

抗大麦黄矮病毒小麦-中间偃麦草二体异代换系的选育和细胞、生化、分子生物学鉴定

唐顺学¹ 李义文¹ 梁辉¹ 曲乐庆¹ 白建荣¹ 贾双娥¹
魏晓丽¹ 李振声¹ 贾旭^{1*} B. FRIEBE²

(1. 中国科学院遗传研究所植物细胞与染色体工程国家重点实验室, 北京 100101;

2. Department of Pathology, Kansas University, Manhattan KS 66506-5501, USA)

摘要: 结合花药培养和常规选育, 从 77-5433 × 中 5 杂交组合后代中选育出 6 个抗大麦黄矮病毒(barley yellow dwarf virus, BYDV) 染色体数目为 42 的小麦(*Triticum aestivum* L.) 新种质, 并用减数分裂配对分析、单体小麦测交法、基因组原位杂交、C 分带、同工酶等电聚焦和 RAPD 对上述材料进行了综合鉴定; 表明这些材料都是小麦-中间偃麦草(*Agropyron intermedium* Garten) 二体异代换系, 其抗病性来自其携带的一对中间偃麦草染色体(来源于中 5)。

关键词: 中 5; BYDV 抗病种质; 二体异代换系; 细胞、生化、分子生物学鉴定

中图分类号: S332 文献标识码: A 文章编号: 0577-7496(2000)09-0952-05

Creation and Cytological, Biochemical, Molecular Identification of Alien Disomic Substitution Lines with BYDV-resistance from *Triticum aestivum*-*Agropyron intermedium* Hybrids

TANG Shun-Xue¹, LI Yi-Wen¹, LIANG Hui¹, QU Le-Qing¹, BAI Jian-Rong¹, JIA Shuang-E¹,
WEI Xiao-Li¹, LI Zhen-Sheng¹, JIA Xu^{1*}, B. FRIEBE²

(1. State Key Laboratory of Plant Cell and Chromosome Engineering, Institute of Genetics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;

2. Department of Pathology, Kansas University, Manhattan KS 66506-5501, USA)

Abstract: By the method of combined anther culture and conventional selection, six new BYDV (barley yellow dwarf virus)-resistant wheat germplasms ($2n = 42$) were obtained from the crosses between common wheat cv. 77-5433 and Zhong 5, a partial *Triticum aestivum*-*Agropyron intermedium* amphiploid. The six germplasms were comprehensively identified by meiosis pairing analysis, testing cross analysis using monosomic analysis, C-banding, isoelectrofocusing (IEF) of isoenzyme and RAPD analyses. The results indicated that all the germplasms were alien substitution lines carrying resistant genes originated from Zhong 5.

Key words: Zhong 5; BYDV-resistant germplasms; alien disomic substitution lines; cytological, biochemical, and molecular identification

由大麦黄矮病毒 (barley yellow dwarf virus, BYDV) 引起的小麦黄矮病在世界各地不断发生, 造成很大的经济损失, 被称为小麦的“黄色瘟疫”^[1]。防治 BYDV 最经济、最安全、最有效的措施是选育抗 BYDV 小麦新品种^[2]。直到现在, 在普通小麦品种中仍未发现能抵抗这种病害的抗性基因^[2], 通过小麦品种间杂交选育抗 BYDV 的小麦品种难见成效。相反, 在小麦野生近缘种属中却存在丰富的优良抗源^[3], 因此通过属间远缘杂交创造小麦抗 BYDV 种质是培育抗 BYDV 品种的必由之路和基础。中间

偃麦草以其与小麦的易杂交性和在小麦背景下的稳定抗性成为 BYDV 的优良抗源。法国 Y. Cauderon 创造的小麦-中间偃麦草部分双二倍体 TAF-46 ($2n = 46$) 及其衍生物二体附加系 L_1 ($2n = 44$)^[2] 的 BYDV 抗性基因位于附加的中间偃麦草第 7 同源群 7Ai 长臂上。我国和澳大利亚科学家以 L_1 为抗源共同育成了一些抗 BYDV 的小麦材料, 经分析这些抗性材料是含 7Ai-1 或其片段的代换或易位系^[4]。我国学者创制的小麦-中间偃麦草部分双二倍体中 5 ($2n = 56$) 高抗 BYDV, 尤其对我国的 BYDV 主流株系 GPV

* 收稿日期: 1999-10-22 接受日期: 2000-06-30

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39770517)。Foundation item: The National Natural Science Foundation of China (39770517)。

* 通讯作者。Author for correspondence.

和 GAV 具有优良抗性, 成为我国抗 BYDV 小麦新种质选育的持久和主要的抗源^[5]。本实验室通过普通小麦与中 5 杂交结合花药培养, 选育出一批抗 BYDV 小麦新种质^[6], 其中包括一些二体代换系。初步认为有的代换系 BYDV 抗性基因是在替换小麦 2D 的中间偃麦草染色体上, 这可能有别于前人报道的 7Ai 染色体^[7]。对这些材料进行准确、全面的鉴定是进一步利用它们的基础。

远缘杂种中的外源染色质可以通过传统的表型标记(如抗病性等)、细胞学方法(如染色体减数分裂配对分析以及染色体分带技术)和生化标记(如同工酶等)进行检测。随着分子生物学的发展, 基因组原位杂交(GISH)、随机扩增多态性 DNA(RAPD)等新技术越来越受到重视。本研究综合运用以上多种方法对获得的多个抗 BYDV 小麦-中间偃麦草二体异代换系进行了鉴定。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 亲本材料 母本为普通小麦(*Triticum aestivum* L.) 77-5433, 是中国农业科学院选育的一个优良小麦品系, 对 BYDV 高感。父本中 5(*Triticum aestivum-Agropyron intermedium*) 是由黑龙江省农业科学院培育出的一个小麦-中间偃麦草部分双二倍体, 高抗 BYDV, 在本实验中作为 BYDV 的抗源。

1.1.2 普通小麦中国春单体材料 一套共 21 个单体中国春小麦在本实验中用于单体测交法鉴定代换系中被代换的小麦染色体。

1.1.3 其他材料 普通小麦中国春(*Triticum aestivum* L. cv. Chinese Spring, $2n = 42$, AABBDD), 中间偃麦草(*Agropyron intermedium* Garten, $2n = 42$, E₁E₂E₃E₄StSt)。这些材料提取的基因组总 DNA 在本实验中作为基因组原位杂交的探针或封阻。

1.2 实验方法

1.2.1 花药培养 以 77-5433 为母本、中 5 为父本进行远缘杂交, 花药培养从杂种自交 F₂ 代开始, 取单核中、晚期花药进行离体培养。花药愈伤组织诱导培养基为 TA^[8], 愈伤组织分化绿苗培养基为 190-2^[9], 壮苗培养基为大量元素减半的 MS 培养基^[9]。

1.2.2 遗传背景鉴定方法 根尖细胞染色体和花粉母细胞染色体制片方法见以前文献报道^[10]。C 分带参照 Gill 等^[11]的方法。GISH 程序基本参照 Mukai 和 Gill^[12]的方法进行。等电点聚焦(IEF) 主要按 Petchy 等^[13]的方法进行。RAPD 分析参照

Williams 等^[14]的方法。

2 实验结果

2.1 抗 BYDV 代换系材料的获得

对遗传稳定的自交后代和花培植株进行抗病鉴定, 选择抗病性和农艺性状良好的植株进行染色体计数, 对染色体数目为 42 的材料进行综合遗传分析。经鉴定后共获得 6 个染色体数目为 42 的抗 BYDV 小麦新种质: HG295, 77422, 遗 4212, 81473-1, 81484 和 81485。除 HG295 和 77422 直接从 77-5433 × 中 5 自交后代中选育外, 其余均来自花培后代。这些材料经抗病性鉴定, 均抗 BYDV。以遗 4212 为例来说, 经我们和中国农业科学院植物保护研究所连续多年的 BYDV 田间和温室接种鉴定, 遗 4212 对 BYDV 的病级为 0~1, 表现为高抗。而遗 4212 的小麦亲本 77-5433 的病级反应为 4~5 级, 易感上述病害, 遗 4212 的另一亲本中 5 则对上述病害表现为高抗。表明这些材料的抗病性来自中 5, 而不是 77-5433, 初步推断这些材料带有中间偃麦草染色质。

2.2 细胞学鉴定

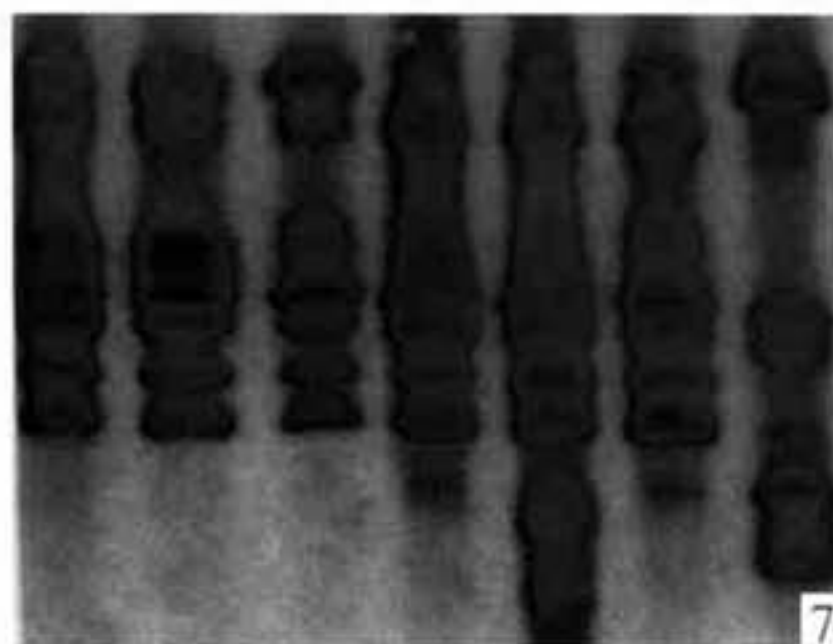
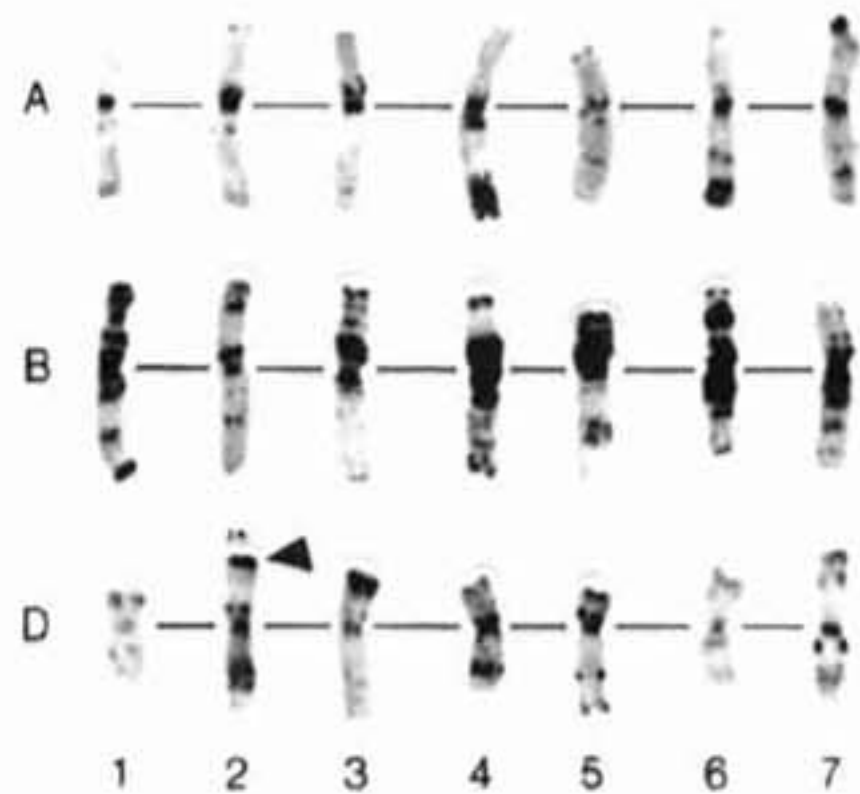
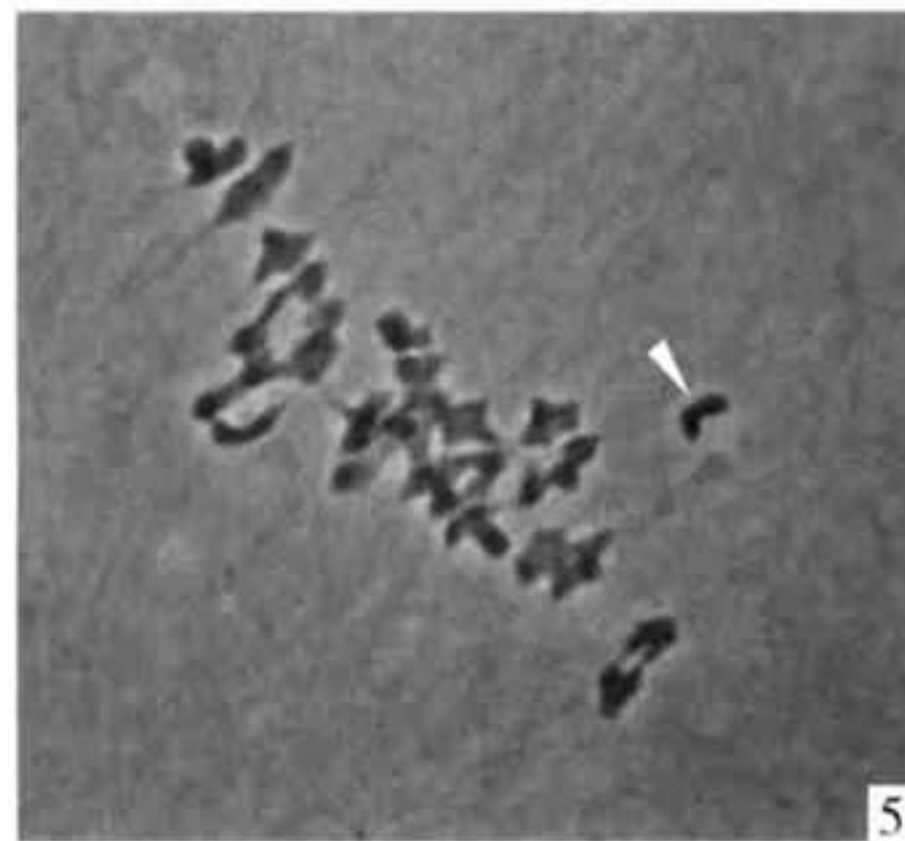
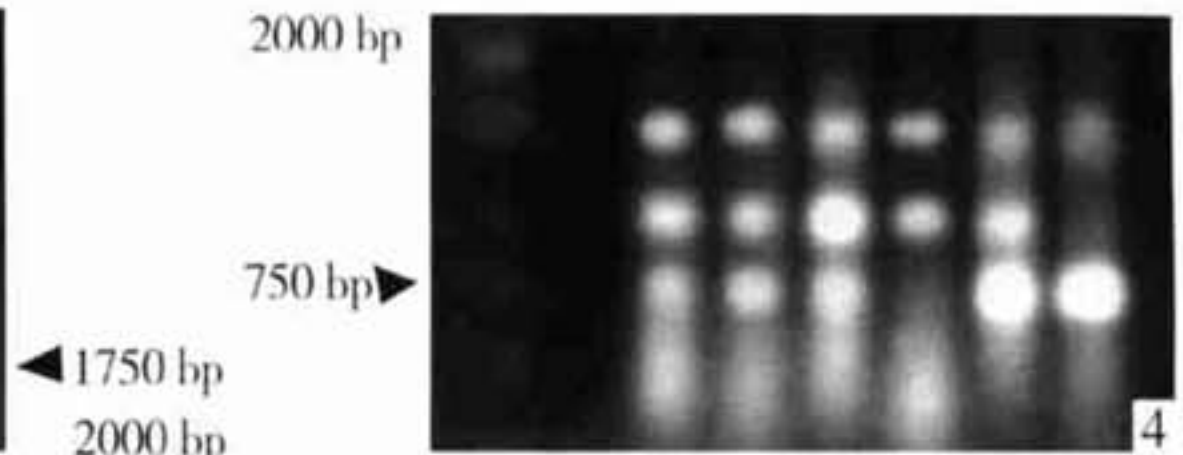
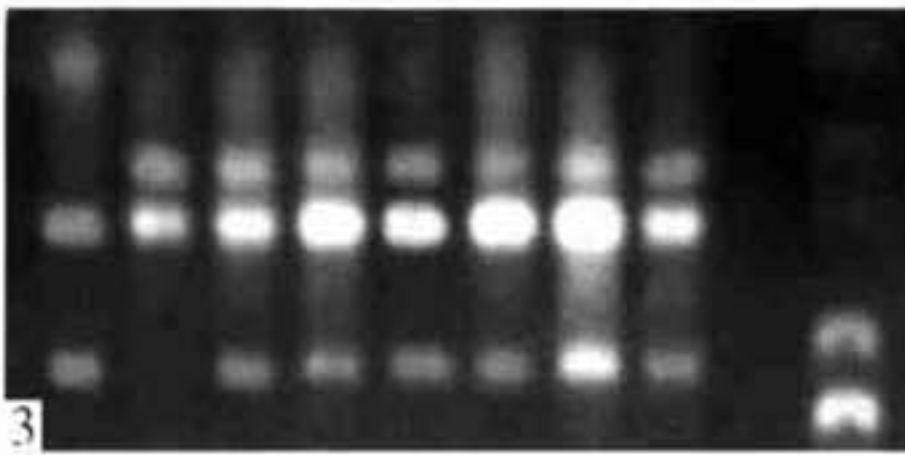
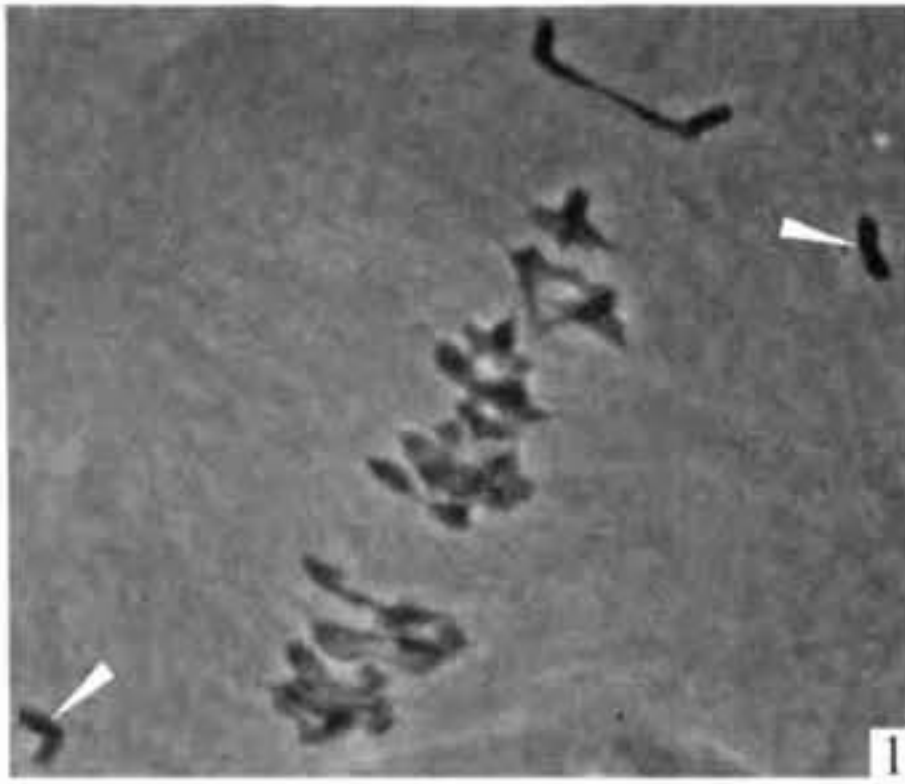
根尖体细胞观察表明, 这些材料(为叙述方便, 一般以遗 4212 为例来说明) 是一个有 42 条染色体的整倍体材料。花粉母细胞(PMC) 观察表明, 遗 4212 染色体配对正常, 在减数分裂中期 I, 几乎在所有细胞中能观察到 21 个二价体, 后期 I 能正常分离, 表明遗 4212 是一个遗传上稳定的整倍体株系。为了解遗 4212 中是否存在中间偃麦草的染色体, 我们以遗 4212 为母本, 与 77-5433 进行回交, 对 F₁ 杂种进行了花粉母细胞观察。在减数分裂中期 I, 几乎在所有细胞中都能观察到 2 个单价体(图 1)。在统计的 62 个(77-5433 × 遗 4212) F₁ 花粉母细胞中, 其染色体平均配对构型为 2.194 I + 19.693 II + 0.096 III + 0.032 IV, 初步推断遗 4212 是一个带有 1 对中间偃麦草染色体的代换系或含 1 对较大中间偃麦草染色体片段的易位系。当以中间偃麦草总基因组 DNA 为探针、中国春为封阻, 对遗 4212 进行 GISH 时, 有 1 对染色体全部染上黄绿色杂交信号, 表明遗 4212 中含有 1 对完整的中间偃麦草染色体(图 2)。对其他材料进行 GISH 时, 也获得了相同的结果, 表明它们都含有 1 对来源于中 5 的携带 BYDV 抗性的染色体。

2.3 RAPD 鉴定

以 Operon 公司 A 组共 20 个引物对中间偃麦

草、中 5、77-5433、HG295、遗 4212、77422 进行 RAPD 扩增。除 OPA-06、OPA-11 的扩增产物呈弥散状外，其余引物都扩增出 3~7 条 RAPD 带。其中 OPA-07、OPA-08、OPA-09 以及 OPA-13 都扩增出在其他材料

中均存在，而在 77-5433 中不存在的携带 BYDV 抗性染色体特异带，其余 14 个引物没有获得与该染色体连锁的特异带。用 OPA-07 引物对上述材料进行扩增，在扩增出的 6 条带中，只有 1 条 600 bp 的扩增带



为该染色体特异带;用 OPA-08 扩增出 7 条带,只有 1 条 1 500 bp 的扩增带存在于除 77-5433 外的其他材料中;用 OPA-09 对 3 个代换系以及 2 个附加系(77421、Z2)进行扩增,共扩增出 4 条带,其中在 1 750 bp 左右有 1 条该染色体特异带(图 3);用 OPA-13 共扩增出 4 条带,其中有 1 条约 750 bp 的带为携带 BYDV 抗性染色体特异带(图 4)。这些结果表明,利用 RAPD 方法鉴定小麦背景下的大片段外源染色质是有效的,用不多的引物就可检测出小麦背景下的携带 BYDV 抗性染色体。这些 RAPD 标记都可用于跟踪该染色体。

2.4 代换系中被代换小麦染色体的鉴定

在分析中,对 4212 和 77422 中的被代换小麦染色体进行了鉴定。

2.4.1 单体测交分析 以一套共 21 个普通小麦中国春单体材料为母本,4212 和 77422 为父本分别进行杂交,从杂种 F_1 中选染色体数目为 41 的种子种于温室,取其花粉母细胞观察染色体配对情况。除(2D 单体×代换系)杂交组合外,其余 19 个(1A 未获得染色体数目为 41 的杂种单株)杂交组合 F_1 单体株 PMC 中,没有单价体(20 II + 1 I)出现,绝大部分出现 3 个单价体(19 II + 3 I)(资料未显示),而在(2D 单体×4212) F_1 单体株花粉母细胞中,绝大部分 PMC 中出现 1 个单价体(20 II + 1 I)(图 5),在 77422 中也获得了相同的结果(资料未显示)。这表明,在 4212 和 77422 中,2D 小麦染色体被代换。

2.4.2 C 带分析 4212 C 分带的结果不仅表明 4212 中的 2D 小麦染色体被携带 BYDV 抗性染色体所代换,而且表明该染色体两端以及着丝点周围具有丰富的 C 带型,可作为携带 BYDV 抗性染色体

的染色体标记(图 6)。

2.4.3 Est-6 的 IEF 分析 Petchy 等^[13]将等电点 7.5~8.3 的胚乳酯酶定位于 2A、2B、2D 的短臂上,并定名为 Est-6。对中间偃麦草、中 5、77-5433、4212、77422 和中国春进行 Est-6 IEF 分析表明,在 pH 8.0 附近有 2D 小麦染色体控制的一条酶带在代换系中消失(图 7)。说明在 3 个代换系中,2D 染色体被代换。

3 讨论

对小麦抗病种质中的外源染色质进行准确鉴定是利用它们的前提。鉴定方法可分为形态学、细胞学、生化以及分子生物学四大类。不同的方法可以解决不同的问题,也各有优缺点。对 BYDV 抗病种质选育来说,田间抗性鉴定(形态学方法)和染色体计数对 BYDV 抗性种质的初步鉴定是有效的,大大提高了后续鉴定的针对性。减数分裂配对分析可以检测材料是否稳定,以及间接确定材料中外源染色体的数目或易位片段的大小,利用单体测交法测定出代换系中被代换的小麦染色体。以上方法都不需要复杂的实验仪器,在不具备其他条件的地方可以使用。原位杂交可以直观地看出材料中的外源染色体数目多少以及易位片段的大小。C 分带可以鉴定特定的外源染色体。同工酶是鉴定同源群关系相对简单的方法,在本实验中,用 Est-6 同工酶鉴定出代换系中被代换的小麦染色体为 2D。RAPD 方法在鉴定外源染色质方面很灵敏,本研究仅利用一套共 20 个引物,就有 4 个引物获得携带 BYDV 抗性染色体的分子标记。以上结果说明利用多种方法对抗病种质材料进行全面分析是很有必要的。

图 1-7. 1. (77-5433 × 4212) F_1 花粉母细胞(PMC)中期 I 相,箭头示 2 个单价体。2. 4212 根尖细胞 GISH 图,箭头示一对中间偃麦草染色体。3. OPA-09 引物的 RAPD 扩增图,箭头示 1 750 bp BYDV 抗性染色体特异带,从左至右依次为中间偃麦草、77-5433、中 5、HG295、4212、77422、77421、Z2、1 kb marker。4. OPA-13 引物的 RAPD 扩增图,箭头所指为携带 BYDV 抗性染色体特有的 750 bp 扩增带,从左至右依次为 1 kb marker、77422、4212、HG295、77-5433、中 5、中间偃麦草。5. (2D 单体小麦 × 4212) F_1 单体株(2n = 41) PMC 中期相 I,示 20 个二价体和 1 个单价体(箭头)。6. 4212 的 C 带图谱,箭头示 2D 小麦染色体被携带 BYDV 抗性染色体代换。7. Est-6 图谱,箭头所指为 pH 8.0 左右的 2D 染色体特异带,从左至右依次为 77422、4212、HG295、77-5433、中 5、中国春和中间偃麦草。

Figs. 1-7. 1. The PMC metaphase I of (77-5433 × Yi 4212) F_1 . The arrowheads indicate 2 univalents. 2. The root-tip cell GISH pattern of Yi 4212. The arrowheads indicate a pair of *Agropyron intermedium* chromosomes in Yi 4212. 3. RAPD pattern of OPA-09. The arrowhead indicates the 1 750 bp specific band of BYDV-resistant chromosomes; from left to right: *Ag. intermedium*, 77-5433, Zhong 5, HG295, Yi 4212, 77422, 77421, Z2, and 1 kb marker. 4. RAPD pattern of OPA-13. The arrowhead indicates the 750 bp specific band of BYDV-resistant chromosomes; from left to right: 1 kb marker, 77422, Yi 4212, HG295, 77-5433, Zhong 5, and *Ag. intermedium*. 5. The PMC metaphase I of (2D monosomic wheat × Yi 4212) F_1 plantlet (2n = 41), showing 20 bivalents and 1 univalent (arrowhead). 6. The C-banding pattern of Yi 4212. The arrowhead indicates that the 2D wheat chromosome is substituted by the BYDV-resistant chromosome. 7. The pattern of Est-6. The arrowhead indicates the specific band of 2D wheat chromosome around pH 8.0; from left to right: 77422, Yi 4212, HG 295, 77-5433, Zhong 5, Chinese Spring, and *Agropyron intermedium*.

参考文献:

- [1] Conti M, D'Arcy C J, Jedlinski H, Burnett P A. The "yellow plague" of cereals, barley yellow dwarf virus. Burnett P A. World Perspectives on Barley Yellow Dwarf. DF, Mexico: DCAS/ CIMMYT, 1987. 1 - 6.
- [2] Qualset C O, Lorens G F, Ullman D E, McGuire P E. Genetics of host plant resistance to barley yellow dwarf virus. Burnett P A. World Perspectives on Barley Yellow Dwarf. DF, Mexico: DCAS/ CIMMYT, 1987. 368 - 382.
- [3] Larkin P J, Brettell R I S, Banks P M, Apples R, Waterhouse P M, Cheng Z M, Zhou G H, Xin Z Y, Chen X. Identification, characterization and utilization of sources of resistance to barley yellow dwarf virus. Burnett P A. World Perspectives on Barley Yellow Dwarf. DF, Mexico: DCAS/ CIMMYT, 1987. 415 - 420.
- [4] Xin Z-Y, Xu H-J, Chen X, Lin Z-S, Zhou G-H, Qian Y-T, Cheng Z-M, Larkin P-J, Banks P, Appels R, Clarke B, Brettell R I S. Development of common wheat germplasm resistant to barley yellow dwarf virus by bio-techniques. *Sci China (Ser. B)*, 1991, **34**:1055 - 1062.
- [5] Xin Z-Y, Chen X, Xu H-J, Lin Z-S, Larkin P-J, Banks P, Clarke B, Appels R, Qian Y-T. Development of addition lines resistance to barley yellow dwarf virus from wheat-*Thinopyrum*. Li Z-S, Xin Z-Y. Proc 8th Int Wheat Genet Symp. Beijing: China Agricultural Sciencetech Press, 1993. 485 - 488.
- [6] Jia X, Zhuang J-J, Hu S-Q, Li H-J, Nie D-T, Yu C-J. A new way of creating wheat germplasms resistant to diseases. *Chin Sci Bull*, 1995, **40**:1652 - 1656.
- [7] Ai S J A, Wen Y-X, Tang S-X, Li Y-W, Zhuang J-J, Jia X. Breeding and cytological and molecular identification of a new germplasm with multiple diseases resistance. *Chin J Gen*, 1997, **24**: 301 - 307.
- [8] Jia X(贾旭), Zhuang J-J(庄家骏), Hu S-Q(胡适全), Yu C-J(俞春江), Nie D-T(聂道泰). Establishment and application of the medium of anther culture of intergeneric hybrids of *Triticum aestivum* × *Triticum - Agropyron*. *Sci Agricul Sin*(中国农业科学), 1994, **27**(4): 83 - 87. (in Chinese)
- [9] Zhuang J-J(庄家骏), Jia X(贾旭), Chen G-Q(陈国庆). Studies of induction of plant differentiation in pollen callus of wheat. *Acta Gen Sin*(遗传学报), 1984, **11**:374 - 381. (in Chinese)
- [10] Zhuang J-J, Jia X, Chen G-Q, Sun S-C. Factors affecting the induction of pollen plants of intergeneric hybrids of *Triticum Agropyron*. *Theor Appl Genet*, 1985, **70**: 289 - 294.
- [11] Gill B S, Friebe B, Endo T R. Standard karyotype and nomenclature system for description of chromosome bands and structural aberrations in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Genome*, 1991, **34**:830 - 839.
- [12] Mukai Y, Gill B S. Detection of barley chromatin added to wheat by genomic *in situ* hybridization. *Genome*, 1991, **34**:448 - 452.
- [13] Petchy E M, Koebner R M D, Gale M D. Genetic characterization of a further homoeoallelic series of grain esterase loci, *Est-6*, in wheat. *Theor Appl Genet*, 1990, **79**:294 - 296.
- [14] Williams J G K, Kubelik A R, Livak K J, Rafalski J A, Tingey S V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl Acids Res*, 1990, **18**:6531 - 6535.