

远缘杂交早代稳定小麦导入了外源DNA片段 并发生了DNA重排*

张连全 刘登才** 颜泽洪 郑有良

(四川农业大学小麦研究所, 都江堰 611830)

摘要 在植物界, 多倍体植物非常普遍. 具有 A, B, D 三个部分同源染色体组的普通小麦是异源多倍体物种的一个典型代表. 近几年, 模拟普通小麦的起源过程进行的研究表明, 从四倍体小麦注入节节麦整个基因组形成异源六倍体小麦的早期阶段, DNA 序列和基因表达发生了可能有利于遗传“二倍化”的变化. 利用普通小麦-黑麦远缘杂交自然结实的早代稳定特异小麦 99L2 研究发现: () 99L2 至少导入了两个黑麦染色体上的 DNA 片段, 表明可能存在不同于传统的小麦-外源染色体配对重组的外源 DNA 导入机制; () 99L2 自身的 DNA 序列发生了变化, 表明外源 DNA 部分片段注入小麦染色体组过程中, 也可能导致小麦自身 DNA 序列发生变化.

关键词 小麦 黑麦 远缘杂交 早代稳定 基因组进化

对小麦、大麦、水稻等自花授粉作物而言, 要从品种(系)杂交后代中获得稳定的品系一般都在 5 代以上. 如果杂交后代能够提早稳定, 无疑会缩短品种选育年限, 提高育种效率. 通过花药培养产生单倍体, 之后经过染色体加倍处理获得纯合品系的单倍-二倍化育种方法可以加快育种进程^[1], 提高育种效率. 在水稻, 发现用特殊的二倍体水稻品系或从二倍体自发产生的三倍体水稻或四倍体水稻与正常二倍体水

稻杂交, 在 F₂ 代获得部分稳定的二倍体株系, 这些 F₂ 株系在形态上和 DNA 水平上都呈现稳定, 同时具有双亲的 DNA, 但是表现出偏父或偏母的现象, 有的还出现了双亲没有的新带, 这种 F₂ 代稳定现象应用于水稻育种也可以大大缩短周期^[2,3].

与品种(系)间杂交不同的是, 作物与其外源物种染色体的遗传基础存在很大差异, 作物远缘杂交后代通常表现为疯狂分离, 更难稳定, 甚至不能得到稳

2005-04-15 收稿, 2005-06-20 收修改稿

* 国家自然科学基金项目(批准号: 30270804 和 30070462)、教育部新世纪优秀人才支持计划项目(NCET-04-0908)、长江学者和创新团队发展计划项目(IRT0453)、人事部留学人员科技活动项目及四川省科技厅和四川省教育厅资助

** 联系人, E-mail: dcliu7@yahoo.com

定后代。不过, 运用远缘杂交染色体消除现象^[4,5], 然后人工进行染色体加倍处理, 可以在早代迅速获得纯合稳定的作物品种。虽然以前没有关于普通小麦 (*Triticum aestivum* L., $2n = 42$, AABBDD)-黑麦 (*Secale cereale* L., $2n = 2x = 14$, RR) 远缘杂交染色体消除现象的报道, 但是我们从普通小麦地方品种新中 (Shinchunaga) 与中国栽培黑麦 (秦岭黑麦) 的属间杂种自然自交结实早代, 未经染色体加倍处理, 意外地获得遗传稳定材料 99L2^[6]。99L2 的形态特征与正常普通小麦类似, 染色体数为 42, 减数分裂中期 染色体配对正常, 通常为 21 个二价体。

本研究比较了早代稳定的特殊小麦新材料 99L2 及其小麦亲本新中 (中) 和黑麦亲本秦岭黑麦的生化与分子标记, 发现 99L2 不但转入了黑麦异源 DNA 片段, 而且发现 99L2 的 DNA 序列存在重排现象。

1 材料与方法

1.1 供试材料

F₃代稳定材料 99L2 及其自交 F₄, F₅, 以及小麦亲本新中 (中) 和黑麦亲本秦岭黑麦, 均保存在四川农业大学小麦研究所。秦岭黑麦是我国的一个栽培黑麦品种, 它对白粉病、条锈病免疫; 新中 (中) 是日本的抗赤霉病小麦地方品种, 由日本横滨大学 Shi Taketa 博士提供。

99L2 的产生过程^[6]: 新中 (中) 与秦岭黑麦的 15 株 F₁ 杂种植株自然结实共获得 F₂ 种子 3 粒, 分单株在实验室发芽获得 3 个植株 F₂₋₁, F₂₋₂ 和 F₂₋₃。三叶期移栽到田间, 但是 F₂₋₁ 和 F₂₋₃ 在苗期被地下害虫咬死, 只剩下 F₂₋₂。从 F₂₋₂ 的自交后代发现所有的 F₃ 植株性状稳定, 取此稳定品系代号为 99L2。尽管 F₂₋₂ 的其他 2 个姊妹植株被虫咬死, 未能产生后代, 不能在 F₂ 及 F₃ 进行相互比较, 但是 F₂₋₂ 的结实情况和农艺性状与其后代 F₃ 类似, 这表明 F₂₋₂ 植株可能已纯合稳定, 即 99L2 在 F₂ 代可能已纯合。

1.2 根尖细胞有丝分裂染色体、花粉母细胞减数分裂观察

对根尖采用 Schiff 试剂染色, 碱性品红常规压片进行体细胞染色体观察。处于减数分裂中期 —— 四

分体时期的花药用卡诺氏液 固定, 用碱性品红制片, 观察统计染色体配对构型。

1.3 染色体 C 带及基因组原位杂交 (GISH) 分析

分带参照 Gill 等人^[7] 的方法, 小麦、黑麦染色体的鉴别分别参照 Gill 等人^[7] 和 Lukaszewski 等人^[8] 的标准进行。基因组原位杂交分析参照美国 Kansas State University 网上 (<http://www.ksu.edu/wgrc/Protocols>) 公布的方法。

1.4 生化标记检测

SDS-PAGE 分析参照 颜泽洪 等人^[9] 的方法; APAGE 分析采用 ISTA1986 年颁布的 APAGE (pH3.2) 标准程序电泳分析醇溶蛋白。

1.5 RAPD 分析

黑麦染色体臂 2RS 上的 12 个 RAPD 引物 (OPA-08, OPC-07, OPB-12, OPJ-13, OPJ-18, OPI-09, OPM-01, OPO-10, OPP-06, OPT-12, OPY-07, OPY-20) 被选取, 其 PCR 反应体系和程序参照 Brunell 等人^[10]。扩增产物在含有 0.8% 的琼脂糖凝胶中以 1 × TAE 缓冲液为介质电泳, 凝胶成像系统观察。

1.6 SSR 分析

选用位于小麦 42 条染色体臂上不同位置的 58 对 SSR 引物, 其引物的特征及 SSR 扩增参考 Röder 等人^[11]。扩增产物在含有 0.5% EB 和 2.0% 的琼脂糖凝胶中以 5 V/cm, 1 × TAE 缓冲液为介质电泳。所用引物如下: 引物编号 1~4: Xgwm164, Xgwm550, Xgwm192, Xgwm233; 引物编号 5-35: Xgwm135-1AL, Xgwm232-1DL, Xgwm614-2AS, Xgwm328-2AL, Xgwm356-2AL, Xgwm374-2BS, Xgwm261-2DS, Xgwm157-2DL, Xgwm369-3AS, Xgwm674-3AL, Xgwm547-3BL, Xgwm161-3DS, Xgwm52-3DL, Xgwm3-3DL, Xgwm4-4AS, Xgwm368-4BS, Xgwm107-4BL, Xgwm113-4BL, Xgwm538-4BL, Xgwm251-4BL, Xgwm304-5AS, Xgwm174-5DL, Xgwm494-6AL, Xgwm570-6AL, Xgwm469-6DS, Xgwm332-7AL, Xgwm400-7BS, Xgwm43-7BS, Xgwm611-7BL, Xgwm428-7DL, Xgwm295-7DS; 引物编号 36~58: Xgwm136-1AS, Xgwm11-1BS, Xgwm140-1BL, Xgwm106-1DS, Xgwm337-1DS, Xgwm512-2AS, Xgwm429-

2BS, Xgwm148-2BS, Xgwm526-2BL, Xgwm120-2BL, Xgwm162-3AL, Xgwm389-3BS, Xgwm160-4AL, Xgwm-6-4BL, Xgwm149-4BL, Xgwm194-4DL, Xgwm-609-4DL, Xgwm186-5AL, Xgwm234-5BS, Xgwm408-5BL, Xgwm459-6AS, Xgwm132-6BS, Xgwm219-6BL.

1.7 黑麦亚端部特异序列检测

扩增黑麦亚端部特异序列 pAW161 的引物(5'-TGAGGGCCAGACGGCCCTTTT-3', 5'-TTATC-GCAATTACA ACTCAAATTT-3')及 PCR 反应体系和程序参照 Bourdoncle 等人 [12]。扩增产物在含有 0.5%EB 和 2.0%的琼脂糖凝胶中以 5 V/cm, 1 × TAE 缓冲液为介质电泳。

1.8 RAPD, SSR 及黑麦亚端部特异 DNA 片段的回收、纯化及克隆测序

DNA 片段回收、纯化使用 V-geneDNA 回收试剂盒。回收纯化后的 DNA 片段, 与 pMD18-T 载体连接, 转化并筛选阳性克隆送样测序 [9]。序列分析与比较采用 NCBI 网址(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)的相关软件。

2 结果与分析

2.1 99L2 遗传稳定性

连续几年的观察表明, 99L2 在形态学上完全稳定, 未发现变异的植株出现。在苗期, 99L2 的形态特征与其小麦亲本新中十分类似, 二者很难区分, 但是, 抽穗及以后, 99L2 与其小麦亲本表现出差异, 主要表现为: 99L2 的抽穗期晚; 99L2 植株偏高, 生育期变长, 成熟时小穗的颖壳硬且紧包种子、难脱粒, 穗子变长, 高抗条锈病等倾向于秦岭黑麦的特征。

以前的研究表明, 99L2 在 F₃ 代的细胞学表现稳定 [6], 本研究对其自交后代 F₄ 和 F₅ 进行的细胞学和生化分析结果进一步证明 99L2 的遗传稳定, 表现在: () 与普通小麦一样, 染色体数目 $2n = 42$, 包括 2 对随体染色体; () 花粉母细胞减数分裂观察的所有细胞中, 几乎都以二价体的形式存在; () 99L2 不同单株的谷蛋白和醇溶蛋白带型完全相同。

2.2 99L2 外源遗传物质检测

(1) 黑麦亚端部特异序列扩增及 DNA 片段测序

结果分析: 选用黑麦亚端部特异序列 pAW161 设计的引物 [12], 对 99L2 及其亲本进行扩增。结果表明, 该引物在 99L2 中扩增出与秦岭黑麦相同的一条分子量约为 350 bp 的带纹, 而在新中中没有扩增产物(图 1), 表明 99L2 这条带纹可能是来自秦岭黑麦染色体亚端部的一段 DNA 序列。重新对 99L2 和秦岭黑麦分别 PCR 扩增, 将其产物克隆。分别将 3 个阳性克隆测序。测序结果表明这段序列长 348 bp(图 2), 99L2 的序列(GenBank 登录号: AY952859)与秦岭黑麦的序列(GenBank 登录号: AY952860)完全相同, 证明 99L2 这段 348 bp 长的 DNA 片段来自秦岭黑麦, 即秦岭黑麦的这段重复序列被转移到 99L2 中。

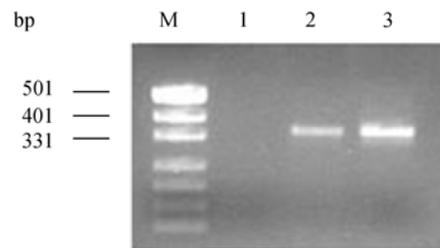


图 1 黑麦亚端部特异序列扩增结果
1 示新中; 2 示 99L2; 3 示秦岭黑麦

在互联网上采用 NCBI 的 BLASTN 程序进行序列相似性搜索, 发现此 348 bp 序列与黑麦亚端部的重复序列家族 pSc200 具有最高的同源性, 与来自黑麦品种 Onohokskayia 的序列 Z54189.1 相同率为 97% (expect = e⁻¹⁶⁹), 与来自黑麦品种 Imperial 的序列 AY522380.1 相同率为 92% (expect = e⁻¹²¹)。

(2) 99L2 的 Giemsa-C 带和基因组原位杂交 (GISH) 分析检测: 对 99L2 进行 Giemsa-C 带鉴定, 可以确定 99L2 没有黑麦端部的特征带纹或其他黑麦特征带; 99L2 的带型与普通小麦相比, 没有明显差别; 随后, 用秦岭黑麦基因组 DNA 作探针, 中国春基因组 DNA 作封阻, 对 99L2 进行基因组原位杂交分析, 结果没有检测到任何杂交信号。

2.3 99L2 及其亲本的生化标记比较

与亲本相比, 99L2 具有秦岭黑麦染色体长臂 1RL 上的高分子量黑麦亚基 *Sec-3* 和 2RS 上的基因

```

TGAGGGCCCA GACGGCCCTT TTTGGGCTCA GAATTTTCCG CGCACGTGAT CCTGTGTGTG
CACGTATGTA AAATCCTCCA GATCGTAAAA ACTAGAAGTC CTATCACCTC AATTCCCCAA
TAGCTTTCCA ACGCCTATGA AAACGACGAA ATCGGTGCTT GTTCTCACTT GCTTTGAGAG
TCTCGATCAA TTCGGACTCT AGGTTGATTT TTGTAATTTT TTTGATCACC GTTTCTTCGC
GAGAGTTGGC CTAACACCCT ATTGTATCCA TACATGGGTG GGGCGCCAAG GACCTGAACA
CCAAAAGTGAT ATGCCGGCTC ATCAAAATTT GAGTTGTAAT TGCGATAA

```

图 2 秦岭黑麦亚端部特异序列

边框表示引物序列；下划粗线表示正向重复序列；其他下划线表示不同的反向重复序列

Sec-2 位点编码的 75 K γ -secalin 亚基^[13](图 3), 这表明黑麦 1RL 和 2RS 上相应的 DNA 片段转入了小麦. 同时, 小麦亲本新中长的 1DL 和 1BL 染色体臂上的 2 个高分子谷蛋白亚基带纹消失了. 醇溶蛋白分析表明, 99L2 与亲本新中长比较发现: 在 α , β 和 ω 区的一些带消失, 而在 α , β , γ 和 ω 区出现了一些新带, 在 γ 区出现位置变化的带, 表明小麦第 1 或第 6 同源群染色体短臂上与醇溶蛋白表达相关的 DNA 序列发生了变化(图 4).

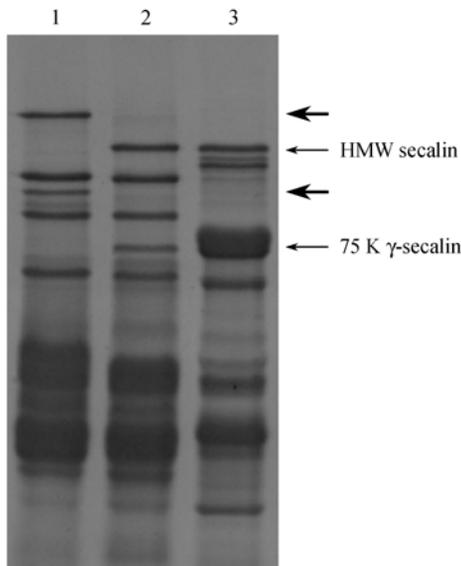


图 3 99L2 及其亲本秦岭黑麦和新中长的谷蛋白电泳图谱 1 示新中长; 2 示 99L2; 3 示秦岭黑麦; 细箭头分别示转入 99L2 的黑麦亚基 HMW secalin, 75 K γ -secalin; 粗箭头示 99L2 中消失的亚基

2.4 99L2 及其亲本的 RAPD 比较

选用 12 个 RAPD 引物^[10], 对 99L2 及其亲本进

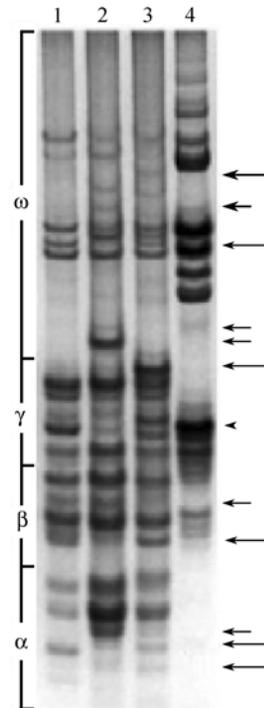


图 4 99L2 及其亲本秦岭黑麦和新中长的醇溶蛋白电泳图谱

1 示中国春; 2 示新中长; 3 示 99L2; 4 示秦岭黑麦; 短箭头示 99L2 消失的带; 长箭头示新带; 无尾箭头示位置变化的带

行扩增. 结果表明, OPB-12, OPC-07, OPI-09, OPJ-13, OPT-12, OPJ-18, OPM-01, OPY-07, OPY-20 等 9 个引物在 99L2 和新中长扩增出了相同的条带, 其中的 7 个引物在 99L2 和秦岭黑麦扩增出完全不同的条带, 2 个引物在 99L2 和秦岭黑麦扩增的条带部分相同, 而这些相同的条带在新中中也存在, 所以, 不能确定 99L2 中的相应条带是来自秦岭黑麦还是新中长. 用

引物 OPO-10, 在材料 99L2 中除了扩增出新中长的带纹, 还扩增出与秦岭黑麦位置类似的一条带纹(图 5, 带纹 1)。但是, 对 99L2 和秦岭黑麦此带纹进行回收、纯化并克隆测序, 结果表明, 99L2 与秦岭黑麦的此带纹在 DNA 组成序列上不相同(分别见 GenBank 登录号 AY954973, AY954974, 二者相同率仅为 51%), 表明 99L2 的这条带不是来自秦岭黑麦。

用引物 OPA-08, OPP-06 在 99L2 中扩增出了新中长和秦岭黑麦均不存在的条带, 用引物 OPO-10 在 500~750 bp 之间扩增出了一条比新中长相应位置分子量更小的带(图 5, 带纹 2), 这些结果表明, 与其小麦亲本相比, 99L2 的 DNA 序列发生过改变。进一步回收、纯化并克隆测序结果表明, OPO-10 在 99L2 中扩增出的新带纹(图 5, 带纹 2)具有 642 bp, 是小麦转座子 Angela-2 长末端重复的一部分(GenBank 登录号: AY954977), 表明 99L2 的这条新带可能来自转座子活动。

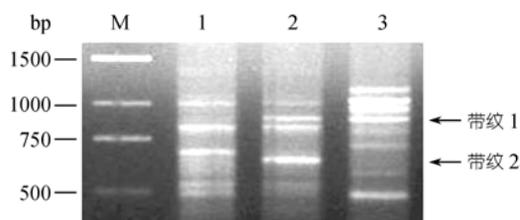


图 5 引物 OPO-10 的 RAPD 扩增结果

1 示新中长; 2 示 99L2; 3 示秦岭黑麦; 带纹 1 示 99L2 与黑麦分子量类似的带纹; 带纹 2 示 99L2 扩增的分子量比新中长较小的 1 条带

2.5 99L2 及其亲本的 SSR 比较

选用位于小麦 21 条不同染色体臂上的 58 对 SSR 引物^[14], 对 99L2 及其亲本进行扩增。除 4 对引物(引物编号 1~4)在 99L2 及其亲本中都没有扩增产物外, 其余的 54 对引物在小麦材料 99L2 和亲本新中长均有扩增产物; 同时, 有 23 对引物在秦岭黑麦无扩增产物。表明来自小麦的 SSR 引物有很大一部分(27/58 = 47%)不能在黑麦中扩增出产物, 即许多小麦的 SSR 引物没有“可转移性”, 不能在黑麦中被应用。

在小麦材料 99L2 和亲本新中长有扩增产物的 54 对引物中, 有 31 对引物(引物编号 5~35, 占 31/54 =

57%) 在 99L2 和新中长扩增出完全相同的条带, 剩下的 23 对引物(引物编号 36~58, 占 43%) 在 99L2 和新中长扩增出了有差异的条带, 表明新中长的相应 SSR 引物揭示的 17 个染色体臂上的 DNA 序列与 99L2 相比, 发生了变化。这种变化表现在: () 亲本新中长的带纹在 99L2 中被丢失; () 在 99L2 扩增出亲本没有的新带; () 99L2 与其亲本新中长的带纹位置表现不同(图 6)。

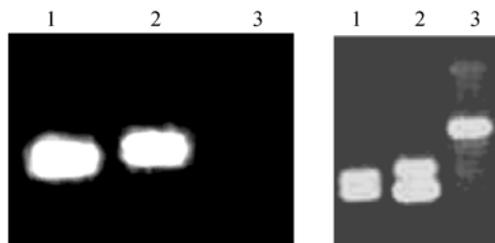


图 6 微卫星引物 *Xgwm337*(左), *Xgwm234*(右)的扩增结果

1 示新中长; 2 示 99L2; 3 示秦岭黑麦

与小麦亲本新中长和黑麦亲本相比, 位于小麦 4B 染色体长臂的引物 *Xgwm6-4BL* 在 99L2 与秦岭黑麦扩增出位置相同的一条带(图 7), 但对这条 SSR 带纹分别进行回收、纯化并克隆测序结果表明, *Xgwm-6* 在 99L2 (AY952872, 197 bp 长) 与秦岭黑麦 (AY954981) 位置相同带纹的 DNA 序列并不相同, 表明这条带并不是来自秦岭黑麦。99L2 的这段 DNA 序列可能是其亲本新中长 SSR 序列 (AY952871, 173 bp 长) 中的 12 个 GA 重复单元增加而产生的新带纹, 因为用 *Xgwm-6* 在新中长扩增出的 173 bp 带纹与 99L2 的 197 bp 带纹仅在 SSR 重复区有 12 个 GA 重复单元不同, 而其他的序列完全一样。

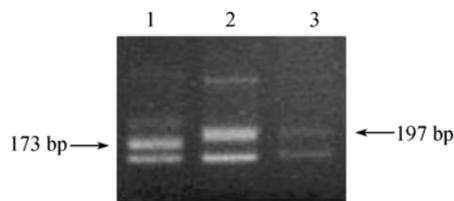


图 7 微卫星引物 *Xgwm6* 的扩增结果

1 示新中长; 2 示 99L2; 3 示秦岭黑麦; 箭头分别示 99L2 与秦岭黑麦位置相同的 197 bp 带纹, 新中长 173 bp 带纹

3 讨论

3.1 99L2 导入了黑麦 DNA 片段

与其亲本相比, 99L2 成熟时小穗的颖壳硬且紧包种子, 难脱粒, 生育期大大偏晚, 植株偏高, 穗子变长, 抗条锈病等形态特征倾向黑麦^[6]. Lukaszewski 等人^[14]认为颖壳硬且紧包种子导致难脱粒性状受位于黑麦染色体臂 2RS 的 Gt 基因控制, 植株偏高也与 2R 有关^[15], 形态学资料表明 99L2 具有 2RS 上的遗传物质. 本研究谷蛋白分析表明黑麦 2R 染色体短臂上的基因 *Sec-2* 位点编码的 75K γ -secalin 亚基转入了 99L2 中. *Sec-2* 在 2RS 上靠近端部的端带, 而 Gt 基因位于近端部与 *Sec-2* 的遗传距离大约在 10 cM^[13,14]. 但是, Giemsa-C 带分析没有检测到任何黑麦染色体端部的特征带, 表明 2RS 端部的特征带不存在. 奇怪的是, GISH 分析黑麦遗传物质时, 也未能检测到任何黑麦染色体片段. 在 Lukaszewski 等人^[14]对 2R 的研究中甚至发现, 用 C 带检测到黑麦的特征带, 用分子标记也发现黑麦的遗传物质, 但用 GISH 却不能检测到黑麦遗传物质, 这似乎不能用外源染色体片段太小来解释. 大量研究表明, 在黑麦的 2R 染色体表现出十分特殊的行为, 例如: () 即使在 Ph1 缺失的情况下, 2RS 几乎不与小麦的染色体发生配对^[16]; () 2RS 端部异染色质区易发生缺失^[17]; () 2R 染色体最容易发生 DNA 序列重排^[18]; () 最容易发生错分裂^[8]等. 但还没有证据表明这种易变化等特殊染色体行为与 GISH 未能检测到 2RS 遗传物质有关.

与亲本相比, 99L2 具有秦岭黑麦 1RL 上的高分子量黑麦亚基 *Sec-3*^[13], 表明黑麦 1RL 上相应的遗传物质也转入了小麦. 此外, 99L2 也导入了秦岭黑麦染色体亚端部重复序列, 但是本研究还不能判定导入了黑麦的哪些(个)染色体重复序列.

3.2 99L2 导入黑麦 DNA 片段及早代稳定的机制

至少 2 个不同黑麦染色体上的遗传物质同时导入小麦新中长, 并在早代获得稳定材料 99L2, 这难以用传统的减数染色体配对、交换产生易位的远缘杂交转移外源遗传物质的遗传重组机制来得到合理解释, 因为: () 根据小麦 Giemsa-C 带带型^[7]和 SSR 遗传图谱^[11], 本研究结果未能证明由于存在小麦-黑麦

的臂间(或大片段)易位而导致的 99L2 小麦染色体臂(或大片段)缺失; () 新中长与秦岭黑麦的部分同源染色体配对水平很低, 几乎没有环状二价体配对构型(资料未提供), 因此在短世代内同时发生两个以上位点的纯合小片段易位是很难的. 前人的研究发现, 在玉米^[5,19]、水稻^[20]等与外源染色体不配对的更远缘杂交也能转入外源遗传物质并获得遗传稳定的材料, 例如在玉米与磨擦禾的杂交后代发现有的后代的染色体完全恢复为玉米的($2n = 20$), 但有些性状来自磨擦禾的^[19]. 此外, 利用: () 染色体消除型远缘杂交^[4,5,21-23]; () 不对称体细胞杂交^[24-26]; () 杀配子基因导致染色体不稳定^[27]; () 花药培养^[28,29]; () 单体附加导致染色体不稳定^[15,28,29]; () 花粉管通道技术等 DNA 直接导入法等导入外源 DNA 片段, 也很难用传统的染色体配对-交换易位的遗传重组理论来解释. 周光宇等人^[20]提出在染色体水平以下部分 DNA 片段杂交的假说来解释导入外源 DNA 的另类机制. 与远缘杂交不同的是, 在水稻品系间杂交也获得了具有双亲 DNA、表现出偏父或偏母现象的早代稳定株系^[2,3]. Wang 等人^[3]推测其机理是由于体细胞联会产生染色体重组并产生纯合细胞导致杂合性丢失.

小麦-黑麦远缘杂交与其他远缘杂交相比, 具有一些不同的特别之处. 例如, 亢增军等人^[30]发现中国小麦地方品种辉县红与中国栽培黑麦荆州黑麦杂种 F_1 有较高的自交结实率, 其自交结实的 13 个 F_2 植株的染色体变幅为 42~51 条; 罗明诚等人^[31]也发现中国小麦地方品种小鱼儿麦与栽培黑麦冬黑麦杂种 F_1 有较高的自交结实率, 其自交结实的 4 个 F_2 植株的染色体变幅为 40~44 条, 同时表明细胞融合和细胞并合可能与之有关. 这些研究表明了在小麦-黑麦远缘杂交自交后代获得具有 42 条染色体的遗传稳定小麦的可能性. 事实上, 目前在全世界小麦育种中被广泛应用并取得巨大成功的小麦-黑麦 1BL/1RS 易位系来自小麦品系 Riebesel 47-51, 而此品系就是通过小麦材料 Lembkes Obotriten 与栽培黑麦 Petkus Roggen 杂交, 然后从其自交后代中创制出来的^[32].

尽管存在上述现象, 但在小麦-黑麦远缘杂交自交的早世代就稳定, 并导入黑麦 DNA 获得小麦材料 99L2 的机制仍然不清楚. 99L2 的产生过程可能包括

几步: 首先是小麦-黑麦杂交获得具有染色体组的 ABDR ($2n = 28$) F_1 单倍体. 然后, 秦岭黑麦 DNA 片段插入小麦亲本新中长 DNA 中, 秦岭黑麦其他的 DNA 被消除, 得到具有新中长 ABD 染色体组和秦岭黑麦 DNA 片段的单倍体. 最后, 通过染色体加倍获得具有 AABBDD 染色体组和秦岭黑麦 DNA 片段的小麦 99L2. 从 99L2 的发生过程推测, 可能存在一种特殊的染色体组加倍方式, 导致遗传组成上迅速纯合稳定, 这样的纯合材料在遗传研究, 特别是在揭示细微差异的分子水平上的研究有特殊的利用价值.

3.3 99L2 导入黑麦 DNA 的同时, 小麦自身 DNA 序列发生了变化

在植物界, 多倍体植物非常普遍. 具有 A, B, D 三个部分同源染色体组的普通小麦是异源多倍体物种的一个典型代表, 它是大约在 8500 年前以四倍体小麦为母本与节节麦为父本天然杂交, 然后通过染色体加倍形成的. 通过模拟普通小麦的起源, 发现从具 AABB 染色体组的四倍体小麦注入 DD 染色体组的节节麦形成六倍体小麦的早期阶段, 不同类型的 DNA 序列发生了变化^[33,34], 这可能有利于实现新合成物种快速进化. DNA 序列在不同染色体组之间迅速变化会造成不同染色体组间的进一步快速分化, 这有利于染色体的二倍体化行为, 即在减数分裂中期染色体配对只发生在来自同染色体组的同源染色体之间, 来自不同染色体组之间的部分同源染色体间不发生配对, 这利于同源染色体间的准确配对和分离, 从而保证染色体正常行为. 同时, 新合成异源多倍体物种中, 在基因表达水平上亦发生了迅速变化^[33-36], 这可能有利于基因表达的遗传二倍化, 并可使遗传行为更加协调. 这些变化在其他异源多倍体植物中也是一个比较普遍的现象.

本研究对具有 AABBDD 染色体组的普通小麦与具有 R 染色体组的黑麦远缘杂交早代稳定材料进行的研究发现, 即使不是整个 R 染色体组, 而是外源 DNA 部分片段注入小麦染色体组过程中, 也可能导致小麦自身 DNA 序列发生变化. 99L2 与其小麦亲本新中长相比, 生物化学和 DNA 分子证据都表明了 99L2 小麦 DNA 序列发生了变化: () SSR 分析发现, 位于染

色体臂上不同位置的大约 43% 的引物检测到了变化, 与 SSR 遗传图谱^[11] 比较, 这种变化可以在染色体的端部、中部、近着丝点处等任何位置. 这种变化表现在: 一是小麦亲本扩增的带纹在 99L2 中被丢失(带纹数量减少), 或在 99L2 扩增出小麦亲本没有的新带(带纹数量增加). 这种现象也出现在小麦与黑麦杂交合成的异源多倍体——小黑麦中^[37], 以及在四倍体小麦与节节麦人工合成的异源六倍体小麦中^[38], 这种变化可能与 SSR 引物序列的改变有关; 二是带纹数量不变, 但 99L2 与其亲本新中长的带纹位置表现不同, 这种变化是由 SSR 重复区的重复单元变异造成, 可能与 DNA replication slippage 有关(未发表资料); () RAPD 的变化可能部分与转座子活动有关; (iii) 高分子量谷蛋白亚基带纹消失及醇溶蛋白带纹的变化, 可能与远缘杂交导致相应蛋白表达相关序列发生变化所致. 研究表明, 谷蛋白亚基的基因间隔区主要由转座子构成^[39-41], 易导致 DNA 序列发生变化, 一些醇溶蛋白位点区域容易发生 DNA 高频重组^[42]. 小麦自身 DNA 序列的这种变化也可能与外源 DNA 片段注入后的遗传协调和遗传稳定性有关.

致谢 感谢四川农业大学小麦研究所细胞室舒焕麟副研究员对 Giemsa-C 带和原位杂交技术的建议和帮助.

参 考 文 献

- Hu H, Xi Z Y, Wang X Z, et al. Chromosome engineering in the *Triticeae* using pollen-derived plants. In: Zhuang Q S, Xin Z Y, eds. Proc 8th Int Wheat Genet Symp. Beijing: Chinese Agricultural Sciencetech Press, 1993. 577~580
- 杨瑶君, 汪旭东, 吴先军, 等. 一种新型水稻的研究进展(综述). 作物学报, 2003, 29(5): 719~724
- Wang R R C, Li X M, Chatterton N J. Loss of heterozygosity and accelerated genotype fixation in rice hybrids. *Genome*, 1999, 42: 789~796[DOI]
- 李大玮, 欧阳平, 邱纪文, 等. 染色体消失法在小麦育种中的应用. 农业生物技术学报, 2000, 8(1): 17~21
- 孙敬三, 陈纯贤, 路铁刚. 禾本科植物染色体消除型远缘杂交的研究进展. 植物学通报, 1998, 15(1): 1~7
- 刘登才, 郑有良, 魏育明, 等. 将秦岭黑麦遗传物质导入普通小麦的研究. 四川农业大学学报, 2002, 20(2): 75~77
- Gill B S, Friebe B, Endo T R. Standard karyotype and nomenclature system for description of chromosome bands and structural aberration in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Genome*, 1991, 34: 830~839

- 8 Lukaszewski A J, Gustafson J P. Translocations and modifications of chromosomes in Triticale \times wheat hybrids. *Theor Appl Genet*, 1983, 64: 239~248[DOI]
- 9 颜泽洪, 万永芳, 刘坤凡, 等. 一种新型高分子量谷蛋白亚基的鉴定及其与同源蛋白氨基酸序列的差异. *科学通报*, 2001, 46(17): 1454~1459[摘要] [PDF]
- 10 Brunell M S, Lukaszewski A J, Whitkus R. Development of arm specific RAPD markers for rye chromosome 2R in wheat. *Crop Sci*, 1999, 39: 1702~1706
- 11 Röder M S, Korzun V, Wendehake K, et al. A microsatellite map of wheat. *Genetics*, 1998, 149: 2007~2023
- 12 Bourdoncle W, Ohm H W. Fusarium head blight-resistance wheat line 'Bizel' does not contain rye chromatin. *Plant Breed*, 2003, 122: 281~282[DOI]
- 13 Shewry P R, Bradberry D, Franklin J, et al. The chromosomal locations and linkage relationships of the structural genes for the prolamins storage proteins (secalins) of rye. *Theor Appl Genet*, 1984, 69: 63~69
- 14 Lukaszewski A J, Rybka K, Korzun V, et al. Genetic and physical mapping of homoeologous recombination points involving wheat chromosome 2B and rye chromosome 2R. *Genome*, 2004, 47: 36~45[DOI]
- 15 任正隆, 张怀琼. 小麦-黑麦染色体小片段易位的诱导. *中国科学, C 辑*, 1997, 27(3): 258~263
- 16 Naranjo T, Fernández-Rueda P. Homoeology of rye chromosome arms to wheat. *Theor Appl Genet*, 1991, 82: 577~586
- 17 May C E, Appels R. Rye chromosome translocations in hexaploid wheat: A re-evaluation of the loss of heterochromatin from rye chromosomes. *Theor Appl Genet*, 1980, 56: 17~23
- 18 Alkhimova A G, Heslop-Harrison J S, Shchapova A I, et al. Rye chromosome variability in wheat-rye addition and substitution lines. *Chromosome Res*, 1999, 7: 205~212[DOI]
- 19 Harlan J R, Dewet J M J. Pathways of genetic transfer from *Trip-sacum* to *Zea mays* Maize. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1977, 74(8): 3494~3497
- 20 周光宇, 龚蓁蓁, 王自芬. 远缘杂交的分子基础——DNA 片段杂交假设的一个论证. *遗传学报*, 1979, 6(4): 405~413
- 21 陈纯贤, 朱立煌, 孙敬三. 玉米特异 DNA 通过有性杂交导入小麦 DH 后代的分子证据. *中国科学, C 辑*, 1997, 27(5): 432~437
- 22 毛 龙, 周 清, 王显平, 等. 高秆野生稻与栽培稻杂交后代的 RFLP 分析. *植物学报*, 1994, 36(1): 11~18
- 23 邱纪文, 金德敏, 李传友, 等. 通过远缘杂交将鸭茅状磨擦禾 DNA 片段导入普通小麦基因组的分子证据. *科学通报*, 1999, 44(20): 2162~2165
- 24 王 晶, 向凤宁, 夏光敏, 等. 利用不对称体细胞杂交向小麦转移高冰草染色体小片段. *中国科学, C 辑*, 2004, 34(2): 113~120[摘要] [PDF]
- 25 周爱芬, 夏光敏, 陈惠民, 等. 普通小麦与簇毛麦对称及不对称体细胞杂交的比较. *中国科学, C 辑*, 2001, 31(4): 298~305 [摘要] [PDF]
- 26 向凤宁, 夏光敏, 陈惠民. 小麦与燕麦不对称体细胞的研究. *中国科学, C 辑*, 2002, 32(4): 299~325[摘要] [PDF]
- 27 Shi F, Endo T R. Genetic induction of structural changes in barley chromosomes added to common wheat by a gametocidal chromosome derived from *Aegilops cylindrica*. *Genes Genet Syst*, 1999, 74: 49~54[DOI]
- 28 张文俊, Snape J W. 分子标记定位黑麦 6R 染色体上的抗小麦白粉病基因. *科学通报*, 1995, 40(24): 2274~2276
- 29 胡 含, 张相岐, 张文俊, 等. 花粉小麦染色体工程. *科学通报*, 1999, 44(1): 6~11
- 30 亓增军, 庄丽芳, 刘大钧, 等. 将荆州黑麦种质导入栽培小麦的研究(I). *南京农业大学学报*, 2000, 23(4): 1~4
- 31 罗明诚, 颜 济, 杨俊良. 小麦-黑麦杂种F₁花粉细胞中的细胞融合现象及非整倍体的产生. *四川农业大学学报*, 1992, 10(4): 612~622
- 32 Rabinovich S V. Importance of wheat-rye translocation for breeding modern cultivars of *Triticum aestivum* L. *Euphytica*, 1998, 100: 323~340[DOI]
- 33 Liu B, Wendel J F. Non-Mendelian phenomena in allopolyploid genome evolution. *Curr Genomics*, 2002, 3: 489~506[DOI]
- 34 Feldman M, Liu B, Segal G, et al. Rapid elimination of low-copy DNA sequences in polyploid wheat: a possible mechanism for differentiation of homoeologous chromosomes. *Genetics*, 1997, 147: 1381~1387
- 35 Kashkush K, Feldman M, Levy A A. Gene loss, silencing and activation in a newly synthesized wheat allotetraploid. *Genetics*, 2002, 160: 1651~1659
- 36 He P, Friebe B R, Gill B S, et al. Allopolyploid alters gene expression in the highly stable hexaploid wheat. *Plant Mol Biol*, 2003, 52: 401~414[DOI]
- 37 Kulevich C, Baenziger P S, Dweikat I. Transferability of SSR markers among wheat, rye, and triticale. *Theor Appl Genet*, 2004, 108: 1147~1150[DOI]
- 38 张连全, 刘登才, 颜泽洪, 等. 在六倍体小麦的异源多倍化早期卫星侧翼序列迅速发生了改变. *中国科学, C 辑*, 2004, 34(2): 121~128[摘要] [PDF]
- 39 Wicker T, Yahiaoui N, Guyot R, et al. Rapid genome divergence at orthologous low molecular weight glutenin loci of the A and A^m genomes of wheat. *Plant Cell*, 2003, 15: 1186~1197[DOI]
- 40 Kong X Y, Gu Y Q, You F M, et al. Dynamics of the evolution of orthologous and paralogous portions of a complex locus region in two genomes of allopolyploid wheat. *Plant Mol Bio*, 2004, 54(1): 55~69[DOI]
- 41 Gu Y Q, Coleman-Derr D, Kong X Y, et al. Rapid genome evolution revealed by comparative sequence analysis of orthologous regions from four Triticeae genomes. *Plant Physiol*, 2004, 135: 459~470[DOI]
- 42 Spielmeier W, Moullet O, Laroche A, et al. Highly recombinogenic regions at seed storage protein loci on chromosome 1DS of *Aegilops tauschii*, the D-genome donor of wheat. *Genetics*, 2000, 155: 361~367