



小麦-大麦矮秆易位系 T2DL·2HS 的鉴定

孙树贵, 刘淑会, 鲁 敏, 王亮明, 杜万里, 陈新宏*

(西北农林科技大学 农学院, 陕西杨陵 712100)

摘 要: 利用形态学、细胞学及分子标记技术对从普通小麦和农家二棱大麦的杂交后代中选育的矮秆种质系 WB7-3 进行了鉴定。结果表明: WB7-3 田间农艺性状较好, 且表现为矮秆; 根尖细胞染色体数目为 $2n=42$, 花粉母细胞减数分裂中期 I(PMC MI) 染色体构型为 $2n=21\text{II}$, 基因组原位杂交(GISH)未出现杂交信号; 位于大麦 2H 染色体短臂上的特异 STS 引物 ABC454 能在 WB7-3 中扩增出大麦特征条带, 表明 WB7-3 含有大麦 2HS 的染色体片段; 利用 210 对位于小麦各条染色体上的 SSR 引物对其进行扩增结果显示, 2DS 上 4 对引物(Xgdm35、Xgdm5、Xgwm261 和 Xgwm455)在 WB7-3 中有条带缺失, 由此确定该小麦矮秆材料 WB7-3 是一个 2DL/2HS 小片段易位系。

关键词: 小麦; 大麦; 矮秆; T2DL·2HS; STS; SSR

中图分类号: Q343.2⁺4; Q789

文献标志码: A

Identification of a Dwarf Translocation Line T2DL·2HS from Wheat-Barley Descendants

SUN Shugui, LIU Shuhui, LU Min, WANG Liangming, DU Wanli, CHEN Xinhong*

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

Abstract: Morphology, cytology and STS, SSR markers were adopted to identify the dwarf line WB7-3 selected from the progenies of common wheat cv. 7182 × two-rowed barley. The results showed that WB7-3 grew evenly presenting favorable agronomic traits and its plant height was very low; the chromosome number of WB7-3 in root tip cells was 42 with 21 bivalents observed in most PMC at MI, and no fluorescence signals appeared in genomic in situ hybridization (GISH) analysis using barley whole genome DNA; but special strip of barley emerged in WB7-3 at STS marker ABC454—one specific STS primer from barley. Meanwhile, the result of amplification using 210 SSR markers from wheat each chromosome was that all strips of wheat emerged in WB7-3 except four markers (Xgdm35, Xgdm5, Xgwm261 and Xgwm455) which from the short arm of 2D chromosome. It showed that WB7-3 was probably a 2DL/2HS small fragment translocation line.

Key words: wheat; *Hordeum disticum*; dwarf; 2DL/2HS translocation line; STS; SSR

大麦(*Hordeum disticum*)具有早熟、多花多粒、耐瘠、耐盐、抗穗发芽等优良性状, 有些品种还抗黄矮病, 通过远缘杂交将大麦的优良性状导入到小

麦, 对拓宽小麦遗传背景具有重要意义。自 20 世纪 70 年代起, 国内外育种家已获得丰富的小大麦中间材料^[1-5], 同时将大麦的许多有益基因导入到小麦

收稿日期: 2013-09-21; 修改稿收到日期: 2013-11-03

基金项目: 陕西省科技统筹创新工程重大项目(2011KTZB02-01); 农业部 948 项目(2013-Z28); 西北农林科技大学唐仲英育种基金

作者简介: 孙树贵(1989—), 男, 在读硕士研究生, 主要从事小麦-大麦远缘杂交研究。E-mail: sunshugui@126.com

* 通信作者: 陈新宏, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事小麦远缘杂交研究。E-mail: cxh2089@126.com

中^[6-10],极大地改良了小麦的遗传基础。

株高是小麦的重要性状之一,矮秆和半矮秆品种的育成与推广对产量的提高起到了关键性作用,极大地提高了世界粮食产量。目前,小麦中报道的矮秆基因约 30 个,但生产上广泛应用的仅有 *Rht-B1b*、*Rht-D1b* 和 *Rht8*^[11] 等个别基因,其利用的单一化在一定程度上限制了小麦品种产量潜力的进一步提高,因此,发掘和利用新的矮秆基因尤为重要。远缘杂交是获得新矮秆种质资源的有效途径之一。目前,多位学者已从小麦与中间偃麦草^[12]、粗山羊草^[13]、华山新麦草^[14]、长穗偃麦草^[15] 的杂交后代中选育了矮秆品系,丰富了小麦的矮源,但尚未见小大麦矮秆后代的相关报道。

本课题组从 1982 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中间材料^[3,5,10,16]。本研究以小大麦矮秆衍生后代 WB7-3 为材料,利用细胞学、分子标记等手段对其进行鉴定,旨在为 WB7-3 在小麦遗传育种中的利用提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料

‘WB7-3’是普通小麦品种‘7182’(母本,2n=6x=42,AABBDD)与‘农家二棱’大麦(父本,2n=2x=14,HH)杂交后,再与‘7182’回交多代获得的稳定矮秆材料。试验所用小-大麦材料‘WB7-3’及其亲本普通小麦‘7182’、‘农家二棱’大麦均由陕西省植物遗传工程育种重点实验室选育、保存和提供。

1.2 方法

1.2.1 农艺性状统计 供试材料于 2011 年 10 月和 2012 年 10 月分别种植于西北农林科技大学西北植物研究所试验田,田间进行形态学观察,并调查、统计株高、小穗数、穗粒数、千粒重等农艺性状。文中数据为 2 年调查结果的平均值。

1.2.2 细胞学观察 根尖细胞染色体数目鉴定:供试材料种子水中浸泡 12 h,置于垫有 2 层湿润滤纸的培养皿内发芽,当根尖长 1~2 cm 时剪取,冰水处理 24 h,用卡诺氏 I 固定液(乙醇:冰乙酸=3:1)固定,4℃保存。取固定 1~3 d 的根尖用 1 mol/L 的盐酸解离 8~10 min,醋酸洋红染色制片,染色体计数并照相。

花粉母细胞减数分裂中期 I (PMC MI) 染色体构型分析:上午 7:00~8:00 田间取材,卡诺氏 II 固定液(乙醇:氯仿:冰乙酸=6:3:1)固定,2~5

d 后取花粉母细胞处于减数分裂中期 I 的花药,醋酸洋红压片,镜检计数,照相。

1.2.3 基因组原位杂交(GISH) GISH 程序参考 Wu 等^[17] 的方法。大麦基因组 DNA 利用地高辛(digoxigenin-11-dUTP, DIG; Roche, Germany)缺口平移法标记。40 μL 杂交液包含:20×SSC 4 μL, 5 μg/μL 鲑鱼精 DNA 1 μL, 10%(W/V) SDS 1 μL, 50%(W/V) DS 8 μL, 甲酰胺 20 μL, 探针 DNA 100 ng, 超纯水补平至 40 μL。杂交信号用荧光素(Anti-Dig FITC)检测,抗褪色剂(H-1300)封片复染, Olympus BX60 荧光显微镜观察, Photometrics Sensys CCD 成像。

1.2.4 STS 和 SSR 分析 采用 CTAB 法提取各材料总 DNA, 稀释成 50 ng/μL 用于 PCR 分析。

根据 Blake 等^[18] 发表的大麦染色体特异 STS 标记, 各条染色体上分别选取 4 对引物进行扩增。SSR 分析选用位于小麦 21 条染色体长、短臂上各 10 对 SSR 引物, 所有引物均由上海生工生物技术有限公司合成。反应体系: 20 μL 反应体系包括 10×PCR Buffer(含 Mg²⁺) 2 μL, dNTP Mixture(2.5 μmol/mL) 1.6 μL, 引物(2.5 μmol/mL) 2 μL, TaqE (5 U/μL) 0.1 μL, 模板 DNA(40~60 μg/μL) 2 μL, ddH₂O 12.3 μL。PTC-200 扩增仪扩增, 反应程序: 94℃预变性 2 min, 94℃变性 1 min, 50℃~60℃退火 1 min, 72℃延伸 50 s, 30 个循环, 72℃延伸 10 min。扩增产物用 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶进行检测, 银染并照相。

2 结果与分析

2.1 WB7-3 主要农艺性状

WB7-3 田间主要表现为矮秆(平均株高仅为 34.6 cm)。与亲本小麦相比, WB7-3 的主要农艺性状有较明显变化, 其中单株穗数、穗长有所下降, 但小穗数、穗粒数、千粒重等产量性状有较大改善(表 1)。从整体的农艺性状上来看, WB7-3 农艺性状稳定, 结实性好, 籽粒饱满, 早熟, 抗旱, 整体表现优于小麦亲本‘7182’, 是较好的遗传材料。WB7-3 及其亲本的株型比较见图 1。

2.2 细胞学鉴定结果

对 WB7-3 根尖细胞染色体数目和花粉母细胞减数分裂中期 I (PMC MI) 染色体构型进行观察表明, WB7-3 染色体数目为 2n=42(图 2, A); 花粉母细胞减数分裂中期 I (PMC MI) 形成 21 个二价体, 其构型为 2n=21 II(图 2, B), 说明 WB7-3 具有

表 1 WB7-3 及其亲本农艺性状

Table 1 The agronomic characters of WB7-3 and its parents

供试材料 The tested materials	株高 Plant height /cm	单株穗数 Panicles per hill	穗长 Spike length /cm	小穗数 Spikelet per spike	穗粒数 Kernels per spike	千粒重 Thousand-grain weight/g
7182	76.0	6.3	8.6	16.2	45.8	42.2
农家二棱大麦 Two-rowed barley	88.4	9.2	5.5	30.2	26.5	53.5
WB7-3	34.6	4.4	6.7	18.7	52.7	45.7

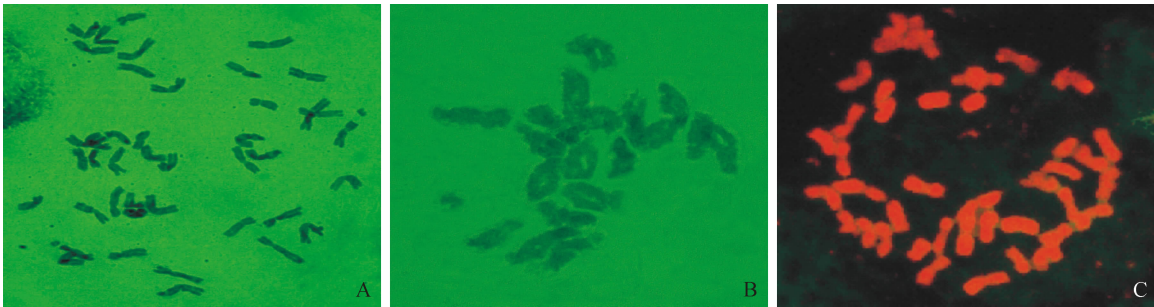


图 2 WB7-3 细胞学鉴定结果

A. 根尖细胞染色体计数($2n=42$);B. 花粉母细胞中期 I 染色体构型($2n=21\text{ II}$);C. 根尖细胞染色体原位杂交图

Fig. 2 Results of cytological identification

A. The chromosome number in root-tip cell($2n=42$);B. Chromosome configuration of WB7-3 at PMC M I ($2n=21\text{ II}$);C. Genomic *in situ* hybridization (GISH) analysis of WB7-3

测到黄绿色杂交信号。

2.3 STS 结果分析

根据 Blake 等^[18]发表的大麦 STS 标记,在 1H-7H 染色体上分别选取 4 对特异引物对普通小麦‘7182’、‘农家二棱’大麦及 WB7-3 进行 PCR 检测,结果表明:只有位于 2H 染色体短臂上的引物 ABC454 在 WB7-3 中扩增出了大麦特异条带,条带大小约 150 bp(图 3,A),说明 WB7-3 含有大麦 2HS 的染色体片段。2H 染色体上的其他 3 对引物(ABA005、ABG058、ABC252-2HL)在 WB7-3 中均未能扩增出特异条带,进一步说明 WB7-3 中的外源染色体片段较小。

2.4 SSR 结果分析

用小麦 21 条染色体上共 210 对 SSR 引物对 WB7-3 及其亲本进行扩增,结果表明,除 2DS 上的 4 对引物(Xgdm35、Xgdm5、Xgwm261 和 Xgwm455)在 WB7-3 中有条带缺失(图 3,B~E)外,其余引物均能在 WB7-3 中扩增出小麦相应的条带,说明 WB7-3 基因型仍为 AABBDD,且缺失了 2D 染色体短臂的部分片段。在 GrainGenes 网站上查找引物位置时发现,这 4 对引物相互距离较近,由此判断 WB7-3 为 2DL/2HS 小片段易位系,外源片段插入位点在分子标记 Xgdm35 和 Xgwm261 附近。



图 1 WB7-3 及其亲本株型对比

A. 普通小麦 7182;B. 农家二棱大麦;C. WB7-3

Fig. 1 Comparison of plant type between WB7-3 and its parents

A. Common wheat 7182;B. Two-rowed barley;C. WB7-3

较好的细胞学稳定性。为进一步明确 WB7-3 染色体组成,利用大麦基因组 DNA 为探针进行荧光原位杂交(GISH)鉴定,结果显示:WB7-3 的各条染色体上均未出现荧光信号(图 2,C),推测 WB7-3 可能为小片段易位系,由于外源染色体片段较小而未检

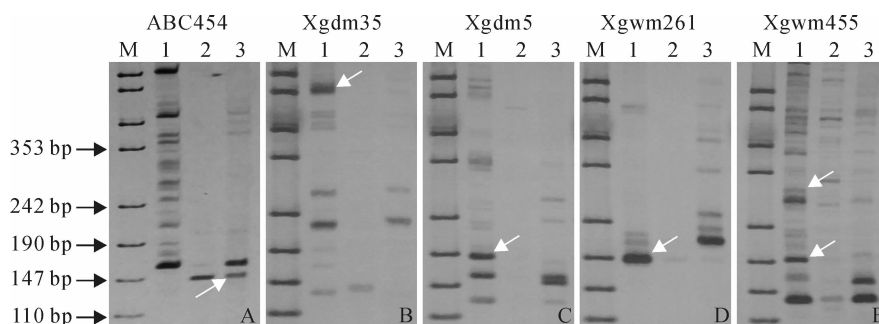


图 3 STS(A)及 SSR(B~E)扩增结果

M. DNA marker PUC18;1. 普通小麦 7182;2. 农家二棱大麦;3. WB7-3

Fig. 3 The amplification patterns of STS(A) and SSR markers (B~E)

M. DNA marker PUC18;1. Common wheat 7182;2. Two-rowed barley;3. WB7-3

3 讨论

随着分子标记技术的发展,多数矮秆基因均已获得与其紧密连锁的分子标记,并在鉴定小麦矮秆基因方面得到广泛应用。Korzun 等^[19]和 Worland^[20]研究结果表明,位于 2DS 上的 SSR 标记 Xgwm261 与小麦矮秆基因 *Rht8* 紧密连锁,凡是能够扩增出 192 bp 片段的品种被认为含有 *Rht8*。由图 3, D 可看出, Xgwm261 在亲本小麦‘7182’中可扩增出 192 bp 的条带,而在 WB7-3 中未出现该大小的条带,说明普通小麦‘7182’含有矮秆基因 *Rht8*, WB7-3 则不含有该基因。但 WB7-3 田间表现却比‘7182’更矮,导致这一现象的原因将进一步通过后续试验进行研究。

小麦遗传背景中外源染色体的检测手段多种多样,传统的 C-分带、基因组原位杂交等技术不仅难度大、费时费力,而且在鉴定小片段外源染色体方面具有一定的局限性,分子标记技术由于可直接在 DNA 分子水平上进行检测,能够准确指出小麦中外源染色体片段的组成、大小和位置而得到广泛应用。STS 即序列标签位点,在小麦中的外源物质检测方面应用较为广泛,利用 STS 标记已成功鉴定出小麦背景中的簇毛麦、黑麦等小麦近缘种的染色体片段^[21-23]。STS 标记遍布于大麦各条染色体,Blake

等^[18]利用大麦 RFLP 标记开发了 115 个能扩增出大麦特异条带的 STS 标记,这些标记对检测小-大麦杂种后代中的外源遗传物质起重要的辅助作用。Sherman 等^[24]利用 4H 染色体上的 9 个 STS 标记,从携带 *ph1b* 基因的小-大麦 4H 二体附加系的中检测出 20 株缺失大麦某些特征带的小大麦重组类型。本研究在对 WB7-3 多次进行原位杂交鉴定均未出现杂交信号后,利用大麦特异 STS 分子标记对其进行检测,明确了外源染色体片段的归属。

通过远缘杂交创造携带有益基因的易位系材料,在小麦遗传改良中起到了重要作用。自 20 世纪 50 年代起,由于黑麦 1RS 上携带了多种抗病基因,使得 1BL/1RS 易位系得到了广泛应用。王金平等^[25]通过细胞学和 SSR 技术,鉴定出兼抗白粉和条锈的小滨麦易位系‘山农 6343’。贾举庆等^[26]利用非洲黑麦与小麦杂交,获得了抗条锈病的渐渗系材料。陈全战等^[27]利用染色体 C-分带和基因组原位杂交,选育出高抗梭条花叶病小麦-簇毛麦易位系 T4VS·4VL-4AL。王秀娥等^[28]利用小麦 7 个部分同源群上的 67 个 RFLP 标记对小麦-大赖草后代材料进行分析,获得了 3 个小麦-大赖草易位系。本研究鉴定结果表明,‘WB7-3’是一个矮秆、综合性状较好的小大麦 2DL/2HS 易位系材料,在小麦育种工作中将有较高的利用价值。

参考文献:

- [1] ISLAM A K M R, SHEPHERD K W, SPARROW D H B. Addition of individual barley chromosomes to wheat[J]. *Barley Genetics*, 1975, 3: 260-270.
- [2] YUAN Y P(原亚萍), CHEN X(陈孝), XIAO SH H(肖世和), et al. Identification of wheat-barley 2H alien substitution lines[J]. *Chinese Bulletin of Botany(植物学报)*, 2003, 45(9): 1 096-1 102(in Chinese).
- [3] CHEN X H(陈新宏), WANG X L(王小利), LIU SH H(刘淑会), et al. Identification of wheat and barley hybrid offspring by GISH and PAGE[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology(遗传学报)*, 2004, 31(7): 730-734(in Chinese).

- [4] WANG X E(王秀娥), ZHAO Y(赵彦), *et al.* Preliminary identification of *Triticum aestivum* L. -*Hordeum californicum* alien chromosome lines by PCR technique[J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*(南京农业大学学报), 2004, **27**(4): 1—5(in Chinese).
- [5] LIU SH H(刘淑会), CHEN X H(陈新宏), LI ZH(李璋), *et al.* Creation and identification of wheat-barley alien substitution line[J]. *Acta Bot. Boreal. -Occident. Sin.* (西北植物学报), 2008, **28**(8): 1 554—1 558(in Chinese).
- [6] MCGUIRE P E. Status of an attempt to transfer the barley yellow dwarf virus resistance gene ydz of barley to hexaploid wheat[J]. *Plant Breeding Abstracts*, 1981, **57**(1): 161—165.
- [7] YAN X F(阎新甫), LIU W X(刘文轩), WANG SH J(王胜军), *et al.* Inheritance of powdery mildew resistance in variants obtained by introducing barley DNA into wheat[J]. *Hereditas*(遗传), 1994, **16**(1): 26—30(in Chinese).
- [8] SUN G Z(孙光祖), LI ZH J(李忠杰), LI X CH(李希臣), *et al.* Selection of wheat new line with resistance to bydv and rard technique[J]. *Acta Agriculturae Nucleatae Sinica*(核农学报), 2000, **14**(2): 72—75(in Chinese).
- [9] ZHANG Y(张艳), YUAN Y P(原亚萍), CHEN X(陈孝), *et al.* Effect of barley 2H chromosome on agronomic traits and quality characteristics of common wheat[J]. *Journal of Triticeae Crops*(麦类作物学报), 2007, **27**(3): 402—406(in Chinese).
- [10] LIU SH H(刘淑会), CHEN X H(陈新宏), ZHAO J X(赵继新), *et al.* Study on identification and application for 2D/2H wheat-barley translocation line with pre-harvest sprouting resistance[J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*(华北农学报), 2005, **20**(1): 71—74(in Chinese).
- [11] HAN J R(韩静然), WANG CH Y(王长有), ZHAO N J(赵宁娟), *et al.* Genetic analysis of dwarf trait in new winter wheat germplasm N0238D[J]. *Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica*(西北农业学报), 2010, **19**(6): 60—63(in Chinese).
- [12] BAO Y G(鲍印广), CUI F(崔法), LI X F(李兴锋), *et al.* Breeding and identification of a dwarf and earliness trititrigia germplasm Shannong 0057-2[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*(农业生物技术学报), 2009, **17**(4): 684—698(in Chinese).
- [13] ZONG H(宗浩), CUI F(崔法), BAO Y G(鲍印广), *et al.* Developing molecular markers for the Rht gene in dwarfing germplasm line Shannong 495[J]. *Journal of Triticeae Crops*(麦类作物学报), 2009, **29**(3): 385—389(in Chinese).
- [14] WU J(武军), MA L(马琳), ZHAO J X(赵继新), *et al.* Molecular cytology on a dwarf germplasm derived from *Triticum aestivum* × *Psathyrostachys huashanica* [J]. *Journal of Northwest A&F University*(Nat. Sci. Edi.) (西北农林科技大学学报·自然科学版), 2010, **38**(12): 123—127(in Chinese).
- [15] 陈桂玲. 小麦-长穗偃麦草矮秆种质系的遗传分析与矮秆基因标记定位研究[D]. 山东泰安: 山东农业大学, 2011.
- [16] CHEN X H(陈新宏), LIU SH H(刘淑会), ZHAO J X(赵继新), *et al.* Molecular cytogenetics identification of wheat-barley alien additional lines [J]. *Journal of Northwest A&F University*(Nat. Sci. Edi.) (西北农林科技大学学报·自然科学版), 2003, **31**(6): 5—8(in Chinese).
- [17] WU J, YANG X M, WANG H, *et al.* The introgression of chromosome 6P specifying for increased numbers of florets and kernels from *agropyron cristatum* into wheat[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2006, **114**(1): 13—20.
- [18] BLAKE T, KADYRZHANOVA D, SHEPHERD K W, *et al.* STS-PCR markers appropriate for wheat-barley introgression[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1996, **3**(5—6): 826—832.
- [19] KORZUN V, RODER M, GANAL M, *et al.* Genetic analysis of the dwarfing gene (*Rht8*) in wheat. Part I. Molecular mapping of *Rht8* on the short arm of chromosome 2D of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1998, **96**(8): 1 104—1 109.
- [20] WORLAND A, KORZUN V, RODER M, *et al.* Genetic analysis of the dwarfing gene *Rht8* in wheat. Part II. The distribution and adaptive significance of allelic variants at the *Rht8* locus of wheat as revealed by microsatellite screening[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1998, **96**(8): 1 110—1 120.
- [21] CHEN Q, CONNER R L, LAROCHE. A molecular characterization of haynaldii villosa chromatin in wheat lines carrying resistance to wheat curl mite colonization[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1996, **93**(6): 679—684.
- [22] LEE J H, KAEPLER S M, GRAYBOSCH R A, *et al.* A PCR assay for detection of a 2RL, 2BS wheat-rye chromosome translocation [J]. *Genome*, 1996, **39**(3): 605—608.
- [23] KOEBNER R. Generation of PCR-based markers for the detection of rye chromatin in a wheat background[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1995, **90**(5): 740—745.
- [24] SHERMAN J D, SMITH L Y, BLAKE T K, *et al.* Identification of barley genome segments introgressed into wheat using PCR markers [J]. *Genome*, 2001, **44**(1): 38—44.
- [25] WANG J P(王金平), WANG H G(王洪刚). Cytological and SSR analysis of tritileymus germplasm line Shannong 6343 with resistance to both powdery mildew and yellow rust[J]. *Journal of Plant Genetic Resources*(植物遗传资源学报), 2009, **10**(1): 46—50(in Chinese).
- [26] JIA J Q(贾举庆), GUO H Y(郭红媛), LI Q R(李倩冉), *et al.* Molecular cytogenetic characterization of *Secale africanum* introgression wheat lines for resistance to stripe rust[J]. *Journal of Shanxi Agricultural University*(Nat. Sci. Edi.) (山西农业大学学报·自然科学版), 2012, **32**(4): 301—306(in Chinese).
- [27] CHEN Q ZH(陈全战), WANG G F(王官锋), CHEN H F(陈华锋), *et al.* Development and characterization of *Triticum aestivum*-*Haynaldia villosa* translocation line T4VS·4VL-4AL[J]. *Acta Agronomica Sinica*(作物学报), 2007, **33**(6): 871—877(in Chinese).
- [28] WANG X E(王秀娥), CHEN P D(陈佩度), ZHOU B(周波), *et al.* RFLP analysis of wheat-L. racemosus translocation lines[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*(遗传学报), 2001, **28**(12): 1 142—1 150(in Chinese).