

普通小麦-华山新麦草异附加系的 分子细胞遗传学研究^{*}

赵继新¹, 陈新宏¹, 王小利¹, 武 军¹,
傅 杰¹, 何蓓如¹, 孙志刚²

(1 西北农林科技大学 农学院, 陕西 杨凌 712100;

2 陕西省种业集团有限责任公司, 陕西 西安 710016)

[摘 要] 利用荧光原位杂交和染色体C-分带技术, 对普通小麦-华山新麦草的异附加系进行了研究。荧光原位杂交结果显示: 异附加系 H9015-17-1-9, H9017-14-16-5 都附加有 2 条华山新麦草的染色体。对这 2 个材料和华山新麦草进行染色体 C-分带带型比较, 初步推断, H9015-17-1-9 附加的是 N^b₅ 染色体, H9017-14-16-5 附加的是 N^b₆ 染色体。

[关键词] 普通小麦; 华山新麦草; 异附加系; 荧光原位杂交; 染色体 C-分带

[中图分类号] Q 943; S512 032

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2004)11-0105-04

华山新麦草(*P. sativa rostrata huashanica*, $2n=14, NN$) 是禾本科小麦族大麦亚族新麦草属的一种多年生异花授粉植物, 是分布在秦岭山脉华山段的一个中国特有种, 具有抗寒、抗旱、耐瘠薄、早熟、优质、矮秆、抗病等特点^[1]。井金学等^[2]、王美南等^[3]、万永芳等^[4]对华山新麦草进行了抗条锈病、全蚀病和赤霉病的研究, 结果表明华山新麦草高抗小麦条锈病和全蚀病, 中抗赤霉病。自 1988 年开展普通小麦与华山新麦草的杂交以来, 先后有陈淑阳等^[1]、孙根楼等^[5]获得了成功。陈淑阳等^[6]利用华山新麦草与普通小麦杂交和回交, 获得了一系列异附加系, 并对这些异附加系进行了细胞遗传学研究。

荧光原位杂交 (Fluorescence In Situ Hybridization, FISH) 是根据核酸分子碱基互补配对原则, 将经荧光染料标记的外源核酸探针与染色体制片上的特异染色体进行杂交, 并对杂交信号进行放大, 通过荧光检测系统(荧光显微镜)进行检测, 以确定某物种的异源染色体或其片段。目前, 荧光原位杂交技术已广泛应用于染色体定位, 染色体结构分析, 染色体物理图谱构建, 外源染色体检测, 物种进化及亲缘关系鉴定等研究领域^[7~9]。染色体 C-分带 (C-banding) 可显示组成型异染色质在染色体上的分布

和结构变异, 能较有效的识别小麦中的异源染色体或染色体片段^[10, 11]。这 2 种方法结合可以准确可靠的检测植物远缘杂种中的异源染色质。自 Jiang 和 Gill^[12]首次用染色体分带-分子原位杂交技术检测小麦-黑麦易位系中的外源染色体片段以来, 钟少斌等^[9]、刘文轩等^[13]和张相岐等^[14]用该方法分别鉴定了普通小麦中的簇毛麦、大赖草和黑麦染色质。周荣华等^[15]用基因组原位杂交技术 (GISH) 检测了普通小麦中的新麦草 (*P. sativa juncea*) 染色质。本研究用 FISH 和 C-分带技术鉴定了普通小麦中的华山新麦草染色体。现将研究结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 供试材料

试验材料有华山新麦草 (*P. sativa rostrata huashanica*), 普通小麦 (*Triticum aestivum*) 品种中国春, 普通小麦与华山新麦草杂交、回交后选育的异附加系 H9015-17-1-9 和 H9017-14-16-5, 均来自本课题组。

1.2 方 法

1.2.1 染色体制片 取发芽种子根尖, 冰水 (0~ 4℃) 预处理 20~ 24 h, 卡诺固定液 (3 份体积分数

^{*} [收稿日期] 2003-10-20

[基金项目] 国家 863 计划项目 (2001AA 241037); 陕西省自然科学基金项目 (2001SM 15); 农业部农业结构调整重大技术研究专项 (2002-02-01A)

[作者简介] 赵继新 (1971-), 男, 陕西汉中, 助理研究员, 硕士, 主要从事小麦异源新种质创造和遗传育种研究。

95% 乙醇 1 份冰醋酸)固定 2~3 d, 质量分数 2% 纤维素酶+果胶酶酶解, 体积分数 45% 醋酸压片; 液氮冰冻揭片; 气干后-20℃ 保存备用。

1.2.2 染色体 C-分带 参照 Gill 等^[16]和 Endo^[17]的方法并略作修改, 即将保存的制片干燥后依次在 45~50℃ 的体积分数 45% 醋酸, 50 g/L 的 Ba(OH)₂ 过饱和溶液以及 2×SSC 溶液中分别处理 3~5, 2~3 和 15~30 min, 每步用自来水冲洗染色体制片, 最后用 pH=6.8 的磷酸缓冲液稀释 Giemsa 染液后适度染色。Olympus(BH-2)生物显微镜观察照相后进行带型分析。

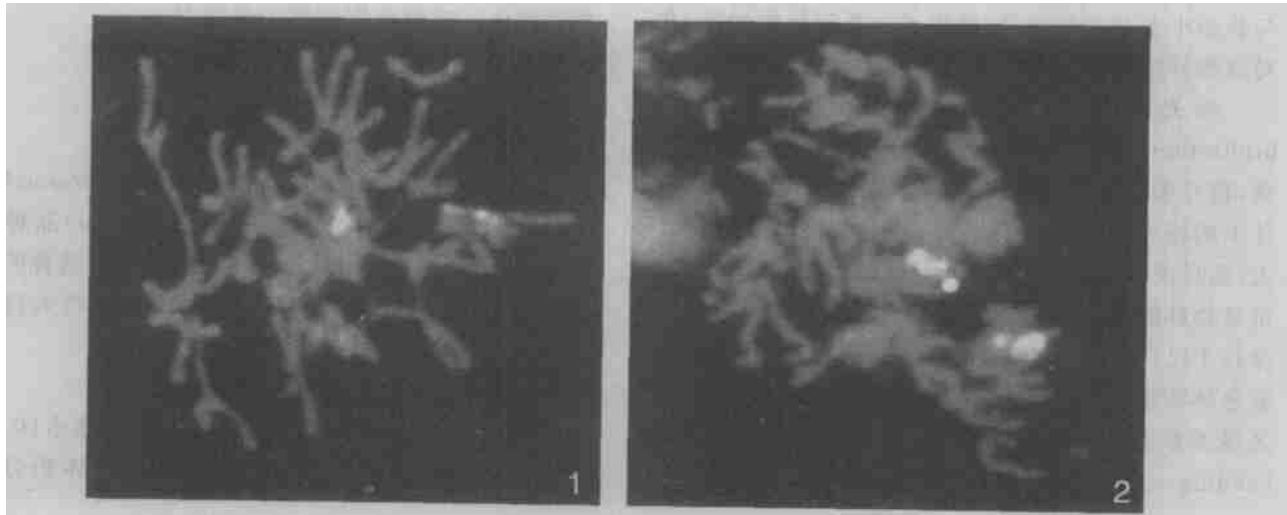
1.2.3 原位杂交 (1)DNA 提取: 用 CTAB 法提取华山新麦草和普通小麦中国春基因组 DNA。(2)探针标记: 采用缺刻平移法用 Digoxin-11-dUTP (Sigma 公司)对华山新麦草基因组 DNA 进行标记。(3)染色体制片处理: 染色体制片依次在 60℃ 干燥 3 h, 500 mg/mL RNase A 溶液 37℃ 处理 1 h, 2×SSC 室温漂洗 5 min; 去离子甲酰胺(体积分数 70%)70℃ 变性 2~3 min; 预冷乙醇(体积分数 70%, 85%, 100%)各脱水 5 min; 最后在空气中干燥。(4)杂交: 将 25 μL 杂交液(去离子甲酰胺 10 μL, 质量分数 50% 硫酸葡聚糖 2 μL, 20×SSC 2.5 μL, 鲑鱼精 DNA (10 mg/mL) 2 μL, 探针 DNA (40 mg/mL) 1.5 μL, 中国春封阻 DNA (300 mg/mL) 7 μL)沸水变性 10 min, 立即置冰上 5 min 后加到载玻片上, 盖上盖玻片, 置于 2×SSC 湿润滤纸盒 60℃ 温育 10 min 后转 37℃ 杂交过夜。(5)漂洗: 依次

在 2×SSC 室温 7 min, 去离子甲酰胺(体积分数 35%)37~42℃ 5 min, 2×SSC 室温 7 min 和 1×PBS 室温 7 min。(6)杂交信号放大: 经 1×PBS 洗过的染色体制片上加 0.5~1 mL 1×Blocking 溶液, 在 15~25℃ 下 30 min; 去溶液后吸 50 μL anti-DIG solution 加到制片上, 盖上盖玻片, 37℃ 保湿 60 min; Washing buffer 37℃ 稍洗 3 次; 吸 50 μL anti-mouse-1g-DIG solution 加到制片上, 盖上盖玻片, 37℃ 保湿 60 min; 清洗同上; 吸 50 μL anti-DIG-fluorescein solution 加到制片上, 盖上盖玻片, 37℃ 黑暗保湿 60 min; 清洗同上; 黑暗干燥后加 12 μL 10 mg/mL PI(含抗褪色剂)染色并封片。(7)检测: 蔡氏荧光显微镜观察, Fuji ISO 400 彩色胶卷照相。

2 结果与分析

2.1 普通小麦-华山新麦草异附加系荧光原位杂交分析

以 Digoxin 标记的华山新麦草基因组 DNA 为探针, 用普通小麦中国春基因组 DNA 作封阻, 与普通小麦-华山新麦草异附加系的根尖体细胞染色体进行原位杂交。在荧光显微镜 450~490 nm 波长激发下, 具有杂交信号的华山新麦草染色体显示黄色, 而不具杂交信号的小麦染色体显示红色。观察发现, 普通小麦-华山新麦草异附加系 H9015-17-1-9, H9017-14-16-5 都有 2 个明显的染色体杂交信号, 说明异附加系 H9015-17-1-9, H9017-14-16-5 都附加有 2 条华山新麦草的染色体(图版 I-1, 2)。



图版 I 普通小麦-华山新麦草异附加系的原位杂交分析

1 异附加系 H9015-17-1-9; 2 异附加系 H9017-14-16-5

Plate I Fluorescence in situ hybridization of alien addition lines

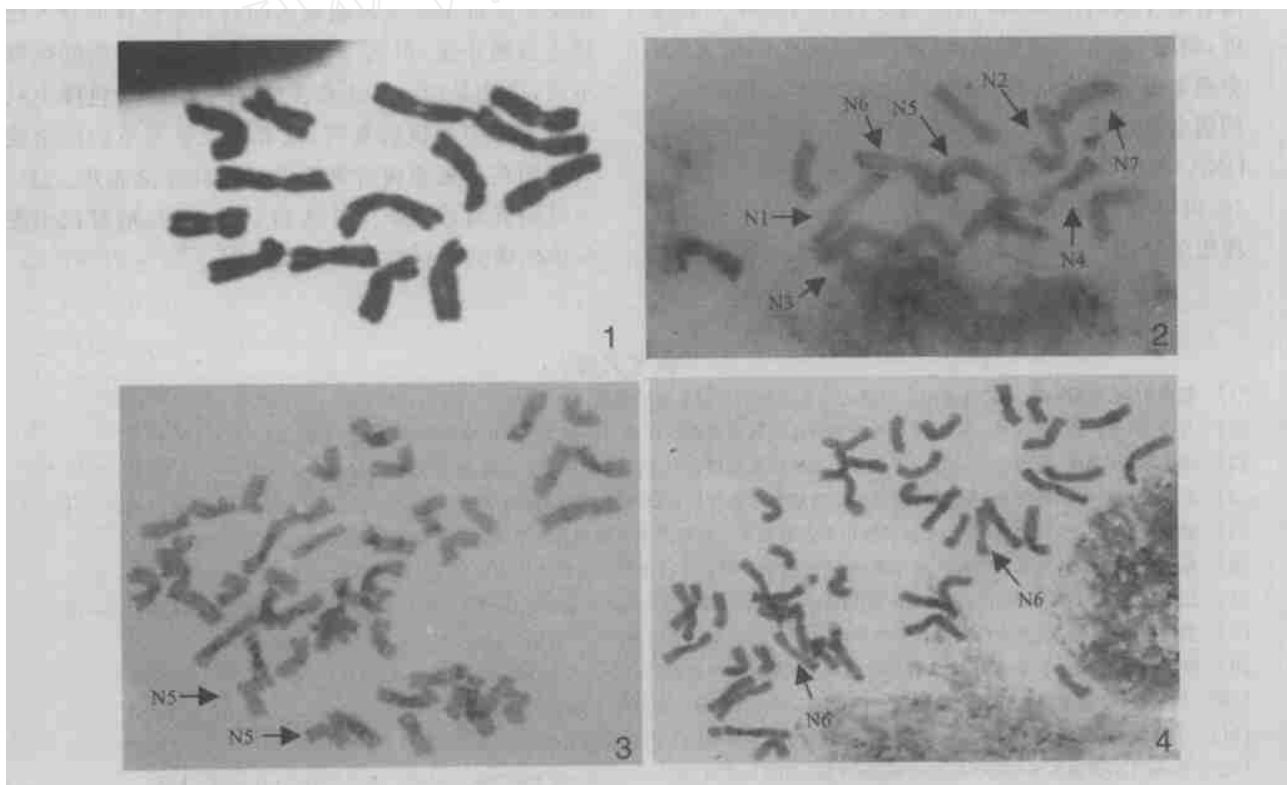
1 A lien addition line H9015-17-1-9; 2 A lien addition line H9017-14-16-5

2.2 普通小麦-华山新麦草异附加系 C-分带鉴定

对华山新麦草的染色体进行了核型和带型分析, 发现其染色体全是中部着丝点染色体(图版 II-1); C-分带带型全是端带, 无着丝点带和中间带, 带纹单一(图版 II-2)。依据王秀娥等^[11]对华山新麦草染色体的命名, 并参照沈颂东等^[18]对华山新麦草所作的核型分析, 结合本研究结果, 华山新麦草各染色体的核型、带型特征为: N_1^h , 短臂端部有一强端带, 长臂端部有一弱端带, 臂比(长臂/短臂, 下同)为 1.29; N_2^h , 长、短臂各有一强端带, 臂比为 1.42; N_3^h , 长、短臂各有一强端带, 臂比为 1.22; N_4^h , 短臂有弱端带, 长臂有强端带, 臂比为 1.18; N_5^h , 短臂有一强端带, 臂比最大, 为 1.54; N_6^h , 长、短臂各有一端带,

长臂端带比短臂端带颜色深, 臂比为 1.25; N_7^h , 染色体最短, 长、短臂各有一端带, 臂比为 1.20。

参照 Gill 等^[16]的普通小麦标准带型, 普通小麦主要显示着丝点带、近端带、中间带, 或端带+中间带和着丝点带, 带纹丰富; 凡是显端带的染色体必然同时显着丝点带、近端带或中间带。因此, 根据普通小麦和华山新麦草染色体的带纹特征, 初步推断 H9015-17-1-9 附加的是华山新麦草的 N_5^h 染色体(短臂有一强端带, 染色体臂比最大, 为 1.54, 图版 II-3), 而 H9017-14-16-5 附加的是华山新麦草的 N_6^h 染色体(长、短臂各有一端带, 长臂端带比短臂端带颜色深, 臂比为 1.25, 图版 II-4)。



图版 II 普通小麦-华山新麦草异附加系染色体 C-分带

1 华山新麦草染色体核型; 2 华山新麦草染色体 C-带带型;

3 异附加系 H9015-17-1-9, $2n=44$; 4 异附加系 H9017-14-16-5, $2n=44$; $N_1 \sim N_7$ 分别与 $N_1^h \sim N_7^h$ 对应

Plate II The root tip chromosomes of the alien addition lines and *P. huashanica*

1 Karyotype of *P. huashanica*; 2 C-banding of *P. huashanica*;

3 Alien addition line H9015-17-1-9, $2n=44$; 4 Alien addition line H9017-14-16-5, $2n=44$;

$N_1 \sim N_7$ indicate the $N_1^h \sim N_7^h$ chromosome of *P. huashanica*

3 讨论

原位杂交技术目前已成为植物远缘杂交中检测与跟踪外源染色质的重要手段之一, 在小麦-亲缘物

种异源新种质的筛选与鉴定方面, 以基因组 DNA 为探针的原位杂交技术发挥了很大作用, 目前得到的许多异源新种质材料中绝大多数是利用基因组原位杂交, 并结合染色体 C-分带等技术鉴定出来

的^[12, 13, 19], 尤其是采用原位杂交-分带序续技术^[19], 将原位杂交和分带在一个实验一张制片上进行, 进一步提高了外源染色体鉴定的准确性和精确性。本研究先对异附加系材料进行原位杂交鉴定, 确定其含有华山新麦草染色体, 然后再对其进行染色体 C-分带鉴定, 虽然不及原位杂交-分带序续技术准确性高, 但由于华山新麦草染色体具有明显区别于普通小麦带型的端带特征, 因此, 本研究用这 2 种方法能比较准确地鉴定出普通小麦中的华山新麦草染色体。

原位杂交过程中, 适当的探针 DNA 与封阻 DNA 比例对杂交信号的显示有重要影响。一般而言, 普通小麦与其近缘野生植物的亲缘关系越远, 所需普通小麦封阻 DNA 的量越少; 相反, 亲缘关系越近, 封阻 DNA 的量则越多。但封阻 DNA 的量太大, 会遮盖部分杂交信号; 封阻的量太小, 又会出现较多的假杂交信号^[10, 20]。在本研究中, 探针(华山新麦草 DNA)与封阻(中国春 DNA)的质量比在 1:30~40, 可以得到较好的杂交信号。另外, 试验中要获得理想杂交信号, 还与洗脱强度有很大关系。洗脱强度

太大, 会使部分杂交信号丢失, 导致有杂交信号的染色体显示不完全; 洗脱强度太小, 又会使信号杂乱, 导致背景信号增多^[10, 20]。本研究通过比较认为, 用体积分数 35% 的去离子甲酰胺溶液在 37~42℃ 洗脱 5 min 可以获得较好的杂交信号。此外, 良好的染色体制片、有较多的中期分裂相是试验成功的又一关键因素。

根据王美南等^[13]的研究, 异附加系 H9015-17-1-9 和 H9017-14-16-5 是 2 个中抗小麦全蚀病的材料, 其外源亲本华山新麦草高抗小麦全蚀病, 普通小麦亲本 7182 不抗该病, 经本研究证实这 2 个材料已含有华山新麦草的染色体。由此可初步推断, 这 2 个材料的抗全蚀病基因来自于华山新麦草, 说明华山新麦草的抗小麦全蚀病基因随着其染色体的导入已转进普通小麦, 但这 2 个材料对小麦全蚀病的抗性不强, 可能是由于华山新麦草的 N_5^h, N_6^h 染色体上只含有一个中等抗病基因, 或者华山新麦草的抗全蚀病基因在小麦遗传背景下没有得到完全表达。这 2 个材料的育成对扩大小麦抗病基因库、培育抗小麦全蚀病新品系(种)具有重要作用。

[参考文献]

- [1] 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
- [2] 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
- [3] 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
- [4] 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
- [5] 孙根楼, 颜济, 杨俊良. 普通小麦和华山新麦草属间杂种的产生及细胞遗传学研究[J]. 遗传学报, 1992, 19(4): 322-326
- [6] 陈淑阳, 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
- [7] Jiang J, Gill B S. Nonisotopic *in situ* hybridization and plant genome mapping: the first 10 years[J]. Genome, 1994, 37(5): 717-725
- [8] 温海霞, 陶澜. 荧光原位杂交在麦类作物育种中的应用研究进展[J]. 中国农学通报, 2002, 18(3): 58-60
- [9] 钟少斌, 张德玉. 小麦-簇毛麦杂种染色体的 DNA 原位杂交研究[J]. 江苏农学院学报, 1994, 15(3): 6-8
- [10] 姚景侠. 小麦细胞与分子遗传研究[M]. 南京: 南京出版社, 2000. 143-181, 209-271
- [11] 王秀娥, 李万隆, 刘大钧. 新麦草属两物种的 C-分带研究[J]. 南京农业大学学报, 1998, 21(1): 10-13
- [12] Jiang J, Gill B S. Sequential chromosome banding and *in situ* hybridization analysis[J]. Genome, 1993, 36(4): 792-795
- [13] 刘文轩, 陈佩度. 一个普通小麦-大赖草易位系 T01 的选育与鉴定[J]. 作物学报, 2000, 26(3): 305-309
- [14] 张相岐, 王献平. 一个小黑麦附加-双代换花粉株系(M16)的创制与鉴定[J]. 遗传学报, 1999, 26(4): 391-396
- [15] 周荣华, 贾继增, 董玉琛, 等. 用基因组原位杂交技术检测新麦草杂交后代[J]. 中国科学(C 辑: 生命科学), 1997, 27(6): 543-549
- [16] Gill B S, Friebe B, Endo T R. Standard karyotype and nomenclature system for description of chromosome bands and structural aberrations in wheat (*Triticum aestivum*) [J]. Genome, 1991, 34(5): 830-839
- [17] Endo T R. Complete identification of common wheat chromosomes by means of the C-banding technique[J]. Jpn J Genet, 1986, 61: 89-93
- [18] 沈颂东, 王世金. 五种新麦草属植物的核型分析[J]. 西北植物学报, 1993, 13(6): 92-97
- [19] 刘文轩, 陈佩度, 刘大钧. 利用荧光原位杂交技术检测导入普通小麦的大赖草染色质[J]. 遗传学报, 1999, 26(5): 546-551
- [20] 马有志, 徐琼芳, 辛志勇, 等. 小麦-中间偃麦草部分双二倍体“中 5”的外源染色体的鉴定[J]. 作物学报, 1998, 24(2): 129-132

(下转第 113 页)

Effect of potassium and manganese fertilizer cooperating application on nutrient content in plant and yield and quality of winter wheat in dryland

ZHANG Hui-min¹, LIU Hong-xia¹, WANG Lin-hao², PEI Rui-jie³,
WANG Hao¹, ZHOU Wen-li¹, GUO Da-yong¹, GUO Yong-xin¹

(1 College of Agronomy, Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471003, China;

2 College of Forestry Vocation, Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471002, China;

3 Nanyang Agricultural College of Henan Province, Nanyang, Henan 473000, China)

Abstract: The effect of potassium and manganese fertilizer cooperating application on nutrient content in plant and yield and quality of winter wheat in dryland was studied. The results showed that the nitrogen and phosphorus content in plant of winter wheat at different stages under potassium and manganese fertilizer cooperating treatments decreased compared to no fertilizer treatment, while the potassium content increased. With potassium and manganese fertilizer cooperating application, there was a significant effect of yield-increasing on winter wheat ranging from 12.0% to 25.5%. Cooperating application of potassium and manganese fertilizer could increase sedimentation value, the content of wet gluten and protein, and prolong the dough stable time. The effect of potassium fertilizer on quality of winter wheat was more significant than that of manganese fertilizer. Only the content of wet gluten and protein was effected by manganese fertilizer.

Key words: potassium and manganese fertilizer cooperating application; winter wheat; rational fertilization; nutrient content in plant; dryland

(上接第 108 页)

Molecular cytogenetic study on the alien addition lines of *Triticum-Psathyrostachys*

ZHAO Jixin¹, CHEN Xinhong¹, WANG Xiaoli¹, WU Jun¹, FU Jie¹, HE Beiru¹, SUN Zhigang²

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

2 Shaanxi Province Seed Industry Group Co. Ltd., Xi'an, Shaanxi 710016, China)

Abstract: The alien addition lines of *Triticum-Psathyrostachys* were detected by fluorescent *in situ* hybridization (FISH) and chromosomes C-banding. FISH shows the alien addition line H9015-17-1-9 and H9017-14-16-5 are all added with the two chromosomes of *Psathyrostachys huashanica*. The analysis using the chromosomes C-banding indicates that H9015-17-1-9 might be an alien addition line of N_5^h and H9017-14-16-5 might be an alien addition line of N_6^h .

Key words: *Triticum aestivum*; *Psathyrostachys huashanica*; alien addition line; fluorescent *in situ* hybridization; chromosomes C-banding