

抗黄矮病小麦新品系 YW 243 的选育和细胞分子生物学鉴定^X

谢皓 陈孝 张增艳 辛志勇 林志珊 杜丽璞 马有志
徐惠君

(中国农业科学院作物育种栽培研究所, 农业部作物遗传育种重点开放实验室, 北京 100081)

提 要 以小麦2中间偃麦草二体异附加系L₁的衍生系PP921为黄矮病抗源, 从[(PP921ö陕7859öö丰抗8号)F₁ × (3 × 丰抗13号öKhapli)F₄]杂交组合F₂代花药培养再生植株中选育出一个抗黄矮病小麦新品系YW 243。经黄矮病毒田间接种鉴定, 细胞学分析, GISH和RFLP分子标记检测, 结果表明: 该系高抗黄矮病毒GPV、GAV株系, 体细胞染色体数目为2n=42, 花粉母细胞减数分裂中期I染色体构型为2n=21°, 遗传上稳定, 是小麦2中间偃麦草7DS·7DL/27XL易位系, 易位发生在7DL的端部, 携有一对来自中间偃麦草的BYDV抗性基因。中国农科院植保所鉴定结果同时表明: YW 243兼抗小麦黄矮病、白粉病、条锈病、秆锈病和叶锈病等5种病害, 是一个优良多抗材料。目前已被广泛应用于抗病育种计划。

关键词 小麦; 黄矮病; 选育; 鉴定

Breeding and Cytological and Molecular Identification of a New Wheat Line YW 243 with BYDV Resistance

XIE Hao CHEN Xiao ZHANG Zengyan XIN Zhiyong LIN ZhiShan DULiPu
MA YouZhi XU HuiJun

(Institute of Crop Breeding and Cultivation, CAAS, Beijing, 100081)

Abstract The wheat line YW 243 with BYDV resistance which come from the derivative PP921 of *Triticum aestivum* 2*Thinopyrum intermedium* addition line L₁, was obtained by anther culture of a cross combination [(PP921öShan 7859ööFengKang8) F₁ × (3 × FengKang13öKhapli) F₄] F₂ generation. The line was tested for its BYDV resistance in the field and cytological analysis, GISH and RFLP analysis were also conducted for this line. The results showed that YW 243 with the somatic chromosome number of 42 and 21 bivalents at M I of PMCs was a genetically stable euploid line resistant to GPV and GAV strains of BYDV. The GISH and RFLP analysis demonstrated that YW 243 was a *Triticum aestivum* 2*Thinopyrum intermedium* translocation line (T7DS·7DL/27XL) with a pair of BYDV resistance genes on the end of 7DL. The extensive disease resistance test was done by the Institute of Plant Protection, CAAS. It proved that YW 243 was also a line resistant to barley yellow dwarf virus, powdery mildew, stripe rust, stem rust and leaf rust and can be

X 国家“九五”科技攻关和“863”计划项目资助

致谢: 本室张珠云同志参加了田间选育工作, 中国农业科学院植物保护研究所钱幼亨研究员、吴立人研究员和段霞瑜研究员在抗病鉴定方面做了许多工作, 在此一并表示衷心感谢。

收稿日期: 1999210211, 接受日期: 2000203205

used as parent in breeding program for resistance to disease

Key words Wheat; Barley yellow dwarf virus (BYDV); Breeding; Identification

小麦黄矮病由大麦黄矮病毒(barley yellow dwarf virus, 简称BYDV)引起,是世界小麦的主要病害之一,被称为小麦的“黄色瘟疫”。我国主要发生在西北、东北和华北麦区,近年来有蔓延趋势,已扩展到黄淮、四川、长江中下游麦区。目前防治小麦黄矮病最经济有效的途径是选育和推广抗BYDV的品种。

抗BYDV育种的基础是优良的抗病资源。迄今普通小麦种质资源中还未发现抗BYDV的材料。小麦的近缘植物中间偃麦草(*Thinopyrum intermedium*)高抗黄矮病,含有抗BYDV基因^[1-4]。Cauderon将普通小麦Vilmorin27(AABBDD, $2n = 42$)与中间偃麦草($E_1E_1E_2E_2XX$, $2n = 42$)杂交育成二体异附加系 $L_1(2n = 44 = 21^\circ + 1^\circ)$ ^[2]。研究表明, L_1 附加的一对染色体为中间偃麦草染色体7X^[5-7],抗BYDV基因位于7X长臂上,为显性单基因^[1, 4, 8]。辛志勇、陈孝等在以 L_1 为抗源通过中国春Ph基因隐性突变体诱导部分同源染色体重组的后代中,选育出高抗小麦黄矮病的新种质PP92I^[8, 9]。PP92I为春性材料,为进一步改良其农艺性状,并能快速有效地应用于北部冬麦区抗BYDV小麦育种计划,对其进行了改良和利用。通过与冬性农艺亲本、抗白粉病品系的杂交和花药培养,选育出兼抗黄矮病、白粉病和锈病的小麦新种质YW 243。本文就YW 243细胞遗传学分析,黄矮病抗性鉴定及其抗性基因的GISH、RFLP分子标记和遗传稳定性的研究的结果进行论述。

1 材料与方法

1.1 供试材料

抗黄矮病亲本PP92I(CSph × 2 Δ L₁ööCSN 5BT 5D ö3ö中 7902); 抗白粉病株系Y901685(3 × 丰抗 13öKhap li), 普通小麦品种陕 7859、丰抗 8号、京 411、中麦 9号和中国春; 异附加系 L_1 及抗病品系YW 443(PP92Iö陕 7859öö丰抗 8号), 供试材料均由本实验室提供。

1.2 方法

1.2.1 小麦黄矮病抗性鉴定 1997~1999年田间苗期接种饲毒(GAV 株系)蚜,每株10头左右,40天后调查发病株数,根据有无病症分为感病和抗病二类,计算感病率。饲毒蚜由中国农科院植保所提供。

1.2.2 细胞学分析 参照谢皓等^[10]的方法。

1.2.3 基因组原位杂交(GISH) 参照马有志等^[11]的实验方法。

1.2.4 RFLP分子标记检测 参照张增艳等^[12]的实验方法。限制性内切酶为EcoR I和Dra I,探针为Psr687和Wg380。

2 结果与分析

2.1 YW 243的选育过程

1988~1989年以PP92I为母本,先后与陕 7859、丰抗 8号杂交,1990年从(PP92Iö陕 7859öö丰抗 8号) F_1 中选择抗黄矮病株系Y9013628与抗白粉病株系Y901685(3 × 丰抗 13öKhap li)杂交。1992年从Y9013628öY901685杂种 F_2 代Y92243株行中选择兼抗黄矮病和白粉病的单株进行花药培养。接种9个穗的1010粒花药于C17培养基上,30天后产生205块愈

伤组织, 出愈率为 20.3%。愈龄 10 天左右转到分化培养基(10M S+ NAA 1 mg/L + KT 1 mg/L)上, 25 天左右分化出 18 株绿苗, 绿苗分化率为 8.8%。绿苗适时转到壮苗培养基上, 培养 30 天后于 10 月份移栽网室。越冬后成活 13 株, 成活率为 72.2%。再生植株用北京地区白粉病混合菌种接种, 获得抗白粉病的双单倍体 5 株, 成熟后分株收获脱粒。1993~ 1994 年度种成株行, 根据田间农艺性状的表现, 中选 Y941392 和 Y941394 二个株行, 从中分别选出 5 株和 29 株, 前者均为白粒, 后者均为红粒。1994~ 1995 年度将 Y941394 升入鉴定圃, 经农艺性状观察和抗性鉴定, 该株系整齐一致。收获后混合脱粒, 定名为 YW 243。

2.2 黄矮病抗性鉴定

早春 3 月下旬于田间对 YW 243、北京地区推广品种京 411 和中麦 9 号接种饲毒(GAV 株系)蚜, 40 天后观察发病情况, 55 株 YW 243 没有发现感病株, 京 411 和中麦 9 号各 25 株均感病, 感病率均达到 100%。1998 年中国农科院植保所用饲毒(GPV 和 GAV 株系)蚜进行苗期接种鉴定, 40 天后调查, YW 243 对 GPV 和 GAV 均表现高抗, 反应型为 0 级。由此说明 YW 243 高抗我国现流行的两个主要 BYDV 株系 GAV 和 GPV。

2.3 细胞学分析

YW 243 根尖细胞的染色体数为 $2n=42$ (图 1)。花粉母细胞减数分裂中期Ⅰ染色体构型为 $2n=21^{\circ}$ (图 2), 观察的 64 个花粉母细胞中 21° 的频率为 100%, 其中环状 $^{\circ}$ 和棒状 $^{\circ}$ 分别为 91.5% 和 8.5%, 染色体配对正常。

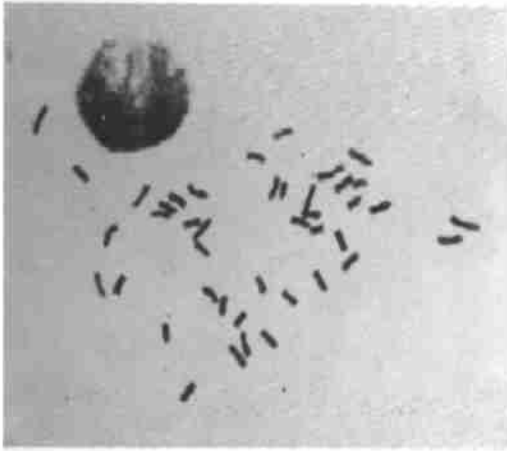


图 1 YW 243 根尖染色体有丝分裂中期, $2n=42$

Fig. 1 The pattern of YW 243 at mitosis metaphase, $2n=42$

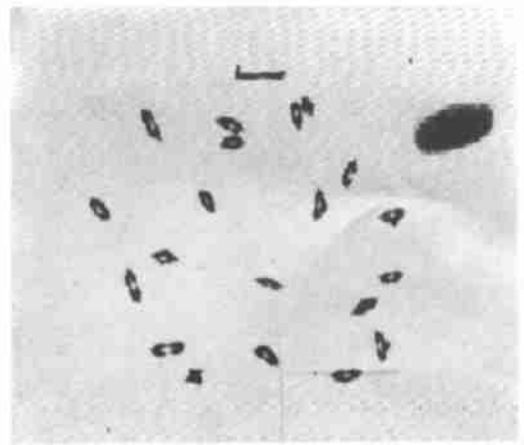


图 2 YW 243 花粉母细胞减数分裂中期Ⅰ, $2n=21^{\circ}$

Fig. 2 The pattern of YW 243 PMC at metaphase Ⅰ, $2n=21^{\circ}$

2.4 基因组原位杂交(GISH)分析

原位杂交样片在荧光显微镜蓝色(B)荧光激发下中间偃麦草染色体杂交信号为黄色, 小麦染色体背景为红色。GISH 的结果表明: YW 243 根尖细胞有丝分裂中期染色体中有 2 条染色体端部出现黄色杂交信号, 其余部分染色体呈红色(图 3)。直观表明这 2 条染色体端部含有中间偃麦草的 DNA 片段, 而且该染色体片段较小, 由于 YW 243 的染色体构型 $2n=21^{\circ}$, 说明是纯合的小麦 2 中间偃麦草小片段易位系。

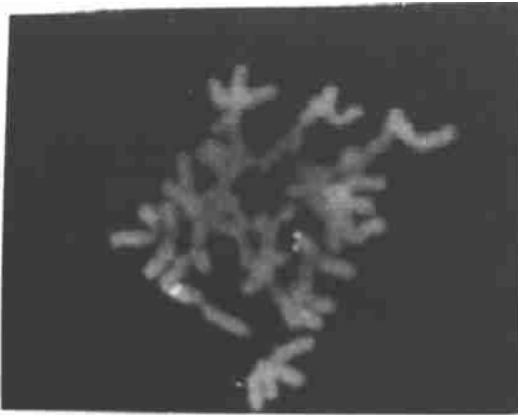


图3 用生物素标记中间偃麦草基因组DNA为探针与 YW 243 染色体的荧光原位杂交
Fig 3 Fluorescence in situ hybridization of YW 243 chromosomes using the biotinylated total DNA of *Th. intermedium* as the probe

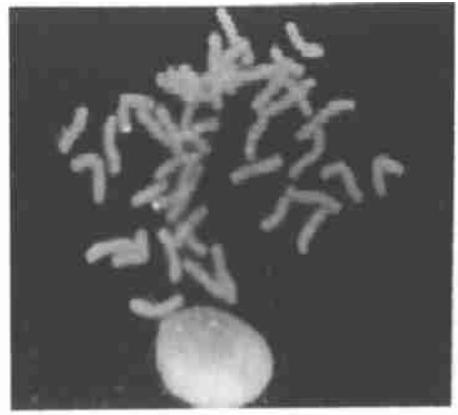


图4 用生物素标记中间偃麦草基因组DNA为探针与 99G44M 染色体的荧光原位杂交
Fig 4 Fluorescence in situ hybridization of 99G44M chromosomes using the biotinylated total DNA of *Th. intermedium* as the probe

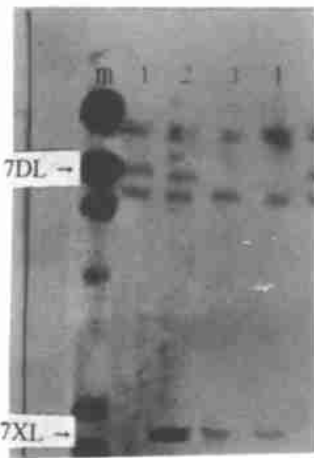


图5 *Psr687* 与 *EcoRI* 酶切 DNA 的杂交, 箭头示特征带。

1. 中国春, 2 *L1*, 3 YW 443, 4 YW 243
Fig 5 Southern blots of *EcoRI* digested DNA probed with *Psr687*, the arrow indicates the marker band
1. S, 2 *L1*, 3 YW 443, 4 YW 243

2.5 RFLP 分子标记检测

选用位于小麦第 7 部分同源群染色体长臂端部, 分别距着丝点 104dM 和 115dM 左右^[4] 的二个探针 *Psr687* 和 *Wg380*, 限制性内切酶 *EcoRI* 和 *DraI* 进行 RFLP 分子标记检测, 发现 *Psr687* 与 *EcoRI* 酶切组合在 *L1*、YW 243 和 YW 443 DNA 杂交带型中于 2.1 kb 处均显示一条 7XL 的特征带, 而 YW 243、YW 442 都缺少 8.6 kb 处的 7DL 特征带 (图 5)。说明 YW 243 和 YW 443 含有 X_{psr687} 位点的 7DL 染色体片段已被 7X 染色体片段所代换。同样在 *Wg380* 与 *DraI* 酶切组合 YW 243 和 YW 443 DNA 杂交带型中于 10.0 kb 处显示一条 7XL 的特征带, 而缺少 6.3 kb 处的 7DL 特征带, 说明 X_{wg380} 位点的 7DL 片段被中间偃麦草的 7XL 片段所代换, 这与前人的研究结果^[1, 12]相吻合。

3 讨论

3.1 经饲毒 (BYDV) 蚜 3 年两地接种鉴定, 证明 YW 243 高抗我国现流行的小麦黄矮病 GPV 和 GAV 株系。由于 YW 243 在花粉母细胞减数分裂中期染色体构型为 $2n = 21^{\circ}$, 所以该系是一个遗传稳定性好的抗病系。

3.2 GISH 杂交信号表明 YW 243 的染色体中有二条易位有中间偃麦草染色体 7XL 片段。RFLP 分析结果说明该片段在染色体 7DL 的端部, 代换了 7DL 相应片段。为此可以认为 YW 243 是小麦 2 中间偃麦草 7DS · 7DL/7XL 小片段纯合易位系, 含有 1 对来自中间偃麦草的抗 BYDV 基因。Banks 等^[3], Hohmann 等^[5]利用 RFLP 和 GISH 分析了以 *L1* 为抗原的 TC14

抗病易位系, 确认 TC14 易位断点在染色体 7DL 中部, Xp sr129 附近, 距着丝点遗传距离约 45cM。张增艳等^[12]对以 PP921 为抗源的抗病易位系 H960642 进行 RFLP 分析表明, 该易位断点在 7DL 端部, 距着丝点的遗传距离 90~99cM 左右。YW 243 也是 PP921 的后代, 并很好地继承了 PP921 对黄矮病的抗性, 故可推测其易位断点和 H960642 相同。因为 PP921 的外源易位片段小, 其含有的抗 BYDV 基因不但能稳定遗传给其子代品系 H960642 和 YW 243, 也可稳定遗传给 YW 243 的子代系 99G44M (YW 243 \times W P50 \times 66AL 2 6V S \times 3 \times 扬 P28, DH₄ 代)。从图 4 可以看到 99G44M 与 YW 243 一样, 在相同位置具有中间偃麦草的染色体片段。

3.3 近些年来, 由于生产条件的改善, 病虫害的组成和消长有了新的变化, 一个麦区往往遭到二种以上病虫害的危害, 将多种抗性基因组装在同一品种是扩大抗病谱, 保持抗病持久性的重要措施。由于 PP921 是春性材料, 而且不抗白粉病, 所以在选育 YW 243 时, 我们有目的把冬性抗白粉病品系 Y901685 组配进去。在 F₂ 代选择抗病株进行花药培养, 通过对 DH₁、DH₂ 代的农艺性状选择和抗性鉴定, 获得了兼抗类型的新品系 YW 243。实践证明选育兼抗性小麦新种质在 F₂ 代选用抗病株进行花药培养比常规的系谱选择法需要的群体小, 省时、省工。中国农科院植保所鉴定报告: YW 243 不但高抗小麦黄矮病、白粉病而且高抗条锈病、秆锈病和叶锈病等病害^[10,13], 是目前报道中少见的兼抗 5 种病害的普通小麦新类型。关于其它病害的抗性鉴定和抗性基因分析将另文发表。

3.4 YW 243 农艺性状较好, 属于冬性小麦, 抗寒、抗旱性较好, 株高 80~90 cm 左右, 穗纺锤形长芒, 每株平均成穗 7~8 穗, 每穗 30 粒左右, 千粒重 40.9 g, 粒色浅红, 半角质, 株型紧凑, 上部叶片短且上冲, 成熟时落黄好, 缺点是穗形较小, 粒小, 有的年份在某些地区发现其颖壳表面有黄褐色斑点。近年来, 我们已把 YW 243 作为兼抗多种病害的抗病亲本提供给各小麦产区的育种单位利用。本课题组已获得转育后的 F₇ 和 DH₄ 代材料, 并且有目的的在杂交组合中加进新的白粉病抗性基因 Pm 21、Pm 2 和 Pm 6。在中选的 YW 243 后代株系中, 未发现颖壳有黄褐色斑点, 说明此性状与抗性基因无连锁。

参 考 文 献

- 1 辛志勇, 陈 孝, 徐惠君等. 中国科学(B 辑), 1991, (1): 36~42
- 2 Cauderon Y, B Saigne, M Dauge, et al. In: *Proc. 4th. Wheat Genet Symp*, Missouri Columbia, 1973, 401~407
- 3 Banks PM, P J Larkin, H S Bariana, et al. *Genome*, 1995, 38: 395~405
- 4 Devos KM, M D Atkinson, C N Chinoy, et al. *Theor Appl Genet*, 1992, 83: 931~949
- 5 Hohmann V, K Badaeva, W Busch, et al. *Genome*, 1996, 39: 336~347
- 6 Friebe B, Y Mukai, B S Gill, et al. *Theor Appl Genet*, 1992, 84: 899~905
- 7 Larkin P J, P M Baoks, E S Lagudah, et al. *Genome*, 1995, 38: 385~394
- 8 陈 孝, 辛志勇, 肖世和等. 作物学报, 1998, 24(1): 16~20
- 9 林志珊, 陈 孝, 辛志勇等. 见: 庄巧生, 杜振华主编: 中国小麦育种研究进展. 北京: 中国农业出版社, 1996, 319~325
- 10 谢 皓, 陈 孝, 林志珊等. 北京农学院学报, 1999, 1: 6~10
- 11 马有志, 徐琼芳, 辛志勇等. 遗传学报, 1997, 24(4): 344~349
- 12 张增艳, 辛志勇, 马有志等. 中国科学(C 辑), 1999, 4: 413~417
- 13 谢 皓, 陈 孝, 林志珊等. 作物杂志, 1997, 3: 8



图 6 Wg380 与 DraI 酶切 DNA 的杂交, 箭头示特征带。

1. YW 443, 2 中国春,
3. YW 243

Fig. 6 Southern blots of DraI digested DNA probed with Wg380, the arrow indicates the marker band

1. YW 443, 2. C. S., 3. YW 243