DOI: 10.3724/SP.J.1006.2020.91063

宁麦 9 号与扬麦 158 株高及其构成因素的遗传解析

姜 朋 何 漪 张 旭 吴 磊 张平平 马鸿翔*

江苏省农业科学院 / 江苏省农业生物学重点实验室 / 江苏省现代作物生产协同创新中心, 江苏南京 210014

摘 要: 宁麦 9 号与扬麦 158 是我国长江中下游麦区的主栽品种和骨干亲本, 长江中下游麦区近 3 年来审定品种中 80% 都是其衍生后代, 研究其性状的遗传具有重要意义。以宁麦 9 号与扬麦 158 为亲本构建的包含 282 个家系的重组自交系群体为材料, 利用 Illumina 90k 芯片对群体进行基因型分析, 建立高密度遗传图谱。连续 3 个生长季对株高及节间长度、穗长等株高构成因素进行测定, 结合遗传图谱对株高及相关性状进行 QTL 定位, 获得 14 个控制株高及其构成因素的稳定表达位点。通过进一步位置比对, 聚焦到 6 个染色体区段, 初步明确了各节间对株高的遗传调控机制。同时, 将 6 个染色体区段中同源性较低的连锁标记转化为适用于高通量筛选的 KASP 标记, 利用 101 份区域试验材料进行标记效应验证, 结果显示聚合 *Qph-2D* 与 *Qph-5A.1* 两个位点具有较高的选择效率, 继续聚合 *Q2A* 后, 中选材料显著减少, 可能降低选择效率; 对 *Q2A* 与 *Q5A* 两个一因多效位点的选择建议以降低株高的等位变异为主; *Qd1-5D* 可作为穗下节间(D1)的选择标记对株高展开优化选择。期望以上结果能为长江中下游麦区的小麦株高遗传改良提供帮助。

关键词: 小麦; 宁麦 9 号; 扬麦 158; 株高; KASP 标记

Genetic analysis of plant height and its components for wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars Ningmai 9 and Yangmai 158

JIANG Peng, HE Yi, ZHANG Xu, WU Lei, ZHANG Ping-Ping, and MA Hong-Xiang*

Jiangsu Academy of Agricultural Sciences / Jiangsu Provincial Key Laboratory for Agrobiolgy / Jiangsu Collaborative Innovation Center for Modern Crop Production, Nanjing 210014, Jiangsu, China

Abstract: Ningmai 9 and Yangmai 158 are the main wheat cultivars and core parents in the middle and lower reaches of the Yangtze River in China. In the past three years, 80% of the released varieties in the middle and lower reaches of the Yangtze River had the background of Ningmai 9 or Yangmai 158. To make better use of these two parents, the genetic mechanism of their traits need to be further clarified. A high-density genetic map was constructed by Illumina 90k chip using 282 recombinant inbred lines (RILs) from the cross between Ningmai 9 and Yangmai 158. In this study, the traits including plant height, internode length, and spike length were determined in three consecutive growing seasons, and 14 stable QTLs were obtained by QTL mapping. By further position alignment, we focused on six chromosome intervals, which preliminarily revealed the genetic regulatory mechanism of the internode on plant height. KASP markers suitable for high-throughput analysis were developed based on the low-homology markers in the six chromosome intervals, and they were further validated in 101 wheat accessions. The polymerization of *Qph-2D* and *Qph-5A.1* had high selection efficiency which might be decreased if further intruding *Q2A*. It suggests that the selection of *Q2A* and *Q5A* should mainly focus on the alleles reducing plant height, and *Qd1-5D* could be used in marker-assisted selection for internode length below spike (D1). The results in this study may provide assistance for wheat height genetic improvement in the middle and lower reaches of the Yangtze River.

Keywords: wheat (*Triticum aestivum* L.); Ningmai 9; Yangmai 158; plant height; KASP marker

本研究由国家重点研发计划项目(2017YFD0100801), 国家现代农业产业技术体系建设专项(CARS-3)和国家自然科学基金项目(31671690)资助。

This study was supported by the National Key Project for the Research and Development of China (2017YFD0100801), the China Agriculture Research System (CARS-3), and the National Natural Science Foundation of China (31671690).

* 通信作者(Corresponding author): 马鸿翔, E-mail: hxma@jaas.ac.cn

第一作者联系方式: E-mail: hmjp2005@163.com

Received (收稿日期): 2019-10-15; Accepted (接受日期): 2020-01-15; Published online (网络出版日期): 2020-02-17.

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20200215.1946.004.html>

株高是小麦重要的农艺性状,影响植株的形态结构,并与田间群体产量密切相关。小麦矮秆基因的利用是绿色革命的重要组成部分,对现代小麦育种具有深远影响^[1]。经典遗传研究表明,小麦株高是一个复杂性状,由多个基因控制,存在主效基因,也有微效位点。迄今为止,已有25个*Rht*基因被命名^[2-4]。位于4B和4D染色体上的*Rht-B1*和*Rht-D1*基因,以及2D染色体上的*Rht8*基因在世界范围内广为应用,其相关分子标记已成功开发^[5-6]。此外,在小麦21条染色体上均检测到影响株高的QTL^[7-11]。McCartney等^[12]利用RL4452×‘AC’ Domain构建的DH群体对包括株高在内的多个农艺性状进行QTL分析,在2D、4B、4D、5B、7A和7B染色体检测到6个株高QTL,其中*QHt.crc-4B*和*QHt.crc-4D*的定位区间与*Rht-B1*和*Rht-D1*位置重合。Griffiths等^[13]利用4个DH群体进行了株高meta-QTL分析,在除3D、4A、5D及第7同源群外的15条染色体上找到16个meta-QTL。Liu等^[9]在5个生长阶段对小麦株高进行了跟踪调查,利用条件与非条件QTL作图方法进行分析,检测到8个条件QTL与9个非条件QTL。其中*QHt-4B-2*在2个时期被重复检测到,表型贡献率达13.42%~16.13%,此研究表明株高基因的表达具有一定的时空特异性。小麦株高是主穗长与各节间长的总和,但控制主穗长及各茎节间长的遗传位点对小麦株高的遗传贡献并不一致。Cui等^[14]利用条件QTL与非条件QTL相结合的分析方法在单个QTL水平揭示了株高与穗长及各节间长之间的关系,其中倒三节对株高影响最大。Zhang等^[15]测定了不同时期的各个节间长度,明确了5个稳定的株高QTL的表达模式及贡献率。

遗传连锁图为遗传定位、标记开发及候选基因发掘等提供了强有力的工具。近年来发展起来的SNP标记具有遗传稳定、数量多、分布广等特点,并且适于高通量检测,基于其开发的9k、90k、660k等基因型芯片集合了成千上万个SNP标记,不仅加快了小麦遗传图谱构建速度,也大大提高了小麦遗传图谱的密度^[16-18]。中国春小麦参考基因组序列的公布,有助于小麦遗传图谱质量的提高,并可直接基于目标区段进行候选基因预测^[19]。

长江中下游麦区是我国第二大麦区,同时也是我国最大的弱筋小麦产区,是我国小麦生产的重要组成部分。宁麦9号与扬麦158分别是由江苏省农

业科学院与江苏里下河地区农业科学研究所育成的高产优质抗病小麦品种,都曾经是生产上的主栽品种,具有较大的推广面积,而且目前仍是重要的骨干亲本,以此为基础育成了数十个小麦品种^[20-21]。宁麦9号的衍生品种宁麦13、扬辐麦4号等,扬麦158的衍生品种扬麦20等均已成为当前生产中的主栽品种及常用亲本。在生产中,宁麦9号株高一般在80~85 cm,扬麦158约为90~95 cm,呈现较大差异,明确其株高遗传机制对小麦育种工作具有重要的指导意义。本研究以来源于宁麦9号/扬麦158的282份重组自交系为材料,结合高密度遗传图谱,对株高及其构成开展QTL定位研究,以期对长江中下游麦区育种工作中的株高选择提供帮助。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以宁麦9号×扬麦158构建重组自交系(RIL)群体($F_{2:8}$),包括282个家系。宁麦9号是扬麦6号与日本西风小麦的杂交后代,前者具有骨干亲本南大2419与江东南的遗传背景;扬麦158来源于St1472/506与扬麦4号杂交组合,St1472/506是黄淮麦区的常用亲本,扬麦4号含有南大2419、胜利麦与阿夫等多个骨干亲本的遗传背景。宁麦9号与扬麦158株高及各节间长度、穗长等性状差异显著(图1)。通过Ellis等^[5]和Asplund等^[6]报道的分子标记确定宁麦9号与扬麦158均为*Rht-B1b/Rht-D1a*变异类型,均不含*Rht8*位点(图2),其株高差异可能来源于其他位点。

图1 宁麦9号与扬麦158的田间表现

Fig. 1 Field phenotype for Ningmai 9 and Yangmai 158

图 2 宁麦 9 号与扬麦 158 株高相关分子标记检测

Fig. 2 Molecular marker test of plant height for Ningmai 9 and Yangmai 158

a: 宁麦 9 号; b: 扬麦 158; M: marker.

a: Ningmai 9; b: Yangmai 158; M: marker.

1.2 田间试验及数据处理

2016—2017、2017—2018 和 2018—2019 连续 3 个生长季将 RIL 群体及其亲本种植于江苏省农业科学院六合基地, 为方便描述, 以收获年份 2017、2018 和 2019 分别表示 3 个环境。采用随机区组设计, 单行种植, 每行 60 粒, 行长 1.6 m, 行距 0.25 m, 2 次重复, 常规田间管理。

于小麦乳熟期从每个家系中取 10 个单茎, 从茎基部开始向上利用直尺测量每个节间-倒五节(The fifth internode from the top, D5)、倒四节(The fourth internode from the top, D4)、倒三节(The third internode from the top, D3)、倒二节(The second internode from the top, D2)、倒一节(The first internode from the top, D1)长度及穗长, 株高为各节间与穗长之和, 并计算平均值用于进一步统计分析。另同时测量 101 份 2018 国家及省区域试验材料的株高, 用于后续验证。

采用 Microsoft Excel 2016 进行表型初步统计与相关分析, 采用 SPSS 19.0 进行方差分析及 t 检测。依据 He 等^[22]的方法, 按 $h^2 = \delta_g^2 / (\delta_g^2 + \delta_{g \times y}^2 / y + \delta_e^2 / ry)$ 计算遗传力, 其中 δ_g^2 表示基因型方差, $\delta_{g \times y}^2$ 表示基因型与环境互作方差, δ_e^2 为误差, y 代表环境数目, r 代表重复数。

1.3 遗传图谱与 QTL 分析

采用 Illumina 90k 芯片获取基因型。遗传图谱覆盖 21 条染色体, 包含 41 个连锁群, 2285 个 bin 标记, 总长为 3022 cM^[23]。采用 QTL IciMapping 4.1 软件^[24]的完备区间作图法(inclusive composite interval mapping, ICIM)进行 QTL 定位^[25], 设 walking step 为 0.1 cM, LOD 阈值为 2.5。

1.4 KASP 标记的开发

根据 SNP 位点和侧翼序列设计 PCR 扩增引物,

开发 KASP 分子标记。设计每个标记 2 条 SNP 特异性引物(F1/F2)和一条通用引物(R), F1 尾部添加能够与 FAM 荧光结合的特异性序列, F2 尾部添加能够与 HEX 荧光结合的特异性序列。利用 Polymarker (<http://www.polymarker.info/>)设计 KASP 引物, 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

从 RILs 群体中随机挑选 46 份材料进行幼嫩叶片取样, 采用 CTAB 法^[25]提取基因组 DNA。KASP 反应总体积为 5 μ L, 包含 2 $\times$ KASP Master Mix 2.5 μ L、KASP Assay Mix (引物混合工作液) 0.07 μ L、浓度为 20 ng μ L⁻¹ 的模板 DNA 2.43 μ L。KASP 反应程序第一步为 94 $^{\circ}$ C, 15 min; 第二步为 94 $^{\circ}$ C, 20 s, 61~55 $^{\circ}$ C, 1 min, 每个循环降低 0.6 $^{\circ}$ C, 共进行 10 个循环; 第三步为 94 $^{\circ}$ C, 20 s, 55 $^{\circ}$ C, 1 min, 共进行 26 个循环, 在 LGC 公司为 Hydrocycler-16 水浴 PCR 仪中进行 PCR。通过 KASP 荧光分析仪(LGC 公司型号为 PHERAstar plus)扫描分析 PCR 结果。

2 结果与分析

2.1 株高及其构成因素的表型分析

在连续 3 年的调查中(表 1), 扬麦 158 的各节间长度、穗长及株高均高于宁麦 9 号, 其中 D5 与 D4 差异较小, 一般为 1~2 cm, D3、D2 与 D1 差异较大, 约为 2~3 cm, 穗长相差约 1 cm, 最终造成株高相差约 10 cm。在 RIL 群体中, 各节间长度、穗长及株高均呈现较大变异, D5 变异系数最大, 约 20%, 其余节间、穗长及株高变异系数在 10%左右, 最大株高与最小株高差异均超过 30 cm, 节间差距从 D5 的 5 cm 左右递增至 D1 的近 20 cm。从 D5 至 D1, 性状遗传力从 0.43 逐步增大至 0.83, 穗长与株高遗传力均超过 0.7。

表 1 株高及其构成因素的表型统计
Table 1 Phenotypic analysis for plant height and its components

性状 Trait	环境 Environment	宁麦 9 号 Ningmai 9 (cm)	扬麦 158 Yangmai 158 (cm)	重组自交系群体 RIL population					遗传力 Heritability
				最大值 Max (cm)	最小值 Min (cm)	平均值 Mean (cm)	标准差 SD	变异系数 CV(%)	
倒五节 D5	2017	4.71	5.64	8.72	2.92	5.83	1.06	18.14	0.43
	2018	4.39	5.66	10.15	3.49	5.84	1.06	18.17	
	2019	3.72	3.76	6.36	1.88	3.86	0.87	22.58	
倒四节 D4	2017	7.38	8.05	12.59	5.58	8.16	1.04	12.79	0.51
	2018	6.89	7.76	12.75	5.50	8.47	1.01	11.96	
	2019	5.28	6.78	10.63	4.93	7.04	0.92	13.10	
倒三节 D3	2017	8.43	10.08	15.84	8.50	11.28	1.31	11.62	0.61
	2018	11.56	13.80	18.87	9.09	13.05	1.56	11.92	
	2019	9.11	11.16	15.73	7.61	11.17	1.30	11.63	
倒二节 D2	2017	15.65	19.24	25.58	12.33	19.62	1.91	9.74	0.76
	2018	18.66	20.63	27.27	16.83	22.17	1.88	8.47	
	2019	17.40	21.34	26.21	15.66	21.11	1.82	8.60	
倒一节 D1	2017	26.28	28.99	38.16	20.04	29.40	2.97	10.11	0.83
	2018	29.83	32.31	42.63	23.87	32.43	2.82	8.70	
	2019	27.53	31.26	41.41	23.02	32.07	3.05	9.50	
穗长 Spike length	2017	9.85	10.43	12.37	6.50	9.49	0.89	9.40	0.72
	2018	8.14	9.11	10.78	5.97	8.73	0.88	10.03	
	2019	7.31	8.21	10.33	5.44	7.82	0.87	11.13	
株高 Plant height	2017	72.29	82.43	101.93	59.54	83.84	6.45	7.69	0.78
	2018	79.48	89.26	108.17	72.53	90.78	6.20	6.83	
	2019	70.35	82.51	102.62	64.25	83.07	6.11	7.36	

D5: the fifth internode from the top; D4: the fourth internode from the top; D3: the third internode from the top; D2: the second internode from the top; D1: the first internode from the top.

株高、穗长及各节间长度在不同基因型与不同年份间差异极显著，同时基因型与年份的互作对其也有极显著影响(表 2)。各节间长度间均呈极显著正

相关，而与穗长相关系数普遍较低。株高与各节间长度、穗长均呈极显著正相关，而同一节间在不同环境间亦呈现出良好的相关性(表 3)。

表 2 株高及其构成因素的方差分析(*F* 值)
Table 2 ANOVA for plant height and its components (*F*-value)

项目 Item	倒五节 D5	倒四节 D4	倒三节 D3	倒二节 D2	倒一节 D1	穗长 Spike length	株高 Plant height
基因型 Genotype	4.15**	7.08**	8.37**	18.23**	17.98**	13.91**	40.51**
环境 Environment	1009.08**	719.59**	783.47**	1205.13**	693.65**	1859.74**	2491.39**
基因型×环境 Genotype×Environment	2.35**	3.45**	3.25**	4.30**	3.06**	3.87**	8.81**

*和**分别表示 0.05 和 0.01 显著水平。
* and ** indicate significant difference at the 0.05 and 0.01 probability levels, respectively. Abbreviations are the same as those given in Table 1.

表 3 株高及其构成因素的相关分析
Table 3 Correlation analysis for plant height and its components

性状 Trait	环境 Environment	倒五节 D5	倒四节 D4	倒三节 D3	倒二节 D2	倒一节 D1	穗长 Spike length	株高 Plant height
倒五节 D5	2017	(0.266**)						
	2018	(0.294**)						
	2019	(0.049)						
倒四节 D4	2017	0.632**	(0.370**)					
	2018	0.551**	(0.400**)					
	2019	0.714**	(0.070)					
倒三节 D3	2017	0.546**	0.631**	(0.347**)				
	2018	0.466**	0.697**	(0.500**)				
	2019	0.531**	0.803**	(0.268**)				
倒二节 D2	2017	0.388**	0.510**	0.637**	(0.506**)			
	2018	0.285**	0.487**	0.549**	(0.639**)			
	2019	0.219**	0.452**	0.570**	(0.459**)			
倒一节 D1	2017	0.242**	0.277**	0.309**	0.471**	(0.616**)		
	2018	0.163**	0.320**	0.184**	0.524**	(0.733**)		
	2019	0.057	0.190**	0.198**	0.618**	(0.512**)		
穗长 Spike length	2017	0.026	0.055	0.059	0.169**	0.157**	(0.467**)	
	2018	-0.058	-0.042	-0.171**	0.105	0.187**	(0.524**)	
	2019	0.222**	0.125*	-0.015	0.067	0.118*	(0.326**)	
株高 Plant height	2017	0.610**	0.683**	0.737**	0.815**	0.771**	0.287**	(0.533**)
	2018	0.531**	0.719**	0.670**	0.821**	0.765**	0.199**	(0.689**)
	2019	0.490**	0.673**	0.678**	0.840**	0.784**	0.267**	(0.456**)

*和**分别表示 0.05 和 0.01 显著水平; 对角线上括号内数字为同一性状不同环境间的相关系数, 2017 为 2017 年度与 2018 年度间相关系数, 2018 为 2018 年度与 2019 年度间相关系数, 2019 为 2019 年度与 2017 年度间相关系数。
* and ** indicate significant difference at the 0.05 and 0.01 probability levels, respectively. The figures in brackets on the diagonal line indicate correlation coefficients between the same traits in different environments. The correlation coefficients between 2017 and 2018 are put in the line of 2017, and those between 2018 and 2019, 2019 and 2017 are put in lines of 2018 and 2019, respectively. Abbreviations are the same as those given in Table 1.

2.2 株高及其构成因素的 QTL 分析

综合 3 个环境表型数据, 利用完备区间作图法共鉴定到 96 个 QTL, 分布在 18 条染色体上, 表型贡献率为 1.72%~12.32%。其中, D5 至 D1 分别检测到 7、14、17、13 和 13 个 QTL, 与穗长相关的 QTL 有 11 个, 控制最终株高的 QTL 有 21 个。进一步对这些 QTL 比较分析, 最终在 2A、2D、5A、5D、7A 等 5 条染色体上获得 14 个多环境表达的稳定 QTL (图 2 和表 4)。其中, 控制 D5、D4 及 D3 长度的 QTL 均为 1 个, 控制 D2 与 D1 均为 3 个, 而控制株高的为 5 个, 没有检测到与穗长相关的稳定 QTL。

通过位置比对发现, *Qd5-5A*、*Qd4-5A*、*Qd3-5A*、*Qd2-5A*、*Qd1-5A* 和 *Qph-5A.2* 遗传位置接近或重合, 很可能为 1 个—因多效 QTL, 同时控制多个节间的长度。*Qd2-2A*、*Qd1-2A* 与 *Qph-2A*, *Qd2-7A* 与 *Qph-7A*,

均是相同的情况。为方便描述, 将 *Qd5-5A*/*Qd4-5A*/*Qd3-5A*/*Qd2-5A*/*Qd1-5A*/*Qph-5A.2*、*Qd2-2A*/*Qd1-2A*/*Qph-2A* 与 *Qd2-7A*/*Qph-7A* 分别简写为 *Q5A*、*Q2A* 与 *Q7A*。除此 3 个 QTL 外, *Qph-2D* 对 D1 具有调节作用, *Qph-5A.1* 同时对 D4 与 D3 产生影响。以株高及各节间长度减少定义其加性效应, 这 3 个位点对应多个性状的加性效应表现一致, *Q5A* 的加性效应来源于扬麦 158, 而 *Q2A* 与 *Q7A* 的加性效应来源于宁麦 9 号。此外, *Qph-2D* 加性效应来源于宁麦 9 号, *Qph-5A.1* 与 *Qd1-5D* 加性效应来源于扬麦 158。

2.3 KASP 标记开发

根据定位结果, 我们最终获得 6 个株高及其构成因素控制区段(图 3), 每个区段内含有多个 SNP 标记, 选择其中序列同源性较低的标记进行 KASP 标记开发, 最终将 IAAV880 (*Q2A*)、IACX9152

表 4 株高及其构成因素的 QTL 定位
Table 4 QTL analysis for plant height and its components

序号 No.	QTL	遗传位置 Genetic position	区间 Interval	2017			2018			2019		
				LOD	表型贡献率 PVE (%)	加性效应 ^a AE ^a	LOD	表型贡献率 PVE (%)	加性效应 AE	LOD	表型贡献率 PVE (%)	加性效应 AE
1	<i>Qd5-5A</i>	52.35-55.75	wsnp_Ex_rep_c104539_89224552-RFL_Contig4162_1285	5.90	8.89	0.31	3.11	4.69	0.24			
2	<i>Qd4-5A</i>	52.35-56.55	wsnp_Ex_rep_c104539_89224552-RAC875_c103967_76	4.22	7.66	0.26	4.40	2.73	0.24			
3	<i>Qd3-5A</i>	52.45-59.75	wsnp_Ex_c49211_53875575-BS00000365_51	6.90	7.89	0.39	4.23	5.18	0.38	4.73	5.25	0.32
4	<i>Qd2-2A</i>	109.15-112.05	Tdurum_contig61938_424-wsnp_Ex_c3695_6740339	3.97	5.93	-0.46	3.34	4.26	-0.39			
5	<i>Qd2-5A</i>	55.85-59.25	BS00096758_51-BS00098207_51	6.58	9.97	0.58	7.50	10.18	0.60			
6	<i>Qd2-7A</i>	49.55-51.95	RAC875_c16624_970-wsnp_Ex_c14009_21899923	4.10	6.13	-0.48	8.13	11.05	-0.62	5.30	6.13	-0.49
7	<i>Qd1-2A</i>	109.35-110.25	Tdurum_contig61938_424-IAAV880	4.74	6.53	-0.79	3.65	5.51	-0.63	6.22	9.29	-0.89
8	<i>Qd1-5A</i>	56.95-58.55	RAC875_c103967_76-BS00098207_51				3.46	5.20	0.60	3.51	5.38	0.66
9	<i>Qd1-5D</i>	9.35-13.85	Kukri_c14878_97-Kukri_c7786_81	3.57	4.87	0.67	3.92	5.90	0.64	2.96	4.30	0.59
10	<i>Qph-2A</i>	109.35-110.55	Tdurum_contig61938_424-IAAV880	4.65	5.79	-1.56	3.03	3.45	-1.26			
11	<i>Qph-2D</i>	15.55-29.65	BS00022211_51-RAC875_c173_905	3.16	3.99	-1.25				4.48	4.88	-1.45
12	<i>Qph-5A.1</i>	18.85-26.55	wsnp_Ex_c12440_19836844-Ex_c6161_335	3.07	3.76	1.21				2.99	2.84	1.08
13	<i>Qph-5A.2</i>	52.65-59.75	wsnp_Ex_c49211_53875575-BS00000365_51	6.49	8.24	1.79	7.34	9.53	2.03	6.35	6.38	1.67
14	<i>Qph-7A</i>	43.45-52.05	Ex_c6196_971-wsnp_Ex_c14009_21899923				7.09	8.94	-2.02	5.45	5.57	-1.62

^a 正效应与负效应分别表示来源于宁麦 9 号和扬麦 158。

^a Positive effect and negative effect were contributed by Ningmai 9 and Yangmai 158, respectively. PVE: phenotypic variance explained; AE: additive effect.

图 3 株高及其构成因素的 QTL 定位
Fig. 3 QTL mapping for plant height and its components
图中数字与表 4 中 QTL 的序号一致。
The numbers in the figure are consistent with the sequence numbers of QTL in Table 4.

(*Qph-2D*)、BobWhite_c1796_701 (*Qph-5A.1*)、BS00098207_51 (*Q5A*)、Kukri_c7786_81 (*Qd1-5D*) 与 wsnp_JD_c6050_7214383 (*Q7A*)等成功转化(表 5 和图 4)。

2.4 KASP 标记的验证

为检测已开发 KASP 标记的功效, 利用 101 份 2018 国家及省区域试验材料进行验证。结果显示, 除 *Q5A* 与 *Qd1-5D* 外, 其他 4 个标记的加性效应与定位结果一致(表 6)。对于 *Q5A* 与 *Q7A* 位点, 仅有不到 10%的检测材料中含有宁麦 9 号等位变异, 这可能影响统计检测结果的准确性; 而 *Qd1-5D* 主要调控 D1 长度, 对最终株高影响不显著。在其他 3 个位点中, *Qph-2D* 对株高有显著影响, 可产生近 2 cm

表 5 株高及其构成因素的 KASP 标记序列
Table 5 Sequence of KASP markers for plant height and its components

标记 Marker	QTL	SNP	F1	F2	R
IAAV880	<i>Q2A</i>	T/C	ccAgaacgcagtgagagtT	ccAgaacgcagtgagagtC	tgacagcgggagcttagG
IACX9152	<i>Qph-2D</i>	T/C	aacagagtetcaGtctctccA	aacagagtetcaGtctctccG	gcctgtCattctcttttcttAtCtT
BobWhite_c1796_701	<i>Qph-5A.1</i>	T/G	ggccccggatccaaaatcT	ggccccggatccaaaatcG	acggagcaaaagtggcttctgt
BS00098207_51	<i>Q5A</i>	T/C	ccaagcttcccgtagaT	ccaagcttcccgtagaC	gccatgatgtTCTgaactctcT
Kukri_c7786_81	<i>Qd1-5D</i>	T/C	catcaccttgatctcttcctcA	catcaccttgatctcttcctcG	ggttctttgttttgagaagagagG
wsnp_JD_c6050_7214383	<i>Q7A</i>	A/G	GtCgttcacctaacagtacT	GtCgttcacctaacagtacC	gCtgaatcagaagaatgcacagA

F1、F2 为 SNP 特异性引物, F1 尾部添加能够与 FAM 荧光结合的特异性序列, F2 尾部添加能够与 HEX 荧光结合的特异性序列; R 为通用引物。

F1 and F2 are the specific primers for the SNP, specific sequence with FAM binding fluorescence is added to the end of F1, and that with HEX binding fluorescence is added to the end of F2; R is common primer.

图 4 株高及其构成因素的 KASP 标记开发
Fig. 4 Development of KASP markers for plant height and its components
A 表示宁麦 9 号等位变异类型, B 表示扬麦 158 等位变异类型。
A indicates the allele of Ningmai 9 and B indicates the allele of Yangmai 158.

表 6 区域试验材料中不同等位变异的 *t*-检测
Table 6 *t*-test of different alleles in the materials from regional test

	<i>Q2A</i>	<i>Qph-2D</i>	<i>Qph-5A.1</i>	<i>Q5A</i>	<i>Qd1-5D</i>	<i>Q7A</i>
宁麦 9 号等位变异 Ningmai 9 allele (cm)	87.82 (79)	87.08 (53)	88.53 (57)	86.44 (9)	87.75 (40)	86.50 (2)
扬麦 158 等位变异 Yangmai 158 allele (cm)	88.41 (22)	88.92 (48)	87.20 (44)	88.10 (92)	88.08 (61)	87.98 (99)
差值 Difference (cm)	0.59	1.84	1.32	1.65	0.33	1.48
<i>t</i> 值 <i>t</i> -value	-0.54	2.08	1.47	-1.05	0.36	0.46
<i>P</i> 值 <i>P</i> -value	0.59	0.04*	0.15	0.30	0.72	0.65

* 表示 0.05 显著水平; 括号中数字表示携带相应等位变异的材料数量。
* indicates significant difference at the 0.05 probability level. The figures in brackets indicate the number of the materials with corresponding alleles.

的株高差异, *Q2A*、*Qph-5A.1* 分别产生 0.59 cm、1.32 cm 的差异, 但未达到显著水平。
按照差异大小逐步分析几个位点的聚合效应发现, 当聚合 *Qph-2D* 与 *Qph-5A.1* 位点时, 株高可相差 4 cm, 进一步聚合 *Q2A* 后, 差异超过 10 cm, 但材料数量急剧减少, 从降低株高的角度出发, 结合 *Qph-2D* 与 *Qph-5A.1* 较单一分子标记选择更加有效, 当聚合更多标记后, 株高降低不显著, 而入选材料有所减少, 选择效率降低。

表 7 QTL 聚合的效应分析
Table 7 Effect of QTL polymerization

	<i>Qph-2D+Qph-5A.1</i>	<i>Qph-2D+Qph-5A.1+Q2A</i>
株高+ Plant height+ (cm)	89.64 (22)	95.50 (2)
株高- Plant height- (cm)	85.61 (18)	84.85 (14)
差值 Difference (cm)	4.03	10.65
<i>t</i> 值 <i>t</i> -value	2.45	2.21
<i>P</i> 值 <i>P</i> -value	0.02*	0.04*

“+”表示增加株高的等位变异组合, “-”表示降低株高的等位变异组合; *表示 0.05 显著水平; 括号中数字表示携带相应等位变异的材料数量。
“+” indicates the combination of the alleles which increase plant height, and “-” indicates the combination of the alleles which reduce plant height; * indicates significant difference at the 0.05 probability level; the figures in brackets indicate the number of the materials with corresponding alleles.

3 讨论

宁麦 9 号与扬麦 158 分别于 1997 年和 1993 年通过品种审定, 育成后均在生产上大面积种植, 为长江中下游麦区乃至全国具有重大影响力的品种。扬麦 158 适应性广, 且具有良好的农艺性状和较好的赤霉病抗性^[27], 宁麦 9 号具有突出的弱筋小麦品质, 且多花多粒、结实性高、丰产性好, 还是我国小麦栽培品种赤霉病抗性 QTL-*Fhb1* 的主要供体^[28]。这 2 个品种已经育成超过 20 年, 在生产中已被后代品种替代, 但它们目前仍被作为杂交亲本应用于小麦育种。当前小麦生产中大面积推广的宁麦 13、扬辐麦 4 号、扬麦 20 等均为宁麦 9 号或扬麦 158 的衍生后代。据统计, 近 3 年江苏省淮南麦区与国家长江中下游麦区通过审定的小麦品种中, 超过 80% 是宁麦 9 号或扬麦 158 的衍生后代([http://www.jsseed.](http://www.jsseed.cn/)

<http://www.moa.gov.cn/>)。此外, 作为我国小麦品种中 *Fhb1* 的主要来源, 宁麦 9 号已被引入其他麦区作为赤霉病抗性亲本加以利用^[29]; 轮选 16、轮选 66 及轮选 166 等国家黄淮南片麦区的审定品种均含有扬麦 158 的遗传背景。鉴于此, 针对其重要农艺性状开展遗传研究对更好地在育种中利用这 2 个材料具实践意义。
宁麦 9 号与扬麦 158 株高差异较大。本研究显示扬麦 158 各节间长度与穗长均大于宁麦 9 号, 同时遗传因素在株高及其构成因素中占主导作用, 与前人研究结果一致^[30-31]。我们通过分子标记检测确定宁麦 9 号与扬麦 158 均为 *Rht-B1b/Rht-D1a* 变异类型, 均不含 *Rht8* 位点。对遗传定位结果比对分析, 最终将影响株高的 QTL 聚焦到 6 个染色体区段。通过物理位置比对, *Qph-2D* 位于 2D 染色体短臂中部, 与

位于 2D 染色体短臂末端的 *Rht8*^[32]相距较远,而与 Wang 等^[33]利用条件与非条件 QTL 作图检测到的 *QPh.cgb-2D.1* 接近。梁子英等^[34]在 5A 染色体 *barc165–barc180* 区段检测到株高、D4 与 D5 的控制位点,其位置与 *Qph-5A.1* 基本重合,而 *Qph-5A.1* 在 2019 环境中与 D4、D3 也表现相关。*Q5A* 位于 5A 染色体长臂,与 *Rht9* 的关联标记 *barc151* 位置接近,并且 *Rht9* 来源于日本小麦品种,而 *Q5A* 亦来源于含有日本西风小麦血统的宁麦 9 号,推测可能为同一位点^[32]。*Rht23* 位于 5D 染色体,其连锁标记 *Xgdm63*、*Xbarc110* 均与 *Qd1-5D* 相近,但由于 5D 染色体标记较少,覆盖度不足,是否为同一位点有待进一步验证^[32]。前人在 2A 染色体上鉴定到多个株高控制位点^[10,33–34],但与 *Q2A* 均相距较远。Peng 等^[35]在 7A 染色体短臂末端 *Xgwm471–Xgwm350* 区间定位到 *Rht22*,而 *Q7A* 位于 7A 染色体短臂中部,可能为不同的位点。

在小麦育种中,一般将株高较低的基因型作为优势等位变异。*Q5A* 与 *Q7A* 在 101 份区域试验材料中呈现较强的选择效应,多数材料在 *Q5A* 位点处呈现来源于扬麦 158 的优势等位变异,*Q5A* 与所有节间长度都有关,可能为一个非常重要的选择位点,并且很可能经历过早期选择,使其在高代材料中分布频率较低;针对此位点,今后可在低代材料中进行验证,并同时构建次级分离群体,为进一步精细定位奠定基础。通过比较基因组学分析发现,*Q7A* 附近区域为许多小麦重要农艺、抗性、品质性状控制位点的热点聚集区,包括开花期、叶枯病、黄色素含量等^[36–39],对其中某些性状的定向选择促使某种基因型被大量保留,最终导致 *Q7A* 呈现大量的非优势等位变异。

各节间长度与不同的农艺性状具有一定的相关性^[40–41],特别是植株抗倒性,研究表明矮秆、D5 较短、D1 较长的植株有利于协调高产与抗倒性^[42]。本研究显示 *Q2A* 同时调控 D1 与株高,*Q5A* 同时调控 D5、D1 与株高,且其对应各性状的加性效应来源一致,无法通过这 2 个位点实现 D1 与 D5、株高的差异化选择。前述 *Q5A* 在多数区域试验材料中呈现来源于扬麦 158 的降低株高、缩短各节间长度的等位变异,*Q2A* 也是多数保留了来源于宁麦 9 号的降低株高的等位变异,表明育种家在株高选择中仍以整株株高为主要选择目标,未考虑各节间的差异性选择,

在选择方向上对这 2 个一因多效位点的选择以降低株高的等位变异为主。*Qd1-5D* 仅控制 D1 长度,且对整体株高影响不大(表 4 和表 6),可作为 D1 的选择标记。

4 结论

共定位到 6 个株高控制区段,并成功转化为适用于大规模筛选的 KASP 标记,经过初步验证,聚合 *Qph-2D*、*Qph-5A.1* 标记对整体株高具有较高的选择效率;继续聚合 *Q2A* 后,中选材料显著减少,可能降低选择效率,而对 *Q5A* 需要在早期育种材料进一步验证,并且对 *Q2A* 与 *Q5A* 一因多效位点的选择建议以降低株高的等位变异为主;*Qd1-5D* 可作为 D1 的选择标记对株高进行优化选择。

References

- [1] Hedden P. The genes of the green revolution. *Trends Genet*, 2003, 19: 5–9.
- [2] Mo Y, Vanzetti L S, Hale I, Spagnolo E J, Guidobaldi F, Al-Oboudi J, Odle N, Pearce S, Helguera M, Dubcovsky J. Identification and characterization of *Rht25*, a locus on chromosome arm 6AS affecting wheat plant height, heading time, and spike development. *Theor Appl Genet*, 2018, 131: 2021–2035.
- [3] Tian X, Wen W, Xie L, Fu L, Xu D, Fu C, Wang D, Chen X, Xia X, Chen Q, He Z, Cao S. Molecular mapping of reduced plant height gene *Rht24* in bread wheat. *Front Plant Sci*, 2017, <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01379>.
- [4] McIntosh R A, Dubcovsky J, Rogers W J, Morris C, Xia X C. Catalogue of gene symbols for wheat: 2017 supplement. <https://shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes/macgene/supplement2017.pdf>. Accessed 17 Feb 2018.
- [5] Ellis M, Spielmeier W, Gale K, Rebetzke G, Richards R. “Perfect” markers for the *Rht-B1b* and *Rht-D1b* dwarfing genes in wheat. *Theor Appl Genet*, 2002, 105: 1038–1042.
- [6] Asplund L, Leino M W, Hagenblad J. Allelic variation at the *Rht8* locus in a 19th century wheat collection. *Sci World J*, 2012, 2012: 385610.
- [7] Börner A, Schumann E, Fürste A, Cöster H, Leithold B, Röder S, Weber E. Mapping of quantitative trait loci determining agronomic important characters in hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor Appl Genet*, 2002, 105: 921–936.
- [8] Peng J, Yefim R, Tzion F, RiDer M S, Youchun L, Eviatar N, Abraham K. Domestication quantitative trait loci in *Triticum dicoccoides*, the progenitor of wheat. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 2489–2494.
- [9] Liu G, Xu S B, Ni Z F, Xie C J, Qin D D, Li J, Lu L H, Zhang J P, Peng H R, Sun Q X. Molecular dissection of plant height QTLs using recombinant inbred lines from hybrids between common wheat (*Triticum aestivum* L.) and spelt wheat (*Triticum spelta* L.). *Chin Sci Bull*, 2011, 56: 1897–1903.
- [10] Griffiths S, Simmonds J, Leverington M, Wang Y, Fish L, Sayers L, Alibert L, Orford S, Wingen L, Snape J. Meta-QTL analysis of

- the genetic control of crop height in elite European winter wheat germplasm. *Mol Breed*, 2012, 29: 159–171.
- [11] Tobias W, Langer S M, Longin C F H. Genetic control of plant height in European winter wheat cultivars. *Theor Appl Genet*, 2015, 128: 865–874.
- [12] McCartney C A, Somers D J, Humphreys D G, Lukow O, Ames N, Noll J, Cloutier S, McCallum B D. Mapping quantitative trait loci controlling agronomic traits in the spring wheat cross R14452x 'AC Domain'. *Genome*, 2005, 48: 870.
- [13] Griffiths S, Simmonds J, Leverington M, Wang Y, Fish L, Sayers L, Alibert L, Orford S, Wingen L, Herry L, Faure S, Laurie D, Bilham L, Snape J. Meta-QTL analysis of the genetic control of ear emergence in elite European winter wheat germplasm. *Theor Appl Genet*, 2009, 119: 383–395.
- [14] Cui F, Li J, Ding A, Zhao C, Wang L, Wang X, Li S, Bao Y, Li X, Feng D, Kong L, Wang H. Conditional QTL mapping for plant height with respect to the length of the spike and internode in two mapping populations of wheat. *Theor Appl Genet*, 2011, 122: 1517–1536.
- [15] Zhang N, Fan X, Cui F, Zhao C, Zhang W, Zhao X, Yang L, Pan R, Chen M, Han J. Characterization of the temporal and spatial expression of wheat (*Triticum aestivum* L.) plant height at the QTL level and their influence on yield-related traits. *Theor Appl Genet*, 2017, 130: 1235–1252.
- [16] Cavanagh C R, Shiaoman C, Shichen W, Bevan Emma H, Stuart S, Seifollah K, Kerrie F, Cyrille S, Brown-Guedira G L, Alina A. Genome-wide comparative diversity uncovers multiple targets of selection for improvement in hexaploid wheat landraces and cultivars. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110: 8057–8062.
- [17] Wang S, Wong D, Forrest K, Allen A, Chao S, Huang B E, Maccaferri M, Salvi S, Milner S G, Cattivelli L. Characterization of polyploid wheat genomic diversity using a high-density 90,000 single nucleotide polymorphism array. *Plant Biotechnol J*, 2014, 12: 787–796.
- [18] Cui F, Zhang N, Fan X, Zhang W, Zhao C, Yang L, Pan R, Chen M, Han J, Zhao X. Utilization of a wheat660k SNP array-derived high-density genetic map for high-resolution mapping of a major QTL for kernel number. *Sci Rep*, 2017, 7: 3788.
- [19] Consortium T I W G S. Shifting the limits in wheat research and breeding using a fully annotated reference genome. *Science*, 2018, 361: eaar7191.
- [20] 张晓, 张伯桥, 江伟, 吕国锋, 张晓祥, 李曼, 高德荣. 扬麦系列品种品质性状相关基因的分子检测. *中国农业科学*, 2015, 48: 3779–3793.
- Zhang X, Zhang B Q, Jiang W, Lyu G F, Zhang X X, Li M, Gao D R. Molecular detection for quality traits-related genes in Yangmai series wheat cultivars. *Sci Agric Sin*, 2015, 48: 3779–3793 (in Chinese with English abstract).
- [21] Jiang P, Zhang P P, Zhang X, Ma H X. Genetic contribution of Ningmai 9 wheat to its derivatives evaluated by using SNP markers. *Int J Genomics*, 2016, 2016: 3602986.
- [22] He X, Lillemo M, Shi J, Wu J, Bjørnstad Å, Belova T, Dreisgacker S, Duveiller E, Singh P. QTL characterization of *Fusarium* head blight resistance in CIMMYT bread wheat line Soru#1. *PLoS One*, 2016, 11: e0158052.
- [23] Jiang P, Zhang X, Wu L, He Y, Zhuang W, Cheng X, Ge W, Ma H, Kong L. A novel QTL on chromosome 5AL of Yangmai 158 increases resistance to *Fusarium* head blight in wheat. *Plant Pathol*, 2020, 69: 249–258.
- [24] Meng L, Li H H, Zhang L Y, Wang J K. QTL IciMapping: integrated software for genetic linkage map construction and quantitative trait locus mapping in biparental populations. *Crop J*, 2015, 3: 269–283.
- [25] Li H, Ye G, Wang J. A modified algorithm for the improvement of composite interval mapping. *Genetics*, 2007, 175: 361–374.
- [26] Saghai-Maroo 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.
- [27] 程顺和, 张勇, 张伯桥, 高德荣, 吴宏亚, 陆成彬, 吕国锋, 王朝顺. 小麦抗赤霉病育种 2 条技术路线的探讨. *扬州大学学报 (农业与生命科学版)*, 2003, 24: 59–62.
- Cheng S H, Zhang Y, Zhang B Q, Gao D R, Wu H Y, Lu C B, Lyu G F, Wang C S. Discussion of two ways of breeding scab resistance in wheat. *J Yangzhou Univ (Agric & Life Sci)*, 2003, 24: 59–62 (in Chinese with English abstract).
- [28] 朱展望, 徐登安, 程顺和, 高春保, 夏先春, 郝元峰, 何中虎. 中国小麦品种抗赤霉病基因 *Fhb1* 的鉴定与溯源. *作物学报*, 2018, 44: 473–482.
- Zhu Z W, Xu D A, Cheng S H, Gao C B, Xia X C, Hao Y F, He Z H. Characterization of *Fusarium* head blight resistance gene *Fhb1* and its putative ancestor in Chinese wheat germplasm. *Acta Agron Sin*, 2018, 44: 473–482 (in Chinese with English abstract).
- [29] 张宏军, 宿振起, 柏贵华, 张旭, 马鸿翔, 李腾, 邓云, 买春艳, 于立强, 刘宏伟, 杨丽, 李洪杰, 周阳. 利用 *Fhb1* 基因功能标记选择提高黄淮冬麦区小麦品种对赤霉病的抗性. *作物学报*, 2018, 44: 505–511.
- Zhang H J, Su Z Q, Bai G H, Zhang X, Ma H X, Li T, Deng Y, Mai C Y, Yu L Q, Liu H W. Improvement of resistance of wheat cultivars to *Fusarium* head blight in the Yellow-Huai rivers valley winter wheat zone with functional marker selection of *Fhb1* gene. *Acta Agron Sin*, 2018, 44: 505–511 (in Chinese with English abstract).
- [30] 陈广凤, 陈建省, 田纪春. 小麦株高相关性状与 SNP 标记全基因组关联分析. *作物学报*, 2015, 41: 1500–1509.
- Chen G F, Chen J S, Tian J C. Genome-wide association analysis between SNP markers and plant height related traits in wheat. *Acta Agron Sin*, 2015, 41: 1500–1509 (in Chinese with English abstract).
- [31] 武炳瑾, 冯洁, 崔紫霞, 张传量, 孙道杰. 利用 90k 基因芯片进行小麦株高 QTL 分析. *麦类作物学报*, 2017, 5: 578–584.
- Wu B J, Feng J, Cui Z X, Zhang C L, Sun D J. QTL analysis of plant height by using 90k chip technology. *J Triticeae Crop*, 2017, 5: 578–584 (in Chinese with English abstract).
- [32] Ellis M H, Rebetzke G J, Azanza F, Richards R A, Spielmeier W. Molecular mapping of gibberellin-responsive dwarfing genes in bread wheat. *Theor Appl Genet*, 2005, 111: 423–430.
- [33] Wang Z H, Wu X S, Ren Q, Chang X P, Li R Z, Jing R L. QTL mapping for developmental behavior of plant height in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Euphytica*, 2010, 174: 447–458.
- [34] 梁子英, 李美霞, 王竹林, 沈玮因, 奚亚军, 孙凤丽, 刘曙东. 小麦株高相关性状的 QTL 分析. *西北农业学报*, 2014, 23:

- 64–72.
Liang Z Y, Li M X, Wang Z L, Shen W N, Xi Y J, Sun F L, Liu S D. Mapping quantitative trait loci for plant height related characteristics in wheat. *Acta Agric Boreali-Occident Sin*, 2014, 23: 64–72 (in Chinese with English abstract).
- [35] Peng Z S, Li X, Yang Z J, Liao M L. A new reduced height gene found in the tetraploid semi-dwarf wheat landrace Aiganfanmai. *Genet Mol Res*, 2011, 10: 2349.
- [36] Roncallo P F, Cervigni G L, Jensen C, Miranda R, Carrera A D, Helguera M, Echenique V. QTL analysis of main and epistatic effects for flour color traits in durum wheat. *Euphytica*, 2012, 185: 77–92.
- [37] Kamran A, Iqbal M, Spaner D. Flowering time in wheat (*Triticum aestivum* L.): a key factor for global adaptability. *Euphytica*, 2014, 197: 1–26.
- [38] Botwright Acuña T L, Rebetzke G J, He X, Maynol E, Wade L J. Mapping quantitative trait loci associated with root penetration ability of wheat in contrasting environments. *Mol Breed*, 2014, 34: 631–642.
- [39] Dreisigacker S, Wang X, Martinez Cisneros B A, Jing R, Singh P K. Adult-plant resistance to *Septoria tritici* blotch in hexaploid spring wheat. *Theor Appl Genet*, 2015, 128: 2317–2329.
- [40] Kelbert A J, Spaner D, Briggs K G, King J R. The association of culm anatomy with lodging susceptibility in modern spring wheat genotypes. *Euphytica*, 2004, 136: 211–221.
- [41] 朱新开, 郭文善, 李春燕, 封超年, 彭永欣. 小麦株高及其构成指数与产量及品质的相关性. 麦类作物学报, 2009, 29: 1034–1038.
Zhu X K, Guo W S, Li C Y, Feng C N, Peng Y X. Relationship of plant height component indexes with grain yield and quality in wheat. *J Triticeae Crop*, 2009, 29: 1034–1038 (in Chinese with English abstract).
- [42] 朱新开, 王祥菊, 郭凯泉, 郭文善, 封超年, 彭永欣. 小麦倒伏的茎秆特征及对产量与品质的影响. 麦类作物学报, 2006, 26: 87–92.
Zhu X K, Wang X J, Guo K Q, Guo W S, Feng C N, Peng Y X. Stem characteristics of wheat with stem lodging and effects of lodging on grain yield and quality. *J Triticeae Crop*, 2006, 26: 87–92 (in Chinese with English abstract).