

植物异源附加系研究进展

王 峰¹, 丁云花¹, 李成琼², 简元才¹

(1.北京市农林科学院蔬菜研究中心, 100097; 2.西南大学蔬菜研究所, 400715)

摘要: 异源附加系是指一个或一对异源染色体附加到一个物种染色体组上的品系, 是遗传研究和染色体工程育种的重要基础材料。根据所附加外源染色体的数目, 可将异附加系分为单体、双体和多重异附加系, 其中单体、双体异附加系的研究和利用价值较高。阐述了异源附加系的特性、培育及鉴定方法, 结合生物学发展进程, 指出了其应用和发展前景。

关键词: 植物杂交; 异源附加系; 染色体; 基因组

异源附加系是在物种原染色体组中附加一条或一对异源种属染色体的种质材料。附加一条的为单体异源附加系 (MAAL), 附加一对的为二体异源附加系 (DAAL)。此外, 还有附加了两条不同外源染色体的双单体附加系; 附加了两对同源外源染色体的双二体附加系; 附加了两对以上同源外源染色体的多重附加系; 以及附加染色体为具端着丝粒染色体的各种不同的端体附加系等。其中最主要的是单体和二体异附加系。单体异附加系遗传稳定性较差。二体异附加系由于附加的一对同源的外源染色体在减数分裂中可以自行配对, 所以较为稳定^[1]。Leighty 和 Taylor (1924) 最早在小麦和黑麦的远源杂交后代中发现了穗轴有毛的小麦-黑麦 5R 异附加系^[2]。到了 20 世纪 40 年代, 人们才开始系统地研究异附加系, 先由小麦族开始, 逐渐扩展到棉花、水稻、油菜、番茄、白菜、甘蓝、黄瓜等有研究及利用价值的作物。

1 异源附加系的特性

减数分裂是有性生殖个体形成生命体的主要过

程, 对配子体和孢子体的相互转变起着关键作用。在此过程中同源染色体间发生配对、交换、遗传重组, 使配子的遗传多样化, 增加了后代的适应性。异源附加系用于植物遗传改良的潜能取决于两个亲本物种间的遗传距离及供、受体染色体重组的能力。根据亲缘关系的远近, 在减数分裂中, 异源附加系的外源染色体与受体染色体可联合构成部分二价体或三价体, 甚至四价体。

单体异附加系因为附加的一条外源染色体终变期一般不能配对, 后期容易落后丢失, 也可能发生着丝粒断裂, 在其后代中形成单端单体或双端二体。而附加一对外源染色体的二体附加系相对更稳定一些。谭光轩等发现在药用野生稻与水稻回交过程中, 附加的药用野生稻染色体以单价体形式存在且常和供体水稻染色体发生断裂和错接^[3]。Littlejohn 等研究证明小麦-二列类麦 ($2n=4x=28$) 个别二体异附加系的稳定性可达到 100%^[4]。Dvorak 等研究证明小麦-黑麦二体异附加系后代的稳定性变化在 80%~95% 左右^[5], 但 Khush 发现有些情况下二体异附加系的两条外源染色体不发生配对而形成两条单价体, 从而形成染色体不等的配子。李立会等对小麦-冰草的 20 个二体异附加系开放授粉后代的观察表明, 10 份材料没有检测到 $2n=44$ 的植株, 10 份材料 $2n=44$ 的二体异附加系频率变化在 33%~100% 之间。二体异附加系稳定性的变化, 主要是所附加的外源染色体的丢失与变异。另外, 能够稳定遗传的二体异附加系也常有所附加的一对外源染色体和栽培种染色体发生了相互易位的情况^[6]。陈新宏等对 14 份小麦-大麦二体异附加系的鉴定发现, 2 个 5H 二体异附加系已发生了小麦和大麦染色体的相互易位^[7]。高海波等对普通小

麦-中间偃麦草的二体异附加系Z4的基因组原位杂交和RAPD分析,证明所附加的一对外源染色体和普通小麦的染色体发生了相互易位^[8]。外源染色体通过雌雄配子的传递率不相同。任艳蕊在选育芥蓝-菜薹(CC+A)异附加系时发现,单体异附加系(CC+A9)的n+1雌、雄配子传递率分别为18.75%和9.82%。在相同遗传背景下每套不同附加系的传递率也不同^[9]。Chetelat等发现在番茄-类番茄茄单体异附加系中,10号染色体的传递率是24%,而6号染色体的传递率为0^[10]。

2 异源附加系的培育

获得异附加系的主要方法有常规法、双二倍体回交法、桥梁法、双重单体或多重单体附加法、单倍体法、细胞融合法等。

最常用的方法是获得栽培物种与亲缘物种的杂种F₁后,用受体品种与F₁或由F₁加倍成的双倍体回交1次至数次,从回交后代中选择单体附加系,再经自交产生双倍体附加系。Omara利用这种方法获得了20多个小麦附加黑麦染色体的异附加系^[11]。山东农业大学以普通小麦“烟农15”与中间偃麦草杂交和回交,在回交后代中选育出了11个二体异附加系。Chen等用人工合成的甘蓝型油菜与白菜型油菜连续回交,获得了白菜-甘蓝附加系^[12]。Jahier等通过甘蓝型油菜和黑芥种间杂交获得了甘蓝型油菜-黑芥二体异附加系^[13]。李再云利用甘蓝型油菜与诸葛菜杂交,也获得了附加几条诸葛菜染色体的甘蓝型油菜材料^[14]。魏文辉等以甘蓝×白芥的杂交种F₁植株为母本,甘蓝为父本进行回交,从获得的BC₁代植株中筛选出一株甘蓝-白芥单体附加系,并通过自交获得甘蓝-白芥双倍体附加系植株^[15]。Peterka等通过萝卜与油菜杂交、回交、加倍途径获得系列甘蓝型油菜-萝卜附加系^[16]。申书兴等以菜薹-芥蓝、大白菜-结球甘蓝种间三倍体(AAC)与菜薹、大白菜(AA)为材料,进行回交,获得了AA+C的单体附加系,并对单体异附加系进行自交获得了双倍体异附加系;并同时培育成功了结球甘蓝-大白菜(CC+A)单体异附加系^[17-19]。李利军等以甘蓝型油菜-萝卜d染色体附加系do和菜心A3作为试材,通过两者之间的正反交,获得了异源三倍体附加系(AAC+d)^[20]。Lukazewski

用八倍体小黑麦和普通小麦杂交获得七倍体小黑麦,再和八倍体小黑麦回交,再经自交产生了二体异附加系。受精后杂种胚败育衰亡是野生种与栽培种杂交中的一个常见现象,由于父母本种间基因组的不协调,导致了胚死亡、胚乳衰退、种子不能正常发育和杂种不育。陈劲枫等以人工双二倍体与普通黄瓜品种杂交获得的异源三倍体再与普通黄瓜品种杂交后,幼胚在MS培养基上培养,从中筛选了2个单体异附加系^[21]。李倩等通过胚挽救技术获得了甘蓝型油菜-萝卜d染色体附加系与甘蓝之间的有性杂种(CCA+d)。

另外,有益的性状也使用桥梁品种与近缘野生或栽培种杂交间接的被转移。孟金陵以美化烟草(SS)为桥梁亲本,实现了普通烟草(SSTT)与野生种小波烟草(RRRR)杂交,再通过回交,获得了基因组为SSTT但附加了一条或一对R染色体的抗病毒的单体(二体)异附加系。栗根义在选育白菜-甘蓝异附加系中,也使用了甘蓝型油菜(4x)为桥梁种。为了加快选育进程,可将花药培养与异附加系选育相结合。翁跃进等通过花药培养获得了小麦-黑麦和小麦-顶芒山羊草异附加系。张永泰等通过小孢子培养获得甘蓝型油菜-白芥单体附加系,经过秋水仙素加倍处理,获得双倍体异附加系^[22]。植物原生质体技术的发展,为不能直接进行有性杂交的两个种实现体细胞杂交提供了可能。Melchers等首次利用二倍体番茄和四倍体的马铃薯实现了体细胞融合^[23]。Sakai利用非对称性原生质体融合将萝卜Kasenacms基因转移到了甘蓝型油菜^[24]。Wang等在甘蓝型油菜和海甘蓝的非对称体细胞杂种的F₂代获得甘蓝型油菜-海甘蓝单体附加系^[25]。

3 异源附加系的鉴定

异源附加系的鉴定主要有形态标记、细胞标记、生化标记、分子标记和原位杂交等。

形态学鉴定是指杂种后代中能够被直接观察到的外观性状,如植株的株型、叶色、花色、生殖特性、抗病虫性等。任艳蕊在选育芥蓝-菜薹(CC+A)异附加系时通过花瓣的特殊表型选育了2n+1植株^[9]。Chetelat发现12个番茄-类番茄茄的单体异附加系都表现各自的类番茄茄的特殊形状

[10]。由于形态标记数量少,多态性差,且易受环境影响,所以需同其他标记结合起来使用。细胞学方法主要包括染色体核型分析(染色体数目、配对行为、着丝粒位置等)和染色体分带(C-带、N-带等)。袁世峰通过根尖细胞染色体计数和花粉母细胞减数分裂行为观察,筛选出了甘蓝型油菜B组染色体附加系^[26]。高东杰在栽培甜菜-白花甜菜单体异附加系中,通过测量外加染色体与栽培甜菜最长染色体长度的比值来鉴定异附加系列。经C-显带和谷氨草酰乙酸转氨酶同工酶技术,任新琴等对普通小麦与大赖草杂交,回交所获得的一对大赖草的11号染色体进行了成功分析。经C-显带和种子HMW-GS电泳技术,刘翠云等成功鉴定了以普通小麦为母本,二棱大麦为父本选育的单体,二体异附加系^[27]。分子标记作为基因型的一种易于识别的表现形式,在辨别外源染色体上具有简便、快捷、准确的特点,相继开发的分子标记如RAPD、AFLP、SSR、STS等在鉴别MAAL中的外源染色体上得到了广泛应用。应用杀配子染色体特有的RAPD标记,郭长虹等鉴定了3个“中国春”具杀配子染色体的二体异附加系及作为3个杀配子基因种源的3种山羊草^[28]。SAAL等用SSR标记位点鉴定芸薹属A、C基因组的杂交种、非整倍体、易位系、代换系。利用筛选的SSR和RAPD分子标记,李倩对甘蓝型油菜-萝卜d染色体附加系进行了成功鉴定。为了快速、稳定鉴定,罗向东等将栽培黄瓜-酸黄瓜单体异附加系的AFLP和RAPD分子标记转化为易操作的SCAR标记^[29]。张丽等成功地将AFLP标记转化为实验结果稳定、操作更简单的序列标记位点(STS)标记,建立了小麦-长穗偃麦草异源附加系(Ee染色体组)特异的分子标记。

随着荧光原位杂交(FISH)技术的发展,在此基础上建立起了基因组原位杂交技术(GISH),为辨别杂种植株中的外源染色体和渗入染色体片段提供了另一个强有力的工具。原位杂交的方法是使用生物素等标记过的DNA片段为探针,与染色体的DNA进行杂交,在显微镜下直接检测与探针序列互补的分子标记技术。Hirai K报道在油萝卜基因组中,发现由6片段(pURsN1-6)组成的5S rDNA高度重复序列,该rDNA基因在油萝卜18条染色体上都存在, Peterka等以pURsN制备油萝卜5S rDNA

的探针,通过原位杂交(FISH)成功鉴定了甘蓝型油菜-萝卜附加系。利用此探针,张绍松等也鉴定了9个甘蓝型油菜-萝卜附加系染色体在自交F₂代的遗传稳定性^[30]。Gao等利用白花甜菜特异的简单重复序列探针鉴定了普通甜菜附加的异源染色体^[31]。Hasterok等利用核糖体5S和25S DNA做探针,检测出了在白菜基因组遗传背景下的3个不同甘蓝染色单体^[32]。利用基因组原位杂交和RFLP标记, Jacobsen等在番茄与马铃薯的回交后代中成功鉴定了番茄染色体附加到马铃薯中。利用染色体原位杂交和RAPD标记,薛秀庄等检测到Elymus-rectisetu染色体附加到普通小麦中。通过利用基因组原位杂交、Giemsa-C分带、SCAR分子标记,吴金华等对含抗白粉病新基因普通小麦-黑麦1R二体异附加系的遗传学特性进行了鉴定。

4 异源附加系的应用和发展前景

伴随有益基因导入受体品种,培育的异源附加系为农业生产提供了更多抗病、抗逆、优质、高产的优异品种,也进一步丰富了种质资源。Mesbah M等对携带有来自平圃甜菜或碗状花甜菜一条染色体的MAALs研究发现,来自不同供体种染色体的抗线虫病水平存在差异^[33]。Daguang Cai等从野生甜菜中克隆到了抗甜菜胞囊线虫基因。Peterka等通过远缘杂交获得了一整套甘蓝型油菜-萝卜附加系,并鉴定出只含萝卜d染色体的附加系高抗线虫。国内潘大仁也利用萝卜与甘蓝型油菜进行属间杂交,将抗线虫基因导入油菜,获得抗胞囊线虫的杂种材料。Snowdon等将白芥的抗黑胥病基因转入到了甘蓝型油菜中^[34]。

由于异附加系有外源染色体的导入,常常引起遗传上的不稳定,从而影响了农艺品质。成套异附加系是研究物种起源和进化、基因克隆、染色体组亲缘关系、基因组互作和表达、构建染色体DNA文库的重要材料。在植物杂种中,单体异附加系为研究减数分裂中单条染色体的配对机制及其对应关系,细胞分裂时的染色体行为提供了一个难得的材料。Attia等在研究不同双单倍体杂种染色体配对和交叉频率中发现,A/C基因组染色体之间配对情况要远高于A/B和B/C染色体之间的配对,证明A和C基因组之间具有一定的亲缘关系^[35]。系列的单体、

二体异附加系可以把供体基因组分割为单个染色体,使其不同染色体处于相同的遗传背景下,消除了基因组内染色体之间的相互影响,有助于将供体所特有的某些显性基因和遗传标记定位到特定染色体上。Chevre利用甘蓝型油菜-黑芥异附加系将来自黑芥的黑胫病的抗性基因定位到染色体B4上^[36]。Rubiales等利用系列小麦-普通小麦附加系将抗叶斑病的基因定位于4号和7号染色体上,将抗腥黑穗病的基因定位于6号染色体上^[37]。Gonzalez等利用小麦-大麦单体附加系,将46个RAPD标记定位到了大麦的不同染色体上。ShigyoM利用MAAL也已完成了洋葱一系列的形态学和分子生物学标记的染色体定位。在获得单条染色体基础上,可建立单条染色体文库,为构建作物高密度遗传图谱提供了有效条件。Truco等利用甘蓝型油菜-黑芥异附加系构建了黑芥遗传连锁图^[38]。Moussa和Budahn利用甘蓝型油菜-萝卜附加系F₂代群体构建了9个连锁群的萝卜分子遗传图谱^[39]。根据减数分裂中染色体形态上的差异,通过显微操作染色体微切割和微克隆技术,用若干条染色体微量模板,可进一步构建可靠的染色体文库^[40]。目前已对小麦、大麦、玉米、西瓜、甜菜等作物进行了切割,并成功构建染色体(区段)特异性DNA文库。

参考文献

- [1] 李树贤.植物染色体与遗传育种[M].北京:科学出版社,2008.
- [2] Leighty C E,Taylor J W.“Hairy neck”wheat segregates from wheat-rye hybrids[J].J Agris Re,1924,28:576.
- [3] Tan G X,Jin H J,Li G ,et al. Production and characterization of a complete set of individual chromosome additions from *Oryza officinalis* to *Oryza sativa* using RFLP and GISH analyses[J]. Theor Appl Genet,2005,111:1585-1595.
- [4] Littlejohn G M,Pienaar R de V.Thinopyrum distichum addition lines :production ,morphological and cytological characterization of disomic addition lines and stable addition substitution line[J].Theor Appl Genet, 1995,90:33-42.
- [5] Dvorak J. Genome relationships among *Elitrigia elongate*,*E. stipifolia* ,“E, elongate 4x” ,*E.caespitosa*,*E.intermedia* and “E, elongate 10x”[J].Canadian Journal of Genetics and Cytology, 1981,23: 481-492.
- [6] 李立会,杨欣明,周荣华.小麦-冰草异源附加系的创建[J].遗传学报,1998,25(6):538-544.
- [7] 陈新宏,刘淑全,赵继新,等.普通小麦-大麦异附加系的分子生物学技术鉴定[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2003,31(6):5-8.
- [8] 高海波,陈孝,陈明.小麦-中间偃麦草异附加系Z4的外援染色质的分子标记[J].西南农业学报. 2005,18(5):634-635.
- [9] 任艳蕊,张成合,申二巧,等.芥蓝-菜薹种间三倍体回交子代染色体数鉴定及单体异附加系的选育[J].园艺学报, 2010,37(2):213-220.
- [10] Chetelat R T,Rick C M,Cisneros P, et al. Identification, transmission, and cytological behavior of *Solanum lycopersicoides* Dun.monosomic alien addition lines in tomato[J].Genome,1998,41:40-50.
- [11] Omara J G . Cytogenetic studies on Triticum. I. A method for determining the effects of individual *Secale* chromosomes on Triticum[J].Genetics,1940,25: 401-408.
- [12] Chen B Y, Cheng B F,Jorgensen R B. Production and cytogenetics of *Brassica campestris alboglabra* chromosome addition lines[J].Theor Appl Genet,1997,94:633-640.
- [13] Jahier J,Chevre A M,Tanguy A M, et al.Extration of disomic addition lines *Brassica napus-B.nigra*[J].Genome ,1989,32: 408-413.
- [14] 李再云.甘蓝型油菜与诸葛菜属间杂交新材料的染色体行为及其进化意义[J].自然科学进展,2003,3(9):43-48.
- [15] 魏文辉,张苏锋,李均.白芥×甘蓝F₁代及BC₁代单体异附加系的GISH分析[J].科学通报, 2006,51: 2490-2494.
- [16] Peterka H,Budahn H,Schrader O, et al. Nematoderesistance in a disomic rapeseed-radish chromosome addition line. In Vollmann J,Grausgruber N,Ruckenbauer P.Genetic Variation for Plant Breeding.Proceedings of the 17th EUCARPIA General Congress Vienna[J].BOUK-University of Natural Resources and Applied Life Sciences,2004,333.
- [17] 刘炜,申书兴,王彦华,等.大白菜-甘蓝异附加系的获得与鉴定[J].园艺学报, 2008,35 (2): 207-212.

- [18] 桑丹,刘畅,陈雪平,等. 大白菜-结球甘蓝5号和8号单体异附加系的筛选和鉴定[J].植物遗传资源学报,2008,9(4): 517-520.
- [19] 张玉成.结球甘蓝-大白菜部分单体异附加系的创建[D].河北:河北农业大学,2008.
- [20] 李利军,丁云花,李成琼,等.甘蓝型油菜附加系与芸薹属A基因组杂交 F₁ 的获得与鉴定[J].中国农学通报,2009,5(13):23-27.
- [21] 陈劲枫,罗向东,钱春桃.黄瓜单体异附加系的筛选与观察[J].园艺学报,2003,30(6):725-727.
- [22] 张永泰,李爱民,陆莉.通过甘蓝型油菜和白芥属间杂种后代的小孢子培养获得二体异附加系[J].作物学报,2006,32(11):1764-1766.
- [23] Melchers G,Sacristan M D,Holder A A.Somatic hybrid plants of potato and tomato regenerated from fused protoplasts[J].Carlsberg Res Commun,1978,43:203-218.
- [24] Sakai T,Liu H J,Iwabuchi M, et al. Introduction of a gene from fertility restored radish(*Raphanus sativus*) into *Brassica napus* by fusion of X-irradiated protoplasts from a cytoplasmic male-sterile hybrid of *B.napus*[J].Theor Appl Genet,1996,93(3):373-379.
- [25] Wang Y P,Snowdon R J,Rudloff E, et al. Cytogenetic characterization and gene variation in progenies from asymmetric somatic hybrids between *Brassica napus* and *Crambe abyssinica* [J]. Genome,2004,47:724-731.
- [26] 袁世峰.甘蓝型油菜 B 组染色体附加系的筛选鉴定与遗传研究[D].江苏:南京农业大学,2006.
- [27] 刘翠云,李璋.大麦杂交的研究进展(2) [J].麦类作物,1997,17(5):8-11.
- [28] 郭长虹,石锐,王同昌,等.杀配子染色体特异 RAPD 标记及山羊草属与普通小麦间分子多态性的研究[J].植物研究,2001,21(3):432-436.
- [29] 罗向东.栽培黄瓜与酸黄瓜种间杂种及异染色体系的创制与评价[D].江苏:南京农业大学,2006.
- [30] 张绍松,Peter Ka , Budahn H,等.油萝卜抗胞囊线虫基因的染色体定位及其在油菜附加系中的稳定性[J].中国农业科学,2008,41(1):93-101.
- [31] Gao D,Guo D,Jung C.Monosomic addition lines of *Beta corolliflora* Zoss in sugar beet:cotological and molecular-marker analysis[J].Theor Appl Genet,2001,103:240-247.
- [32] Hasterok R,Wolny E,Kulak S, et al .Molecular cytogenetic analysis of *Brassica rapa*-*Brassica oleracea* var.*alboglabra* monosomic addition lines[J]. Theor Appl Genet,2005,111: 196-205
- [33] Mesbah M,Scholten O E,Bock TSMd, et al. Chromosome localisation of genes for resistance to *Heterodera schachtii*, *Cercospora beticola* and *Polymyxabetae* using sets of *Beta procumbens* and *B.patellaris* derived monosomic additions in *B.vulgaris*[J].Euphytica,1997,97:117-127.
- [34] Snowdon R J,Winter H,Diestel A. Development and characterization of *Brassica napus* *Sinapis arvensis* addition lines exhibiting resistance to *Leptosphaeria maculans*[J].Theoretical and Applied Genetics,2000,101:1008-1014.
- [35] Attia T,Robbelen G. Cytogenetic relationship within cultivated *Brassica* analysed in Amphidiploids from the three diploid ancestors[J].Can J Genet Cytol,1986,28:323-329.
- [36] Chevre A M,Eber F,Barret P, et al.Characterisation of *Brassica nigra* chromosomes and of blackleg resistance in *B. napus* DB.*nigra* addition lines[J].Plant Breed,1996,115:113-118.
- [37] Rubiales D,Moral A,Mart A.Chromosome location of resistance to septoria leaf blotch and commonbunt in wheat-barley addition lines[J].Euphytica,2001,122:369-372.
- [38] Truco M J,Quiros C F. Structure and organization of the B genome based on a linkage map in *Brassica nigra*[J].Theor Appl Genet,1994,89:590-598.
- [39] Moussa M A A.Polymerase chain reaction (PCR)-based marker analyses for the genomic and nematode resistance QTL in *Raphanus sativus*[D].Egypt Assiut University, 2004.
- [40] Vega J M,Abbo S,Feldman M. Chromosome Painting in Plants:In situ hybridization with a DNA Probe from a specific microdissected chromosome arm of common wheat [J].Proc Natl Acad Sci USA,1994,91:12041-12045. 图