

## 用 RFLP 鉴定普通小麦—纤毛鹅观草二体附加系中外源染色体的同源转化性\*

陶文静\*\* 刘金元\*\*\* 王秀娥 刘大钧 陈佩度

(南京农业大学农业部作物细胞遗传重点开放实验室, 江苏南京 210095)

**提 要** 用小麦族 7 个部分同源群的 40 个 RFLP 探针对小麦-纤毛鹅观草二体附加系进行分析, 在证实了原有细胞学鉴定结果的基础上, 又进一步提供了纤毛鹅观草染色体部分同源群的分子证据。即 96K025、96K026 中添加的一对纤毛鹅观草染色体 B 属于第 2 部分同源群; 96K012、96K013 中添加的一对染色体 E 属于第 5 部分同源群。对以上株系的衍生株系分析结果表明, 染色体 B、E 在后代中可稳定传递。96K030 中添加的一对染色体 D 与染色体 B 同属第 2 部分同源群。端二体附加系 96K033 所添加的纤毛鹅观草染色体 B 的一条臂, 只与第 2 群短臂探针有杂交信号, 从而初步确定其可能与小麦族第 2 部分同源群短臂同源。而另一条臂则与第 2 群长臂同源。

**关键词** 普通小麦; 纤毛鹅观草; 二体异附加系; RFLP; 同源转化性

## Homoeology Identification of the Alien Chromosomes or Their Arms Involved in *T. aestivum*-*R. ciliaris* Disomic Addition Lines by RFLP Analysis

Tao Wenjing\*\* Liu Jinyuan\*\*\* Wang Xiu'e Liu Dajun Chen Peidu

(Cytogenetics Institute, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095)

**Abstract** *Roegneria ciliaris* chromosomes or its arms involved in *Triticum aestivum*-*Roegneria ciliaris* addition lines were successfully identified by means of RFLP analysis with 40 probes. Results confirmed previous cytological identification and determined the homoeologous grouping of the *R. ciliaris* chromosomes involved in the addition lines. Lines 96K025 and 96K026 are proved to contain an intact pair of *R. ciliaris* chromosome B, being identified as belonging to homoeologous group-2. The R. c. chromosomes E added to disomic addition lines 96K012 and 96K013 belong to homoeologous group-5. Line 96K030 contains a pair of R. c. chromosome D, identified as also homoeologous to wheat group-2 chromosomes. A pair of chromosome B long arms added to ditelosomic addition line 96K033 is homoeologous to short arms of wheat group-2, and the short arm of chromosome B belongs to homoeologous group-2 long arm correspondingly.

The results proved RFLP analysis a powerful tool for identifying the alien addition lines and clarifying the homoeology of alien *R. ciliaris* chromosomes or arms involved.

**Key words** *T. aestivum*; *R. ciliaris*; Disomic addition line; RFLP analysis; Homoeology

纤毛鹅观草 [*Roegneria ciliaris* (Trin) Nevski] 是小麦族 (Triticeae) 禾草。它对潮湿气候具有

\* 国家自然科学基金和国家“863”计划资助课题 \* \* 现工作单位中国农业科学院生物技术研究中心

\* \* \* 现工作单位山东省农业科学院原子能研究所

收稿日期: 1998-12-22

很强的适应性<sup>[1]</sup>,对小麦条纹花叶病毒(WSMV)和大麦黄矮病毒(BYDV)病都有极高的抗性<sup>[2]</sup>;而且它和鹅观草属的另一物种鹅观草还是极好的小麦赤霉病抗源材料<sup>[1,3]</sup>。将上述抗性转移给普通小麦的工作从80年代初即已开始<sup>[1,3,4,5,6]</sup>,现已从回交、自交后代中筛选出添加有部分纤毛鹅观草染色体并对赤霉病有较好抗性的异附加系<sup>[6,7,8,9]</sup>。对这些附加系中的外源染色体进行准确鉴定和追踪有利于更有效地实现外源抗性基因转移、评估不同位点基因效应和在育种实践中进一步利用这些附加系。

早期确定异附加系和代换系中的外源染色体与小麦的同源转化性往往借助于形态标记、同工酶和其它生化标记<sup>[10,11]</sup>。形态标记由于易受环境条件和遗传背景的影响而出现表型差异,没有丰富的经验难以作出正确的判断;不同的同工酶和其他生化标记除受发育或组织特异表达影响外还需要不同的电泳和染色方法,因此确定一个同源群往往需要大量技术的综合<sup>[12]</sup>,Sharp等人<sup>[13]</sup>发展的一套用于鉴定小麦族7个同源群不同染色体臂的RFLP探针,及最近小麦7个部分同源群14个长短臂RFLP遗传图谱的构建,为以DNA杂交为基础的限制性片段长度多态(RFLP)技术在确定小麦不同染色体组部分同源关系方面的应用奠定了基础。RFLP技术的优点在于其稳定,不受环境因素和遗传背景的影响;效率高,可在一个实验中同时实现异附加系、代换系和易位系的筛选和确定外源染色体与小麦染色体组的部分同源关系。

本文用小麦族14个长短臂上的40个RFLP探针对普通小麦——纤毛鹅观草附加系及其衍生后代株系进行了检测与分析,确定了添加在普通小麦背景中的有关纤毛鹅观草染色体的部分同源群归属。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

试验所用普通小麦中国春-纤毛鹅观草二体附加系是南京农业大学细胞遗传所从中国春与小麦-纤毛鹅观草双二倍体回交,自交后代中通过形态标记、根尖染色体计数、C-分带筛选

表1 实验所用的普通小麦——纤毛鹅观草二体附加系

Table 1 *T. aestivum-R. ciliaris* disomic addition lines used for detection

附加系 Addition lines	所涉及外源染色体 Alien chromosomes involved	衍生后代 Progenies derived
96K04	J <sup>n</sup>	97K04 97K07 97K06
96K08	C <sup>n</sup>	97K10
96K12	E <sup>n</sup>	97K012 97K013
96K13	E <sup>n</sup>	97K015 97K016
96K025	B <sup>n</sup>	97K037 97K039
96K026	B <sup>n</sup>	97K042 97K045
96K029	D <sup>n</sup>	97K055
96K030	D <sup>n</sup>	97K056 97K057 97K058
96K032	t1YS <sup>n</sup>	97K062
97K033	tBa <sup>n</sup>	96K066 97K067

获得(表1),并经过赤霉病抗性鉴定。以普通小麦中国春和供体亲本纤毛鹅观草(*Roegneria ciliaris* (Trin) Nevski. 2n=28, SSYY, 以后用R. c.表示)作为对照。纤毛鹅观草染色体序号排列参照Jiang (1993)。14条染色体分别代之以字母1S、1Y、A、B、C、D、E、F、G、H、I、J、K。

用于RFLP分析的小麦7个同源群专化探针BCD(大麦

cDNA探针),CDO(燕麦cDNA探针),PSR(小麦cDNA或gDNA探针),KSU(节节麦gDNA探针)分别由美国康乃尔大学M. S. Sorrells博士,英国John Innes Centre M. D. Gale博士,美国Kansas州立大学B. S. Gill博士惠赠。

### 1.2 方法

植物 DNA 提取基本上采用 K. S. Gill 等(1991)描述的 CTAB 方法<sup>[14]</sup>(细节上略有修改), 将两次酚、氯仿纯化后的 DNA 分别用 3 种限制性内切酶(*EcoRI*、*EcoRV*、*DraI*)消化, 参照 Sharp 等(1988)<sup>[15]</sup>提供的方法转置 Hybond<sup>TM</sup>N<sup>+</sup>(Amersham) 尼龙膜上, 探针采用随机引物法(Prime-a-gene Labeling System, Promega), 用  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP 进行标记后, 与膜上的 DNA 杂交, -70℃下放射自显影, 以显示杂交信号。

## 2 结果

根据小麦族物种非整倍体分析和连锁遗传资料选择了 40 个 RFLP 探针(每个同源群 4~6 个探针)用于检测 C. S. -R. c 二体附加系中外源染色体的存在, 及它们与小麦的同源转化性。这些探针覆盖了小麦 7 个部分同源群的 14 个长短臂, 其中除 CDO388、CDO684 分别属于第 2、第 5 和第 2(*EcoRI*)、第 3(*EcoRV*)同源群外, 其余的只在小麦一个同源群中检测到信号。这些探针都能在中国春(C. S)与纤毛鹅观草之间检测出多态性杂交位点, 但只有第 2、第 5 群的探针可分别在 96K025(B”), 96K030(D”)96K033(tBL”)和 96K012(E”)中检测到纤毛鹅观草的特异带。7 个部分同源群探针在 94K04、96K08、96K032 中均未能检测到纤毛鹅观草的特异带。

### 2.1 端二体附加系 96K033(tBL”), 二体附加系 96K025(B”)、96K030(D”)

用第 2 部分同源群短臂探针 Psr912、KSUF11(表 2)在 96K025、96K030、96K033 中可以检测到同样的杂交带型, 即在这些材料中除了可以检测到与普通小麦中国春相同的杂交带外, 还出现了供体亲本纤毛鹅观草特异的杂交带。而第 2 部分同源群长臂探针 Psr934、Psr101、CDO684(表 2)只在 96K025、96K030 中检测到纤毛鹅观草特异的杂交信号, 在 96K033 中未检测到多态性杂交带(图版 I -1, 2)。说明 96K025 中添加的纤毛鹅观草染色体 B

表 2 用第 2、第 5 部分同源群 DNA 探针检测小麦-纤毛鹅观草二体附加系的结果

Table 2 Detection results of wheat-*R. ciliaris* addition lines by using probes of homoeologous group 2 and 5

探针 Probe	来源 Origin	位点 Location	拷贝数 Copy number	显示多态性的二体附加系 Addition lines revealing polymorphism
BCD1130	cDNA	5AS 5BS 5DS	S <sup>a</sup>	96K012, 96K013(97K012, 97K013, 97K015, 97K016)
WG363	gDNA	5AS 5BS 5DS	S	96K012, 96K013(97K012, 97K013, 97K015, 97K016)
CDO338	cDNA	5AL 5BL 5DL 2BL 2DL	L <sup>b</sup>	96K012, 96K013(97K012, 97K013, 97K015, 97K016)
WG419	gDNA	5AL 5BL 5DL	S	96K012, 96K013(97K012, 97K013, 97K015, 97K016)
Psr128	cDNA	5AL 5BL 5DL	S	96K012, 96K013(97K012, 97K013, 97K015, 97K016)
Psr912	gDNA	2AS 2BS 2DS 5AL 5DL	L	96K025, 96K026(97K037, 97K039, 97K042, 97K045) 96K030, 96K033
BCD111	cDNA	2AL 2BL 2DL	S	96K025, 96K026(97K037, 97K039, 97K042, 97K045)
CDO684	cDNA	2AL 2BL 2DL	L	96K025, 96K030
Psr101	cDNA	2AL 2BL 2DL 2Hx 2Rx	L	96K025, 96K030
Psr934	gDNA	2AL 2BL 2DL	S	96K025, 96K026(97K037, 97K039, 97K042)96K029, 96K030(97K055, 97K056, 97K057, 97K058)
KSUF11	gDNA	2AS 2BS 2DS	L	96L025, 96K026(97K037, 97K039, 97K042)96K029, 96K030(97K055, 97K056, 97K057, 97K058), 96K033 (97K066, 97K067)

a: 单拷贝, b: 低拷贝。 a: single copy, b: low copy.

和 96K030 中添加的染色体 D 均属于第 2 部分同源群;端二体附加系 96K033 中添加的纤毛鹅观草染色体 B 的端体与小麦染色体组第 2 群短臂具有部分同源关系。我们对以上附加系的后代衍生株系分析的结果发现, 96K025、96K026 的后代衍生株系 97K037、97K039、97K042、97K045 中的染色体 B 得到了稳定传递(图版 1-3, 4)。

## 2.2 二体附加系 96K012(E<sup>+</sup>)

用第 5 部分同源群长臂和短臂的探针 BCD1130、WG363、CDO388、WG419、Psr128(表 2)在二体附加系 96K012、96K013 中均能检测到纤毛鹅观草的特异带, 用这些探针在其后代衍生株系 97K012、97K013、97K015、97K016 中亦检测到了同样的信号(图版 1-5, 6), 说明 96K012 中添加的染色体 E 属于第 5 部分同源群, 并可在后代中较稳定地传递。

## 3 讨论

利用小麦近缘属染色体组的染色体与小麦染色体间残存的不同程度的部分同源关系, 创造异染色体系(异附加系、异代换系和易位系), 从而把小麦近缘种属的有益性状基因转移到小麦中, 已成为小麦遗传改良的重要手段之一。对外源基因进行追踪和染色体标定, 是有目的地对这些基因进一步利用的基础。为了有效地利用异附加系, 需要对导入小麦背景中的染色体进行准确鉴定, 其一是肯定是否有外源染色体, 其二是明确添加的究竟是亲缘物种的哪条染色体, 及其与受体小麦染色体的同源关系, 以便进一步创造代偿性代换系和易位系。

南京农业大学细胞遗传研究所从纤毛鹅观草向普通小麦转移赤霉病抗性的工作始于 80 年代, 并已获得了抗性较现有抗病对照苏麦 3 号小麦高的涉及不同纤毛鹅观草染色体的异附加系<sup>[7]</sup>。在确定普通小麦—纤毛鹅观草附加系工作中, 由于已有普通小麦中国春和纤毛鹅观草的标准带型可供利用<sup>[9, 16, 17]</sup>, 染色体 C-分带技术发挥了重要作用。但纤毛鹅观草 C-分带时上色较慢, 且在普通小麦背景中与 A、D 组不同染色体间的区分技术要求较高, 从而给筛选和鉴定工作带来一定困难。以 DNA 分子杂交为基础的 RFLP 技术不仅能显示外源染色质是否已被导入, 而且还能确定被导入染色质的大小、染色体组和部分同源群归属, 并定位导入小麦背景中的外源优良基因。Sharp 等<sup>[13]</sup>仅用 1 至 2 个 RFLP 探针就确定了小麦异附加系中的外源染色体或染色体臂, 结果与细胞学鉴定相吻合。这表明 RFLP 分析方法可提高小麦异染色体系鉴定的准确性和筛选效率。

本文报道了用 40 个小麦单、寡拷贝 RFLP 探针对经形态标记和细胞学鉴定初步筛选到的异附加系进行了准确鉴定, 结果确定了添加到小麦背景中的纤毛鹅观草染色体与小麦染色体的同源转化性。研究结果表明 RFLP 分析在异附加系的筛选和确定外源染色体部分同源群归属方面是十分有效的。我们对 7 个经染色体 C-分带筛选到的异附加系及其衍生后代株系所进行的 Southern 杂交结果表明, 其中只有 4 个附加系被 RFLP 标记检测出具有外源添加染色质, 其中 3 个为二体附加系, 一个为端二体附加系。染色体 C-分带的结果认为 96K025、96K030 中分别添加了纤毛鹅观草染色体 B、D<sup>[7]</sup>, 我们用第 2 部分同源群长短臂的探针 (Psr101、Psr934、BCD292、CDO418、KSUF11、CDO684, 其中探针 Psr101、Psr912、KSUF11 均位于两臂着丝粒附近) 在 96K025 和 96K030 中却检测到完全相同的纤毛鹅观草特异带, 因此很有可能这两个材料中添加的为同一条纤毛鹅观草染色体。纤毛鹅观草的染色体 E 属第 5 部分同源群, 这一对染色体在小麦背景中十分稳定, 在后代衍生株系中能正常传递。因为位于第 5 部分同源群着丝粒附近探针 WG363、WG419, 和另两个染色体中部探针, 在

96K012、96K013 及其后代衍生株系中均能检测到纤毛鹅观草特异带, 小麦族着丝粒附近区域相对来说十分保守, 是确定部分同源群的重要区域。染色体 C-分带的结果表明端二体附加系中添加的是一对纤毛鹅观草染色体 B 的端体, 赤霉病抗性鉴定证明其抗性高于回交亲本普通小麦中国春, 略低于抗病对照品种苏麦 3 号, 推测染色体 B 的这条臂可能携有一抗赤霉病基因<sup>[7]</sup>。RFLP 分析过程中发现只有第 2 部分同源群短臂的探针在此端体上有纤毛鹅观草特异的杂交带。结合以上染色体 B 二体附加系 Southern 杂交的结果, 我们推测这条臂属于第 2 部分同源群短臂, 而染色体 B 的另一臂则与第 2 同源群的长臂有部分同源关系, 从而把染色体 B 端体上可能携带的抗赤霉病基因初步定位于第 2 部分同源群的短臂上, 这为进一步利用端体材料创造易位系转移抗性基因提供了线索。

## 参 考 文 献

- 1 颜 阳, 刘大钧. 中国农业科学, 1987, 20(6):17~21
- 2 Sharma H C, B S Gill, J K Uyemoto. Phytophatol Z, 1984, 110: 143~147
- 3 翁益群, 刘大钧. 中国农业科学, 1989, 22(5):1~7
- 4 Sharma H C, B S Gill. Wheat Inf Serv, 1981, 52: 19~22
- 5 Sharma H C, B S Gill. Theor Appl Genet, 1983a, 66: 111~121
- 6 Sharma H C, Wheat Inf Serv, 1989, 69: 1~4
- 7 王秀娥, 陈佩度, 刘大钧. 遗传学报, 1997, 24(2):137~140
- 8 Jiang J, W J Raupp, B S Gill. Genome, 1992, 35: 614~620
- 9 Jiang J, P D Chen, B Friebe, et al. Genome, 1993, 36: 327~333
- 10 Gale M D, T E Miller. In: Wheat Breeding, its Scientific basis (Lupton F G H, ed), London: Chapman and Hall, 1987, 173~210
- 11 Miller TE, S M Reader. Theor Appl Genet, 1987, 74: 214~217
- 12 Forster B P, S M Reader, et al. Genet. Res, 1987, 50: 91~97
- 13 Sharp P J, S Chao, et al. Theor Appl Genet, 1989, 78: 342~348
- 14 Gill K S, E L Lubbers, B S Gill, et al. Genome, 1991, 34: 362~374
- 15 Sharp P J, M Kreis, P R Shewry, et al. Theor Appl Genet, 1988, 75: 286~290
- 16 Endo T R. Jpn. J. Genet., 1986, 61: 89~93
- 17 Gill B S. Genome, 1991, 34: 830~839

## 图 版 说 明

1. 用第 2 部分同源群长臂探针 CDO684 与附加系及亲本普通小麦中国春、纤毛鹅观草 *EcoRI* 酶切 DNA 的 Southern 杂交结果。(1) 普通小麦中国春, (2) 纤毛鹅观草, (6) 96K025, (12) 96K030。箭头示纤毛鹅观草染色体特异片段。
2. 第二部分同源群短臂探针 KSUF11 与附加系的后代衍生株系及亲本普通小麦中国春、纤毛鹅观草 *DraI* 酶切 DNA 的 Southern 杂交结果。(1) 普通小麦中国春, (2) 纤毛鹅观草, (11)、(12)、(13) 96K025、96K026 的后代衍生株系 97K037、97K039、97K042, (14)、(15)、(16)、(17) 96K029、96k30 的后代衍生株系 97K055、97K056、97K057、97K058, (19)、(20) 96K033 的后代衍生株系 97K066、97K067。箭头示多态性片段。
- 3~4. 分别用第 2 部分同源群短臂探针 BCD111、Psr912 与 *EcoRV* 酶解的普通小麦中国春、纤毛鹅观草及附加系的后代衍生株系基因组 DNA 的 Southern 杂交。(1) C. S., (2) R. c., (11)、(12)、(14)、(15) 2B<sup>+</sup> 附加系 97K037、97K039、97K042、97K045。3. BCD111/*EcoRV*, 4. Psr912/*EcoRV*。
- 5~6. 用第 5 部分同源群短臂探针 CDO388, BCD1130 与 *DraI* 酶解的(1)CS、(2)纤毛鹅观草及附加系 DNA 杂交的放射性自显影图, (7)、(8)、(9)、(10) 97K012、97K013、97K015、97K016, 箭头示纤毛鹅观草特异带。5. CDO388/*DraI*, 6. BCD1130/*DraI*。

陶文静等：用 RFLP 鉴定普通小麦—纤毛鹅观草二体附加系中外源染色体的同源转化性

Tao Wenjing et al. : Homoeology Identification of the Alien Chromosomes or Their Arms Involved in *T. aestivum*-*R. ciliaris* Disomic Addition Lines by RFLP Analysis

图版 I

Plate I

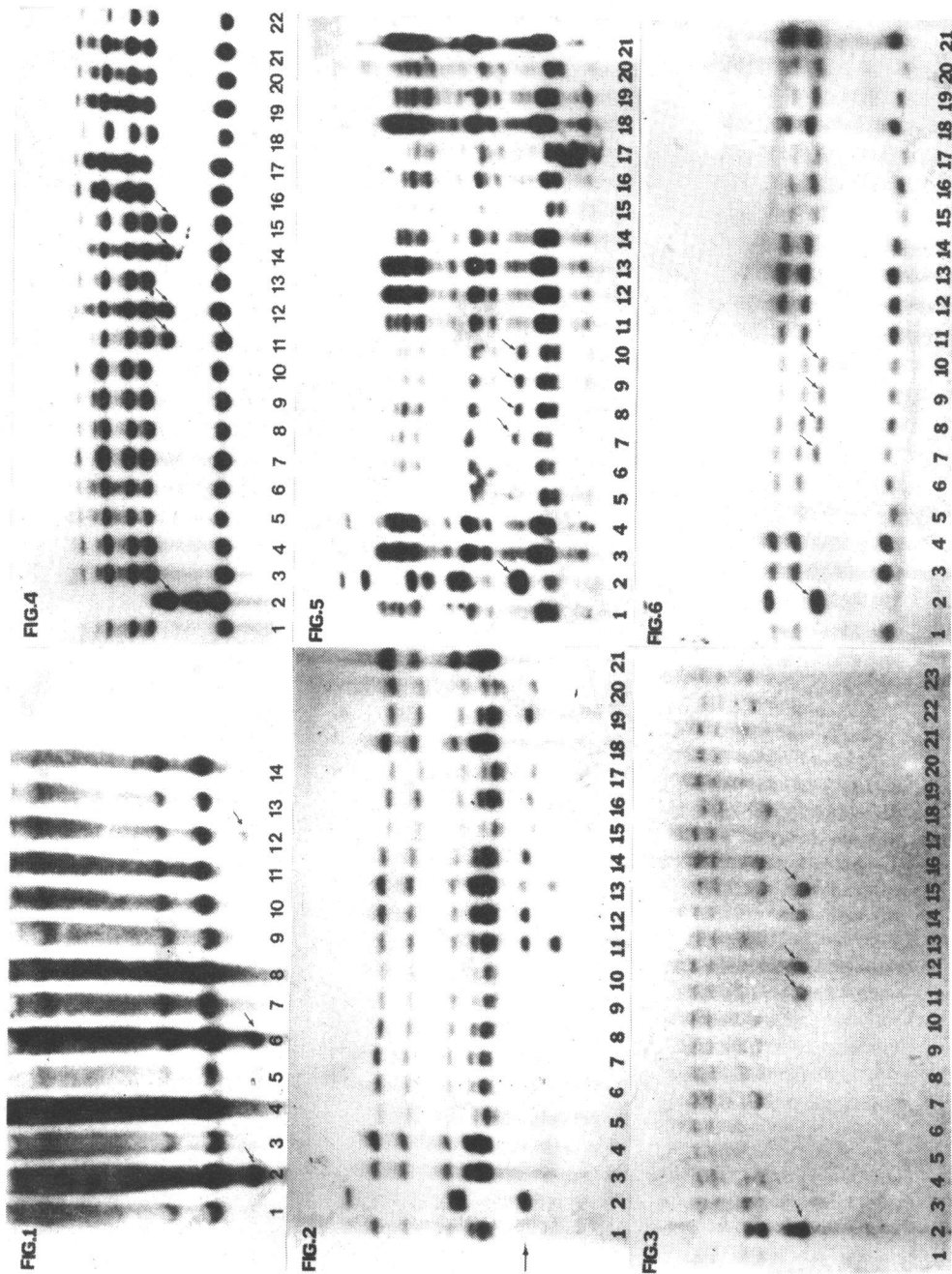


Fig. 1 Hybridization of *Eco*RI-restricted DNA of addition Lines and control C. S. , R. c. with 2L-specific probe CDO684. (1) C. S. ; (2) *R. ciliaris*; (6) 96K025; (12) 96K030. 2L fragment are indicated by arrowheads.

Fig. 2 Hybridization patterns obtained with 2S-specific probe KSUF11 for *Dra*I digested DNA from wheat C. S. , R. c. and wheat-*R. ciliaris* addition lines. (1) C. S. ; (2) R. C (11), (12), (13) 97K037, 97K039, 97K042; (14), (15), (16), (17) 97K055, 97K056, 97K057, 97K058; (19), (20) 97K066, 97K067. The arrow head indicates R. c specific fragments.

Fig. 3~4 Photograph of Southern blot on which 2L-specific probe BCD111 (Fig. 3) and 2S-specific Probe Psr912 (Fig. 4) have been hybridized to *Eco*RV-digested genomic DNAs from Chinese Spring; *R. ciliaris*, and C. S.-*R. ciliaris* addition lines. Showing RFLP in the (11), (12) and (14), (15)—— 97K037, 97K039, 97K042, 97K045.

Fig. 5~6 Southern blots of *Dra*I-digested DNA probed with CDO388 (5L, Fig. 5) and BCD1130 (5S, Fig. 6). (1) C. S. ; (2) R. c. (7), (8), (9), (10) 97K012, 97K013, 97K015, 97K016 show RFLPs.