

# 抗赤霉病普通小麦-大赖草端二体代换系 7Lr#1S(7A)的选育及减数分裂行为分析

王林生<sup>\*</sup>, 陈佩度<sup>\*</sup>

南京农业大学作物遗传与种质创新国家重点实验室, 细胞遗传研究所, 南京 210095;

河南科技大学农学院, 洛阳 471003

<sup>\*</sup> 联系人, E-mail: [pdchen@njau.edu.cn](mailto:pdchen@njau.edu.cn)

2008-03-05 收稿, 2008-07-03 接受

国家高技术研究发展计划(批准号: 2006AA10Z1F6)、江苏省自然科学基金(批准号: BK2006720)、江苏省高技术研究计划(批准号: BG2005310)和高等学校创新引智计划(批准号: B08025)资助项目

**摘要** 大赖草对赤霉病具有较好的抗性, 将大赖草赤霉病抗性基因转入普通小麦, 对拓宽小麦赤霉病抗性基础有重要意义. 本研究在获得抗赤霉病普通小麦-大赖草异附加系基础上, 采用  $1200\text{ R }^{60}\text{Co-}\gamma$  射线处理小麦-大赖草单体附加系 MA7Lr 花粉, 授予已去雄的绵阳 85-45. 经分子细胞学鉴定, 从  $M_1$  中得到了大赖草 7Lr#1S 端体植株, 从其自交后代中选育出一对 7Lr#1S 端着丝粒染色体代换了 1 对 7A 染色体的端二体代换系. 筛选出共显性 EST-SSR 分子标记-CINAU31. 对该代换系花粉母细胞减数分裂期染色体进行分子原位杂交和染色体配对分析,  $M_1$  的染色体构型为  $17.50\text{ II}^{\text{W}}+2.19\text{ II}^{\text{W}}+0.42\text{ II}^{7\text{Lr}\#1\text{S}}+1.08\text{ }^{7\text{Lr}\#1\text{S}}+0.69\text{ }^{\text{W}}$ , 2 条端着丝粒染色体在  $M_1$  配成二价体的花粉母细胞 PMC 占观察总数的 59.7%. 在后期 和末期 端着丝粒染色体 7Lr#1S 常出现特殊的染色体行为, 可观察到 2 条端着丝粒染色体移向一极、端着丝粒染色体落后、端着丝粒染色体的姊妹染色单体提前分离等方式, 从而产生了 3 种不同类型的四分体, 且在一些四分体中有数目不等的微核出现. 但由于端二体代换系产生的 7Lr#1S 雌雄配子有较高的传递率, 保证了该端二体代换系较好的遗传稳定性, 其自交后代中 84% 的植株为端二体代换. 两年大田、温室赤霉病接种鉴定, 对赤霉病表现出较高的抗性, 表明该端着丝粒染色体携有赤霉病抗性的主效基因. 因此, 端二体代换系可作为外源基因定位、功能分析、端体细胞学行为研究的良好材料, 同时也可作为进一步创造小片段易位的重要资源.

**关键词**

普通小麦

大赖草

端体代换系

减数分裂行为分析

赤霉病抗性

赤霉病是温暖湿润麦区的一种灾害性病害, 随着全球气候变暖和少免耕栽培方式的扩大应用, 赤霉病为害有扩展和加重趋势. 培育和利用赤霉病抗性品种是一种经济有效的策略. 在很长一段时期抗赤霉病育种使用的抗源局限于苏麦 3 号、Frontana 等少数品种及其衍生系. 因此, 拓宽赤霉病抗性遗传基础, 导入新的抗性基因成为当务之急. 大赖草 (*Leymus racemosus*,  $2n = 4x = 28$ ) 是一种与小麦亲缘

关系较远的多年生植物, 具有耐盐、抗旱、抗多种病害等多种优良特性<sup>[1,2]</sup>, 从中亚到东欧都有广泛分布. 大赖草高抗小麦赤霉病, 作为小麦赤霉病的一种新抗源, 愈来愈引起人们的重视.

陈佩度等人<sup>[3]</sup>选育出多个普通小麦-大赖草附加系, 并从中鉴定出 3 个高抗赤霉病的普通小麦-大赖草附加系(AdLr.2, AdLr.7 和 AdLr.14). Qi 等人<sup>[4]</sup>利用 RFLP 分析认为, Lr.2 和 Lr.14 分别与小麦的第 7 和第 5

部分同源群有关. 孙文献等人<sup>[5]</sup>获得了 2 个普通小麦-大赖草端二体附加系 95G09 和 95G11, 并对其赤霉病抗性进行了分析; Kishii 等人<sup>[6]</sup>也得到了 10 个普通小麦-大赖草附加系, 并对其应用价值和大赖草 J(7Lr)染色体的配子传递进行了初步分析. 但大赖草 7Lr#1S 端二体代换系的选育与研究尚未见报道.

本文报道了普通小麦-大赖草端二体代换系的选育和鉴定, 并对端二体代换系中外源端着丝粒染色体在减数分裂中的细胞学行为及端二体代换系在小麦改良和遗传研究中的应用加以分析和讨论.

## 1 材料与方法

( ) 植物材料. 抗赤霉病普通小麦-大赖草单体附加系 MA7Lr 由南京农业大学细胞遗传研究所选育, 感赤霉病品种绵阳 85-45 引自四川省绵阳地区农业科学研究所.

( ) 辐射处理. 用  $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$  射线处理刚开花的小麦-大赖草单体附加系 MA7Lr 的穗子, 辐射剂量 1200 R ( $1\text{ R} = 2.58 \times 10^4\text{ C/kg}$ ), 剂量率 100 R/min. 在辐射后 2 d 内采集经辐射处理过的穗子上的新鲜花粉, 授予已去雄套袋的绵阳 85-45. 辐射处理在江苏省农业科学院原子能利用研究所进行.

( ) 细胞学分析. 染色体 C-分带参照 Gill 等人<sup>[7]</sup>的方法. 花粉母细胞制片参照 Chen 等人<sup>[8]</sup>的方法. 以荧光素 (fluorescein-12-dUTP) 标记的大赖草基因组 DNA 为探针, 探针的标记采用缺刻平移法. 杂交程序参照 Zhang 等人<sup>[9]</sup>的方法. 染色体用碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 染色显示背景, 并用 Vectashield 胶黏合盖片. 杂交信号在 BX60 荧光显微镜蓝色激发光 (450~490 nm) 下观察, GISH 图像通过 SPOT CCD (charge coupled device) 获取.

( ) 分子标记鉴定. 植物 DNA 的提取参照 Edwards 等人<sup>[10]</sup>的方法. 引物合成根据陈海梅等人<sup>[11]</sup>和陈军方等人<sup>[12]</sup>报道的第 7 部分同源群的 EST-SSR 引物序列合成引物. 引物由上海英俊公司合成. PCR 反应在 GeneAmp 2700 PCR 扩增仪上进行, 20  $\mu\text{L}$  总反应体系中含 2.0  $\mu\text{L}$   $10\times$  缓冲液 (10 mmol/L Tris-HCl, 50 mmol/L KCl), 1.6  $\mu\text{L}$   $\text{MgCl}_2$  (2.5 mmol/L), 1.6  $\mu\text{L}$  dNTP (1.5 mmol/L), 0.4  $\mu\text{L}$  引物 (10  $\mu\text{mol/L}$ ), 50~100 ng 模板 DNA, 1.5 U Tag 酶. PCR 反应条件为: 95 预变性 5 min; 94 变性 30 s, 61 退火 45 s, 72 延伸 1 min, 32 个循环; 最后 72 延伸 10 min, 4 保存. 反应结束后, 在扩增产物中加入 2  $\mu\text{L}$  加样缓冲液 (6 $\times$  缓冲液:

0.25% 溴酚蓝, 0.25% 二甲苯青, 40% 蔗糖), 在浓度为 8% 的非变性连续聚丙烯酰胺凝胶 (Acr:bis = 39:1) 上恒压 180 V 电泳 1.5 h 左右, 缓冲体系为  $1\times\text{TBE}$ , 银染, 照相.

## 2 结果与分析

### 2.1 端二体代换系的选育

利用辐射处理的小麦-大赖草单体附加系 MA7Lr 的花粉, 授予已去雄的感病品种绵阳 85-45. 得到 66 粒  $M_1$  种子, 其中 57 粒可发芽成苗, 经根尖细胞有丝分裂中期染色体 C-分带, 从中检测出 9 株均含 1 条有较强端带的端着丝粒染色体的单株, 以大赖草基因组 DNA 作探针进行荧光原位杂交, 显示该端着丝粒染色体来自大赖草, 其端部有很强的荧光杂交信号, 结合 C-分带结果, 推断该端着丝粒染色体是大赖草 7Lr 短臂产生的, 表示为 7Lr#1S. 把鉴定过的端体材料种于赤霉病鉴定圃, 开花初期赤霉菌接种, 接种结果, 端体的病小穗率为 2.50%, 绵阳 85-45 为 37.64%, 苏麦 3 号为 1.76%, 端体表现出了较高的赤霉病抗性.

从其中 1 株抗病端体植株上收获了 16 粒种子, 对这 16 株  $M_2$  植株进行染色体 C-分带和 GISH 鉴定: 2 株染色体数  $2n = 40 + t''$ , 为端二体代换 (图 1); 2 株  $2n = 42 + t''$ , 为端二体附加; 6 株  $2n = 42 + t'$ , 为单端体附加; 3 株  $2n = 41 + t'$ , 为单端体代换; 3 株无 7Lr#1S. 赤霉病抗性鉴定结果表明 (表 1), 含有 7Lr#1S 的端体植株的赤霉病抗性虽不及苏麦 3 号, 但明显高于绵阳 85-45.

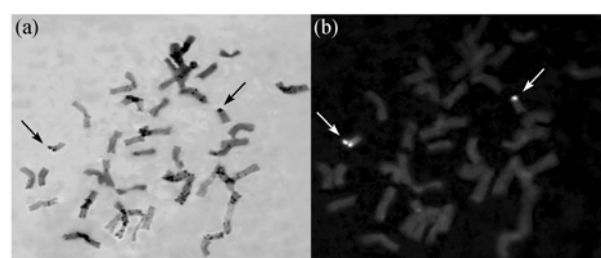


图 1 端二体代换系 (7Lr#1S) 有丝分裂中期染色体的顺次 C-分带 (a) 和 GISH (b)

图中箭头所指为端着丝粒染色体 7Lr#1S

### 2.2 端二体代换系的分子鉴定

根据陈海梅等人<sup>[11]</sup>和陈军方等人<sup>[12]</sup>报道的小麦第 7 部分同源群的 EST-SSR 引物序列, 合成了 16 对引物, 分别进行 PCR 扩增, 筛选出 1 对在中国春、大赖草之间表现明显多态的引物 (图 2), 命名为

表 1 M<sub>2</sub>植株赤霉病抗性鉴定

|         | 端二体代换 | 端二体附加 | 单端体附加 | 单端体代换 | 无 7Lr#1S | 绵阳 85-45 | 苏麦 3 号 |
|---------|-------|-------|-------|-------|----------|----------|--------|
| 鉴定植株数   | 2     | 2     | 6     | 3     | 3        | 30       | 30     |
| 病小穗率(%) | 2.38  | 2.76  | 4.23  | 4.76  | 28.57    | 34.50    | 1.58   |

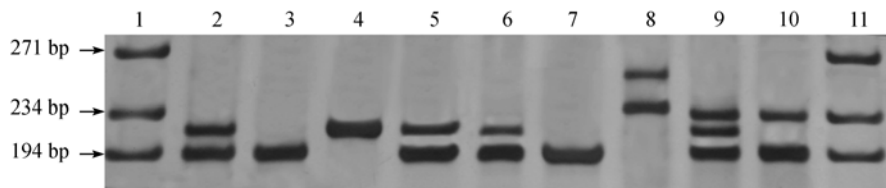


图 2 EST-SSR 标记 CINAU31 扩增结果

1 和 11 为 Marker; 2, C.S; 3, N7AT7B; 4, N7BT7A; 5, N7DT7A; 6, Tel7AS; 7, Tel7AL; 8, *L. racemosus*; 9, DA7Lr#1; 10, DTS7Lr#1S

CINAU31, 左引物为 5'-CTGGAAGACCAAGGAGG-3', 右引物为 5'-GGAAACTGGGAGGGCAAT-3'。经小麦缺体四体分析, 在 7A 和 7B 上分别扩增出 220 和 194 bp 的条带, 而在大赖草上扩增出约 240 和 250 bp 两条特异的条带。进一步用小麦 7AS 和 7AL 端体分析发现, 中国春 220 bp 的拷贝定位于 7AS。用 CINAU31 引物对大赖草二体附加系 DA7Lr 和端二体代换系进行 PCR 分析, DA7Lr 扩增出 2 条与中国春相同的带(7A 和 7B)和 1 条大赖草约 240 bp 的特异带, 说明 240 bp 带来自大赖草 7Lr, 而端二体代换系扩增出 1 条 7B 的条带和 1 条 7Lr 的条带, 却缺少了 7AS 的条带, 结合分子细胞遗传学分析, 表明此端二体代换系为大赖草 7Lr 短臂的 1 对端着丝粒染色体代换了 1 对 7A 染色体, 表示为 DTS7Lr#1S(7A)。

### 2.3 端二体代换系 7Lr#1S(7A)的减数分裂行为分析

对端二体代换系花粉母细胞减数分裂行为进行 GISH 分析发现, 在小麦背景中 2 条大赖草端着丝粒染色体 7Lr#1S, 除偶线期大多联会成二价体(图 3(a))外, 其余各时期均出现特殊的染色体行为(表 2, 图 3)。粗线期-双线期和中期 分别有 67.1%和 59.7%的 PMC 的 7Lr#1S 联会成二价体, 在 32.9%和 40.3%的 PMC 中以单价体形式存在; 后期 和末期 7Lr#1S 常出现特殊的染色体行为, 可观察到 2 条端着丝粒染色体移向一极、端着丝粒染色体落后、端着丝粒染色体的姊妹染色单体提前分离等方式。

( ) 粗线期-双线期 7Lr#1S 染色体行为。粗线期-双线期是减数分裂的重要时期, 此期稳定的二价体联会是确保同源染色体交换、重组和分离的关键。粗线期普通小麦同源染色体均联会成二价体, 到双线期二价体可看到 1 个以上的交叉; 大赖草 2 条

7Lr#1S 在粗线期表现多种联会形式, 以二价体联会为主(图 3(b)), 也存在不联会的单价体(图 3(c)), 还发现了 7Lr#1S 二价体的不完全联会; 在双线期也观察到 7Lr#1S 的多种联会方式。图 3(d)中 7Lr#1S 二价体联会较紧密; 有的可明显观察到交叉, 也观察到了 7Lr#1S 二价体着丝粒的提前解离。图 3(e)中 7Lr#1S 二价体已成棒状, 图 3(f)中 2 条 7Lr#1S 成为单价体。双线期端着丝粒染色体多样化的联会方式, 使中期和后期 的多样性排列和分离成为可能。

( ) 中期 7Lr#1S 染色体行为。中期 是观察染色体构型的关键时期。分析表明, 端二体代换系中期染色体构型为  $17.50 \text{ II}^{\text{W}} + 2.19 \text{ II}^{\text{W}} + 0.42 \text{ II}^{7\text{Lr}\#1\text{S}} + 1.08 \text{ }^{7\text{Lr}\#1\text{S}} + 0.69 \text{ }^{\text{W}}$ ; 染色体构型中的 17.50 个环状二价体均来自普通小麦; 棒状二价体中, 小麦 2.19 个, 大赖草 7Lr#1S 0.42 个; 单价体中, 大赖草 7Lr#1S 为 1.08 个, 小麦单价体为 0.69 个。GISH 分析发现, 2 条 7Lr#1S 在 M 配成二价体的 PMC 占观察 PMC 总数的 59.7%, 以单价体存在的 PMC 占 40.3%, 2 条单价的 7Lr#1S 随机排列在赤道板的一侧(图 3(h))或两侧(3(i)), 从而导致后期 染色体的多样性分离。

( ) 后期 7Lr#1S 染色体行为。在后期 观察到大赖草端着丝粒染色体有多种分离形式, 可归纳为 3 种, 即以 7Lr#1S 单价体分离、7Lr#1S 单价体-7Lr#1S 姊妹染色单体分离和 7Lr#1S 姊妹染色单体分离。单价体分离( $\text{ }^{7\text{Lr}\#1\text{S}} / \text{ }^{7\text{Lr}\#1\text{S}}$ )是后期 分离的主要形式(图 3(j)), 占 52.9%(表 2), 但常发现分离滞后现象(图 3(k)), 也发现了 2 条单价体 7Lr#1S 移向同一极的特殊现象(图 3(l)), 同时还观察到其中 1 条 7Lr#1S 或者 2 条 7Lr#1S 着丝点已发生解离但姊妹染色单体还没分离的现象。图 3(m)中的 2 条 7Lr#1S 姊

表 2 7Lr#1S 端着丝粒染色体减数分裂行为<sup>a)</sup>

|        | 粗线-双线期 |        | 中期     |        | 后期      |        |                   | 末期      |        |      | 四分体 <sup>b)</sup> |     |     |
|--------|--------|--------|--------|--------|---------|--------|-------------------|---------|--------|------|-------------------|-----|-----|
|        | 7Lr#1S | 7Lr#1S | 7Lr#1S | 7Lr#1S | 7Lr#1S/ | 7Lr#1S | scs <sup>c)</sup> | 7Lr#1S/ | 7Lr#1S | scs  | A                 | B   | C   |
| PMC    | 159    | 78     | 86     | 58     | 54      |        | 48                |         | 84     | 78   | 96                | 8   | 10  |
| 百分数(%) | 67.1   | 32.9   | 59.7   | 40.3   | 52.9    |        | 47.1              |         | 51.9   | 48.1 | 84.2              | 7.0 | 8.8 |

a) 表中 PMC 表示花粉母细胞, <sup>7Lr#1S</sup> 表示 2 条 7Lr#1S 联会成二价体, <sup>7Lr#1S</sup> 表示 2 条不联会的 7Lr#1S, <sup>7Lr#1S/</sup> <sup>7Lr#1S</sup> 表示后期 二价体均衡分离; b) A, B, C 分别表示 3 种四分体类型. A, 四分体的 4 个子细胞均含有 1 条 7Lr#1S; B, 2 个子细胞各有 2 条 7Lr#1S, 其余 2 个不含 7Lr#1S; C, 2 个子细胞各有 1 条 7Lr#1S, 1 个子细胞含有 2 条 7Lr#1S, 另 1 个子细胞不含 7Lr#1S; c) scs 表示端着丝粒姊妹染色单体解离

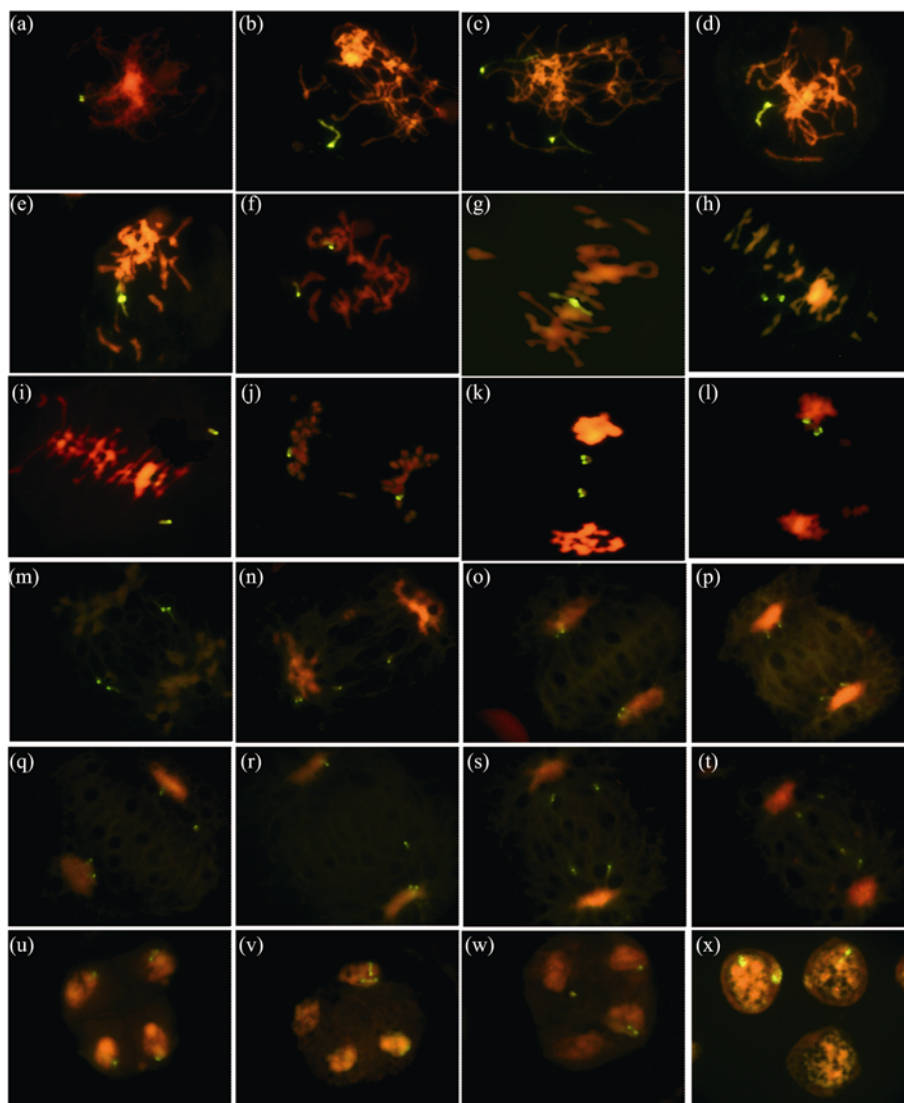


图 3 DTS7Lr#1S 中 7Lr#1S 减数分裂行为及单核花粉粒 GISH 分析

(a) 偶线期联会的 <sup>7Lr#1S</sup>; (b) 粗线期联会的 <sup>7Lr#1S</sup>; (c) 粗线期 2 条不联会的 <sup>7Lr#1S</sup>; (d) 双线期联会的 <sup>7Lr#1S</sup>; (e) 双线期棒状 <sup>7Lr#1S</sup>; (f) 双线期 2 条不联会的 <sup>7Lr#1S</sup>; (g) 中期 棒状 <sup>7Lr#1S</sup>; (h) 中期 2 条 <sup>7Lr#1S</sup> 在赤道板一侧; (i) 中期 2 条 <sup>7Lr#1S</sup> 在赤道板两侧; (j) 后期 2 条 <sup>7Lr#1S</sup> 正常移向两极; (k) 后期 2 条 <sup>7Lr#1S</sup> 滞后分离; (l) 后期 2 条 <sup>7Lr#1S</sup> 移向一极; (m) 后期 2 条 <sup>7Lr#1S</sup> 姊妹染色单体已移向两极; (n) 后期 1 条 <sup>7Lr#1S</sup> 与 1 条已分离的姊妹染色单体移向一极. (o)~(t) 末期 <sup>7Lr#1S</sup> 的不同分离形式: (o) 2 条 <sup>7Lr#1S</sup> 正常移向两极; (r) 1 条 <sup>7Lr#1S</sup> 与 1 条已分离的姊妹染色单体移向一极; (p), (q), (s) 和 (t) 2 条 <sup>7Lr#1S</sup> 姊妹染色单体不同的分离形式. (u) 四分体的 4 个子细胞均含 1 条 7Lr#1S; (v) 四分体中 2 个子细胞含 2 条 7Lr#1S, 另 2 个子细胞不含 7Lr#1S; (w) 四分体中, 1 个子细胞含 2 条 7Lr#1S, 2 个子细胞各含 1 条 7Lr#1S, 还有 1 个子细胞不含 7Lr#1S; (x) 表示 3 种不同的单核花粉粒  $t''$ ,  $t'$  和  $ot$

妹染色单体已完全分离, 分别移向细胞的两极; 图 3(n)中的 2 条 7Lr#1S, 其中 1 条 7Lr#1S 的 2 条姊妹染色单体已完全分离, 与另 1 条 7Lr#1S 一道移向细胞的同一极, 形成了 7Lr#1S 单价体-7Lr#1S 姊妹染色单体的分离形式。

( ) 末期 7Lr#1S 染色体行为. 末期 端着丝粒染色体分离行为的多样性更加突出. 除正常的 7Lr#1S 单价体形式分离外(图 3(o)), 与后期 一样表现为 7Lr#1S 单价体-7Lr#1S 姊妹染色单体和 7Lr#1S 姊妹染色单体分离(图 3(p)~(t)). 图 3(p)和(q)中的 7Lr#1S 姊妹染色单体尽管与普通小麦染色体一样到达两极, 但到达两极后染色体的存在状态明显不同, 普通小麦染色体已解螺旋, 而 7Lr#1S 仍看到染色体的具体形态, 染色体解螺旋显著滞后. 图 3(r)中的 7Lr#1S 表现为 7Lr#1S 单价体-7Lr#1S 姊妹染色单体分离. 7Lr#1S 姊妹染色单体分离形式各异(图 3(s)和(t)), 主要表现在 7Lr#1S 姊妹染色单体到达两极的运动状态多样化, 呈现出明显的时空连续性. 末期 7Lr#1S 姊妹染色单体的提前分离、分离的滞后成为产生多种四分体和微核的主要原因。

( ) 四分体及单核花粉粒的形成. GISH 分析发现, 依据四分体子细胞含有 7Lr#1S 数目的多少, 把端二体代换系产生的四分体类型分为 3 种, 分别表示为 A, B, C. A 型四分体的 4 个子细胞均含有 1 条 7Lr#1S(图 3(u)); B 型 4 个子细胞中 2 个子细胞各有 2 条 7Lr#1S, 另 2 个子细胞不含 7Lr#1S(图 3(v)); C 型 4 个子细胞中 2 个子细胞各有 1 条 7Lr#1S, 1 个子细胞含有 2 条 7Lr#1S, 另 1 个子细胞不含 7Lr#1S(图 3(w)). 统计分析表明, A, B, C 3 种四分体所占比例分别为 84.2%, 7.0%和 8.8% (表 2). 同时在四分体中还发现有多种类型的微核出现, 含有 1 个微核的四分体占 19.3%, 含有 2 个微核的四分体占 12.3%, 多于 3 个微核的四分体占 5.3%. 微核中既有小麦染色体形成的(图 3(u)), 也有 7Lr#1S 形成的(图 3(w)), 也有二者共同形成的。

四分体经过胼胝质酶的作用, 胼胝质被分解, 4 个子细胞从四分体中释放出来, 进而形成单核花粉粒. 依据含有 7Lr#1S 数目差异, 单核花粉粒可分成 3 种类型, 即含有 1 条、2 条和没有端着丝粒染色体 3 种(图 3(x)). GISH 分析 154 个单核花粉粒, 三者的比例分别为 79.2%, 7.2%和 13.6%。

( ) 二体代换系的遗传稳定性分析. 端二体代

换系遗传稳定性分析发现, 以端二体代换系作母本与中国春杂交, 后代出现 2 种植株类型, 含有 7Lr#1S 的单端体植株( $t'$ )和不含 7Lr#1S 的植株( $0t$ ), 二者比例分别为 91.4%和 8.6%(表 3); 以端二体代换系作父本与中国春杂交, 后代出现单端体( $t'$ )和端二体( $t''$ )两种类型, 二者比例分别为 82.9%和 17.1%, 后者表明产生了未减数的 7Lr#1S 单核花粉粒, 没有发现不含 7Lr#1S 的类型; 端二体代换系自交后代仅出现端二体( $t''$ )代换和单端体( $40 + t'$ )2 种类型, 二者比例分别为 84.0%和 16.0%, 并没有发现端三体代换和缺体(7A)等类型, 说明端二体代换系具有较好的遗传稳定性。

表 3 遗传稳定性分析

| 材料                   | 传递方式 | 观察植株数 | 后代类型比例(%) |       |      |
|----------------------|------|-------|-----------|-------|------|
|                      |      |       | $t'$      | $t''$ | $0t$ |
| $40 + t'' \times CS$ | 雌配子  | 35    | 91.4      | 0.0   | 8.6  |
| $CS \times 40 + t''$ | 雄配子  | 35    | 82.9      | 17.1  | 0.0  |
| $40 + t''$           | 自交   | 50    | 16.0      | 84.0  | 0.0  |

### 3 讨论

自Sears<sup>[13]</sup>采用X射线诱导获得抗叶锈病的普通小麦-小伞山羊草易位系以来, 通过电离辐射已获得了许多携带外源有益基因的小麦新种质<sup>[14-20]</sup>, 证明了电离辐射是诱发染色体结构变异, 尤其是创造染色体易位常用而有效的方法。

Pienaar和van Niekerk<sup>[21]</sup>认为, 采用 1000~1500 R 剂量<sup>60</sup>Co- $\gamma$ 射线处理小麦花粉可有效诱导染色体结构变异. 本研究采用 1200 R剂量诱导小麦-大赖草附加系花粉, 后代具有较高的成苗率(86.4%)和染色体结构变异率, 是比较适宜的花粉辐射剂量. 辐射的 57 株后代中除产生 9 株大赖草端体外, 还获得了 6 株小麦-大赖草易位, 外源染色体结构变异率达 26.3%. 从 16 株单端体后代中, 除发现 2 株端二体代换系外, 还得到了 2 株端二体附加系, 9 株单端体(包括单端体附加和单端体代换)和 3 株无外源端体植株。

Sears<sup>[22,23]</sup>育成的 42 个小麦端体具有广泛的应用价值, 主要用于非整倍体的鉴定, 基因的定位和作图<sup>[24]</sup>. 利用小麦-外源端体创造小片段易位, 减少外源冗余基因, 已成为行之有效的办法. Sears<sup>[25]</sup>采用 *Agropyron elongatum*端体 3AgL结合 $ph1b$ 和缺体 5B-四体 5D获得了携带抗叶锈基因 $Lr24$  的易位植株. 本研究创造的小麦-大赖草端二体附加系和代换系

7Lr#1S, 经两年大田、温室鉴定, 表现出较高的赤霉病抗性, 因此, 二者可作为进一步创造携带赤霉病抗性基因小片段易位系的重要材料。目前该项工作正在进行。

EST-SSR侧翼序列作为基因的一部分在物种之间高度保守。EST-SSR引物在物种之间具有较高的通用性, 有助于在亲缘关系较远的物种间进行比较作图 and 同源基因的克隆。Gupta等人<sup>[26]</sup>采用 78 对小麦 EST-SSR 引物, 对大麦基因组进行扩增, 发现有 55.12% 的引物具有通用性。Gao等人<sup>[27]</sup>采用 478 对 EST-SSR 引物对水稻、玉米、大豆等作物进行了扩增, 有 255 对引物表现出了高度的通用性。我们根据陈海梅等人<sup>[11]</sup>和陈军方等人<sup>[12]</sup>报道的小麦第 7 部分同源群的 EST-SSR 引物序列筛选出的 CINAU31 标记, 可有效鉴别中国春、大赖草、大赖草附加系 7Lr、端二体代换系及涉及该外源片段的易位系, 因此是一个较好的共显性标记。进一步用缺体-四体、端体定位, 该标记定位于 7B 和 7AS 上; 且证明了端二体代换系代换了 7A, 说明大赖草 7Lr 与 7A 较近的亲缘关系, 这与 Qi 等人<sup>[4]</sup>对大赖草第 7 部分同源群染色体的鉴定结果一致, 也给葛荣朝等人<sup>[28]</sup>根据 C 分带结果推测的多枝赖草染色体与小麦的 A 及 D 组染色体在遗传进化上可能有更为密切的亲缘关系提供了有力的分子证据。

同源染色体配对对于减数分裂期同源染色体重组和染色体的正确分离尤为重要。Burnham 等人<sup>[29]</sup>对减数分裂同源染色体配对进行的细胞学、遗传学和电子显微镜分析表明, 联会在染色体末端附近频繁起始。Ding 等人<sup>[30]</sup>研究认为, 减数分裂前期染色体端粒的凝集可促进同源染色体配对, 端粒凝集的缺乏可减少染色体臂区域联会的频率。本研究获得的端二体代换系, 是由大赖草的 1 对端着丝粒染色体 7Lr#1S 代换了小麦的 1 对 7A 形成, 缺少了 7Lr 整个长臂, 因而对端粒的凝集造成一定程度的影响, 从而降低了端着丝粒染色体的联会频率和程度; 另外缺失的小麦遗传背景也可能影响端着丝粒染色体的稳定联会。因而在粗线期就看到了约 1/3 的 PMC 中 2 条端着丝粒染色体以单价体形式存在, 即使联会成二价体也没

有普通小麦的二价体稳定, 所以到了中期 单价体的比例有所升高。单价 7Lr#1S 与纺锤体微管不同的结合方式, 形成了后期 末期 单价 7Lr#1S 提前解离的多样化分离方式, 且大多表现出明显的滞后分离, 同时也发现由于 2 条 7Lr#1S 代换了 1 对 7A, 后期 小麦染色体也出现了滞后分离。赵茂林等人<sup>[31]</sup>在观察小麦-多枝赖草单体异附加系和李瑞芬等人<sup>[32]</sup>在观察小麦-簇毛麦单体异附加系外源染色体减数分裂行为时, 也发现外源单价体后期 的提前解离现象。

末期 7Lr#1S 的多样化分离方式, 形成了 3 种不同类型的四分体和多种微核类型, 进一步形成 3 种单核花粉粒, 且出现了含有 2 条未减数的 7Lr#1S 花粉粒(图 3(x)), 这已被花粉 GISH 分析和测交同时证实(表 3), 主要是由末期 7Lr#1S 单价体-7Lr#1S 姊妹染色单体和 7Lr#1S 姊妹染色单体分离所致。端二体代换系遗传稳定性分析表明, 7Lr#1S 通过雌配子的传递率高达 91.4%, 因此, 7Lr#1S 可通过雌配子稳定传递; 虽然端二体代换系 PMC 中 2 条 7Lr#1S 在减数分裂中具有特殊的细胞学行为, 尤其是末期 表现多种分离方式, 但形成的 3 种花粉粒中,  $20 + t'$  花粉比例最高, 达 79.2%;  $20 + 0t$  花粉比例低(占 13.6%), 且在授粉过程中很难竞争过  $20 + t'$  的花粉;  $20 + t''$  花粉比例最低, 占 7.2%, 其在授粉过程中的竞争力也不如  $20 + t'$  花粉强, 从而保证了 7Lr#1S 花粉较高的传递率, 因此, 该端二体代换系具有较高的遗传稳定性, 自交后代端二体代换植株占 84.0%。正因为  $20 + 0t$  花粉授粉过程中的竞争力弱, 自交后代中很少发现缺体植株。自交后代没发现端三体植株, 其主要原因是含 2 条 7Lr#1S 的花粉自交授粉时, 有可能表现拮抗作用, 从而限制了外源端着丝粒染色体在后代的积累。

端二体代换系中外源端着丝粒染色体特殊的减数分裂行为, 为端着丝粒染色体的进一步细胞学研究提供了良好的平台, 较高的遗传稳定性为端体的遗传学、功能性研究提供了可靠保证, 因此, 端二体代换系是一个比较理想的细胞学和遗传学研究材料, 也可作为进一步创造小片段易位的重要资源。

## 参考文献

- McGuire P E, Dvorak J. High salt-tolerance potential in wheatgrasses. *Crop Sci*, 1981, 21: 702—705
- Mujeeb-Kazi A, Bekele G T, Mirand J L. Incorporation of alien genetic information from *Elymus giganteus* into *Triticum aestivum*. In:

- Proceeding the 6th International Wheat Genet Symp, Kyoto, Japan, 1983. 223—231
- 3 陈佩度, 王兆悌, 王苏玲, 等. 将大赖草种质转移给普通小麦的研究. 抗赤霉病异附加系选育. 遗传学报, 1995, 22: 206—210
  - 4 Qi L L, Wang S L, Chen P D, et al. Molecular cytogenetic analysis of *Leymus racemosus* chromosomes added to wheat. Theor Appl Genet, 1997, 95: 1084—1091[doi]
  - 5 孙文献, 陈佩度, 刘大钧. 将大赖草种质转移给普通小麦的研究. 端体异附加系的选育与鉴定. 遗传学报, 1998, 25(3): 259—264
  - 6 Kishii M, Yamada T, Sasakuma T, et al. Production of wheat-*Leymus racemosus* chromosome addition lines. Theor Appl Genet, 2004, 109: 255—260
  - 7 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*). Genome, 1991, 34: 830—839
  - 8 Chen P D, Qi L L, Zhou B, et al. Development and molecular cytogenetic analysis of wheat-*Haynaldia villosa* 6VS/6AL translocation lines specifying resistance to powdery mildew. Theor Appl Genet, 1995, 91: 1125—1128
  - 9 Zhang P, Li W, Friebe B, et al. Simultaneous painting of three genomes in hexploid wheat by BAC-FISH. Genome, 2004, 47: 979—987[doi]
  - 10 Edwards K, Johnstone C, Thompson C. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. Nucleic Acids Res, 1991, 19: 1349[doi]
  - 11 陈海梅, 李林志, 卫宪云, 等. 小麦EST-SSR标记的开发、染色体定位和遗传作图. 科学通报, 2005, 50(20): 2208—2216
  - 12 陈军方, 任正隆, 高丽锋, 等. 从小麦 EST 序列中开发新的 SSR 引物. 作物学报, 2005, 31(2): 154—158
  - 13 Sears E R. The transfer of leaf rust resistance from *Aegilops umbellulata* to wheat. Brookhaven Symp Biol 1956, 9: 1—22
  - 14 Driscoll C J, Jensen N F. Characteristics of leaf rust resistance transferred from rye to wheat. Crop Sci, 1964, 4: 372—374
  - 15 Driscoll C J, Jensen N F. Release of a wheat-rye translocation stock involving leaf rust and powdery mildew resistance. Crop Sci, 1965, 5: 279—280
  - 16 Sharma D, Knott D R. The transfer of leaf-rust resistance from *Agropyron* to *Triticum* by irradiation. Can J Genet Cytol, 1966, 8: 137—143
  - 17 Driscoll C J, Anderson L M. Cytogenetic studies of transec-a wheat-rye translocation line. Can J Genet Cytol, 1967, 9: 375—380
  - 18 Mukai Y, Friebe B, Hatchett J H, et al. Molecular cytogenetic analysis of radiation-induced wheat-rye terminal and intercalary chromosomal translocations and the detection of rye chromatin specifying resistance to Hessian. Chromosoma, 1993, 102: 88—95[doi]
  - 19 Sears E R. Use of radiation to transfer alien chromosome segments to wheat. Crop Sci, 1993, 33: 897—901
  - 20 Bie T D, Cao Y P, Chen P D. Mass production of intergeneric chromosomal translocations through pollen irradiation of *Triticum durum*-*Haynaldia villosa* amphiploid. J Integrat Plant Biol, 2007, 49(11): 1619—1626[doi]
  - 21 Pienaar R de V, Van Niekerk H A. The effect of gamma-irradiation on wheat gametophytes. In: Proceeding the 4th International Wheat Genet Symp. Columbia, Missouri, USA, 1973. 289—294
  - 22 Sears E R. The aneupolids of common wheat. Mo Agr Exp Stn Res Bull, 1954, 572: 58
  - 23 Sears E R. Chromosome mapping with the aid of telocentrics. In: Proceeding the 2nd International Wheat Genet Symp. Stockholm, 1966. 370—381
  - 24 Sears E R, Sears Lotti M S. The telocentric chromosomes of common wheat. In: Proceeding the 4th International Wheat Genet Symp. New Delhi, 1978. 389—407
  - 25 Sears E R. Transfer of alien genetic material to wheat, In: Evans L T, Peacock W J, eds. Wheat Science-Today and Tomorrow. Cambridge: Cambridge Univerisity Press, 1981. 75—89
  - 26 Gupta P K, Rustgi S, Sharma S, et al. Transferable EST-SSR markers for the study of polymorphism and genetic diversity in bread wheat. Mol Gen Genomics, 2003, 270: 315—323[doi]
  - 27 Gao L F, Jing R L, Huo N X, et al. One hundred and one new microsatellite loci derived from ESTs (EST-SSRs) in bread wheat. Theor Appl Genet, 2004, 108: 1392—1400[doi]
  - 28 葛荣朝, 赵茂林, 赵宝存, 等. 用 HBSG 法对多枝赖草、普那菊苣根尖染色体进行 C-分带的研究. 河北师范大学学报(自然科学版), 2006, 30: 213—216
  - 29 Burnham C R, John T, Stout W, et al. Chromosome pairing in maize. Genetics, 1972, 71: 111—126
  - 30 Ding D Q, Yamamoto A, Haraguchi T, et al. Dynamics of homologous chromosome pairing during meiotic prophase in fission yeast. Dev Cell, 2004, 6: 329—34[doi]
  - 31 赵茂林, 李瑞芬, 梁宏霞. 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. 自然科学进展, 2001(11), 9: 945—949
  - 32 李瑞芬, 梁宏霞, 赵茂林. 小麦-簇毛麦单体异附加材料外源染色体减数分裂行为的研究. 中国农业科学, 2002, 35(2): 127—131