

普通小麦-华山新麦草矮秆种质 B62 的 分子细胞学鉴定

武 军, 马 琳, 赵继新, 陈新宏, 刘淑会, 杨群慧

(西北农林科技大学 农学院, 陕西 杨凌 712100)

【摘 要】 【目的】对普通小麦(*Triticum aestivum* L.) 品种 7182 与华山新麦草(*Psathyrostachys huashanica*) 杂交后代中选育的矮秆种质 B62 进行农艺性状考察和外源遗传物质检测。【方法】以普通小麦-华山新麦草矮秆种质 B62 为材料, 在田间农艺性状考察的基础上, 采用细胞学及基因组原位杂交(根尖与花粉母细胞中期 I)技术, 检测 B62 中的华山新麦草遗传物质。【结果】根尖细胞学鉴定表明, B62 染色体条数为 44 条; 根尖细胞染色体原位杂交(GISH)表明, B62 携带 2 条华山新麦草染色体; 花粉母细胞减数分裂 I 中期染色体 GISH 结果显示, 2 条外源染色体能够配对, 说明 2 条异源染色体是华山新麦草的 1 对同源染色体。【结论】矮秆种质 B62 为普通小麦-华山新麦草二体异附加系, 其农艺性状优于其小麦亲本 7182。

【关键词】 普通小麦; 华山新麦草; 矮秆; 异附加系; GISH 分析

【中图分类号】 S512.101

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2010)12-0123-05

Molecular cytology on a dwarf germplasm derived from *Triticum aestivum* × *Psathyrostachys huashanica*

WU Jun, MA Lin, ZHAO Ji-xin, CHEN Xin-hong, LIU Shu-hui, YANG Qun-hui

(College of Agronomy, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】 The study was to observe the agronomy and alien genetic chromatin of a dwarf germplasm B62 obtained by screening the offspring of hybridizing between *Triticum aestivum* L. cv. 7182 and *Psathyrostachys huashanica*. 【Method】 Cytology analysis, genomic in situ hybridization (GISH) analysis on root tip and PMC I of B62 were used. 【Result】 44 chromosomes were observed after identifying root tip in cytology. With *P. huashanica* Ns genomic DNA as a probe, root tip genomic in situ hybridization (GISH) analysis identified two material carries *P. huashanica* chromosomes. Then it was concluded that B62 was a wheat-*P. huashanica* disomic or double monosomic addition line; and the addition line for pollen mother cell mid-meiosis I genomic in situ hybridization (GISH). The results show that the two alien chromosomes can pair and arrange in equatorial plate. It shows that the two added chromosomes are a pair of homologous chromosomes in *P. huashanica*. 【Conclusion】 B62 is a dwarf material of the wheat-*P. huashanica* hybridization disomic addition line, which agronomic are traits better than the wheat parent-7182.

Key words: *Triticum aestivum*; *Psathyrostachys huashanica*; dwarf; alien addition line; GISH analysis

华山新麦草(*Psathyrostachys huashanica*) 是 禾本科(Poaceae)小麦族(Triticeae)新麦草属(*Ps-*

* [收稿日期] 2010-05-10

[基金项目] 西北农林科技大学科研专项(Z109021002); 西北农林科技大学唐仲英育种基金项目(A212020716); 陕西省重大科技攻关“13115”专项(2007ZDKG-01)

[作者简介] 武 军(1970—), 男, 陕西南郑人, 副研究员, 博士, 主要从事小麦远缘杂交育种研究。

[通信作者] 陈新宏(1966—), 男, 陕西周至人, 研究员, 博士, 主要从事小麦远缘杂交育种研究。

thyrostachys nevski)的一个多年生二倍体($2n=14$)草本植物,含 Ns 基因组^[1-2]。它是我国特有的禾草植物,仅生长于陕西华山,与同属的其他物种有较大的形态差异和形成间断地理分布,多生长于谷坡岩石的残积土上,植株丛生,具有抗寒、抗旱、耐瘠薄、早熟、优质、矮秆、抗病等特点^[3]。自 20 世纪 80 年代以来,杭焱等^[4]、王丽等^[5]、刘文献等^[6]、孙根楼等^[7]、Ib Linde-Laursen 等^[8]利用分子标记技术,对华山新麦草的遗传多样性、染色体组、生殖生态及濒危原因等进行了研究。

利用普通小麦与华山新麦草杂交,将华山新麦草的优良基因导入普通小麦,可以提高小麦的抗病和抗逆性,丰富小麦遗传种质资源,为小麦育种特殊遗传材料的建立提供重要的基因资源。陈漱阳等^[9-10]利用普通小麦 7182 与华山新麦草成功进行了杂交,并获得了一批小麦-华山新麦草衍生后代;王益等^[11]对中国春 ph2b 突变体与华山新麦草属间杂种 F_1 的衍生后代(BC_2 和 BC_1F_1)进行了细胞学观察和田间农艺性状调查。万永芳等^[12]、井金学等^[13]、王美南等^[14]、魏芳勤等^[15]对华山新麦草进行了抗赤霉病、条锈病和全蚀病的研究,结果表明华山新麦草中抗小麦赤霉病、高抗小麦条锈病和全蚀病。

株高是小麦品种的一个重要农艺性状,植株过高容易引起倒伏减产,适度矮化可耐肥、抗倒、增产。尤其在近年来,随着小麦灌溉条件的不断改善和超高产育种措施的实施,要在灌溉条件下创造更高的产量,克服高产与倒伏的矛盾,就必须降低株高,培育矮秆高产品种。目前,已发现的小麦矮秆基因约有 25 个^[16],但在育种中被广泛利用的较少,世界上约 90% 以上的矮秆和半矮秆品种携带着来自农林 10 号和赤小麦的矮秆基因^[17],这表明目前小麦矮化育种所利用的矮秆基因比较单一。虽然我国矮源较为丰富,但关于矮源的研究起步较晚,且目前小麦育种中应用的矮秆亲本在不同程度上都具有早衰和籽粒蛋白质含量较低等缺陷。因此,创造和发现新的矮源并对其进行深入研究显得尤为重要^[18]。本课题组通过普通小麦 7182 与华山新麦草杂交、回交和多代自交,在 BC_1F_5 分离出 1 株矮秆小麦(田间代号 B62),并经过连续 3 年种植,其矮秆性状稳定。本研究利用形态学、细胞学及基因组原位杂交等技术对 B62 进行鉴定,以期对 B62 在小麦育种中的利用及其进一步研究提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料

普通小麦品种 7182 与华山新麦草杂交后代选育出的一个矮秆种质 B62,由本课题组提供。

1.2 方法

1.2.1 形态学观察 将矮秆种质 B62 及其亲本 7182 和华山新麦草种植于西北农林科技大学原西北植物研究所东院试验地,进行形态学观察,并对株高、有效分蘖数、小穗数和穗叶距等性状进行考察。

1.2.2 根尖细胞有丝分裂的染色体观察 将 B62 种子放在垫有 2 层湿润滤纸的培养皿内发芽($25\text{ }^{\circ}\text{C}$),当根长至 1 cm 时剪取根尖用冰水处理 24 h,然后置于卡诺氏 I 固定液($V(\text{乙醇}):V(\text{冰乙酸})=3:1$),于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱固定,保存。取固定 1~3 d 的根尖,用 1 mol/L 的盐酸 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 解离 5~7 min,去掉盐酸,用锡夫试剂染色至根尖呈红色后制片,并进行染色体计数。

1.2.3 根尖细胞染色体原位杂交(GISH) (1)根尖处理。将 B62 根尖固定 2~5 d 后用体积分数 45% 醋酸压片,液氮冷冻后揭片备用。

(2)探针标记。用 Dig-Nick-Translation Mix (Roche, Germany)试剂盒标记基因组 DNA,详细标记方法参考制造商产品说明书(20 μL 体系中, Dig-Nick-Translation Mix 4 μL , DNA 1 μg , 加 ddH_2O 至 20 μL)。探针标记完毕后加入 1.0 μL 0.5 mol/L EDTA ($\text{pH } 8.0$),置 $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴 10 min,终止反应。

(3)GISH 程序。参照 Han 等^[19]的方法,所用探针为经缺口转移法标记的华山新麦草基因组 DNA,探针与封阻 DNA 用量比为 1:50。探针杂交信号用荧光素(FITC)检测。经 PI 复染后,在 450~490 nm 波长下观察,杂交信号呈黄绿色,小麦染色体呈红棕色。用 Nikon Eclipse E600 (日本)显微镜在 Spot 系统下照相。

1.2.4 花粉母细胞染色体原位杂交(GISH) (1)当旗叶、倒二叶距离为 3~4 cm 时,取处于减数分裂中期 I 的花药,卡诺氏液 II ($V(\text{无水乙醇}):V(\text{氯仿}):V(\text{冰乙酸})=6:3:1$)固定, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用,2~5 d 后用体积分数 45% 醋酸压片,液氮冷冻后揭片备用。(2)探针标记和 GISH 程序同 1.2.3 根尖染色体原位杂交。

2 结果与分析

2.1 矮秆种质 B62 的农艺性状

田间农艺性状调查表明, B62 株高在 48~53

cm,其亲本小麦品种 7182 株高在 80~85 cm,华山新麦草株高 45~50 cm;B62 有效分蘖数 9~13,亲本 7182 有效分蘖数 8~11;B62 穗叶距在 5~7 cm,亲本 7182 在 13~15 cm;B62 小穗数 20~22,亲本

7182 小穗数 17~20。从整体的综合农艺性状来看,B62 的表现优于小麦亲本 7182。矮秆种质 B62 及其亲本 7182 和华山新麦草的田间农艺表现见图 1。

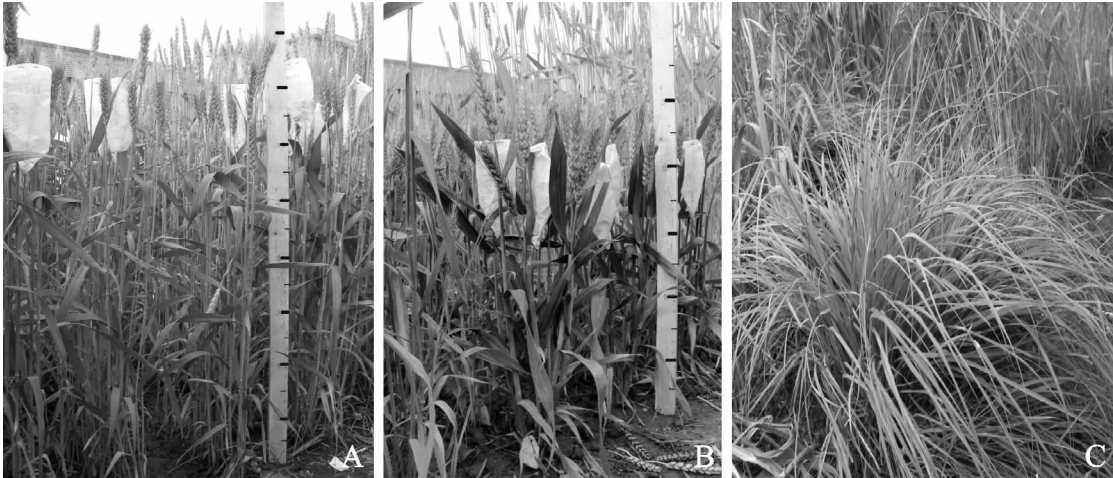


图 1 矮秆种质 B62 及其亲本 7182 和华山新麦草的田间农艺表现
A. 7182;B. B62;C. 华山新麦草

Fig. 1 Agronomic performance of dwarf germplasm B62 and its parents 7182 and *P. huashanica* in field
A. 7182;B. B62;C. *P. huashanica*

2.2 矮秆种质 B62 根尖细胞染色体观察

矮秆种质 B62 根尖细胞染色体观测发现,B62 根尖细胞中的染色体条数为 44 条(图 2),大于普通

小麦(2n=42),据此推断 B62 为普通小麦 7182 与华山新麦草杂交后代的异附加系。



图 2 矮秆种质 B62 根尖细胞染色体

Fig. 2 Cytological observation of dwarf germplasm B62

2.3 矮秆种质 B62 根尖细胞染色体原位杂交

以华山新麦草基因组 DNA 为探针,对矮秆种质 B62 进行根尖染色体原位杂交,结果显示,44 条染色体中有 2 条具有杂交信号,表明这 2 条染色体来源于华山新麦草 Ns 基因组(图 3),据此推断,B62 为普通小麦与华山新麦草的二体异附加系或双单体异附加系。



图 3 矮秆种质 B62 根尖细胞染色体原位杂交结果
箭头所指的染色体为华山新麦草染色体

Fig. 3 GISH result on root tip cell of dwarf germplasm B62
Arrows indicate the *P. huashanica* chromosome

2.4 矮秆种质 B62 花粉母细胞减数分裂中期 I 的 GISH 分析

通过对矮秆种质 B62 花粉母细胞减数分裂中期 I 进行基因组原位杂交,观测染色体配对情况,发现 2 条外源染色体能够在此期进行配对(图 4),表明这 2 条外源染色体是来源于华山新麦草的 1 对同源染色体,即 B62 为普通小麦与华山新麦草的二体

异附加系。

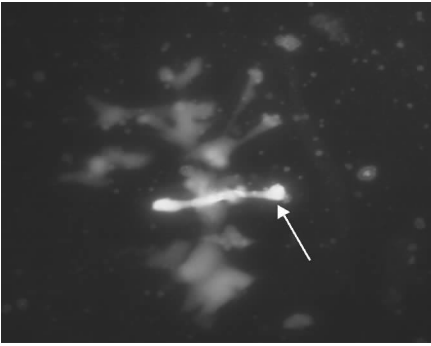


图 4 矮秆种质 B62 花粉母细胞减数分裂中期 I GISH

箭头所指的染色体是华山新麦草染色体

Fig. 4 GISH analysis on PMC I of dwarf germplasm B62

Arrow indicate the *P. huashanica* chromosome

3 讨 论

株高是小麦高产、稳产的重要农艺性状,而矮秆特性是小麦抗倒伏能力的重要指标。因此,矮秆小麦种质的培育和鉴定对于小麦育种具有重要意义。通过将小麦近缘种属的染色体或染色体片段导入普通小麦是创造小麦矮秆种质,丰富小麦矮秆性状遗传基础的一个有效途径。鲍印广等^[20]利用普通小麦品种烟农 15 与中间偃麦草杂交、回交和多代自交,选育出 1 个含有中间偃麦草染色体片段的矮秆、早熟新种质山农 0057-2;宗浩等^[21]利用人工合成的双二倍体 Am6(硬粒小麦 DR147/粗山羊草 Ae39)与济南 17 杂交、回交,选育出矮秆种质山农 495。本课题组利用普通小麦 7182 与华山新麦草杂交、回交及多代自交,选育出具有明显矮秆特性的材料小麦-华山新麦草二体异附加系新种质 B62,该种质材料综合农艺性状优于其小麦亲本,是一个较好的矮源材料。

外源基因只有导入小麦中才会有利用价值,而外源基因在受体植物遗传背景中是否表达以及如何表达,是植物育种学研究的重要课题。唐宗祥等^[22]认为,外源基因在受体植物中的表达有 2 种方式,一是直接表达原功能,二是与受体遗传背景发生相互作用。但是在有利基因转入小麦的同时,往往不利基因也随之带入,而且这些不利基因的作用明显超过了有利基因。

矮秆种质 B62 矮秆性状的形成原因,根据基因的表达方式,有可能是导入的 1 对华山新麦草同源染色体本身具有矮秆基因,当导入小麦基因组中进行了表达,因而该材料具有明显的矮秆特性;也有可

能是华山新麦草的其他具有矮秆基因的染色体片段(片段较小,GISH 检测不出来)导入了小麦基因组所致;还有可能是外源物质的导入引起小麦基因发生了突变,这些需要进一步对矮化基因的定位进行深入研究证实。

[参考文献]

- [1] Dewey D R. Historical and current taxonomic perspectives of *Agropyron*, *Elymus* and related genera [J]. Crop Science, 1983, 23: 637-642.
- [2] Dewey D R, Hsiao C. A cytogenetic basis for transferring Russian wild rye from *Elymus* to *Psathyrostachys* [J]. Crop Science, 1983, 23: 123-126.
- [3] 郭本兆. 中国植物志 [M]. 北京: 科学出版社, 1987.
- [4] 杭 焱, 金 燕, 卢宝荣. 濒危植物华山新麦草(*Psathyrostachys huashanica*)的遗传多样性及其保护 [J]. 复旦学报: 自然科学版, 2004, 43(2): 260-267.
- [5] 王 丽, 杨 娟, 郭 晶, 等. 用 RAPD 检测华山新麦草自然居群的遗传结构和居群分化 [J]. 生态学报, 2005, 25(4): 720-727.
- [6] 王 丽, 杨 娟, 郭 晶, 等. 用 RAPD 检测华山新麦草自然居群的遗传结构和居群分化 [J]. 生态学报, 2005, 25(4): 720-727. (in Chinese)
- [7] 刘文成, 李立会, 刘伟华. 华山新麦草居群取样策略的 SSR 分析 [J]. 麦类作物学报, 2006, 26(2): 16-20.
- [8] Liu W X, Li L H, Liu W H, et al. SSR analysis on the sampling strategy of *Psathyrostachys huashanica* keng population [J]. Journal of Triticeae Crops, 2006, 26(2): 16-20. (in Chinese)
- [9] 孙根楼, 颜 济, 杨俊良. 华山新麦草属间杂种细胞间遗传物质的转移及其在物种演化中的意义 [J]. 四川农业大学学报, 1994, 12(3): 333-337.
- [10] Sun G L, Yan J, Yang J L. Intermeiocyte connections, cytomixis in intergeneric hybrids derived from *Psathyrostachys huashanica* and the importance in evolution [J]. Journal of Sichuan Agricultural University, 1994, 12(3): 333-337. (in Chinese)
- [11] Ib Linde-Laursen, Roland von Bothmer. Comparison of the karyotypes of *Psathyrostachys juncea* and *P. huashanica* (*Poaceae*) studied by banding techniques [J]. Plant Systematics and Evolution, 1986, 151: 203-213.
- [12] 陈淑阳, 张安静, 傅 杰. 普通小麦与华山新麦草的杂交 [J]. 遗传学报, 1991, 18(6): 508-512.
- [13] Chen S Y, Zhang A J, Fu J. The hybridization between *Triticum aestivum* and *Psathyrostachys huashanica* [J]. Acta Genetica Sinica, 1991, 18(6): 508-512. (in Chinese)

- [10] 陈漱阳,侯文胜,张安静,等. 普通小麦-华山新麦草异附加系的选育及细胞遗传学研究 [J]. 遗传学报,1996,23(6):447-452.
Chen S Y, Hou W S, Zhang A J, et al. Breeding and cytogenetic study of *Triticum aestivum*-*Psathyrostachys huashanica* alien addition lines [J]. Acta Genetica Sinica, 1996, 23(6): 447-452. (in Chinese)
- [11] 王 益,康厚扬,原红军,等. 普通小麦与华山新麦草衍生后代的农艺性状和细胞遗传学研究 [J]. 四川农业大学学报,2008,26(4):405-410.
Wang Y, Kang H Y, Yuan H J, et al. Cytogenetic and morphological studies on the derivative progenies of *Triticum aestivum* × *Psathyrostachys huashanica* [J]. Journal of Sichuan Agricultural University, 2008, 26(4): 405-410. (in Chinese)
- [12] 万永芳,颜 济,杨俊良,等. 小麦近缘野生植物的赤霉病抗性研究 [J]. 植物病理学报,1997,27(2):107-111.
Wan Y F, Yan J, Yang J L, et al. Study on wild relatives of wheat for resistance to head scab [J]. Acta Phytopathologica Sinica, 1997, 27(2): 107-111. (in Chinese)
- [13] 井金学,傅 杰,袁红旭,等. 三个小麦野生近缘种抗条锈性传递的初步研究 [J]. 植物病理学报,1999,29(2):147-150.
Jing J X, Fu J, Yuan H X, et al. A preliminary study on heredity of resistance to stripe rust in three wild relatives of wheat [J]. Acta Phytopathologica Sinica, 1999, 29(2): 147-150. (in Chinese)
- [14] 王美南,商鸿生. 华山新麦草对小麦全蚀病菌的抗病性研究 [J]. 西北农业大学学报,2000,28(6):69-71.
Wang M N, Shang H S. Evaluation of resistance in *Psathyrostachys huashanica* to wheat take-all fungus [J]. Journal of Northwest Agricultural University, 2000, 28(6): 69-71. (in Chinese)
- [15] 魏芳勤,武 军,赵继新,等. 普通小麦和华山新麦草衍生系 H9021 对全蚀病抗性的遗传分析 [J]. 麦类作物学报,2009,29(1):153-156.
Wei F Q, Wu J, Zhao J X, et al. Denetic analysis of resistance to take-all fungus of wheat line H9021 derived from wheat-*Psathyrostachys huashanica* [J]. Journal of Triticeae Crops, 2009, 29(1): 153-156. (in Chinese)
- [16] 康苏花,兰素缺,李杏普,等. 小麦矮秆基因的研究进展 [J]. 河南师范大学学报:自然科学版,2010,34(1):93-97.
Kang S H, Lan S Q, Li X P, et al. Research progress of wheat dwarfing genes [J]. Journal of Henan Normal University: Natural Science Edition, 2010, 34(1): 93-97. (in Chinese)
- [17] Burner A, Korzun A V, Worland A J. Comparative genetic mapping of loci affecting plant height and development in cereals [J]. Euphytica, 1998, 100: 245-248.
- [18] 吴昆仑. 小麦矮秆基因研究和利用简述 [J]. 青海农林科技, 2006(3): 24-25.
Wu K L. Brief introduction on research and application dwarfing gene [J]. Science and Technology of Qinghai Agriculture and Forestry, 2006(3): 24-25. (in Chinese)
- [19] Han F P, Liu B, Fedak Z, et al. Genomic constitution and variation in partial amphiploids of wheat-*Thinopyrum intermedium* as revealed by GISH, multicolor GISH and seed storage analysis [J]. Theor Appl Genet, 2004, 109: 1070-1076.
- [20] 鲍印广,崔 法,李兴峰,等. 矮秆早熟小偃麦种质山农 0057-2 的选育与鉴定 [J]. 农业生物技术学报,2009,17(4):684-689.
Bao Y G, Cui F, Li X F, et al. Breeding and identification of dwarf and earliness *Trititrigia* germplasm Shannong 0057-2 [J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2009, 17(4): 684-689. (in Chinese)
- [21] 宗 浩,崔 法,鲍印广,等. 小麦矮秆种质系山农 495 矮秆基因的分子标记定位 [J]. 麦类作物学报,2009,29(3):385-389.
Zong H, Cui F, Bao Y G, et al. Developing molecular markers for the Rht gene in dwarfing germplasm line Shannong 495 [J]. Journal of Triticeae Crops, 2009, 29(3): 385-389. (in Chinese)
- [22] 唐宗祥,符书兰,任正隆,等. 黑麦端部特异重复序列 pSc200 在新合成的不同小麦-黑麦双二倍体中的变异 [J]. 中国农业科学,2008,41(11):3477-3481.
Tang Z X, Fu S L, Ren Z L, et al. Variation of rye-specific telomeric tandem repeat pSc200 in newly synthesized wheat-rye amphiploids [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2008, 41(11): 3477-3481. (in Chinese)