

黄淮麦区地方小麦品种子粒颜色 相关基因 *Tamyb10-1* 等位变异检测

李 婷¹, 陈 杰^{1,2}, 陈 锋¹, 崔党群¹

(¹河南农业大学农学院/河南省粮食作物协同创新中心/小麦玉米作物学国家重点实验室, 郑州 450002;

²河南省驻马店市农科院小麦所, 驻马店 463000)

摘要: *Tamyb10-1* 基因属于 MYB 家族的一种转录因子, 决定着小麦种皮的颜色, 同时对穗发芽抗性也具有一定影响。本研究以来自我国黄淮麦区的地方小麦品种为材料, 利用功能标记对参试小麦品种 *Tamyb10-1* 基因位点在 3A、3B 和 3D 染色体上的等位变异类型进行了检测。结果表明, 参试材料中上述每一位点均有 2 种等位变异类型, 由此形成了 7 种基因型组合, 分别为 *Tamyb10-A1a/Tamyb10-B1a/Tamyb10-D1a*、*Tamyb10-A1a/Tamyb10-B1a/Tamyb10-D1b*、*Tamyb10-A1a/Tamyb10-B1b/Tamyb10-D1a*、*Tamyb10-A1b/Tamyb10-B1a/Tamyb10-D1a*、*Tamyb10-A1b/Tamyb10-B1b/Tamyb10-D1a*、*Tamyb10-A1b/Tamyb10-B1a/Tamyb10-D1b* 和 *Tamyb10-A1b/Tamyb10-B1b/Tamyb10-D1b*, 其分布频率分别为 38.0%、15.0%、1.0%、8.0%、1.0%、33.0% 和 4.0%。进一步研究结果表明, 种皮颜色为白色时, *Tamyb10-1* 基因在 3 个位点均为野生型, 而当任何一个位点发生突变时均表现为红色。由于该基因也影响穗发芽的抗性, 且子粒颜色与其抗氧化能力密切相关, 因此本研究对以子粒颜色性状为育种目标的优异种质资源筛选具有一定参考价值。

关键词: 普通小麦; *Tamyb10-1* 基因; 子粒颜色; 等位变异

Molecular Identification of the *Tamyb10-1* Gene Controlling the Grain Color in Landrace Wheat Cultivars from Huanghuai Wheat Region

LI Ting¹, CHEN Jie^{1,2}, CHEN Feng¹, CUI Dang-qun¹

(¹Agronomy College of Henan Agricultural University/Collaborative Innovation Center of Henan Grain Crops/National Key Laboratory of Wheat Maize Crop Science, Zhengzhou 450002; ²Zhumadian Institute of Agricultural Sciences, Zhumadian 463000)

Abstract: *Tamyb10-1* genes, a kind of transcription factors of the MYB family, determine the grain color of bread wheat and also have certain influence upon pre-harvest sprouting in bread wheat. In this study, the *Tamyb10-1* functional markers reported previously were used to identify allelic variations on the *Tamyb10-A1*, *Tamyb10-B1*, and *Tamyb10-D1* loci in 100 landrace wheat varieties from Huanghuai wheat region. The results indicated that there were two types of alleles on each *Tamyb10-1* locus, which resulted in 7 allelic combinations of *Tamyb10-1* genes, including *Tamyb10-A1a/Tamyb10-B1a/Tamyb10-D1a*, *Tamyb10-A1a/Tamyb10-B1a/Tamyb10-D1b*, *Tamyb10-A1a/Tamyb10-B1b/Tamyb10-D1a*, *Tamyb10-A1b/Tamyb10-B1a/Tamyb10-D1a*, *Tamyb10-A1b/Tamyb10-B1b/Tamyb10-D1a*, *Tamyb10-A1b/Tamyb10-B1a/Tamyb10-D1b*, and *Tamyb10-A1b/Tamyb10-B1b/Tamyb10-D1b*. Their distribution percentage were 38.0%, 15.0%, 1.0%, 8.0%, 1.0%, 33.0%, and 4.0%, respectively. Further analysis suggested that wheat cultivars with wild-type *Tamyb10-1* at three loci showed white grains, whereas wheat cultivars with at least one mutant of *Tamyb10-1* at three loci showed red grains. In addition, the *Tamyb10-1* genes also affected pre-harvest sprouting and grain color was closely related with antioxidant capacity. Therefore, this study could provide certain useful information for the purpose

收稿日期: 2013-12-08 修回日期: 2014-01-23 网络出版日期: 2014-08-07

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20140807.1022.022.html>

基金项目: 国家“973”发展规划(2014CB138105); 教育部新世纪优秀人才(NCET-13-0776); 河南省教育厅科技创新团队项目(14IRTSTHN010)

第一作者主要从事小麦分子遗传育种工作。E-mail: july19880619@126.com; 陈杰为共同第一作者

通信作者: 陈锋, 主要从事小麦分子育种工作。E-mail: chf0088@sina.com.cn

of screening relatively superior wheat germplasms.

Key words: bread wheat; *Tamyb10-1* genes; grain color; allelic variations

小麦作为一种重要的粮食作物,为世界上超过40%的人口提供了20%以上的热量和蛋白质^[1],其产量的提高和品质的改良是世界范围内重要的研究课题之一。随着经济的发展和水平的提高,消费者对面制食品如面条、馒头、饺子等的外观色泽也提出了更高的要求。面粉的色泽主要由麸星、灰份及所含的色素成分来决定。由于小麦制粉中总有小部分麸星混入面粉中去,从而影响面粉颜色,因而种皮颜色的深浅对面粉颜色有着直接影响。用深色小麦加工的面粉,麸星就能明显地表现出来,特别是高出粉率的面粉更明显;用浅色麦加工出来的面粉颜色白^[2]。小麦种皮的颜色对面粉品质的影响较大,在国际市场中,尤其是在亚洲地区,人们更喜欢白皮小麦^[3]。宗学风等^[4]研究发现,小麦子粒颜色越深,其抗氧化能力越强,红粒小麦的抗氧化酶活性显著高于白粒小麦。J. E. Flitham 等^[5]通过比较近等基因系的休眠性认为,控制红色种皮的等位基因同时也控制休眠基因的表达;阎长生^[6]认为种子休眠与红色种皮密切相关。小麦子粒的颜色也是影响穗发芽的重要因素之一,一般情况下,红粒小麦比白粒小麦具有更强的穗发芽抗性^[7-9]。

小麦子粒颜色主要受位于3A、3B和3D染色体长臂上的*R* (*Red*) 基因控制^[10-12]。小麦子粒的红色素是多酚化合物即儿茶素或原花色素,是通过类黄酮生物合成途径合成的^[13]。E. Himi 等^[9,14-16]通过对发育小麦子粒类黄酮途径中查耳酮合成酶(CHS, chalcone synthase),查耳酮异构酶(CHI, chalcone isomerase),黄烷酮-3-羟化酶(F3H, flavanone 3-hydroxylase)和二氢黄酮醇-4-还原酶(DFR, dihydroflavonol 4-reductase)4个基因表达的检测,发现白粒小麦中这几个基因的表达水平显著低于红粒小麦,表明*R*基因是类黄酮合成基因的转录活化因子。同时,该基因具有一因多效功能^[7-9],通过调节控制类黄酮合成的基因表达而影响子粒的休眠性,从而影响穗发芽抗性。

E. Himi 等^[17]通过染色体定位以及类黄酮生物合成途径关键酶基因的功能分析,确定*Tamyb10*是一个稳定的*Tamyb10-1*候选基因,并分别从小麦3A、3B和3D染色体长臂上克隆出了*Tamyb10-A1*、

*Tamyb10-B1*和*Tamyb10-D1*基因,发现该基因主要在发育阶段的种子中表达。在*Tamyb10-A1*基因位点,隐性等位基因*Tamyb10-A1a*有2个突变类型:*Tamyb10-A1a* (CS type)和*Tamyb10-A1a* (No17 type)。*Tamyb10-A1a* (CS type)类型基因编码的氨基酸序列中缺少MYB结构域第一个R2重复的前半部分。*Tamyb10-A1a* (No17 type)类型中*Tamyb10-A1*基因在第2个内含子中有1个GeST插入(属于hAT家族)。在*Tamyb10-B1*基因位点,隐性等位基因*R-B1a*第3外显子上存在1个19 bp的缺失,导致其可能在开放阅读框中发生了移码。当*Tamyb10-A1*、*Tamyb10-B1*和*Tamyb10-D1*3个基因位点均为*Tamyb10-A1a*(*r2*)、*Tamyb10-B1a*(*r3*)和*Tamyb10-D1a*(*r1*)隐性等位基因时,子粒颜色表现为白色,而当其中任意一个基因位点为显性等位基因时,子粒颜色表现为红色^[10,16-17]。

迄今为止,尽管小麦子粒颜色与其他性状的关系如多酚氧化酶、脂肪酸氧化酶活性^[18]、子粒的抗氧化能力^[4]等的研究在国内已有许多报道,但是关于控制子粒颜色相关基因的等位变异及其在地方品种的分布规律仍鲜见报道。而河南省作为“中国粮仓”,小麦产量更是占全国的1/4,其丰富的小麦种质资源材料为育种和小麦生产做出了巨大贡献。鉴于此,本研究选取主要包括河南小麦品种在内的黄淮麦区小麦地方品种,利用已知的分子标记以及本实验室开发的分子标记^[19]对*Tamyb10-1*基因进行了等位基因的分子检测,以明确该基因在黄淮麦区小麦地方品种中的分布规律,旨在为选育以子粒颜色为目标性状的小麦育种工作及优异种质资源的筛选提供一定的借鉴。

1 材料与方法

1.1 供试材料

选用河南农业大学小麦分子育种研究室的100份黄淮麦区地方小麦品种为材料(表1),试验材料分别于2010-2011年和2011-2012年种植于河南农业大学科教示范试验园区。每个材料种植2行,行长2 m,行间距23 cm,单粒点播,株距10 cm。田间管理按当地试验田进行。抽穗后去杂,适时收获,自然干燥。所有供试材料均未出现倒伏和穗发芽现象。

表 1 参试小麦的种皮颜色表型和基因型

Table 1 Phenotypes and genotypes on grain color of landrace wheat cultivars surveyed

| 资源编号 Accession No. | 品种 Cultivar | 基因型 Genotype | | | 粒色 Grain color | 资源编号 Accession No. | 品种 Cultivar | 基因型 Genotype | | | 粒色 Grain color |
|--------------------------|----------------|-------------------|-------------------|-------------------|----------------------|--------------------------|----------------|-------------------|-------------------|-------------------|----------------------|
| | | <i>Tamyb10-A1</i> | <i>Tamyb10-B1</i> | <i>Tamyb10-D1</i> | | | | <i>Tamyb10-A1</i> | <i>Tamyb10-B1</i> | <i>Tamyb10-D1</i> | |
| | | ZM000096 | 大红芒 | b | | | | a | b | 红 | |
| ZM000191 | 葫芦头 | a | a | a | 白 | ZM003815 | 老芒麦 | b | a | b | 红 |
| ZM000226 | 小白芒 | a | a | a | 白 | ZM003897 | 德国红 | a | a | b | 红 |
| ZM000232 | 小红芒 | a | a | a | 白 | ZM003995 | 锤锤麦 | a | a | b | 红 |
| ZM000236 | 蚰子麦 | a | a | a | 白 | ZM002418 | 白糠亮麦 | a | a | a | 白 |
| ZM000248 | 燕京白 | a | a | a | 白 | ZM002249 | 老红芒 | a | a | a | 白 |
| ZM000250 | 五花头 | b | a | a | 红 | ZM002143 | 白麦 | a | a | a | 白 |
| ZM000252 | 大红芒 | a | a | b | 红 | ZM002688 | 红秃头 | a | a | a | 白 |
| ZM000253 | 小红芒 | a | a | b | 红 | ZM002696 | 蚰子麦 | a | a | a | 白 |
| ZM000254 | 大红芒 | a | a | b | 红 | ZM002757 | 白疙瘩 | a | a | a | 白 |
| ZM000258 | 红芒红 | a | a | a | 白 | ZM002779 | 蚰子头 | b | a | b | 红 |
| ZM000259 | 红芒白 | a | a | a | 白 | ZM4703 | 长腰麦 | b | a | a | 红 |
| ZM000269 | 葫芦头 | a | a | b | 红 | ZM4698 | 洋青棵 | b | a | a | 红 |
| ZM000270 | 葫芦头 | a | a | a | 白 | ZM4861 | 金包银 | b | a | b | 红 |
| ZM000451 | 白皮麦 | a | a | a | 白 | ZM4679 | 红春麦 | b | a | b | 红 |
| ZM000537 | 罗城小麦 | b | b | b | 红 | ZM4863 | 白毛麦 | a | a | a | 白 |
| ZM000533 | 河婆麦 | b | b | b | 红 | ZM4728 | 大红麦 | b | a | b | 红 |
| ZM000539 | 红芒红 | b | b | b | 红 | ZM4767 | 红兰麦 | b | a | b | 红 |
| ZM000556 | 小白芒 | a | a | b | 红 | ZM4783 | 兰选麦 | b | a | b | 红 |
| ZM000562 | 红芒炸 | b | a | b | 红 | ZM4769 | 大白麦 | a | a | a | 白 |
| ZM000610 | 红粒麦 | a | a | b | 红 | ZM4780 | 金黄麦 | a | a | b | 红 |
| ZM000654 | 沧州红 | b | a | b | 红 | ZM4778 | 铁堡麦 | a | a | b | 红 |
| ZM000664 | 大青红 | a | a | a | 白 | ZM4781 | 短麦 | a | a | b | 红 |
| ZM000672 | 红芒白 | a | a | a | 白 | ZM4782 | 苏麦 | b | a | b | 红 |
| ZM000728 | 蚂蚱肚 | a | a | a | 白 | ZM4790 | 小红麦 | b | a | b | 红 |
| ZM000729 | 方葫芦头 | a | a | a | 白 | ZM4785 | 小麦 | a | a | b | 红 |
| ZM000731 | 红葫芦头 | a | a | a | 白 | ZM4787 | 大红麦 | a | a | b | 红 |
| ZM001756 | 蚂蚱头 | a | a | a | 白 | ZM4806 | 糜麦 | b | a | b | 红 |
| ZM001759 | 红半芒 | a | a | a | 白 | ZM4859 | 红光头 | a | a | b | 红 |
| ZM001776 | 扁穗毛麦 | a | a | a | 白 | ZM4851 | 白矮麦 | a | a | a | 白 |
| ZM002007 | 三月黄火麦 | a | a | a | 白 | ZM4846 | 红小麦 | a | a | a | 白 |
| ZM001998 | 小红芒 | a | a | a | 白 | ZM4711 | 红芒麦 | b | a | b | 红 |
| ZM001993 | 红蚰子 | a | a | a | 白 | ZM4716 | 青兰麦 | b | a | b | 红 |
| ZM001989 | 白秃头麦 | a | a | a | 白 | ZM4765 | 小红麦 | b | a | b | 红 |
| ZM001980 | 白葫芦头 | a | a | a | 白 | ZM4760 | 长芒芒 | b | a | b | 红 |
| ZM001916 | 红芒蚰麦 | a | a | a | 白 | ZM4737 | 和尚头 | a | a | b | 红 |
| ZM001788 | 光头红麦 | a | a | a | 白 | ZM6233 | 小玉花 | b | a | b | 红 |
| ZM001784 | 红芒扁穗 | a | a | a | 白 | ZM6225 | 三月黄 | b | a | b | 红 |
| ZM001790 | 红槽麦 | b | b | a | 红 | ZM6185 | 鸭舌子 | b | a | b | 红 |
| ZM002039 | 鱼鳞糙小麦 | a | a | a | 白 | ZM6202 | 和尚头 | b | a | b | 红 |
| ZM002801 | 半截芒 | b | a | a | 红 | ZM6204 | 草鞋底 | a | a | a | 白 |
| ZM002792 | 玉麦 | b | a | a | 红 | ZM5567 | 红壳洋麦 | b | a | a | 红 |
| ZM002797 | 红芒白 | a | a | a | 白 | ZM5569 | 有芒小麦 | b | a | b | 红 |
| ZM002800 | 蚰子头 | b | a | b | 红 | ZM5559 | 洋小麦 | b | a | b | 红 |
| ZM002807 | 望水白 | b | a | b | 红 | ZM5603 | 六柱洋小麦 | b | a | b | 红 |
| ZM002873 | 红蚰子 | b | a | b | 红 | ZM5453 | 火烧百日麦 | b | a | a | 红 |
| ZM002849 | 红螭芒 | b | a | b | 红 | ZM5465 | 鸡子头 | b | b | b | 红 |
| ZM003269 | 靠山红 | b | a | b | 红 | ZM5478 | 有芒长四方 | b | a | b | 红 |
| ZM002981 | 德国红 | b | a | a | 红 | ZM6559 | 红麦 | a | b | a | 红 |
| ZM003876 | 红芒麦 | b | a | b | 红 | ZM5525 | 雪里青 | b | a | b | 红 |

1.2 DNA 提取

每个材料选取具有代表性即该材料中绝大多数粒形、大小等外观较为一致的 3 粒种子,参照等 F. Chen 等^[20]方法提取参试小麦品种(系)的基因组 DNA。其中, DNA 提取液含 288 mmol/L NaCl、200 mmol/L Tris · HCl (pH = 8.0)、25 mmol/L EDTA 和 0.5% SDS。紫外分光光度计检测 DNA 浓度与质量, -20 °C 下保存备用。

1.3 PCR 扩增和电泳分析

特异引物的目的片段扩增在 PCR 扩增仪 ABI 9700 或 Research PTC-200 上进行。PCR 反应体系为 25 μL, 含 10 × PCR 缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl, pH 值 9.0, 50 mmol/L KCl, 1.0% Triton X-100), 1.5 mmol/L MgCl₂, 0.3 mmol/L dNTP, 每条引

物 10 pmol/L, 0.5 U *Taq* 酶, 模板 DNA 100 ng。标记 R3A-1 和 R3A-2 以及 R3B-1 和 R3B-2 的 PCR 程序采用步降 (touch down) 退火程序: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 由 65 °C 开始每个循环的退火温度降低 1 °C, 退火时间 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 以上循环 10 次; 然后 94 °C 变性 30 s, 58 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 循环 35 次; 最后 72 °C 延伸 7 min。标记 R3A-3 循环中延伸时间为 2 min, 其余同上。标记 R3D-1 的 PCR 程序同样采用步降退火程序: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 由 68 °C 开始, 每个循环的退火温度降低 1 °C, 退火时间 30 s, 72 °C 延伸 90 s, 以上循环 10 次; 然后 94 °C 变性 30 s, 61 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 90 s, 循环 35 次; 最后 72 °C 延伸 7 min。各标记的详细情况见表 2。

表 2 鉴定不同位点 *Tamyb10-1* 基因所需的引物

Table 2 Primers for identification of different *Tamyb10-1* loci

| 标记 Marker | 引物序列(5' - 3') Primer sequence | 扩增片段(bp) Fragment size | 目标等位变异 Targeted allele | 参考文献 Reference |
|--------------|-----------------------------------------------------|---------------------------|-------------------------------------------------------------------|-------------------|
| R3A-1 | F:CTATGTGGATGGCCTTGGAT R:CTACCAGCTCGTTTGGGAAG | 665 | <i>R-A1b</i> | [18] |
| R3A-2 | F:TTFCAATCGAGTGGGCATAA R:CCTGACGATGAGCTCCTCTT | 536 | <i>R-A1a</i> (CS type) | [18] |
| R3A-3 | F:FCCCTACATGGGAGACAGAGA R:FGTTATCACATGCTGATCCTGA | 2750/565 | <i>R-A1a</i> (No17 type) / <i>R-A1b</i> or <i>R-A1a</i> (CS type) | [18] |
| R3B-1 | F:AGCAAGAGGAACCTGCAGTC R:GATGCCCTCCAGATCAAGGT | 282/263 | <i>R-B1b/R-B1a</i> | [18] |
| R3B-2 | F:AGGAACCTGCAGTCTCACGG R:CTCGTGAACCCCTCTGCT | 183/164 | <i>R-B1b/R-B1a</i> | [20] |
| R3D-1 | F:TAGGCCAACACCTTCTAAACG R:AGGCACACCAGCTTATTTGG | 1353 | <i>R-D1b</i> | [18] |

物 PCR 扩增产物在含有溴化乙锭 (EB) 的 1% 琼脂糖凝胶上进行电泳分离检测, 在 Alpha Imager HP 凝胶成像系统上扫描成像并存入计算机。根据每个品种 3 个子粒 DNA 的检测结果判断该品种(系)的 *Tamyb10-1* 基因类型。

1.4 分子标记的 PCR 检测

目前用于检测 *Tamyb10-A1* 位点等位变异的已知功能性标记为 E. Himi 等^[17]开发的 R3A-1、R3A-2 和 R3A-3。R3A-1 和 R3A-2 均是显性标记, 具有 *Tamyb10-A1b* 类型等位基因的材料能扩增出 665 bp 的片段, 而 *Tamyb10-A1a* 类型的材料则扩增出 536 bp 的片段; R3A-3 是一个共显性功能标记, 用于

检测具有 *Tamyb10-A1a* (No17 type) 类型的等位基因, 由于 *Tamyb10-A1a* (No17 type) 类型材料中 *Tamyb10-A1* 基因第 2 个内含子有 1 个 2.2 kb 的插入片段, 因而扩增片段为 2750 bp, 在非 *Tamyb10-A1a* (No17 type) 等位基因型的材料中则可以扩增出 565 bp 的片段。

目前在 *Tamyb10-B1* 位点发现有 *Tamyb10-B1b* 和 *Tamyb10-B1a* 2 种类型等位基因。陈杰等^[19]利用 GenBank 上公布的基因序列, 重新开发了一个共显性标记 R3B-2, 该标记在琼脂糖凝胶电泳上很容易检测到 2 种等位基因之间的差异。在具有

Tamyb10-B1b 类型等位基因的材料中可以扩增出 183 bp 的片段,在 *Tamyb10-B1a* 类型材料中可以扩增出 164 bp 的片段。该标记的目的片段与 E. Himi 等^[14]开发的标记 R3B-1 目的片段(*Tamyb10-B1b* 类型扩增片段为 282 bp, *Tamyb10-B1a* 类型扩增片段 263 bp)相比更小,克服了 2 种基因型间因差异较小在琼脂糖凝胶上检测结果并不理想的缺点。

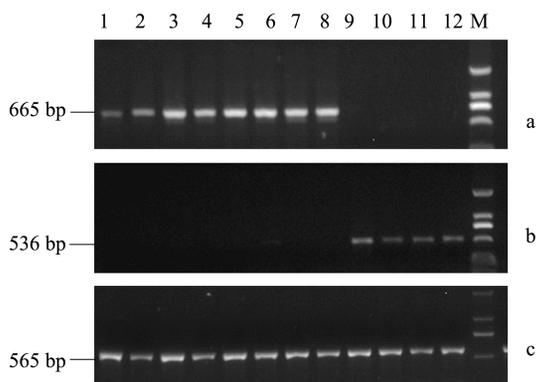
利用 E. Himi 等^[17]开发的显性功能标记 R3D-1 检测 *Tamyb10-D1* 位点等位变异类型。用该标记能扩增出 1353 bp 片段的小麦品种为 *Tamyb10-D1b* 类型,而扩增不出任何带型的材料则认为是 *Tamyb10-D1a* 类型等位基因。

采用 Primer Premier 5.0 软件进行引物设计, DNAMAN 6.0 进行序列比对。所用标记的序列、退火温度、PCR 扩增片段大小及其目标等位变异见表 2。所有引物均由上海生工生物工程技术有限公司合成。

2 结果与分析

2.1 分子标记检测 *Tamyb10-1* 的等位变异类型

利用 R3A-1、R3A-2 和 R3A-3 标记对参试的 100 份小麦材料在 3A 染色体上进行分子检测,部分扩增结果如图 1 所示。结果表明,所有参试材料中 *Tamyb10-A1* 位点属于 *Tamyb10-A1b* 类型等位基因的材料有 46 份(可扩增出 665 bp 的片段);



1:红芒麦;2:金包银;3:和尚头;4:红螭芒;5:河婆麦;
6:罗城小麦;7:鸡子头;8:红槽麦;9:小白芒;10:大青红;
11:蚂蚱头;12:红麦;M:DL2000,下同

1:Hongmangmai,2:Jinbaoyin,3:Heshangtou,4:Hongquanmang,
5:Hepomai,6:Luochengxiaomai,7:Jizitou,8:Honglumai,9:Xiaobaimang,
10:Daqinghong,11:Mazhatou,12:Hongmai,M:DL2000,the same as below

图 1 R3A-1(a)、R3A-2(b)和 R3A-3(c) 功能性标记的 PCR 扩增结果

Fig. 1 PCR amplification of functional markers R3A-1(a), R3A-2(b), and R3A-3(c)

属于 *Tamyb10-A1a* (CS type) 类型等位基因的材料有 54 份(可扩增出 536 bp 的片段); 2 类等位基因的分布频率分别为 46.0% 和 54.0%。在这批材料中没有发现 *Tamyb10-A1a* (No17 type) 类型等位基因。

采用陈杰等^[19]新开发的功能性标记 R3B-2 对参试材料的 3B 染色体进行分子检测,部分扩增结果如图 2 所示。检测结果表明,所有参试材料在 *Tamyb10-B1* 基因位点,属于 *Tamyb10-B1a* 类型的小麦品种有 94 份(可扩增出 164 bp 的片段),属于 *Tamyb10-B1b* 类型的小麦品种有 6 份(可扩增出 183 bp 的片段),其分布频率分别为 94.0% 和 6.0%。

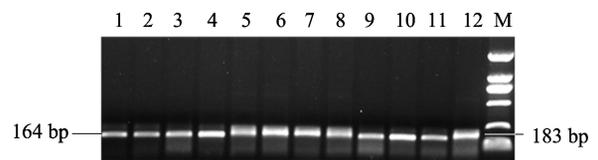


图 2 R3B-2 功能性标记的 PCR 扩增结果

Fig. 2 PCR amplification of functional marker R3B-2

采用标记 R3D-1 对参试材料的 3D 染色体进行分子检测,扩增检测结果如图 3 所示。*Tamyb10-D1* 位点检测结果表明,所有参试材料中,有 52 份属于 *Tamyb10-D1b* 类型(可扩增出 1353 bp 的片段),有 48 份 *Tamyb10-D1a* 类型(未扩增出任何条带),其分布频率分别为 52.0% 和 48.0%。

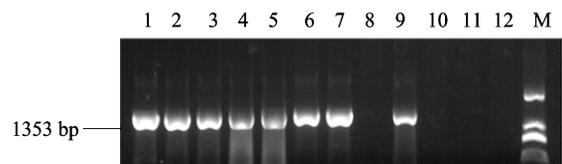


图 3 R3D-1 功能性标记的 PCR 扩增结果

Fig. 3 PCR amplification of functional marker R3D-1

2.2 不同类型 *Tamyb10-1* 基因型分布频率及其与种皮颜色的关系

参试材料种皮颜色调查结果见表 1。可以看出,所有的白粒小麦基因型在 *Tamyb10-A1*、*Tamyb10-B1* 和 *Tamyb10-D1* 位点均表现为野生型;而当其中一个位点发生突变时,其子粒颜色均表现为红色。这与 E. Himi 等^[14,16]以及 R. A. McIntosh 等^[10]的研究结果一致。

特异引物的 PCR 扩增结果表明,参试材料中,每个 *Tamyb10-1* 位点(*Tamyb10-A1*、*Tamyb10-B1* 和 *Tamyb10-D1*)均存在有 2 种基因型,共形成了 7 种基因型组合,7 种基因型组合频率分布如图 4。其中

子粒颜色表现为白色基因型组合 *Tamyb10-A1a/Tamyb10-B1a/Tamyb10-D1a* 的材料数目最多,有 38 份,其分布频率为 38.0%。其次为子粒颜色表现为红色的一种基因型组合 *Tamyb10-A1b/Tamyb10-B1a/Tamyb10-D1b*,该组合共有 33 份,其分布频率分别为 33.0%。其他基因型组合分别为 *Tamyb10-A1a/Tamyb10-B1a/Tamyb10-D1b*、*Tamyb10-A1a/Tamyb10-B1b/Tamyb10-D1a*、*Tamyb10-A1b/Tamyb10-B1a/Tamyb10-D1a*、*Tamyb10-A1b/Tamyb10-B1b/Tamyb10-D1a*、*Tamyb10-A1b/Tamyb10-B1b/Tamyb10-D1b*,其分布频率分别为 15.0%、1.0%、8.0%、1.0%、4.0%,均表现为红色。

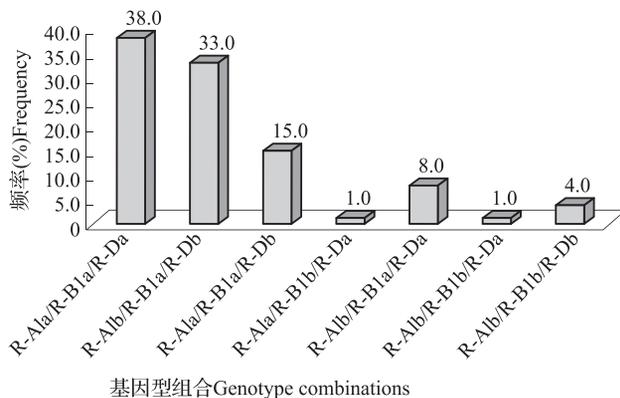


图 4 参试材料 *Tamyb10-1* 基因型频率分布

Fig. 4 Frequency distribution of *Tamyb10-1* allelic combinations in the surveyed wheat cultivars

3 讨论

子粒颜色是影响面粉色泽的重要因素之一,而面粉色泽与面筋质量、淀粉品质和蛋白质数量等因素共同决定面制食品的品质性状,就我国面条而言,品质性状的重要性排序为面筋强度 > 淀粉糊化特性 > 面粉颜色 > 子粒硬度 > 蛋白质数量^[21-24]。河南省作为小麦种植大省其品质育种起步相对较晚,且主要集中在面筋品质的改良及蛋白质含量的提高方面,与面条颜色相关性状的研究多限于品种多种酶活性等分析^[25-26],缺乏对子粒颜色相关基因型的了解。本研究对来自包括河南在内的黄淮麦区地方品种 *Tamyb10-1* 基因的分子检测表明,白粒小麦和红粒小麦的分布频率以后者居高,这与陈杰等^[19]的研究结果一致。但是,与红色子粒相关的其他基因型组合的频率分布不均匀。因此,了解这些品种(系) *Tamyb10-1* 的基因型,有利于以子粒颜色为目标性状的优异种质资源的改良以及小麦品质的分子

标记辅助选择育种。

同时, *Tamyb10-1* 基因的功能性标记 R3A-1、R3A-2、R3A-3、R3B-1 以及 R3D-1 检测方法简单,结果可靠,能准确地检测到相应的等位基因变异。而且本实验室新开发的功能性标记 R3B-2 克服了 *Tamyb10-B1b* 和 *Tamyb10-B1a* 2 种基因型间因差异较小在琼脂糖凝胶上检测结果并不理想的缺点。由于基因功能性标记可大大提高分子标记选择辅助育种的效率和准确度,其开发与应用已经成为小麦分子育种的重要方向^[15],因此在与子粒颜色相关的品质育种方面可以直接利用这些标记来进行辅助选择。关于 *Tamyb10-1* 基因在 3D 染色体上的隐性等位基因 *Tamyb10-D1a*,其核苷酸序列目前仍然未被克隆出来,根据 E. Himi 等^[17]的研究认为,这可能是由于该类型品种的 *Tamyb10-D1* 位点有一个较大的插入或缺失所致,也可能是用于克隆这个等位基因的引物不具有较高的特异性。克隆出 *Tamyb10-D1* 基因上的隐性等位基因 *Tamyb10-D1a* 的序列,并且设计相应的功能标记,是下一步研究 *Tamyb10-1* 基因的重点之一。

从本研究可以看出, *Tamyb10-A1*、*Tamyb10-B1*、*Tamyb10-D1* 中显性等位基因的多少与红色的深浅密切相关,即上述位点中任一为显性基因的材料子粒红色度明显浅于 2 个或 3 个位点为显性的材料。然而,目前关于小麦种皮颜色的表型测定还仅停留在人为目测阶段。人为目测法是利用种皮外观颜色对人视觉的刺激反应直接进行评定,这种方法容易操作,但不能对种皮颜色的程度进行较为精确的量化,是否能够用比色计或色差计量化测定小麦的种皮颜色还需要进一步验证。控制小麦子粒颜色的基因 *Tamyb10-1* 除了对面粉的色泽有重要影响外,还与种子的穗发芽抗性及休眠密切相关^[7-9],可通过调节控制类黄酮合成的几个基因的表达而影响子粒的休眠性,从而影响穗发芽抗性。E. Himi 等^[16]证明了在白粒品种中,由于 *Tamyb10-1* 基因没有表达而使类黄酮基因的表达降低。*Tamyb10-1* 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, *Tamyb10-1* 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。本研究中, *Tamyb10-1* 基因的 3 个隐性等位基因中, *Tamyb10-A1a* (54.0%) 和 *Tamyb10-B1a* (94.0%) 的分布频率高于其相应显性等位基因 *Tamyb10-A1b* (46.0%) 和 *Tamyb10-B1b* (6.0%),尤

其是在 *Tamyb10-B1* 位点,隐性基因的分布频率达到了 94.0%。因此,虽然 *Tamyb10-D1* 位点上的隐性基因 *Tamyb10-D1a* (48.0%) 略低于其显性等位基因 *Tamyb10-D1b* (52.0%),但是与白色子粒相关的基因型组合 *Tamyb10-A1a/ Tamyb10-B1a/ Tamyb10-D1a* (38.0%) 在参试材料中的分布频率明显高于其他 6 种与红色子粒相关的基因型组合。在参试的 100 份黄淮麦区地方小麦品种中,与白色子粒相关的各基因型组合分布频率较高,而且与红色子粒相关的各基因型组合频率分布不均匀,这可能与当地人们对面食的要求及有关单位的育种方向有关。另外,本实验室研究结果表明,拥有 *Tamyb10-1* 基因 3 个位点都突变的小麦品种穗发芽抗性明显优于野生型和其中 1 个或 2 个位点发生突变的品种,因此黄淮麦区作为我国小麦最为重要的产区,在今后小麦育种工作中穗发芽抗性研究方面,可以考虑优先选用具有 *Tamyb10-A1b/Tamyb10-B1b/Tamyb10-D1b* 基因型组合的材料,以选育具有较好穗发芽抗性的品种。

参考文献

- [1] Gill B S, Appels R, Botha-Oberholster A M, et al. A workshop report on wheat genome sequencing research on wheat consortium [J]. *Genetics*, 2004, 168(2):1087-1096
- [2] 邱俊伟. 关于如何改善面粉色泽的探讨 [J]. *粮食与饲料工业*, 1997(11):3-4
- [3] Matus-Cadiz M A, Hucl P, Perron C E, et al. Genotype × environment interaction for grain color in hard white spring wheat [J]. *Crop Sci*, 2003, 43(1):219-226
- [4] 宗学风, 张建奎, 李帮秀, 等. 小麦籽粒颜色与抗氧化作用 [J]. *作物学报*, 2006, 32(2):237-242
- [5] Flintham J E, Gale M D. Dormancy gene maps in homologous cereal genomes [C]//Noda K, Mares D J. Seventh International Symposium on Pre-harvest Sprouting in Cereals. Osaka: Center for Academic Societies Japan, 1996:143-149
- [6] 闫长生. 中国北方冬小麦品种穗发芽抗性的遗传变异 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2002
- [7] Flintham J E. Different genetic components control coat-imposed and embryo-imposed dormancy in wheat [J]. *Seed Sci Res*, 2000, 10(1):43-56
- [8] Warner R L, Kudrna D A, Spaeth S C, et al. Dormancy in white-grain mutants of chinese spring wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. *Seed Sci Res*, 2000, 10(1):51-60
- [9] Himi E, Mares D J, Yanagisawa A, et al. Effect of grain colour gene (*R*) on grain dormancy and sensitivity of the embryo to abscisic acid (ABA) in wheat [J]. *J Exp Bot*, 2002, 53(374):1569-1574
- [10] McIntosh R A, Hart G E, Devos K M, et al. Catalogue of gene symbols for wheat [C]//Proceedings of the ninth international wheat genetics symposium. Canada: University of Saskatchewan Extension Press, 1998:1225-1232
- [11] Li J, Wei H T, Hu X R, et al. Locus R-D1 conferring red-grain-color in synthetic derivative wheat Chuanmai 42 mapped with SSR markers [J]. *Mol Plant Breeding*, 2010, 1(3):1-6
- [12] Groos C, Gay G, Perretant M R, et al. 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*, 2002, 104(1):39-47
- [13] Winkel-Shirley B. Flavonoid biosynthesis. A colourful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology [J]. *Plant Physiol*, 2001, 126(2):485-493
- [14] Himi E, Nisar A, Noda K. Colour genes (*R* and *Rc*) for grain and coleoptile upregulate flavonoid biosynthesis genes in wheat [J]. *Genome*, 2005, 48(4):747-754
- [15] Himi E, Noda K. Isolation and location of three homoeologous dihydroflavonol-4-reductase (*DFR*) genes of wheat and their tissue-dependent expression [J]. *J Exp Bot*, 2004, 55(396):365-375
- [16] Himi E, Noda K. Red grain colour gene (*R*) of wheat is a mybtype transcription factor [J]. *Euphytica*, 2005, 143(3):239-242
- [17] Himi E, Maekawa M, Miura H, et al. Development of PCR markers for *Tamyb10* related to *R-1*, red grain color gene in wheat [J]. *Theor Appl Genet*, 2011, 122(8):1561-1576
- [18] 左爱辉. 小麦籽粒颜色性状相关基因型鉴定及其优异基因挖掘 [D]. 郑州: 河南农业大学, 2012
- [19] 陈杰, 陈锋, 詹克慧, 等. 普通小麦籽粒 *Tamyb10* 基因等位变异的分子检测 [J]. *麦类作物学报*, 2013, 33(2):224-229
- [20] Chen F, Xu H X, Zhang F Y, et al. Physical mapping of *puroindoline b-2* genes and molecular characterization of a novel variant in durum wheat (*Triticum turgidum* L.) [J]. *Mol Breeding*, 2011, 28(2):153-161
- [21] He Z H, Yang J, Zhang Y, et al. Pan bread and dry white Chinese noodle quality in Chinese winter wheats [J]. *Euphytica*, 2004, 139(3):257-267
- [22] Liu J J, He Z H, Zhao Z D, et al. Wheat quality traits and quality parameters of cooked dry white Chinese noodle quality [J]. *Euphytica*, 2003, 131:147-154
- [23] Liu J J, He Z H, Yang J, et al. Variation of starch properties in wheat cultivars and their relationship with dry white Chinese noodle quality [J]. *Sci Agric Sin*, 2003, 36(1):7-12
- [24] Zhang Y, Quail K, Mugford D, et al. Variation of milling quality and its association with color of white salt noodle in Chinese winter wheat cultivars [J]. *Cereal Chem*, 2005, 82(6):633-638
- [25] 孙道杰, 何中虎, 夏先春. 小麦籽粒 PPO 活性分子标记研究 [J]. *西北农林科技大学学报: 自然科学版*, 2006, 34(9):149-156
- [26] 陈锋, 左爱辉, 崔党群. 小麦籽粒多酚氧化酶及其控制基因研究进展 [J]. *麦类作物学报*, 2011, 31(4):780-785