中国科学(B 辑)
第25卷 第10期 SCIENCE IN CHINA (Series B) 1995年10月

一个抗小麦黄矮病新种质的选育和鉴定

贾 旭 聂道泰 胡适全 朱立煌 胡 含 贾双娥 庄家骏
(中国科学院遗传研究所，北京 100101)
钱幼亭 周广和
(中国农业科学院植物保护研究所，北京 100094)

摘要 通过广泛的田间鉴定、温室鉴定以及酶联检测(ELISA)，从77-5433×中5组合的F_9代中选出一个高抗小麦黄矮病的材料，HG295. HG295的体细胞染色体数为42，在减数分裂中期I，在大部分花粉母细胞中可观察到21个二价体，这说明HG295是一个整倍体材料，遗传上业已稳定. 对(HG295×77-5433)F_1代花粉母细胞的观察表明，HG295含有较多的外源遗传物质，可能是一个双体异代换系或具有较大外源片断的易位系. 利用最近发展起来的RAPD标记和Southern杂交等技术，证实了HG295中确实存在来自于中间偃麦草的DNA.

关键词 小麦黄矮病 BYDV ELISA 代换系 易位系 RAPD

小麦黄矮病是由大麦黄矮病病毒(BYDV)侵染小麦所引起的病毒病，是一个较难预测的病害，危害甚广. 尽管通过某些栽培措施能起到一定的防治作用，但普遍认为品种抗性的利用是一条有效的途径. 然而，在普通小麦中还未发现良好的抗源[1~3]. 在大麦中，已发现几个抗性基因[4]，McGuire PE等对大小麦杂交进行了研究，试图将大麦中的Yd2基因转移到小麦中[5,6]. 在小麦近缘种属中，已鉴定出13个种对BYDV的PAV株系有良好的抗性，其中中间偃麦草(*Thinopyrum intermedium* 或 *Agropyrum intermedium*)的黄矮病抗性利用的研究进行得较多，并育成了几个对BYDV具有抗性的中间型材料，如部分双二倍体TAF46，无芒中4，中5以及由TAF育成的双体异附加系L1[7~9]. 辛志勇等利用L1为抗源，成功地将L1中的黄矮病抗性转移到小麦基因组[10]. 由于无芒中4，中5对中国流行的GPV株系的抗性要比TAF46，L1强[11]，因而其抗性的利用不容忽视.

RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA)是近年在PCR(Polymerase Chain Reaction)技术基础上发展起来的新技术[12]，在某些方面它比RFLP更实用，具有快速、无放射性污染和DNA用量少等特点，特别是在检测远缘杂种中外源遗传物质的存在上，它的作用受到充分的肯定. 在本研究中，我们从小麦栽培品种77-5433/中5的杂交组合中选育出一个抗BYDV品系HG295，并用细胞学和RAPD技术确认了其中间偃麦草的成分.

1994-12-10收稿，1995-03-28收修改稿

1 材料和方法

1.1 材料

中 5、中间偃麦草种子由孙善澄先生提供. 普通小麦品种有 77-5433, 燕麦有岸黑.

1.2 方法

1.2.1 小麦黄矮病抗性鉴定 田间鉴定和温室鉴定采用 BYDV 的 GPV 和 PAV 株系, 方法与钱幼亭等报道的基本相同[13]. 酶联检测用 PAV 株系, 方法与 Xin Z Y 等报道的基本相同[8]. 不同的是植株维持在 15 000LUX 光照下 12 h/d, 白天 20 ℃, 晚上 7 ℃的环境箱中.

1.2.2 细胞学鉴定 根尖体细胞染色体检定的方法为取生长旺盛的根尖, 在 0 ~ 4 ℃水中处理 24 h, 卡诺氏固定液固定一周后, 醋酸洋红染色, 45% 醋酸压片. 花粉母细胞观察的方法是在上午 11 ~ 12 时剥取合适穗子固定 1 ~ 2 d. 固定液为酒精: 氯仿: 冰醋酸 (6:3:1), 醋酸洋红压片.

1.2.3 DNA 的提取和 RAPD 分析 从新鲜叶片中提取 DNA. 方法主要采用 Murray 和 Thompson 报道的[14] 以及 Bernatchy 和 Tauksley 报道的程序[15]. 扩增条件与 Williams 等报道的基本相同[12]. 在 25 μL 反应液中, 加入约 20 ng DNA 作为模板. 反应液组成为 10 mmol/L Tris-HCl (PH8.3), 50 mmol/L KCl, 2.0 mmol/L $MgCl_2$, 0.001% gelatin, 200 μmol/L 各种 dNTP, 0.2 μmol/L 引物 (Operm Technologies, Inc) 和 1.25 unit Taq 酶 (Perkin Elmer Cetus). 在 Perkin Elmer Cetus PCR 仪上进行扩增. 经 30 s 的变性后, 进行 40 个循环的扩增. 每个循环在 94 ℃ 1 min, 35 ℃ 1 min, 72 ℃ 2 min, 40 个循环后, 在 72 ℃ 继续保持 5 min, 然后置于 4 ℃ 待测. 扩增产物在 1.4% 琼脂糖胶进行电泳分析.

2 结果

2.1 HG295 的获得和黄矮病抗性鉴定

1990 年上半年, 通过黄矮病抗性的田间鉴定, 我们从 77-5433 × 中 5 这个组合的 F_9 代中选出一个农艺性状较好, 有希望高抗黄矮病的材料, HG295. 为了防止未接上 BYDV 而出现的假象, 我们对筛选出的抗病单株进行了 3 次重复鉴定. HG295 的病级反应为 0 ~ 1 级, 病情指数为 0 ~ 11.1; 中 5 的病级反应为 0 级, 病情指数为 0; 而 HG295 的小麦亲本 77-5433 的病级反应为 4 ~ 5 级, 病情指数为 44.4 ~ 55.6. 这表明 HG295 与中 5 一样对 BYDV 具有较好

表 1 接种 BYDV PAV 株系 3 星期后幼苗的 ELISA 测定值

材 料	ELISA A_{405} 测定值	
	实 验 A	实 验 B
中 5 (未接种)	0.013±0.008 (0.007 ~ 0.019)	0.019±0.006 (0.014 ~ 0.026)
中 5 (接种)	0.068±0.036 (0.032 ~ 0.104)	0.095±0.026 (0.063 ~ 0.137)
岸 黑	0.773±0.173 (0.603 ~ 0.948)	0.631±0.168 (0.537 ~ 0.849)
HG295-1	0.072	
HG295-2		0.049
HG295-3		0.107
77-5433	0.417 (0.391 ~ 0.443)	0.307±0.060 (0.248 ~ 0.368)
缓冲液	0.000	0.000

的抗性．我们进行了酶联检测(ELISA)以进一步确定 HG295 的抗性程度．从表 1 可见，HG295、中 5 接种和中 5 未接种的病毒含量都较低，但 77-5433 的病毒含量较高．这表明 HG295 对 BYDV 的抗性来自中 5，而不是 77-5433．综合以上结果，我们认为 HG295 高抗黄矮病，主要表现在被病毒侵染后，不出现症状，植株内病毒含量较低．

2.2　细胞学分析

根尖体细胞压片表明，HG295 有 42 条染色体(图 1)．对其花粉母细胞观察表明，HG295 染色体配对基本正常．在减数分裂中期 I，在大部分细胞中能观察到 21 个二价体(图 2)，后期 I 能正常分离(图 3)，在某些细胞中可能由于外源遗传物质的影响偶尔也出现较多的单价体．在所观察的两个花粉母细胞中，HG295 的染色体平均配对构型为 0.72 I + 20.39 II + 0.07 III + 0.02 IV．这表明，HG295 这个材料是一个整倍体株系，而且在遗传上已基本稳定．

为了了解 HG295 中外源遗传物质的存在情况以及出于进一步利用 HG295 的需要，我们以 HG295 为母本，以普通小麦品种 77-5433 为父本进行了杂交，对 F_1 杂种进行了花粉母细胞观察，在中期 I，在绝大部分花粉母细胞中均可观察到两个或两个以上的单价体(图 4)，在所观察的 98 个花粉母细胞中其染色体平均配对构型为：2.592I + 19.50II + 0.082III + 0.041IV．由此我们认为 HG295 是个双体异代换系或是有较大外源染色体片断的易位系．

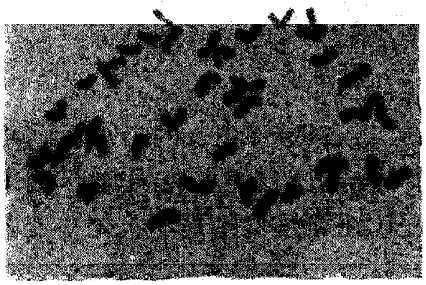

图 1　HG295 的染色体组成，$2n=42$

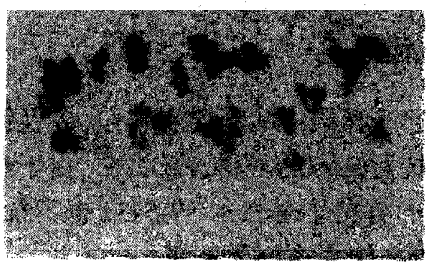

图 2　HG295 PMC 中期 I，21II

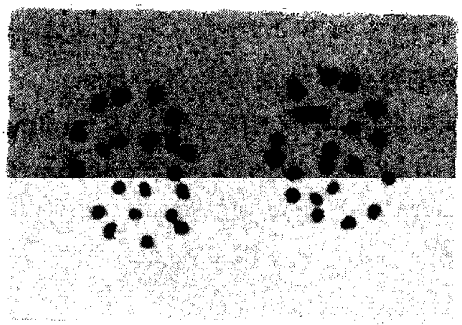

图 3　HG295 PMC 后期 I 21-21 分离

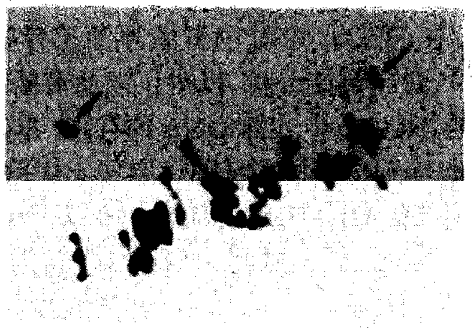

图 4　(HG295×77-5433)F_1，PMC，2 个单价体

2.3　随机扩增 DNA 多态性(RAPD)分析

一共检测了 45 个引物．在初步检测中，其中 5 个引物在 HG295 中表现出一条与中 5 和中间偃麦草相同的带，而在普通小麦亲本 77-5433 中不存在．经过多次重复，其中引物 OPAB-01 的多态性产物 $OPAB\text{-}01_{1200}$，在每次重复试验中都能在中间偃麦草、中 5 和 HG295 中而不在 77-5433 中出现(图 5)．将中间偃麦草、中 5、HG295 和 77-5433 的核 DNA 经限制性内切酶消化，以 ^{32}P 标记的 $OPAB\text{-}01_{1200}$ 为探针进行 Southern 杂交分析，结果信号呈现出多态(图

6). 在中间偃麦草中信号最强，其次是中 5，再次是 HG295，而在 77-5433 中无杂交信号. 这表明在 HG295 中确实存在中间偃麦草 DNA.

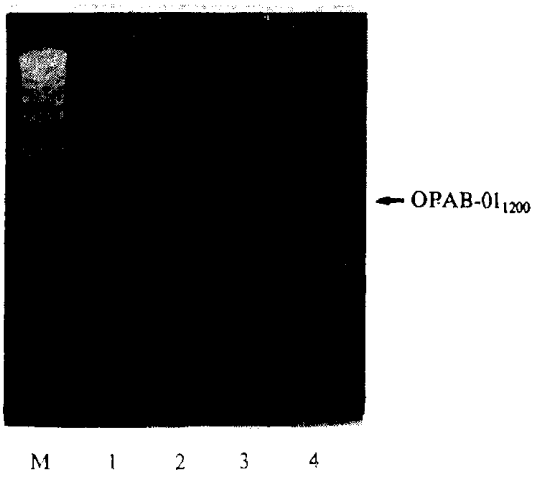

图 5 HG295 的 RAPD 分析，引物为 OPAB-01
1—— 中间偃麦草，2—— 中 5，3—— 77-5433，
4 —— HG295，M —— Marker VII



图 6 HG295 的 OPAB-01$_{1200}$ Southern 杂交分析
1，5—— 中间偃麦草；2，6—— 中 5；
3，7—— 77-5433；4，8—— HG295；
1 ~ 4—— BamHI；5 ~ 8—— EcoR I

3 讨论

通过广泛的田间和温室鉴定，以及酶联检测，我们从 77-5433× 中 5 的杂种后代中选育出一个高抗黄矮病的材料，HG295. 由于中 5 的小麦背景材料南大 2419，克强均不抗 BYDV[8]，HG295 的直接小麦亲本 77-5433 也不抗 BYDV，故可认为 HG295 的黄矮病抗性与无芒中 4、中 5 一样也来源于中间偃麦草.

HG295 的体细胞染色体数为 42，在遗传上已基本稳定. (HG295×77-5433)F_1 PMC 分析表明，在 HG295 中有较多的外源遗传物质. 目前，我们正利用中国春小麦的双端体系统对 HG295 进行测交分析，以辨认涉及黄矮病抗性的外源染色体或外源染色体片断.

在 HG295 中外源 DNA 的存在，用随机扩增 DNA 多态性 (RAPD) 标记和 Southern 杂交分析也得到了进一步证明. 存在于中间偃麦草、中 5 和 HG295 中的同一个 Southern 杂交信号说明在 HG295 中确实存在中间偃麦草的遗传物质，这也是 HG295 高抗 BYDV 的遗传基础. 这个 RAPD 标记，在以后的遗传操作中可作为一个辨认外源 DNA 的有用标记.

参 考 文 献

1 Qualset C O, Williams J C, Topcu M A *et al*. The barley yellow-dwarf virus in wheat: importance, sources of resistance, and heritability. In: Sears E R, Sears L M S eds. Proceedings of the Fourth International Wheat Genetics Symposium, Missouri, USA, 1973. Missouri: College of Agriculture University of Missouri, 1973. 465 ~ 470

2 Qualset C O, Lorens G F, Ullman D·E *et al*. Genetics of host plant resistance to barley yellow dwarf virus. In: Burnett P A ed. Proceedings of International Workshop on Barley Yellow Dwarf, Udine, Italy, 1987. D. F. Mexico: CIMMYT, 1990. 368 ~ 381

3 Cisar G, Brown C M, Jedlinski H. Effects of fall or spring infection and sources of tolerance of barley yellow dwarf of

winter wheat. Crop Science, 1982, 22: 474～478
4 Rasmusson D C, Schaller C W. The inheritance of resistance in barley to the yellow dwarf virus. Agronomy Journal, 1959, 51: 661～664
5 McGuire P E. Status of an attempt to transfer the barley yellow dwarf virus resistance gene Yd2 of barley to hexaploid wheat. In: Burnett P A ed. Proceedings of the Workshop on Barley Yellow Dwarf, Mexico, 1983. D. F. Mexico: UNDP and CIMMYT, 1984. 113～119
6 McGuire P E, Qualset C O. Transfer of the Yd2 barley yellow dwarf virus resistance gene from barley to wheat. In: Burnett P A ed. Proceedings of the Workshop on Barley Yellow Dwarf, Udine, Italy, 1987. D. F. Mexico: CIMMYT, 1990. 476～481
7 Zhou G H, Qian Y T, Cheng Z M *et al*. A cereal germplasm, "Zhong 4" for resistance to barley yellow dwarf virus in China. In: Burnett P A ed. Proceedings of the Workshop on Barley Yellow Dwarf, Udine, Italy, 1987. D. F. Mexico: CIMMYT, 1990. 394～395
8 Xin Z Y, Brettell R I S, Cheng Z M *et al*. Characterization of a potential source of barley yellow dwarf virus resistance for wheat. Genome, 1988, 30: 250～257
9 Brettell R I S, Banks P M, Cauderon Y *et al*. A single wheatgrass chromosome reduces the concentration of barley yellow dwarf virus in wheat. Ann Appl Biol, 1988, 113: 599～603
10 辛志勇，徐惠君，陈　孝等．应用生物技术向小麦导入黄矮病抗性基因的研究．中国科学，B 辑，1991, (1): 36～42
11 陈　孝，Larkin P J, Brettell R I S 等．抗大麦黄矮病(BYDV)种质 - 无芒中 4 的同工酶电泳图谱的研究．中国农业科学，1992, 25(2): 27～33
12 Williams J G K, Kubelik A R, Livak K J *et al*. DNA polymorphisms amplified by arbitary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res, 1990, 18: 6 531～6 535
13 钱幼亭，周广和．麦类种质资源抗耐黄矮病的田间鉴定技术研究．植物病理学报，1986, 13: 159～164
14 Murray M G, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Res, 1980, 8: 4 321～4 325
15 Bernatzky R, Tanksley S D. Majority of random cDNA clones correspond to single loci in the tomato genome. Mol Gen Genet, 1986, 203: 8～14