

利用细胞学和 RAPD 技术鉴定抗病小偃麦易位系*

王洪刚¹ 朱 军² 刘树兵¹

(¹山东农业大学农学系, 山东泰安 271018; ²浙江大学农业与生物技术学院, 浙江杭州 310029)

提 要 本研究对从中间偃麦草与小麦杂种后代中选育的小偃麦种质系 GP143, 在进行白粉病和条锈病抗性鉴定的基础上, 对其进行了细胞学和 RAPD 鉴定。结果证明 GP143 兼抗白粉病和条锈病, 其根尖细胞染色体数为 42, 花粉母细胞减数分裂中期 I (PMCM I) 染色体构型为 $2n=21II$, 在它与小麦的杂种 F_1 PMCM I 染色体构型中, 常观察到四价体; 对 GP143 及其双亲进行 RAPD 分析, 从 40 个随机引物中筛选出 4 个引物能够扩增出中间偃麦草亲本的特异 DNA 片段。初步确定 GP143 是一个小偃麦易位系。

关键词 小偃麦易位系; 抗病性; 细胞学; RAPD

Identification of Tritelytrigia Translocation Line with Disease Resistance by Cytology and RAPD Analysis

WANG Hong-Gang¹ ZHU Jun² LIU Shu-Bing¹

(¹Agronomy Department of Shandong Agricultural University, Taian 271018; ²Agriculture and Biotechnology College of Zhejiang University, Hangzhou, 310029, China)

Abstract *Tritelytrigia* gemplasm line GP143 with good resistance to powdery mildew and stripe rust, which came from the progeny of *Elytrigia intermedium* and Yannong15, was identified by cytology and RAPD analysis. The results showed that chromosome number of GP143 in root tip cell was 42, chromosome configuration of GP143 in PMCM I was $2n=21II$, and quadrivalent was observed in PMC of (F_1) hybrid between GP143 and different wheat varieties. GP143 and its parents were further analyzed by RAPD method. 40 random primers were used for RAPD amplification, the specific DNA of *E. intermedium* can be amplified by 4 of them in GP143. Therefore, GP143 was proved as a translocation line.

Key words *Tritelytrigia* translocation line; Disease resistance; Cytology; RAPD

在小麦的遗传改良中, 将小麦亲缘野生物种中携带优良基因的染色体片段转移到小麦染色体上, 育成异源易位系, 是拓宽小麦遗传基础, 创造新种质或培育新品种的重要途径。关于异源易位系的鉴定方法随着遗传学的发展, 已由传统的形态学方法和细胞学方法发展到生化和分子生物学方法。

RAPD 技术 (Random Amplified Polymorphic DNA) 是由 Williams^[1] 等发展起来的一项分子生物学技术。由于在其应用过程中, 与其他分子生物学技术相比, 它具有程序较为简单、

* 本研究由国家自然科学基金资助。(批准号: 39970458)

收稿日期: 2000-08-04, 接受日期: 2001-02-04

Received on: 2000-08-04, Accepted on: 2001-02-04

操作方便、所需样品量少等优点,不仅在基因定位、遗传作图和分子标记研究方面,而且在异源遗传物质的检测中已被广泛应用。刘树兵^[2]等通过RAPD分析建立了长穗偃麦草1E和3E染色体的特异RAPD标记。徐琼芳^[3]等,王洪刚^[4]等利用RAPD技术分别标记了抗黄矮病和抗白粉病小麦—中间偃麦草染色体异附加系。Qi^[5]等成功地利用RAPD标记,跟踪和鉴定了小麦—簇毛麦6AL/6VS易位系抗白粉病基因Pm21。鲍晓明^[6]等利用RAPD技术鉴定了两个小冰麦易位系。

本研究对从中间偃麦草与小麦杂种后代中选育的小偃麦种质系GP143,在抗病性鉴定的基础上,利用细胞学和RAPD技术进一步进行了鉴定。

1 材料和方法

1.1 材料

本研究利用的材料中间偃麦草(*Elytrigia intermedium*, $2n=42$)和普通小麦品种烟农15、铭贤169、辉县红,均为本实验室保存,小偃麦种质系GP143是由本实验室从烟农15与中间偃麦草杂交后代中选育而成。

1.2 方法

1.2.1 抗病性鉴定 白粉病的鉴定是将待鉴定材料冬播于温室内,行长40 cm,行距18 cm,每行播种30粒,重复两次。同时以感病品种铭贤169和辉县红作为对照并种成感染行。在感染行内接种白粉病15号菌种,当其大量繁殖后采集菌种抖洒在待鉴定材料叶片上,同时借助感染行进行诱发感染。苗期抗性按0、0.5、1、2、3、4六级标准调查。成株抗性鉴定是在试验网室内进行,方法同前,抗病性按0、1、2、3、4、5、6、7、8、9十级标准调查。条锈病抗性鉴定是在试验网室进行,种植方法同前。在拔节期,采用注射法对待鉴定材料和感染行材料接种条中27、29、30、31和水源46混合菌种,待感染行材料充分发病后按0、1、2、3、4、5六级标准调查抗病性。两种病害调查均只记载反应型和发病率,发病率以感病植株占调查植株总数的百分数表示。

1.2.2 细胞学鉴定方法 根尖细胞学鉴定是取适宜根尖低温预处理24小时,法氏固定液固定,铁矾—苏木精方法压片镜检。花粉母细胞染色体构型鉴定是取适期花药,卡诺液固定,席夫试剂染色压片镜检。

1.2.3 RAPD鉴定 DNA的提取采用Shaps^[7]等提出并经Devo^[8]等改进的方法。RAPD扩增引物为中国科学院遗传研究所分装美国Operon公司生产的十聚体核苷酸,本实验所用40个引物为E组和F组。扩增反应体积为20 μ L,其中包括10 mmol/L Tris·Cl, pH 8.5, 50 mmol/L KCl, 2.5 mmol/L MgCl₂, 600 μ mol/L dNTP, 15 ng引物, 20 ng模板DNA, 0.8U Taq酶。反应在DNA ThermalCycler 480PCR仪上进行,每个循环94 变性15秒,36 复性30秒,72 延伸45秒,46个循环后,在72 保温4分钟。扩增产物用1.4%琼脂糖凝胶电泳分离,紫外灯下观察结果并拍照。

2 结果与分析

2.1 抗病性鉴定

小偃麦种质系GP143是从烟农15与中间偃麦草杂种后代中选育出的高代稳定材料,株高80 cm,繁茂性好,多花多实,综合性状较为优良,植株形态明显具有双亲的特征。对其抗

白粉病和条锈病的鉴定结果(表 1)表明,小偃麦种质系 GP143 苗期和成株期对白粉病 15 号菌种和对条锈病混合菌种的反应型级值和发病率均较低,对以上两种病害均具有良好的抗性,这说明小偃麦种质系 GP143 兼抗白粉病和条锈病两种病害。由于 GP143 的亲本中间偃麦草对以上两种病害免疫,而亲本烟农 15 则表现感染,因此 GP143 对白粉病和条锈病抗性是来自中间偃麦草。

表 1 GP143 抗白粉病和抗条锈病鉴定结果

Table 1 The identification result on GP143 resisting powdery mildew and stripe rust

材料 Material	白粉病 Powdery mildew				条锈病 反应型 Reaction type of stripe rust	条锈病 感病率(%) Infection percentage of stripe rust
	苗期反应型 Reaction type in seedling stage	苗期感病率(%) Infection percentage in seedling stage	成株期反应型 Reaction type in adult stage	成株期感病率(%) Infection percentage in adult stage		
中间偃麦草 <i>Elytrigia intermedium</i>	0	0	0	0	0	0
烟农 15 Yannong 15	3	93.4	7	98.1	4	84.7
铭贤 169 Mingxian 169	4	100	9	100		
辉县红 Huixianhong	4	100	8	100	5	100
GP143	1	21.2	3	26.3	1	17.8

2.2 细胞学鉴定

细胞学鉴定结果表明,中间偃麦草和烟农 15 根尖细胞染色体数均为 $2n=42$, 烟农 15 花粉母细胞减数第一分裂中期(PMCM I)染色体构型为 $2n=21\text{II}$, 而中间偃麦草 PMCM I 染色体构型则较为复杂,既有多价体,也有单价体出现。GP143 是从烟农 15 与中间偃麦草杂种后代中选育出的高代稳定种质系,细胞学分析证明,该种质系根尖细胞染色体数目为 42 条(图 1), PMCM I 染色体构型较稳定,一般为 21 个二价体(图 2)。但在 GP143 与烟农 15 等材料的杂种 F_1 花粉母细胞内,常可观察到四价体(图 3),这表明 GP143 有可能是一个易位系。



图 1 GP143 根尖细胞染色体 $2n=42$
Fig. 1 Chromosomes of GP143 in root tip cell, $2n=42$



图 2 GP143 PMCM I 染色体构型, $2n=21\text{II}$
Fig. 2 Chromosome configuration of GP143 in PMCM I, $2n=21\text{II}$



图 3 GP143 与烟农 15 杂种 F_1 PMCM I 染色体构型, $2n=19\text{II}+1\text{IV}$
Fig. 3 Chromosome configuration of hybrid F_1 between GP143 and Yannong 15 in PMCM I

2.3 RAPD 鉴定

以中间偃麦草、烟农 15 和 GP143 为材料, 选用 Operon 公司生产的 E 组和 F 组的 40 个引物进行扩增反应, 扩增产物在 1.4% 琼脂糖凝胶中均能分出较为清晰的带, 不同引物扩增的带从 1~6 条不等。在 40 个引物中有 4 个引物扩增出特异带型, 经过多次重复这些带型能够稳定出现, 可将它们区分为两种类型。第一种类型: GP143 与中间偃麦草的带型一致, 烟农 15 亲本缺少个别带。例如, OPE-02(GGTGCGGGAA) 引物在 GP143 和中间偃麦草中扩增出两条相同的带, 而在烟农 15 中仅扩增出一条带, 在 1.3 kb 处三个材料有一条共同的带, 但在 0.8 kb 处烟农 15 则缺乏此带(图 4), 说明此带是中间偃麦草特异序列的扩增产物。OPF-07(CCGA TATCCC) 引物在 GP143 和中间偃麦草中扩增出 4 条相同的带, 但在烟农 15 中仅扩增出 2 条带, 在 1.0 kb 和 0.6 kb 处 3 个材料扩增有 2 条相同的带, 而在 1.6 kb 和 1.2 kb 处烟农 15 则缺乏这 2 条带(图 5), 说明该两条带是中间偃麦草特异序列的扩增产物。第二种类型: GP143 与中间偃麦草的带型一致, 但缺少烟农 15 亲本中的带。例如, OPE-14(TGCGGCTGAG) 引物在 GP143 和中间偃麦草中扩增出 2 条相同的带, 但在烟农 15 中扩增出 3 条带, 在 1.0 kb 和 0.6 kb 处 3 个材料均有 2 条相同的带, 而在 0.5 kb 处烟农 15 则增加一条带(图 6)。引物 OPF-10(GGAA GCTTGG) 在 GP143 和中间偃麦草中扩增出一条相同的带, 而在烟农 15 中扩增出 2 条带, 在 0.6 kb 处 3 个材料均有一条相同的带, 但烟农 15 在 0.5 kb 处增加一条带(图 7)。

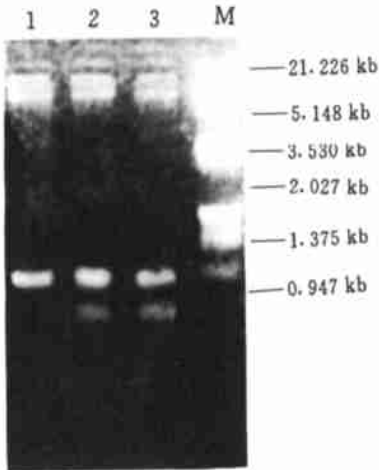


图 4 引物 OPE-02 的扩增结果

1. 烟农 15; 2. GP143; 3. 中间偃麦草
M. 分子量标准(λ DNA/*Hind*III+*Eco*R I)

Fig. 4 RAPD using primer OPE-02

1. Yannong 15; 2. GP143; 3. *E. intermedium*; M.
Molecular weight marker (λ DNA/*Hind*III+*Eco*R I)

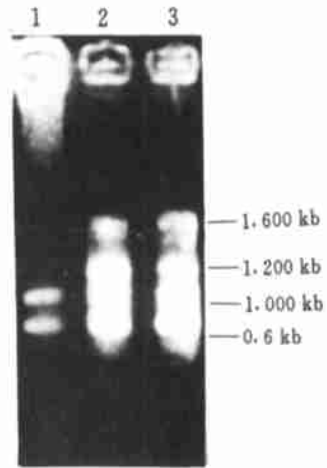


图 5 引物 OPE-07 的扩增结果

1. 烟农 15; 2. GP143; 3. 中间偃麦草

Fig. 5 RAPD using primer OPE-07

1. Yannong 15; 2. GP143;
3. *E. intermedium*

以上结果表明, 在 GP143 中含有中间偃麦草的 DNA 序列, 结合细胞学鉴定结果可以初步确定 GP143 是一个烟农 15 与中间偃麦草染色体的易位系。

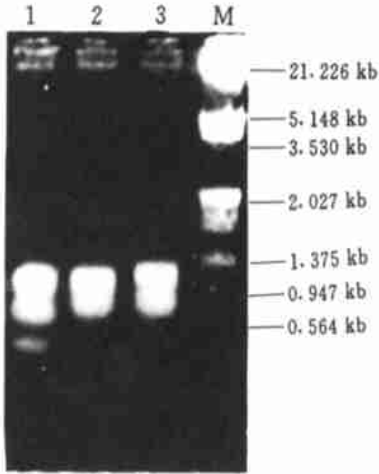


图6 引物OPE-14的扩增结果

1. 烟农15; 2. GP143; 3. 中间偃麦草
M. 分子量标准(λ DNA/*Hind*III+*Eco*R I)

Fig. 6 RAPD using primer OPE-14

1. Yannong15; 2. GP143; 3. *E. intermedium*;

M. Molecular weight marker(λ DNA/*Hind*III+*Eco*R I)



图7 引物OPE-10的扩增结果

1. 烟农15; 2. GP143; 3. 中间偃麦草

Fig. 7 RAPD using primer OPE-10

1. Yannong15; 2. GP143;

3. *E. intermedium*

3 讨论

小偃麦种质系 GP143 是从中间偃麦草与烟农 15 杂种后代中选育的一个综合性状较好、高抗条锈和白粉病的优良种质材料。抗病性鉴定结果证明, 中间偃麦草对条锈和白粉病免疫, 烟农 15 对条锈和白粉病均表现感染, 而 GP143 对以上两种病害则表现高抗, 这表明其抗性可能来自中间偃麦草。通过细胞学和 RAPD 鉴定, 可以初步确定 GP143 是一个烟农 15 与中间偃麦草染色体的易位系。

参 考 文 献

- 1 Williams J G K, A R Kubelik, J. L. Kenneth, et al *Nucleic Acid Res*, 1990, 18: 6531~ 6535
- 2 刘树兵, 贾继增, 王洪刚等 作物学报, 1998, 24(6): 687~ 690
- 3 徐琼芳, 马有志, 辛志勇等 遗传学报, 1999, 26(1): 49~ 53
- 4 王洪刚, 张建民, 刘树兵 西北植物学报, 2000, 20(1): 64~ 67
- 5 Lili Qi, Mingshu Cao, Peidu Chen, et al *Genome*, 1996, 39: 191~ 197
- 6 鲍晓明, 黄百渠, 李松涛等 遗传学报, 1993, 20(1): 81~ 87
- 7 Sharp P J, S Chao, S Desai, et al *Theor Appl Genet*, 1989, 78: 342~ 348
- 8 Devos K M, Tillan, M D Gale, et al *Theor Appl Genet*, 1993, 85: 784~ 792