

小麦-多枝赖草单体异附加材料减数分裂期外源染色体的行为研究*

赵茂林** 李瑞芬 梁宏霞

张学勇

北京市农林科学院北京农业生物技术研究中心,北京 100089 中国农业科学院作物品种资源研究所,北京 100081

摘要 通过细胞学观察和基因组原位杂交技术分析小麦-多枝赖草单体异附加材料减数分裂期外源染色体的遗传行为。研究结果表明:在减数分裂中期,附加的多枝赖草染色体在一定程度上干扰小麦同源染色体的正常配对,出现了未配对的小麦染色体;在减数分裂后期,30.2%~35.6%的外源染色体随机走向一极,19.5%~20.9%的外源染色体提早分裂,多枝赖草染色体落后和断裂的频率分别为19.8%~21.1%和7.9%~10.5%,同时有少量小麦染色体也发生了不规则分裂现象,表明附加的多枝赖草染色体也影响了小麦染色体后期的正常分离,这为小麦与多枝赖草染色体间产生易位提供了条件。

关键词 小麦 多枝赖草 单体异附加 减数分裂 基因组原位杂交

近年来,在小麦栽培品种的更新推广过程中,出现种内的遗传基础变窄,多样性较差,对生物和非生物危害因素的耐性降低,从而影响小麦品种进一步改良。而小麦的野生近缘种属含有许多与丰产、优质、抗逆等有关的优良基因。利用这些近缘种有利基因的有效途径是创制携带具有目标性状的易位系^[1]。目前,国内外已通过各种途径创制出多种材料的易位系^[2]。在前人研究的基础上,赵茂林于1994年提出并实施“单体异附加材料花药培养创制易位系”的方法^[3],目的是把单体异附加系雄配子染色体发生的易位,经花药培养纯合加倍,在后代中迅速选育出稳定的易位系。在单体异附加材料中,附加的外源染色体在减数分裂期的遗传行为如何?它是怎样诱导异源易位的产生呢?本研究通过基因组原位杂交技术和细胞学分析,研究小麦-多枝赖草单体异附加材料减数分裂期外源染色体的遗传行为,为揭示外源染色体与小麦染色体间发生易位的规律提供依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

Line24 是一个抗黄矮病的小麦-多枝赖草二体异附加系($2n = 44 = 22 \text{ II}$),由北京农业生物技术中心植物分子细胞遗传学实验室保存;莱州 953 和京 411 是小麦感黄矮病品种($2n = 42 =$

2000-12-01 收稿,2001-02-07 收修改稿

* 国家自然科学基金(批准号:39700099)和北京市自然科学基金(5972002)资助项目

** E-mail: Zhaoml@sun.midwest.com.cn

21 II), 分别由中国农业科学院作物品种资源研究所和北京农林科学院作物所提供.

1.2 实验方法

1.2.1 单体异附加材料的制备 莱州 953 或京 411 为母本与 Line24 杂交, 所获杂种即为单体异附加材料($2n = 43 = 21 \text{ II} + 1 \text{ I}$).

1.2.2 染色体减数分裂细胞学分析 花粉母细胞(PMC)减数分裂前、中和后期染色体制片的取材和方法见文献[4], 对减数分裂中期染色体构型和后期不规则分裂行为(落后染色体、提早分裂和不对等分离现象)进行统计[5].

1.2.3 染色体基因组原位杂交 参照 Zhang 等的实验程序[6], 以地高辛标记多枝赖草总基因组 DNA 为探针, 以普通小麦中国春基因组为封组 DNA, 与分散清晰的单体异附加材料花粉母细胞减数分裂前期、中期和后期的染色体进行原位杂交, 并以二体异附加系 Line24 和小麦亲本京 411 为对照.

2 结果与分析

2.1 小麦-多枝赖草单体异附加材料减数分裂期的细胞学观察

2.1.1 附加外源单价染色体在减数分裂中期的行为 由 Line24 分别和小麦京 411、莱州 953 杂交, 所获 F_1 代杂种分别为 941 和 934, 其染色体数为 43, 是小麦-多枝赖草单体异附加材料. 从两者花粉母细胞减数分裂中期 I 染色体构型来看, 二价体出现频率比预期值有所下降(表 1), 其中 934 的二价体出现频率仅为 20.36, 低于预期值 21; 而单价体的出现频率为 2.28, 高于预期值 1. 在个别细胞中, 可观察到 5 个单价体, 这表明附加的外源单价体在一定程度上可以干扰小麦染色体正常配对. 从表 1 可以看出, 二体附加系 Line24、小麦亲本京 411 及单体异附加系 941、934 减数分裂中期相中几乎未观察到多价体的出现, 表明小麦染色体遗传背景中未发生染色体间的易位.

表 1 单体异附加材料及亲本减数分裂中期 I 染色体构型

材料	染色体数	染色体组成	观察细胞数 ^{a)}	染色体构型 ^{b)}			
				单价体	二价体	三价体	四价体
京 411	42	$2n = 21 \text{ II}$	69	0.04 (0~2)	20.98 (20~21)	—	—
Line24	44	$2n = 21 \text{ II} + 2\text{L}$	79	0.05 (0~2)	21.98 (21~22)	—	—
京 411 × Line24	43	$2n = 21 \text{ II} + 1\text{L}$	86	1.28 (1~3)	20.86 (20~21)	—	—
莱州 953 × Line24	43	$2n = 21 \text{ II} + 1\text{L}$	93	2.28 (1~5)	20.36 (19~21)	—	—

a) 表中 1L 示一条多枝赖草染色体; 2L 示一对多枝赖草染色体. b) 数字表示相应价体在不同细胞内的分布平均个数, 括号内数字为个数范围, 一未观察到

2.1.2 附加外源单价染色体在减数分裂后期的行为 在减数分裂后期, 二体附加系 Line24 中附加的一对外源染色体在 95.9% 的 PMC 中分离正常, 即配对的 2 条外源染色体分别走向两极(表 2). 由京 411、莱州 953 分别与 Line24 杂交获得的单体异附加材料中, 分别有 37.9% 和 54.5% 的 PMC 中单条外源染色体随机走向一极, 形成 21/22 的分离情形. 在这 2 份材料中, 分

别有 31.8% 和 21.0% 的细胞含有落后染色体,一般为 1~3 条(图版 I (a)). 同时分别有 12.1% 和 12.7% 的细胞中单价体在中期 I 形成姐妹染色单体,有的细胞出现 2 个姐妹染色单体,有的则出现 4 个姐妹染色单体(图版 I (b)). 另外,还观察到 7.3%~9.1% 的细胞中有染色体断片,表明附加的单条外源染色体不仅干扰小麦染色体的正常配对,还影响小麦染色体后期的正常分离. 在减数分裂后期 II,一些细胞中出现提早分裂的染色体(图版 I (c)),有的断裂或落后,在末期 II 微核出现比例较高(76.3%~81.2%). 但在这些细胞中哪些染色体是外源的,哪些是小麦染色体发生的不规则分裂现象仍不清楚.

表 2 单体异附加材料减数分裂后期 I 染色体分裂情况及末期 II 微核比例(%)

材料	后期 I					微核率
	21/22 或 22/22	提早分裂	落后	断裂	其他	
Line24	95.9		2.3		1.8	3.7
京 411 × Line24	37.9	12.1	31.8	9.1	9.1	76.3
莱州 953 × Line24	54.5	12.7	21.0	7.3	4.5	81.2

2.2 小麦-多枝赖草单体异附加材料减数分裂期的基因组原位杂交

2.2.1 间期-中期 I 的染色体基因组原位杂交 对 2 份单体异附加材料花粉母细胞减数分裂间期制片进行基因组原位杂交分析,发现高度丝状的染色质成团,红色的小麦染色质背景下可以清晰地观察到黄色多枝赖草染色质,并用小麦-多枝赖草二体附加系作对照(图版 I (d)). 随着时期的后移,染色质收缩成染色体,到终变期能分清二价体和单价体(图版 I (e)). 中期的染色体形态较好,个别细胞中出现 3 条单价染色体,包括小麦染色体未配对的单价体和 1 条外源染色体;大部分细胞中含有 21 对呈红色的小麦二价体,和 1 条呈黄色的多枝赖草单价体(图版 I (f)).

2.2.2 后期 I ~ 末期 I 的染色体基因组原位杂交 通过基因组原位杂交技术,可以明确哪些不规则分裂现象是外源染色体,哪些是多枝赖草干扰小麦染色体而形成的. 研究结果表明(表 3),30.2%~35.6% PMC 中的外源染色体随机走向一极,通常是 22 条染色体一极含有黄色多枝赖草单价体(图 1(g)). 在所观察的细胞中,多枝赖草姐妹染色体提早分裂的频率为 19.5%~20.7%(图版 I (h), I (i)),这些提早分裂的姐妹染色单体有的分别走向两极,有的在末期仍落后. 多枝赖草染色体落后和断裂的频率分别为 19.8%~21.1% 和 7.9%~10.5%. 在 2

表 3 单体异附加材料花粉母细胞减数分裂后期 I 的基因组原位杂交结果^{a)}

材料	观察细胞数	不对等分离	提早分裂	落后	断裂	不能确定
京 411 × Line24	101	L: 35.6	L: 20.7	L: 19.8	L: 7.9	2.0
		W:	W: 3.0	W: 0.9	W: 2.0	
		LW:	LW: 4.0	LW: 3.0	LW: 2.0	
莱州 953 × Line24	86	L: 30.2	L: 19.5	L: 21.1	L: 10.5	3.5
		W:	W: 2.3	W: 1.2	W: 2.3	
		LW:	LW: 1.2	LW: 3.5	LW: 4.7	

a) L, W 和 LW 分别代表多枝赖草染色体、小麦染色体和同时具有多枝赖草和小麦染色体,其后的数字表示它们出现不同类型不规则分裂现象的频率(%)

份单体异附加材料中有少量小麦染色体也发生了提早分裂、落后及断裂等不规则现象。多枝赖草和小麦姐妹染色体同时提早分裂的频率为 1.2% ~ 4.0%，两者同时断裂的频率为 2.0% ~ 4.7%，这可能为其产生易位提供了条件。

2.2.3 后期 II ~ 末期 II 及四分体期的染色体基因组原位杂交 经第 1 次减数分裂后随机走向一极的多枝赖草染色体，在后期 II 约 10% 细胞中的外源染色体进行了第 2 次正常减数分裂，进一步证明单体异附加材料通过自交选择是可以保持的。提早分裂的多枝赖草姐妹染色体分别走向两极，在后期 II 约 3% 细胞中的外源染色体发生断裂，在约 5% 细胞中未观察到外源染色体信号，表明这部分细胞中的外源染色体可能已丢失。

在四分体时期可以观察到许多微核，原位杂交结果表明，86.1% ~ 95.6% 的微核是由多枝赖草染色体造成的，而约 4.4% ~ 13.9% 的微核来自小麦染色体。

3 讨论

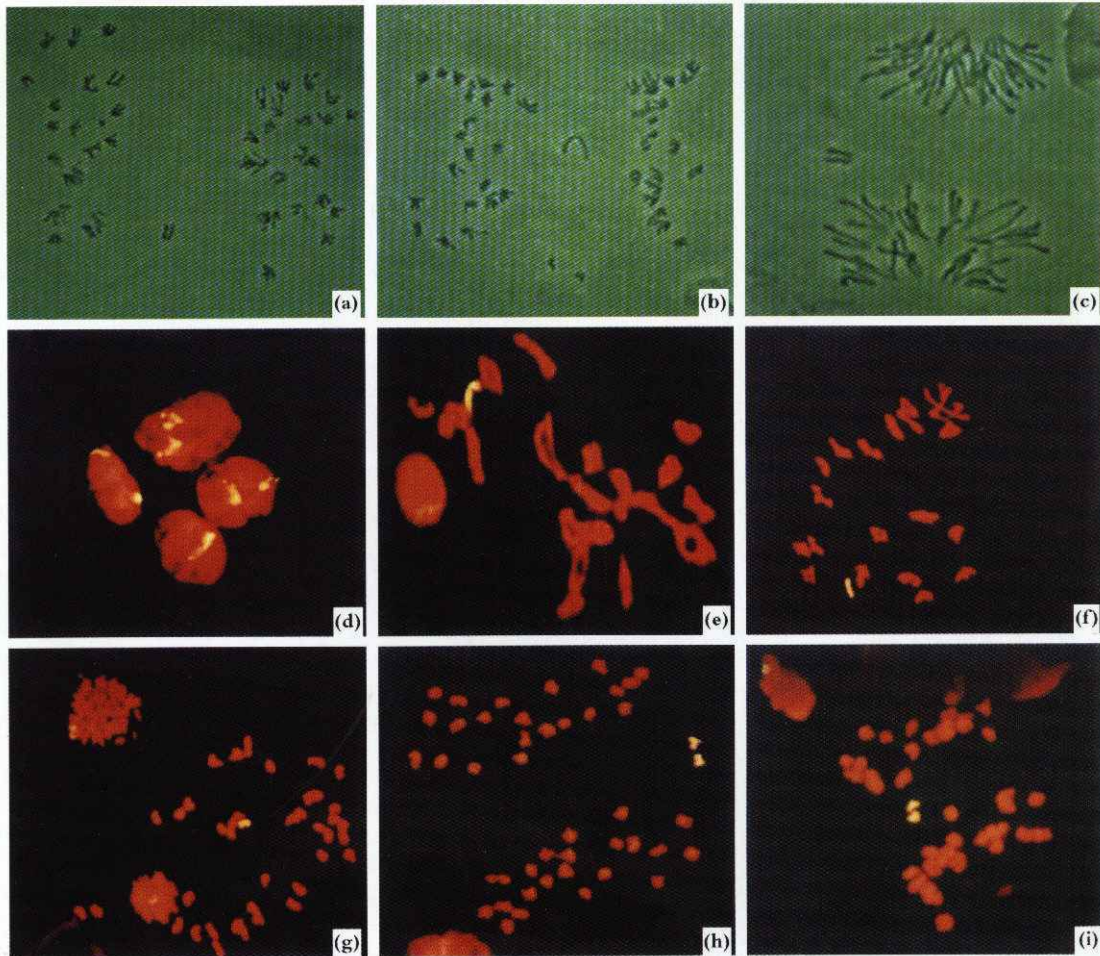
诱导异源易位有多种方法^[2,7]。Sears 首先建立了远缘杂交-(双二倍体)-附加系-单体杂交-代换系-辐射-易位系的程序^[8]，但实际操作十分费时费力；Riley 等则使用部分同源染色体配对的 5B 控制系统诱导易位，却因必须以小麦的 5B 缺体或 Ph 突变基因为基础而受限。之后，诱导易位开始脱离小麦特殊遗传材料的限制。Lukaszewski 等^[9]和胡含等^[1]分别在六倍体小黑麦与普通小麦的杂交后代和花药培养后代中发现了高频率小麦-黑麦染色体臂间的 Robertson 易位；任正隆等^[7,10,11]则在八倍体小黑麦与普通小麦的杂交后代中发现了大量的小麦-黑麦染色体臂间的 Robertson 易位、黑麦染色体间的易位和黑麦染色体小片段的转移；辛志勇等^[12]在小麦单体异附加系幼胚组织培养后代中选出了小片段易位系；我们在此基础上于 1994 年提出了“单体异附加材料花药培养法”选育小麦新品种的细胞工程新途径，目的是把单体异附加系雄配子染色体发生的易位，经花药培养纯合加倍，在后代中迅速选育出稳定的易位系^[3]。结果同时在小麦-多枝赖草、小麦-中间偃麦草、小麦-簇毛麦和小麦-黑麦单体附加系的花培后代中，都得到了形态上表现相应外源种的抗黄矮病或抗白粉病特性的易位系。由此可见，在单体异附加系的后代中容易选到小麦与外源种间染色体易位系的结论，具有一定的普遍性。这些易位系究竟是怎样发生的呢？Sears^[8]和 Lukaszewski 等^[9]认为是减数分裂过程中“着丝粒的断裂-融合”形成 Robertson 易位，任正隆等^[7,10,13]认为是减数分裂时外源染色体的“单体附加-破碎-整合”形成小片段易位，进而阐述了单体附加系做工具系统诱导易位系的方法和理论。他们都是根据后代植株的根尖有丝分裂中期染色体的构型推断出这样的结论，并没有直接的减数分裂期的证据。

本研究通过基因组原位杂交技术和细胞学分析，直接研究小麦-多枝赖草单体异附加材料减数分裂期外源染色体的遗传行为，发现附加的多枝赖草单价染色体在中期干扰了小麦染色体正常配对，同时在减数分裂后期出现提早分裂、断裂和落后等不规则现象，少量小麦染色体也发生了类似现象。尽管在小麦-多枝赖草单体异附加材料中未观察到重组易位现象，但我们在其他小麦与近缘种的单体异附加材料减数分裂后期明确地观察到了这一现象(另文报道)。李义文等^[5]通过荧光原位杂交技术分析了小麦-簇毛麦(*Haynaldia villosa*)单代换材料减数分裂行为，在后期也直接观察到 0.7% ~ 1.72% 小麦与簇毛麦染色体重组易位的产生。这些正好与上述学者的结论相吻合，是对“单体附加诱导易位”理论的有力支持。可见，单体附加在小麦

中的外源染色体,与二体附加不同,不仅本身具有遗传不稳定性,在世代交替过程中高频率地断裂、破碎以至丢失,而且还诱导小麦染色体发生遗传不稳定性,引起小麦染色体的断裂、破碎和丢失,从而导致外源染色体和小麦染色体间的重组易位频率提高。因此,利用单体异附加诱导异源易位的方法,可以促进小麦以至其他作物育种工作中对于优良外源种质资源的高效利用,拓宽品种遗传基础;同时对于相关遗传理论研究和外源基因鉴定、分离和克隆以至开展基因工程育种也将产生影响。

参 考 文 献

- 1 胡 含,等. 花粉小麦染色体工程. 科学通报, 1999, 44(1): 6
- 2 张学勇. 普通小麦异源易位系的产生及利用. 遗传, 1992, 13(5): 39
- 3 赵茂林. 植物育种新方法-附加系花药培养变异法. 见: 全国第二届青年农学学术年会论文集. 北京: 中国农业科技出版社, 1995. 759
- 4 李懋学,等. 植物染色体研究技术. 哈尔滨: 东北林业大学出版社, 1991. 11
- 5 李义文,等. 荧光原位杂交分析小麦-簇毛麦杂种减数分裂与染色体易位. 遗传学报, 2000, 27(4): 317
- 6 Zhang X Y, et al. Characterization of *Thinopyrum intermedium* alien chromosomes and their translocations in wheat derivatives of Zhong 5 by multicolor fluorescence. Chinese Agricultural Sciences, 2000, 3: 56
- 7 任正隆. 遗传转移的 MADI 过程. 四川农业大学学报, 1990, 8(1): 1
- 8 Sears E R. Chromosome engineering in wheat. In: Proceedings of the 4th International Wheat Genetics Symposium. Columbia: Missouri, USA, 1972. 23
- 9 Lukaszewski A J, et al. Translocations and modification of chromosomes in triticales X wheat hybrids. Theor Appl Genet, 1983, 64: 239
- 10 Ren Z L, et al. The use of monosomic rye addition lines for transferring rye chromatin into bread wheat. I. The occurrence of translocations. Plant Breeding, 1990, 105: 257
- 11 Ren Z L, et al. The use of monosomic rye addition lines for transferring rye chromatin into bread wheat. II. Breeding value of homozygous wheat/rye translocations. Plant Breeding, 1990, 105: 265
- 12 辛志勇,等. 应用生物技术向小麦导入黄矮病抗性的研究. 中国科学, B 辑. 1991, (1): 36
- 13 任正隆,等. 小麦-黑麦染色体小片段易位的诱导. 中国科学, C 辑, 1997, 27(3): 258



细胞学观察和染色体分子原位杂交结果

(a)~(c)为小麦-多枝赖草单体异附加系花粉母细胞减数分裂中期相差显微镜下普通细胞学分析图片。(a)示落后一条染色体；(b)示2条染色体提早分裂形成4条姐妹染色单体；(c)花粉母细胞减数分裂中期II染色体落后。(d)~(i)为原位杂交图片。(d)小麦-多枝赖草二体异附加系 Line24 减数分裂前期 I；(e)小麦-多枝赖草单体异附加系花粉母细胞减数分裂终末期；(f)小麦-多枝赖草单体异附加系花粉母细胞减数分裂中期 I；(g)小麦-多枝赖草单体异附加系花粉母细胞减数分裂后期 I；(h)，(i)示小麦-多枝赖草单体异附加系花粉母细胞减数分裂后期 I 外源姐妹染色单体提早分裂