关，但它们并不是影响穗发芽抗性的主要因素。

我们利用普通小麦 *Vp-1* 基因的保守序列设计了引物，与穗发芽敏感性材料相比，*Vp-1* 在抗性品种第三个内含子中存在一个193bp的插入或83bp的缺失，而且插入类型只存在于

少数的穗发芽抗性极高且非常稳定的几个地方品种中。根据 *Vp-1* 基因在穗发芽抗性与敏感性材料之间的差异设计了一个与穗发芽抗性相关的 STS 共显性标记-*Vp1B3*,该标记在抗性品种中扩增出 845bp 和 569bp 的片段,在感性品种中扩增出 652bp 的片段,这一标记更适合于白粒品种的穗发芽抗性筛选。

除 1D 染色体外,其它染色体都携带有穗发芽抗性相关的基因,其中以 3A、3B、3D 和 4A 染色体与其关系最为密切。用位于第三染色体群 *R* 基因作为标记结合位于 3B 染色体组的 STS 标记 *Vp1B3* 对育种材料进行筛选,以提高选择效率。另外对于一些解释表型变异高的标记如 QPhs.ccsu-3A.1 经过验证可以在穗发芽抗性筛选中直接利用。

4.问题与展望

小麦抗穗发芽研究已有较长历史,但总体进展缓慢。虽然国内外已育成一些穗发芽抗性强的品种,但抗穗发芽特别是白粒小麦抗穗发芽问题仍未很好解决。主要有以下 5 方面的原因:第一,小麦是异源六倍体作物,影响穗发芽的基因分别位于 A、B 和 D 三组染色体上,而且在第 2、3、4、5、6 和 7 染色体群均有分布,所以与水稻和玉米相比,影响小麦穗发芽的因素要复杂的多;第二,种子的休眠性是由种皮引起和胚自身的休眠以及由外界因素诱导而引起的休眠三者共同作用的结果,目前已经明确 *Vp-1* 是影响小麦胚休眠的一个主要基因;第三,环境条件对穗发芽的影响很大,影响遗传研究和田间选择;第四,白粒品种中穗发芽抗源较少,而且其抗性机制不明确,同时抗源的农艺性状差,给育种应用带来了困难;第五,在分子标记方面存在的问题包括鉴定方法不一致,标记的可用性有待验证,多数标记缺乏大田品种或群体的直接验证,标记开发与育种应用结合不够紧密。

在小麦穗发芽抗性的分子生物学方面,应重点研究淀粉酶抑制剂基因,因为淀粉酶抑制剂基因调控 α -淀粉酶的合成,进而影响穗发芽的发生。小麦、大麦和黑麦中的 α -淀粉酶抑制剂对小麦的 α -淀粉酶都有抑制作用,其中大麦的 α -淀粉酶抑制剂作用最强^[50, 51]。今后应在小麦的近缘属中筛选对小麦 α -淀粉酶抑制作用更强的 α -淀粉酶抑制剂基因,利用胚乳和胚中特异性启动子启动 α -淀粉酶抑制剂或蛋白酶抑制剂基因,通过转基因获得在籽粒胚乳和盾片中表达 α -淀粉酶抑制剂和蛋白酶抑制剂的转基因植株,从而降低淀粉和蛋白质的降解,提高小麦穗发芽抗性。也可通过 RNA 干扰技术阻止编码 α -淀粉酶和蛋白酶的 mRNA 的转录,从而提高小麦穗发芽抗性。值得一提的是,编码 α -淀粉酶的基因在谷类作物中高度保守,因此,一种 RNA 干扰载体可以干扰阻止不同物种中 α -淀粉酶的转录。相比之下,编码蛋白酶的基因可能是一个基因家族,操作起来则较为复杂^[52]。加强对穗发芽抗性关键基因 *Vp-1* 的分子生物学研究也是今后的一个工作重点。

参考文献:

- [1] Groos C, Gay G, Perretant M R, Gervais L, Bernard M, Dedryver F, Charmet G . Study of the relationship between pre-harvest sprouting and grain color by quantitative trait loci analysis in a white × red grain bread-wheat cross [J]. *Theor Appl Genet*, 2000, 104: 39-47
- [2] Humphreys D G, Noll J. Methods for characterization of pre-harvest sprouting resistance in a wheat breeding program [J]. *Euphytica*, 2002, 126: 61-65
- [3] Derera N F, Bhatt G M, McMaster G J. On the problem of pre-harvest sprouting of wheat [J]. *Euphytica*, 1977, 26: 299-308
- [4] Derera N F. The harmful harvest rain [J]. *J. Agric. Sci.*, 1982, 48: 67-78
- [5] Gordon I L, Selection against sprouting damage in wheat. III Dormancy, Germinative, Alpha-amylase, grain redness and flavanols [J]. *Aust. J. Agric. Res.*, 1979, 30: 387-402
- [6] Derera N F. Preharvest field sprouting in cereal [M]. CRC Press, Inc, 1989
- [7] Hagemann M C, Ciha A J. Evaluation of methods used in testing wheat susceptibility to pre-harvest sprouting [J]. *Crop Science*, 1984, 24: 249-254
- [8] 肖世和, 闫长生, 张海萍, 孙果忠. 小麦穗发芽研究[J]. 中国农业科学技术出版社, 2002, pp 92-99
- [9] Campbell J A. A new method for detection of sprout damaged wheat using nephelometric determination of alpha-amylase activity [J]. *Cereal Res. Commun.*, 1980, 8: 107-112
- [10] 张海峰, Zemetra R S, Liu C T. 冬小麦穗发芽抗性及其鉴定方法的研究[J]. 作物学报, 1989, 15(2): 116-122
- [11] Masojc P, Marths L R. Variations of the levels of α -amylase and endogenous α -amylase inhibitor in rye and triticale grain [J]. *Swedish J. Agric. Res.*, 1991, 21: 3-9
- [12] 张海峰, 卢荣禾. 小麦穗发芽抗性机理与遗传研究[J]. 作物学报, 1993, 19: 523-530
- [13] 沈正兴, 俞世蓉, 吴兆苏. 小麦品种穗发芽抗性研究[J]. 中国农业科学, 1991, 24: 44-50
- [14] Gale M D. The genetics of pre-harvest sprouting in cereals, particularly in wheat [A]. In: *Pre-harvest Field Sprouting in Cereals* [C]. Derera NF (eds). CRC Press Inc., Boca Raton, USA, 1989, 85-110
- [15] Gale M D, Flintham J E, Devos K M. Cereal comparative genetics and pre-harvest sprouting [J]. *Euphytica*, 2002, 126: 21-25
- [16] 何震天, 陈秀兰, 韩月澎. 白皮小麦抗穗发芽研究[J]. 麦类作物学报, 2000, 20: 84-87
- [17] Himi E, Noda K. Red grain color gene (R) of wheat is a Myb-type transcription factor [J]. *Euphytica*, 2005,

- 143: 239-242
- [18] Lullien-Pellerin V, Popineau Y, Meersman F. Reversible changes of the wheat gamma 46 gliadin conformation submitted to high pressures and temperatures [J]. *Eur J Biochem*, 2001, 268: 5705-5712
- [19] Upadhyay M P. Characterization of pre-harvest sprouting resistance in Clark' scream white winter wheat [J]. *Euphytica*, 1988, 37: 85-92
- [20] Kermode A R, Fisher S A, Polishchuk E. Accumulation and proteolytic processing of vicilin deletion-mutant proteins in the leaf and seed of transgenic tobacco [J]. *Planta*, 1995, 197: 501-13
- [21] 张海萍, 常成, 肖世和. 小麦胚休眠中 ABA 信号转导的蛋白质组分析[J]. *作物学报*, 2006, 32: 690-697
- [22] Laura P, Fernando C, Reyna O, Veronica M R, Silvina E, Roberto S, Rodolfo A S, Ruben B, Norberto D I, Roberto L B. Expression analysis of a GA 20-oxidase in embryos form two sorghum lines with contrasting dormancy: possible participation of this gene in the hormonal control of germination [J]. *J Exp Bot*, 2003, 54: 2071-2079
- [23] Peter E T, Rosa M B, Gilber E. Differentially expressed genes associated with dormancy or germination of *Arabidopsis thaliana* seeds [J]. *Planta*, 2005, 221: 637-647
- [24] Bailey P C, Mckibbin R S, Lenton J R. Genetic map location for orthologous VP1 genes in wheat and rice [J]. *Theor Appl Genet*, 1999, 98: 281-284
- [25] Nakamura S, Toyama T. Isolation of a VP1 homologue from wheat and analysis of its expression in embryos of dormant and non-dormant cultivars [J]. *J Exp Bot*, 2001, 52: 875-876
- [26] Rowan S M, Mark D W, Paul C B. Transcripts of Vp-1 homeologues are misspliced in modern wheat and ancestral species [J]. *PNAS*, 2002, 99:10203-10208
- [27] Jones H D, Peters N C B, Holdsworth M J. Genotype and environment interact to control dormancy and differential expression of the VIVIPAROUS 1 homologue in embryos of a vena fatua [J]. *The Plant Journal*, 1997, 12: 911-920
- [28] Wilkinson M D, Mckibbin R S, Bailey P C, Flintham J E, Gale M D, Lenton J R, Holdsworth M J. Use of comparative molecular genetics to study pre-harvest sprouting in wheat [J]. *Euphytica*, 2002, 126: 27-33
- [29] Gale M D, Flintham J E, Arthur E D. Alpha-amylase production in the late stages of grain development-An early sprouting damage risk period? [A]. In: *Third International Symposium on Pre-Harvest Cereals* [C]. Kruger J E and LaBege D E (eds). Westview Press Inc., Boulder Co.USA, 1983, 29-35
- [30] Mrva K, Mares D J. Environmental and genetic factors that control late maturity α -amylase in wheat [A]. In: *Proceedings of the 44th Australian Cereal Chemistry Conference* [C], 1994, 78-79

- [31] Mrva K, Mares D J. Inheritance of late maturity α -amylase in wheat [J]. *Euphytica*, 1996, 88: 66-67
- [32] Mrva K, Mares D J, Williams K J, Cheong J. Molecular markers associated with late maturity alpha-amylase (LMA) in wheat [J]. In: Proceedings of 54th Australian Cereal Chemistry Conference and 11th Wheat Breeders Assembly [C]. Black C K, Panozzo J F, Rebetzke G J (eds). 2004, Pp150-151
- [33] Morris C F, Anderberg R J, Goldmark P J, Walker-Simmons M K. Molecular cloning and expression of abscisic acid-responsive genes in embryos of dormant wheat seeds [J]. *Plant Physiology*, 1991, 95: 814-821
- [34] Gatford KT, Hearnden P, Ogonnaya F, Eastwood R F, Halloran G M. Novel resistance to pre-harvest sprouting in Australian wheat from the wild relative *Triticum tauschii* [J]. *Euphytica*, 2002, 126: 67-76
- [35] Weidner S, Krupa U, Amarowicz R, Abe M K S. Phenolic compounds in embryos of triticale caryopsis at different stages of development and maturation in normal environment and after dehydration treatment [J]. *Euphytica*, 2002, 126: 115-122
- [36] Shun-Ichi O, Yoichi A, Daryi M. Development of highly sprouting tolerant wheat germplasm with reduced germination at low temperature [J]. *Euphytica*, 2005, 143: 301-307
- [37] Mares D J. Temperature dependence of germinability of wheat grain (*triticum aestivum* L.) in relation to pre-harvest sprouting [J]. *Aust. J. Agric. Res.*, 1984, 35: 115-128
- [38] Li C D, Ni P X, Francki M, Hunter A, Zhang Y, Schibeci D, Li H, Tarr A, Wang J, Cakir M, Yu J, Bellgard M, Lance R, Appels R. Genes controlling seed dormancy and pre-harvest sprouting in a rice-wheat-barley comparison [J]. *Funct Integr Genomics*, 2004, 4: 84-93
- [39] Patrick B, Margaret E S, Ralph O. Raffinose accumulation in maize embryos in the absence of a fully functional Vp1 gene product [J]. *Planta*, 1997, 203: 222-228
- [40] Flinham J E. Sprouting risks and genetic strategies for breeding resistant wheats [A]. In: Ringlund K, Mosleth E, Mares D J (eds). Pre-harvest sprouting in cereals 1989 [C], Westview Press/Boulder, San Francisco, Oxford: 1990, 176-182
- [41] Anderson J A, Sorrells M E, Tanksley S D. RFLP analysis of genomic regions associated with resistance to pre-harvest sprouting in wheat [J]. *Crop Sci.*, 1993, 33: 453-459
- [42] Roy J K, Prasad M, Varshney R K. Identification of a microsatellite on chromosome 6B and a STS on 7D of bread wheat showing an association with pre-harvest sprouting tolerance [J]. *Theor Appl Genet*, 1999, 99: 336-340
- [43] Zanetti S, Winzeler M, Keller M, Keller B, Messmer M. Genetic analysis of pre-harvest sprouting in a wheat \times spelt cross [J]. *Crop Sci*, 2000, 40: 1406-1407

- [44] Flintham J. Different genetic components control coat-imposed and embryo-imposed dormancy [J]. *Seed Sci Res*, 2000, 10: 43-50
- [45] Flintham J, Adlam R, Bassoi M, Holdsworth M, Gale M. Mapping genes for resistance to sprouting damage in wheat [J]. *Euphytica*, 2002, 126: 39-45
- [46] Ulrike L, Marion S R, Dreas B. QTL mapping of the domestication traits pre-harvest sprouting and dormancy in wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. *Euphytica*, 2005, 143: 247-249
- [47] KulWal PL, Kumar N, Gaur A, Khurana P, Khurana JP, Tyagi AK, Balyan HS, Gupta PK. Mapping of a major QTL for pre-harvest sprouting tolerance on chromosome 3A in bread wheat [J]. *Theor Appl Genet*, 2005, 111: 1052-1059
- [48] King R W, Wettsitein K P. Epicuticular waxes and regulation of ear wetting and pre-harvest sprouting in barley and wheat [J]. *Euphytica*, 2000, 112: 157-166
- [49] Flintham J E, Angus W J, Gale M D. Heterosis, overdominance for grain yield, and alpha-amylase activity in F1 hybrids between near-isogenic Rht dwarf and tall wheats [J]. *J. Agric. Sci.*, 1997, 129: 371-378
- [50] Jacobsen J V, Beach L R. Control of transient of α -amylase and rRNA genes in barely aleurone protoplasts by gibberellic acid and abscisic acid [J]. *Nature*, 1985, 316: 275-277
- [51] Olsen O A, Klemsdal S S, Jakobsen K S, Hughes W, Aalen R, Bosnes M, LØnnebory. Molecular strategies for improving pre-harvest sprouting resistance in cereal. Fifth International Symposium on Pre-harvest Sprouting in Cereals [J]. Westview Press, 1990, 96-97
- [52] Jones H D, Peters N C B, Holdsworth M J. Genotype and environment interact to control dormancy and differential expression of the VIVIPAROUS 1 homologue in embryos of a vena fatua [J]. *The Plant Journal*, 1997, 12: 911-920