

抗穗发芽 2D/2H 小大麦易位系的鉴定和应用研究

刘淑会, 陈新宏, 赵继新, 武 军, 李 璋

(西北农林科技大学 农学院, 陕西 杨凌 712100)

摘要: 大麦 2H 染色体长臂上的 *Isa-H* 基因控制 α -淀粉酶抑制蛋白的合成, 减轻高 α -淀粉酶活性对小麦穗发芽的不利影响。为了检测小大麦杂交后代中是否有大麦 *Isa-H* 基因导入, 利用染色体 C-分带和原位杂交技术相结合对所创制的 2H 小大麦异附加系 WBA9812 和易位系 WBT371 进行了鉴定, 以完整麦穗吸水保湿发芽法测定穗发芽的抗性, 结合农艺性状观测, 选育出具有抗穗发芽等优异特性的小大麦新种质。分析结果表明: WBT371 是 2D/2H 易位系, 抗小麦穗发芽。WBT371 为进一步培育抗穗发芽小麦新品种创造了宝贵的种质资源。

关键词: 小麦; 大麦; 穗发芽; 新种质

中图分类号: S512.01 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7091(2005)01-0071-04

Study on Identification and Application for 2D/2H Wheat-barley Translocation Line with Pre-harvest Sprouting Resistance

LIU Shu-hui, CHEN Xin-hong, ZHAO Ji-xin, WU Jun, LI Zhang

(College of Agronomy, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling 712100, China)

Abstract: *Isa-H* gene on the barley 2HL chromosome is controlled composing of α -amylase restrainable protein, and using barley *Isa-H* gene can lighten activity of α -amylase and unfavorably influence of sprouting. New germplasm with resistance sprouts can be created by introduce the barley *Isa-H* gene to wheat through distant hybridization between wheat and barley. In order to identify whether or not the barley *Isa-H* gene introduce the material of wheat-barley hybrid progenies, the alien addition lines WBA9812 and translocation line WBT371 were identified by Genomic in situ hybridization (GISH) and chromosomes C-band, and their resistance to pre-harvest sprouting were also menstruated by the way of full ear sop water to germinate on keeping wet. Combining with observation of their agriculture properties, the new germplasm with pre-harvest sprouting resistance was selected. The identification results showed that WBT371 was 2D/2H translocation line, and with high resistance to sprouting. Chromosome C-band and FISH were effect ways to identify wheat-barley hybrid progeny materials. The method of full ear sop water to germinate on keeping wet was simple and credibility to test sprouting. WBT371 was invaluableness germplasm to breed new variety with resistance to sprouting.

Key words: Wheat; Barley; Resistance to Pre-harvest sprouting; New germplasm

小麦收获前穗发芽是世界性自然灾害, 在小麦成熟收获时遇连阴雨或在潮湿的环境下, 穗发芽现象十分普遍, 严重地影响小麦的品质, 特别是食品加工品质变劣^[1-4]。培育抗穗发芽品种是解决穗发芽问题最有效的办法。而目前小麦穗发芽抗源严重

缺乏, 因而有必要加强小麦远缘杂交、常规育种和分子生物学育种的结合来创造新抗源种质, 改造和提高小麦的抗穗发芽特性。据研究^[1,5], 穗发芽主要原因是 α -淀粉酶的活化使小麦子粒品质下降, 穗发芽的进程和后果都与内源 α -淀粉酶活性提高密切相

收稿日期: 2004-05-16

基金项目: 陕西省自然科学基金项目(2003C, 04); 杨凌农业生物技术育种中心(1999-5); 西北农林科技大学校基金资助

作者简介: 刘淑会(1969-), 女, 陕西杨凌人, 在读硕士, 实验师, 主要从事小麦远缘杂交遗传育种工作。

关,而大麦 2H 染色体长臂上的 Isa-H 基因控制 α -淀粉酶抑制蛋白的合成,合成的量比小麦多且活性强,如能将大麦的 Isa-H 基因导入到小麦遗传背景中,将为进一步的遗传研究及小麦穗发芽的防御提供宝贵材料,并对丰富小麦种质资源和小麦育种具有重要意义。

本课题从 1983 年开始进行小麦与大麦杂交工作,已获得了多个相对稳定的小大麦异附加系,并有目的地利用缺体回交法和辐射方法创制出 2D/2H 小大麦异代换系和易位系^[6,7],本研究利用染色体 C-分带和原位杂交技术相结合对所创制的材料进行鉴定,以完整麦穗吸水保湿发芽法测定穗发芽的抗性,结合农艺性状观测,创制具有抗穗发芽等优异特性的小大麦新种质。

1 材料和方法

1.1 材料

稳定的二体异附加系 WBA9812($2n=44$)是李璋等^[6,7]用普通小麦品种 7182 作母本,与 6 个栽培二棱大麦品种杂交,通过杂种幼胚培养获得 F_1 植株,用普通小麦品种昌农 82、中国春、小偃 107 等回交 2 次,再从各回交后代选择 $2n=43,44$ 的植株套袋自交,结合形态学和细胞学观察,从中选育的相对稳定的二体异附加系。

小大麦易位系 WBT371 是对小大麦二体异附加系 WBA9812($2n=44$)和 2D 阿勃缺体小麦($2n=40$)杂种 F_1 利用⁶⁰Co- γ 射线进行成株辐照处理,结合细胞学鉴定和农艺性状观察而获得的。

当前大田应用品种小偃 22 和小偃 107,抗穗发芽对照品种丰产 3 号。

1.2 方法

1.2.1 原位杂交 染色体制片:将种子在 25℃ 下萌发,待根长至 1~2 cm 时取下根尖在冰水中预处理 24 h,卡诺固定液(酒精:醋酸=3:1)固定 1~2 d。用水冲洗后,45%醋酸下压片,液氮冷冻揭片,气干,-20℃ 保存备用。

总基因组 DNA 的提取和标记:大麦和中国春的基因组 DNA 提取采用 CTAB 法,大麦 DNA 标记依照“DIG-Nick-Translation Mix (Sigma 公司)使用说明”采用 DIG-11-dUTP 缺刻平移法进行。

杂交液配制($2 \times 35 \mu\text{L}/\text{片}$):100% 去离子甲酰胺 25 μL , $20 \times \text{SSC}$ 3 μL ,50% (W/V) 硫酸葡聚糖 6 μL ,ssDNA(10 mg/mL)3 μL ,探针 DNA 3 μL ,封阻

DNA:探针 DNA 为 50:1。

杂交:变性处理后的每制片片加 35 μL 变性的杂交液,加盖玻片,在 60℃ 用 $2 \times \text{SSC}$ 润湿的盒中温育 10 min,然后放 37℃ 杂交过夜。

漂洗:依次在 $2 \times \text{SSC}$ 溶液室温漂洗 7 min,35% 去离子甲酰胺溶液 40℃ 漂洗 5 min, $2 \times \text{SSC}$ 溶液室温漂洗 5 min 和 $1 \times \text{PBS}$ 溶液室温漂洗 7 min。

荧光信号的检测:荧光信号的检测依照“Fluorescent Antibody Enhancer Set for DIG Detection”(Sigma 公司)说明进行。用 PI 染色,抗退色剂封片,荧光显微镜观察,照相。

1.2.2 染色体 C-分带 参照 Endo 的改良方法^[9]。

将种子消毒后用水浸泡,使种子吸胀露白后将种子摆放于垫有吸水纸的玻璃皿中,置于 23~25℃ 的温箱中发根,根长约 1~1.5 cm 时剪根。将剪取的根尖放在盛有水的取样瓶中,置于冰瓶中处理 20~24 h,采用酒精(95%):冰乙酸(V/V)=3:1 的卡诺氏固定液固定 2~3 d。根尖用 45% 冰乙酸(V/V)压片,将压好的片子在显微镜下检查,选择分散好、干净的片子。将片子放入液氮中处理 3 min 左右,立即用刀片揭去盖玻片。再将片子放入 45% 冰乙酸中过一下,然后转入 45~50℃ 的 45% (V/V) 冰乙酸中脱色 2.5~3 min,气干。镜检、选择分裂相好的染色体制片。将干燥的片子置于 45~50℃ 的 5% (W/V) $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 饱和液中处理 2.5 min,拿出后立即用水冲洗干净。然后将片子移入 45~50℃ 的 $2 \times \text{SSC}$ 溶液中处理 3~20 min,拿出片子后用水冲洗并用吸水纸吸去多余水分。在胶卷盒中倒入 22 mL 的磷酸缓冲液(用 1/15 mol/L 的 Na_2HPO_4 与 1/15 mol/L 的 KH_2PO_4 等量混合,调节 pH=6.8),滴入约 5~10 滴 Giemsa 染液,然后将 4 张片子背靠背放入盒中,染色约 30~60 min(染色时间和染液浓度要根据室内温度调节),将染好的片子用水冲洗干净,用吸耳球把片子吹干,OLMPUS BX60 显微镜观察、照相。

1.2.3 吸水纸保湿发芽法测定穗发芽抗性 在开花后 35~40 d、即蜡熟期至完熟期,各品种每重复随机取样 10 株,每株随机取 1 穗,麦穗带秆长度为 15 cm。麦穗用 1% 漂白粉溶液消毒 2 min 左右,将消毒的 10 个完整带秆麦穗放在吸水纸上,将其卷成筒状,直立于水池中(水深 13 cm),用喷雾器自上而下喷水,前 3 d 每天喷水 5~6 次,以后每天 3 次,以保持穗子湿润。第 5,8,11 d 分别随机取 2 穗,以芽鞘

为种子一半长作为发芽标准,记载全穗发芽率(SP_5 , SP_8 和 SP_{11}),并参照李美珍等^[4]方法计算平均发芽率 SP(以第 8 d 的总发芽数占总种子数的百分数表示),发芽指数 SI, $SI = SP_5 \times 7 + SP_8 \times 4 + SP_{11} \times 1$ 。

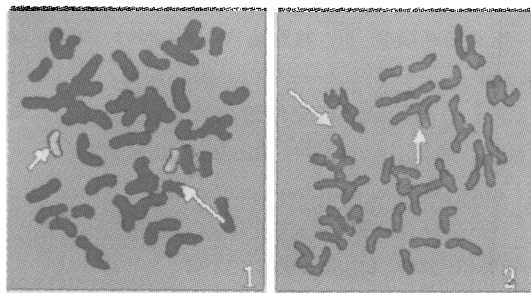
以抗穗发芽品种丰产 3 号和目前陕西主栽品种小偃 22 为对照。

试验在陕西省植物遗传工程育种重点实验室及植物所西院试验地进行。

2 结果与分析

2.1 原位杂交分析结果

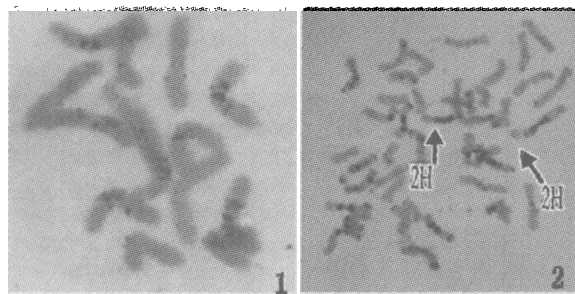
利用地高辛标记的大麦基因组 DNA 作为探针,中国春小麦染色体组 DNA 作封阻(用量 1:30 左右),与小大麦异附加系和易位系的体细胞染色体进行原位杂交。GISH 鉴定表明,在荧光显微镜下,具有杂交信号的大麦染色体显示为黄色,小麦染色体显示为橙红色。从图 1 可以看出,1 显示为黄色的 2 条染色体为 WBA9812 中的 2 条大麦染色体。2 显示为黄色的染色体片断为大麦染色体导入易位系 WBT371 的大麦染色体片断。因此可以断定 WBA9812 为二体小大麦异附加系, WBT371 为易位系,而且均为端部易位。



1: WBA9812; 2: WBT371. 箭头示黄色信号为大麦染色体或片断
1: WBA9812; 2: WBT371. Arrows which show yellow signals indicate the chromosome or chromosome fragments of barley

图 1 原位杂交鉴定结果

Fig. 1 The result of identification by GISH



1: 大麦; 2: WBA9812. 箭头示大麦 2H 染色体
1: barley; 2: WBA9812. The arrow show barley 2H chromosomes

图 2 染色体 C-分带鉴定结果

Fig. 2 The result of root chromosomes C-banding

2.2 染色体 C-分带分析结果

栽培大麦 C-带的共同特征是均显示着丝点带而不显示端带,这与普通小麦的 C-分带主要显示中间带、近端带和着丝点带+中间带或端带、近端带等带型较易区分。图 2 中 1 为农家二棱大麦染色体 C-分带图, 2 为小大麦异附加系 WBA9812。通过比较小大麦异附加系 WBA9812、易位系 WBT371 和农家二棱大麦的 C-带带型,发现 WBA9812 含有大麦的 2H 染色体(图 2, 2H 染色体长,着丝点附近有 4 条带)。易位系 WBT371 中未发现具有大麦的带型片断,可能是易位片断太短的缘故。

2.3 穗发芽抗性鉴定

利用吸水纸保湿发芽法来测定小大麦异附加系和易位系的穗发芽抗性,从表 1 可以看出,小偃 107 高感穗发芽,小偃 22 中感, WBA9812 和抗穗发芽对照品种丰产 3 号抗性相当,而易位系 WBT371 抗性稍优于对照丰产 3 号。

表 1 抗穗发芽测定结果

Tab. 1 The identification results of resistance to pre-harvest sprouting

品种名称 Variety name	种子平均发芽率 (%) (SP) Seed average germinate rate	穗发芽指数 (SI) Spike sprouting index
小偃 22 (Xiaoyan22)	28.2	68.9
小偃 107 (Xiaoyan107)	52.2	92.6
丰产 3 号 (FengchanNo. 3)	4.0	22.6
WBA9812	4.2	25.5
WBT371	2.3	8.3

2.4 易位系农艺性状

遗传性稳定的小大麦易位系 WBT371 除抗穗发芽外综合表现较突出,属半冬性,幼苗半匍匐,分蘖力强,幼苗健壮,叶片上挺、叶色深绿;株型紧凑,株高 80 cm;秆粗硬有弹性,抗倒伏性强。穗长方形,穗层整齐,成穗率高,结实性好。长芒、白壳、白粒、角质,千粒重 40 g。中早熟,比小偃 22 早熟 1~2 d,落黄好。对条锈病和黄矮病免疫,中抗叶枯、赤霉及白粉病,综合抗性好。据测定蛋白质含量为 14.65%,沉降值为 32.5 mL,吸水率为 59.6%,形成时间为 4.6 min,稳定时间为 7.2 min,软化度为 68 F.U,评价值为 70。

3 讨论

虽然大麦与小麦分别属于大麦族的不同亚族,亲缘关系较远,但其形态差异不是很明显,所以普通小麦-大麦异附加系、异代换系和易位系在形态上

较难与亲本区别开来^[5-7]。近年来,GISH 技术由于其不需要分离特异性探针,并具有快速、直观等优点而被广泛应用于分子细胞遗传学研究,实验技术已基本成熟^[8]。但 GISH 只能检测外源染色体是否导入及导入的数目,还难以鉴定出大麦的哪条染色体被导入。由于大麦染色体 C-带均显示着丝点带而不显示端带,而普通小麦主要显示中间带、近端带和着丝点带+中间带或端带、近端带等带型,因而普通小麦中的异源大麦染色体较易识别,这为普通小麦-大麦异附加系和代换系的细胞学鉴定提供了特定标记。染色体带型分析对整臂或大片段易位的鉴定有一定效果(如果易位片段涉及显带部分且具有特征性),但对不显带或带型无明显差异的区段和小片段易位就无能为力,本实验中易位系均未能表现出大麦的特异带型。

小麦穗发芽抗性的鉴定方法已有不少报道,如种子发芽法、人工模拟降雨诱发穗发芽测定法、种子休眠性、 α -淀粉酶活性和降落值、种子吸水速率、种子浸出液的电导率等生理生化测定法,其中常用的方法有以下三种:(1)直接检查发芽种子;(2)用脱粒的种子或完整的麦穗置于湿沙或吸水纸中,或者人工模拟湿润麦穗发芽试验;(3)分析种子内 α -淀粉酶活性凝胶溶解而引起的变化。上述三种方法,第一种方法简单易行,但受自然条件影响较大;第三种方法虽然 α -淀粉酶活性是穗发芽抗性可靠的生理指标,但它只能测定胚乳的状况,不能测定种子发芽的潜力;第二种方法如果用脱粒种子试验,只能测出种子休眠程度对穗发芽的影响,外源抑制物质及穗的形态结构对穗发芽的作用则难以了解,而用完整麦

穗进行试验,则能从种子休眠、外源抑制物质和穗部形态、结构等方面较直观、全面地反映其品种穗发芽特性。鉴定穗发芽的时期,一般认为最好是在小麦开花后 35~40 d 进行。本研究利用完整麦穗吸水纸保湿法检测出的 2 个抗穗发芽小大麦易位系,为进一步培育抗穗发芽小麦新品种创造了宝贵的种质资源。

参考文献:

- [1] 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(6):523-529.
- [2] 武高潮,杜运科.小麦穗发芽与抗穗芽种的选育[J].陕西农业科学,1996,(2):6-8.
- [3] 沈正兴,俞世蓉,吴兆苏.小麦品种抗穗发芽性的研究[J].中国农业科学,1991,24(5):44-50.
- [4] 李美珍,李世平,靖金莲.小麦穗发芽抗性研究[J].河南农业科学,1996,11:8-9.
- [5] 原亚萍,胡汉桥.应用基因组原位杂交及 RFLP 标记鉴定小麦中的的大麦染色体[J].遗传学报,2000,27(12):1080-1083.
- [6] 李 璋,刘翠云.普通小麦×栽培大麦杂种植株及回交后代的产生和鉴定[J].遗传学报,1987,14(3):188-192.
- [7] 刘翠云,李 璋,阎正禄.普通小麦×大麦杂种后代细胞遗传学研究[J].西北植物学报,1997,17(4):499-504.
- [8] 李子先,刘东旭.植物细胞遗传学的研究方法与技术[M].成都:四川科学技术出版社,1991.25-45.
- [9] Endo T R. Complete identification of wheat chromosomes by means of a C-banding technique[J]. Jpn J Genet,1986,61:89-93.