

异源细胞质小麦-中间偃麦草易位系的培育 与荧光原位杂交鉴定

牟金叶^① 李集临^② 王献平^① 景建康^① 张相岐^{①*}

(^①中国科学院遗传研究所, 北京 100101; ^②哈尔滨师范大学生物系, 哈尔滨 150080.)

*联系人, Email: xqzhang@igtp.ac.cn)

摘要 利用提莫菲维(*T.timopheevii*)细胞质雄性不育的小麦-中间偃麦草部分双二倍体为母本与普通小麦杂交后再与父本普通小麦连续回交和自交, 在后代中选出两个稳定的小麦类型 H96269-2 和 H96278, 染色体数目均为 $2n = 42$ 。经接种鉴定, 两个稳定类型均对条锈病有较好的抗性。以中间偃麦草基因组 DNA 为探针的荧光原位杂交结果表明, 两个类型都是小麦-中间偃麦草的小片段易位系, 易位的中间偃麦草染色体片段位于一对小麦染色体的短臂端部。遗传分析表明, 抗条锈基因可能位于中间偃麦草染色体的易位片段上。

关键词 小麦-中间偃麦草易位系 胞质杂种 基因组荧光原位杂交 条锈病

中间偃麦草 (*Agropyron intermedium*) 是小麦的野生近缘种, 具有抗锈病、黄矮病等多种病害, 高蛋白以及耐旱、耐寒、耐贫瘠等优异性状, 而且易于与小麦杂交, 是改良小麦不可多得的优良基因资源, 已被广泛应用于小麦育种和遗传学研究。30 年代以来, 先后培育出小麦-中间偃麦草部分双二倍体^[1,2]、异附加系^[3]、代换系^[4]和易位系^[5]等中间材料及小麦品种^[2]。

基因组原位杂交 (GISH) 是在染色体上直接检测目标 DNA 的存在与分布的一种较理想的技术。1985 年, Rayburn 等人^[6]首次将非放射性标记技术应用于植物染色体的原位杂交, 在小黑麦中检测到了黑麦的 DNA 重复序列。1989 年, Le 等人^[7]用生物素标记的黑麦基因组 DNA 作探针, 鉴定了小黑麦杂种及其易位系中的黑麦染色体。近年来, 已有一些利用基因组荧光原位杂交技术分析小麦-中间偃麦草杂种遗传组成的报道^[8~12], 但迄今尚未见到用基因组原位杂交技术分析胞质杂种小偃麦易位系的报道。本文报道了两个提莫菲维(*T.timopheevii*)细胞质的小麦-中间偃麦草小片段易位系的创制和基因组荧光原位杂交的分析结果。

1 材料与方法

(i) 材料。提莫菲维细胞质的雄性不育小麦-中间偃麦草部分双二倍体 G 中 3 ($2n = 8x = 56$, 由日本的常胁恒一郎教授惠赠), 普通小麦品种恢 75 以及中间偃麦草和普通小麦品种中国春。

(ii) 易位系的培育。用 G 中 3 与普通小麦品种恢 75 杂交, 杂种 F_1 与小麦亲本连续回交和自交, 选出稳定的小麦类型用于抗病鉴定和染色体组成分析。

(iii) 抗条锈病鉴定。对两个稳定的小麦类型 H96269-2 和 H96278 分别进行了苗期和成株期抗条锈病鉴定。苗期鉴定在温室中进行, 于幼苗 2 叶期用按株涂抹方法接种。成株鉴定在田间进行, 在拔节前用喷雾法接种诱发。诱发品种为高感品种铭贤 169。于发病盛期记载反应型。反应型采用 6 级分类法, 0 级为免疫, 0₁ 级为近免疫, 1 级为高抗, 2 级为中抗, 3 级为中感, 4 级为高感。抗病鉴定在中国农业科学院植物保护研究所由吴立人研究员协助完

成.

(iv) 染色体组成的原位杂交分析. (1) 染色体制片. 小麦类型的种子在 25℃下萌发, 待根长至 1~2 cm 时取下根尖在冰水中预处理 24 h, 卡诺固定液 (酒精:醋酸 = 3:1) 固定 1~2 d, 用无离子水冲洗, 45%醋酸下压片, 液氮冷冻揭片, 气干, -20℃保存备用. (2) 基因组 DNA 提取和标记. 取中间偃麦草和普通小麦中国春的新鲜幼嫩叶片, 用 CTAB 方法分别提取基因组 DNA^[13]. 中间偃麦草 DNA 用 Bio-16-dUTP 通过缺刻平移法(Nick-translation)进行标记, 标记的探针用 1×TE 缓冲液稀释成 20 ng·μL⁻¹, -20℃冰箱中储存备用. (3) 原位杂交. 参考文献 [14]的方法进行,略有改动. 原位杂交前, 染色体制片在 60℃下烘干 2~3 h; 每张制片加 20 μL 杂交液, 内含探针 DNA 20 ng, 封阻 DNA 3~4 μg; 在 88℃下共变性 10 min; 37℃杂交过夜后的制片依次用 2×SSC-30%甲酰胺-2×SSC-2×SSC-1×PBS 在 37℃下分别洗脱 5 min. (4) 信号放大. 洗脱后的制片上加 50 μL anti-biotin (10 μg·mL⁻¹), 加盖玻片, 37℃下保温 60 min. 1×PBS (37℃) 漂洗 3×5 min, 沥干. 每张制片加 50 μL anti-mouse-FITC (10 μg·mL⁻¹), 加盖玻片, 37℃保温 60 min. 1×PBS 37℃洗 3×5 min, 沥干. 用 3 μg·mL⁻¹ 的 PI(prodidum iodide) 在室温下避光复染 5 min, 蒸馏水快速冲洗后用抗褪色剂 VECTASHIELD H-1000 封片. (5) 观察与照相. 杂交信号的观察在荧光显微镜下进行. 选取信号清晰、染色体分散较好的细胞用 Confocal 激光共聚焦显微镜扫描并照相.

2 结果

(i) 易位系的选育. 在提莫非维细胞质的雄性不育八倍体小偃麦 G 中 3 与普通小麦品种恢 75 杂种的连续回交再自交的后代中选择到两个形态性状稳定、可育的小麦类型 H96269-2 和 H96278. 这两个株系均带有一些中间偃麦草的性状, 如穗节较长, 颖壳较硬, 生育期较长等.

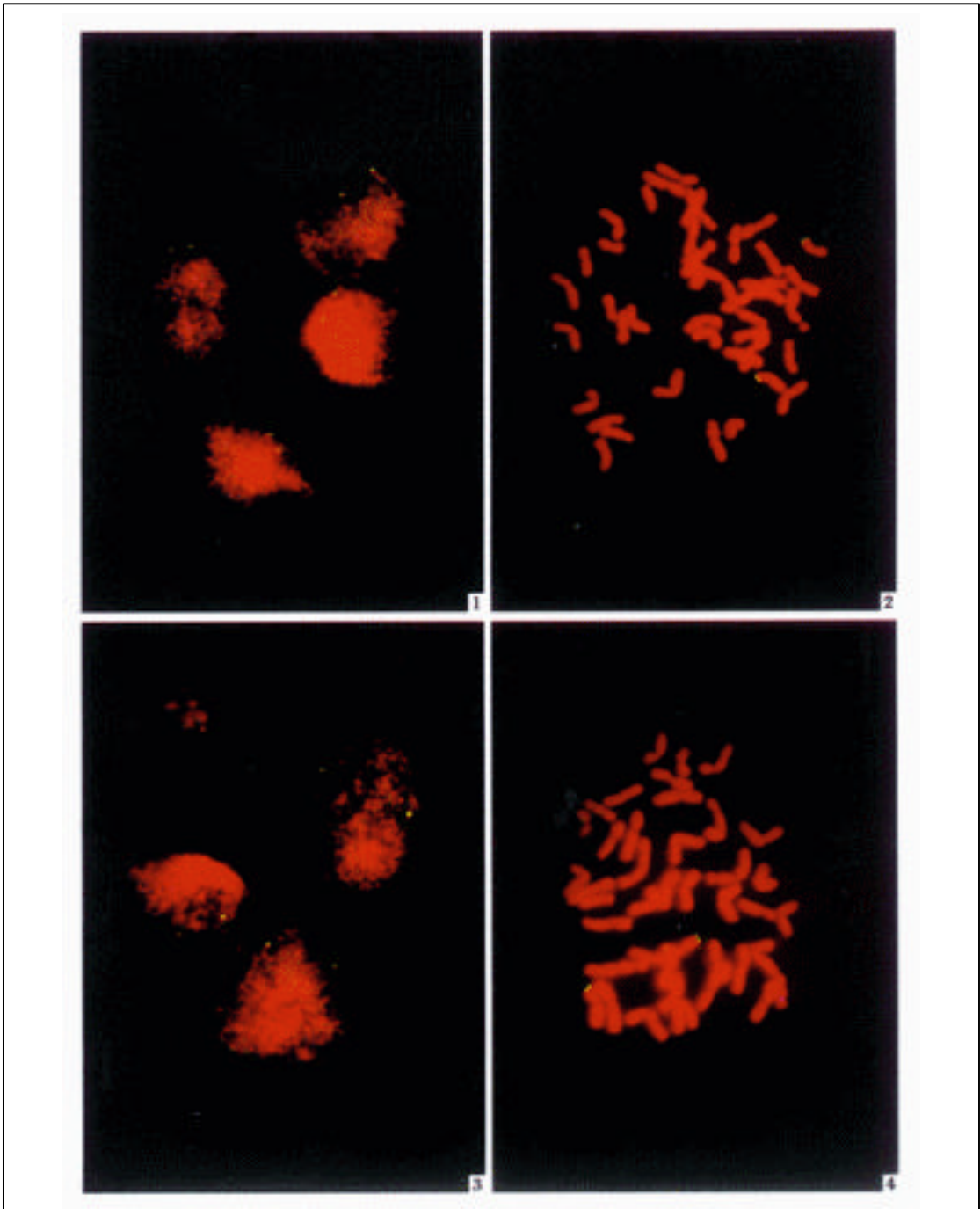
(ii) 抗条锈病鉴定结果. 苗期鉴定接种优势小种条中 29, 31 和从 31 号分离的毒性更强的 Hy-3 等 3 个小种. 鉴定结果 (表 1) 显示, H96269-2 和 H96278 对这 3 个小种抗性极高, 均达到免疫或近免疫水平. 同时亲本小麦品种恢 75 对 3 个小种均表现高感. 成株期接种条中 29 和 31 两个小种, 结果除 H269-2 对 29 号小种中感外, 其他均表现高抗到免疫. 并且, 各个菌种对这两个材料的感染严重度都比较低 (5%~40%), 同时亲本小麦品种恢 75 对 29 和 31 号小种均表现中度感染. 为确定抗性来源, 对这两个材料的 F₂ 分离群体进行了单株鉴定, 结果两个群体的抗性均呈单基因 Mendel 式分离, 由此推测, 抗性性状可能来自于中间偃麦草的核染色体.

表 1 小偃麦易位系苗期抗条锈病鉴定结果 (1998 年)

材料	条锈小种				
	苗期			成株期	
	29	31	Hy-3	29	31
H96269-2	0	0	0	3 ⁻	0;
H96278	0	0	0~0;	0	0;~1
恢 75	4	4	4	3 ⁻	3 ⁻

(iii) 原位杂交结果. 在相差显微镜下观察, H96269-2 和 H96278 的体细胞染色体数均为 2n = 42, 未见明显的形态变异. 用生物素标记的中间偃麦草基因组 DNA 作探针进行的分子

原位杂交结果显示: H96269-2 的每个间期细胞核中(图版 I -1)有两个点状黄绿色杂交信号, 表



图版 I 小麦-中间偃麦草易位系的基因组原位杂交

1——H96269-2 间期细胞核的原位杂交; 2——H96269-2 中期染色体的原位杂交; 3——H96278 间期细胞核的原位杂交; 4——H96278 中期染色体的原位杂交

明其含有一对来自中间偃麦草的染色质片段。在有丝分裂中期细胞核中(图版 I-2)可以清晰地看到一对小麦-中间偃麦草易位染色体,中间偃麦草染色体易位片段位于小麦染色体短臂的端部。经显微测量,易位片段的长度约为短臂长的 $1/10$ 。H96278 的间期细胞中同样可以看到类似图版 I-1 的一对点状杂交信号(图版 I-3),中期染色体的原位杂交图象也清楚地看到有一对小麦-中间偃麦草的小片段端部易位染色体(图版 I-4)。易位片段的相对长度约为染色体短臂的 $1/30$ 。在细胞分散较好的区域,间期核的检测率几乎为 100%,中期染色体在不同制片中的检测率在 70%~90%之间,平均为 76.4%。易位涉及的小麦和中间偃麦草染色体的同源群归属尚不清楚,需用其他技术进一步识别。

3 讨论

近年来, GISH 技术由于其不需要分离特异性探针,并具有快速、直观等优点而被广泛应用于分子细胞遗传学研究,实验技术已基本成熟。但对于亲缘关系较近的小片段易位系鉴定仍有一定难度。我们认为,良好的染色体制片和合适的封阻 DNA 浓度是杂交成功与否的两个关键问题。

要得到质量较高的制片,根尖良好的生长状态、制片过程中仔细分离根尖分生组织、根尖固定保存的时间不宜过长等都是很重要的。本实验采用固定根尖直接压片法制作染色体标本,得到了较理想的染色体制片和原位杂交结果。封阻 DNA 与探针含量的比例是基因组原位杂交成功与否的另一个关键问题。一般来说,杂种的两个亲本基因组间亲缘关系越近,所需封阻 DNA 的比例越高,但过高浓度的封阻 DNA 会影响信号的强度。在本实验中,经过比较筛选,确定封阻 DNA 与探针的比例在 150~200:1 范围内比较合适,既得到了清晰的杂交信号,又没有非特异性杂交(图版 I-1)。

小片段易位系是最有育种价值的变异类型。关于麦类易位系的产生途径,可分为自发易位和人工诱导两类。自发易位主要是利用各种类型的远缘杂种(包括附加系、代换系及双二倍体)在与小麦杂交和回交过程中产生易位。关于诱导易位已建立了多种方法,主要有辐射、*Ph* 基因、杀配子基因、组织或花药体外培养等。但频率都很低(一般在 4%以下),小片段易位的频率更低。本实验利用提莫菲维细胞质的八倍体小偃麦与恢复系小麦恢 75 杂交,在后代中的 6 个稳定类型中检出了两个小片段易位系,其频率是非常高的。可能提莫菲维细胞质对于诱导异源染色体间的易位是有利的。但由于类型较少,难下结论,该问题值得进一步研究。另外,原位杂交时,曾用正常的八倍体小偃麦中 3 为正对照,结果显示信号强度和检出率与被检材料相似,说明提莫菲维细胞质对原位杂交结果没有特殊影响。但异源细胞质中是否含有其他有利基因尚需进一步研究。

本文报道了两个提莫菲维细胞质的小麦-中间偃麦草小片段易位系。由图版 I-2 和 I-4 可见两者都是端部易位。马有志等人^[9]和张增艳等人^[12]也曾获得小麦-中间偃麦草的端部易位系。为什么易位容易发生在染色体端部目前尚不清楚。推测可能和端部易位只需要一次交换或两次断裂和一次重融,而中间插入易位则需要 2 次交换或 4 次断裂和 2 次重融有关。深入研究这一现象对于探讨染色体结构及小麦染色体与异源染色体之间的易位机制可能会有所帮助。

将小麦野生近缘种的优良基因导入小麦,培育出附加系、代换系或易位系是利用野生资源改良小麦的重要步骤,而易位系在育种实践中最有应用价值,也是进行基因的分子标记和

分离的好材料。本文研究的两个胞质杂种小片段易位系对小麦条锈病有良好的抗性,作者已用 RAPD 方法筛选到一个来自中间偃麦草易位片段的分子标记 OPG02₅₅₀(结果另文发表)。一方面证明了原位杂交结果的可靠性,同时也为克隆中间偃麦草的抗锈病基因奠定了基础。

致谢 胡含研究员审阅了本文,特致谢意。本工作为国家科技部“九五”攻关(批准号:96-014-01-06-02)和中国科学院“九五”特别支持(批准号:KZ95T-02-02-09)资助项目。

参 考 文 献

- 1 齐津 H B, 著. 多年生小麦. 李特特, 刘毓湘, 黄慕玉, 等, 译. 北京: 农业出版社, 1982
- 2 孙善澄. 小偃麦新品种与中间类型的选育途径. 程序和方法. 作物学报, 1981, 7 (1): 51~58
- 3 何孟元, 徐宗尧, 邹明谦, 等. 两套小冰麦异附加系的建立. 中国科学, B 辑, 1988, (11): 1161~1168
- 4 艾三江·阿布都拉, 文玉香, 唐顺学, 等. 一个多抗小麦-中间偃麦草新种质的选育和细胞分子生物学鉴定. 遗传学报, 1997, 24(5): 441~446
- 5 辛志勇, 徐惠君, 陈 孝, 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): 36~42
- 6 Rayburn A L, Gill B S. Use of biotin labeled probes to map specific DNA sequence on wheat chromosomes. J Heredity, 1985, 76: 78~81
- 7 Le H T, Armstrong K C, Miki B. Detection of rye DNA in wheat-rye hybrids and wheat translocation stocks using total genomic DNA as a probe. Plant Mol Biol Rep, 1989, 7:150~158
- 8 Friebe B, Mukai Y, Gill B S, et al. C-banding and *in-situ* hybridization analyses of *Agropyron intermedium*, a partial wheat × *Ag. intermedium* amphiploid, and six derived chromosome addition lines. Theor Appl Genet, 1992, 84: 899~905
- 9 马有志, 富田因则, 田中升, 等. 应用分子原位杂交技术解析小麦-天兰冰草部分双二倍体-远中 2 号的染色体构成. 遗传学报, 1997, 24 (4): 344~349
- 10 马有志, 徐琼芳, 辛志勇, 等. 小麦-中间偃麦草部分双二倍体“中 5”的外源染色体的鉴定. 作物学报, 1998, 24 (2): 129~132
- 11 韩方普, 张相岐, 卜秀玲, 等. 应用荧光原位杂交技术研究小冰麦异附加系 TAI-27 的变异. 中国科学, C 辑, 1998, 28(4): 362 ~ 365
- 12 张增艳, 马有志, 辛志勇, 等. 应用原位杂交技术鉴定抗黄矮病小麦新种质. 中国农业科学, 1998, 31(3): 1~4
- 13 顾红雅, 瞿礼嘉, 陈章良. 植物分子生物学——实验手册. 北京: 高等教育出版社, 1998. 4 ~ 6
- 14 Gustafson J P, Dille J E. The chromosomal location of *Oryza sativa* recombination linkage groups. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89: 8646~8650

(1999-10-27 收稿)