

小麦-冰草附加系 1·4 重组 P 染色体对 *Ph* 基因的抑制作用

杨国辉, 杨欣明, 王睿辉, 高爱农, 李立会, 刘伟华*

中国农业科学院作物科学研究所/国家农作物基因资源与基因改良重大科学工程, 北京 100081

* 联系人, E-mail: liuw@caas.net.cn

2009-04-21 收稿, 2009-08-28 接受

国家高技术研究发展计划(编号: 2006AA10Z174)和国家科技支撑计划(编号: 2006BAD13B02)资助项目

摘要 冰草属(*Agropyron Gaertn.*)的 P 组染色体被推测可能携带有抑制小麦 *Ph* 基因的遗传系统, 但是相关的研究很少. 本研究发现, 在小麦-冰草附加系 II-21-2(附加 1·4 重组 P 染色体)的减数分裂中存在染色体联会异常的现象. 对该附加系进行细胞遗传学和 *Ph1* 基因扩增等分析与检测, 结果表明附加系 II-21-2 的 *Ph1* 基因扩增正常, 未见缺失; 小麦-冰草附加系 II-21-2 减数分裂中期每个花粉母细胞出现六价体或四价体的数目分别为 0.41 和 0.13, 而附加系受体小麦 Fukuho 减数分裂无染色体异常联会. 双色 GISH/FISH 检测表明, 附加系 II-21-2 的 P 染色体不直接参与多价体的组成, 多价体为小麦自身染色体构成. 附加系 II-21-2 的 1·4 重组 P 染色体能够抑制小麦 *Ph* 基因的作用, 从而引起小麦部分同源染色体之间的联会, 并造成包括小麦 3B-3D 等部分同源染色体之间的易位. 小麦-冰草附加系的 P 染色体促进小麦部分同源染色体联会的作用或特性在未来小麦的遗传改良中具有潜在应用价值.

关键词

小麦-冰草附加系
P 染色体
Ph 基因
部分同源染色体
联会

Ph (pairing homoeologous) 基因是四倍体小麦 (AABB) 和六倍体小麦 (AABBDD) 中一种抑制小麦部分同源染色体配对的基因, *Ph* 基因的存在保证了作为异源多倍体的小麦在减数分裂中进行严格的同源染色体配对, 主要以 5B 染色体上的 *Ph1*^[1~3] 基因以及 3D 染色体上的 *Ph2*^[4] 基因作用为主, 其中 *Ph1* 基因的作用显著强于 *Ph2* 基因. 在 *Ph* 基因缺失或突变体中, 小麦部分同源染色体则能够产生联会和遗传交换. 由于存在正常的 *Ph* 基因, 小麦花粉母细胞减数分裂不出现多价体, 保证异源六倍体小麦能够正常进行减数分裂和遗传.

冰草属 (*Agropyron Gaertn.*) 是小麦族中的一个多年生近缘属, 其染色体组为 P, 包括二倍体 (PP)、四倍体 (PPPP) 和六倍体 (PPPPPP) 3 种倍性. 在早期的研究中, 小麦与冰草间几乎没有一个可育的属间杂种

产生. 然而, 在 20 世纪 90 年代前后, 不仅获得了多个普通小麦与四倍体冰草植物的属间杂种, 个别组合还获得了可育的自交和回交后代^[5,6]. 在小麦与冰草的远缘杂交中, 不同学者相继发现普通小麦与四倍体冰草杂种 F₁ 减数分裂中二价体数目大于 7, 由此推测冰草 P 组染色体可能存在抑制小麦 *Ph* 基因效应的遗传系统^[6~12], 但是详细的研究和证据尚未见相关报道.

李立会等^[13,14]利用普通小麦 Fukuho 与四倍体冰草 (*A. cristatum* (L.) Gaertn.) 杂交, 通过胚拯救实现了小麦与冰草杂交的成功, 并通过回交获得了一套小麦-冰草二体异附加系, 为研究冰草不同 P 染色体携带的基因奠定了材料基础. 本研究室在一整套小麦-冰草附加系中发现, 附加系 II-21-2 中的花粉母细胞减数分裂存在多价体的异常联会现象. 本文对该

附加系减数分裂染色体联会异常现象进行分析,为冰草 P 染色体可能具有抑制小麦 *Ph* 基因效应的推测提供依据。

1 材料与方法

(i) 材料. 小麦-冰草二体附加系 II-21-2 (附加的 P 染色体为 1·4 重组 P 染色体)、供体亲本四倍体冰草 Z559 和受体亲本普通小麦 Fukuho 由中国农业科学院作物科学研究所李立会实验室提供, 中国春、中国春 *ph1b* 突变体、中国春 5B 缺体 5D 四体 (N5BT5D) 均由中国农业科学院作物科学研究所种质资源研究中心小麦室提供。

(ii) 花粉母细胞(PMC)减数分裂中期 I (MI) 染色体制片. 选取小麦 4~5 cm 长的幼穗, 以卡诺氏固定液 II (无水乙醇:冰乙酸:三氯甲烷 = 6:1:3) 固定 48 h, 用 70% 的乙醇于 -20℃ 保存. 挑取花药镜检, 选择处于减数分裂中期的花粉母细胞以 45% 的冰乙酸压片, 相差显微镜观察。

(iii) 根尖染色体制片. 室温下浸泡种子, 萌发后置 4℃ 处理 24 h, 然后 24℃ 下生长. 根长约 1~2 cm 时, 取根尖, 冰水处理 24 h, 卡诺氏固定液 I (无水乙醇:冰醋酸=3:1) 固定 48 h, 70% 乙醇 -20℃ 保存, 以 45% 冰乙酸压片, 相差显微镜观察, 液氮冷冻后揭片备用。

(iv) 原位杂交检测. 原位杂交程序参照 Friebe 等人^[15]和 Le 等人^[16]的方法, 采用冰草 P 基因组 DNA 作为检测冰草染色体的探针. 来自粗山羊草 (*Ae. tauschii*) 重复序列克隆 pAs1 与来自黑麦的重复序列

克隆 pSc119.2 (MuKai 等人)^[17]或与来自大麦的重复序列克隆 pHvG39 (Pedersen 等人)^[18]分别用于识别小麦染色体. 克隆 pAs1 为鉴别小麦 D 染色体的主要探针, 克隆 pHvG39 在小麦的 A, B, D 三个染色体组上都有杂交信号, 尤其在 B 染色体组着丝粒部位具有较强的杂交信号, 在 A 和 D 基因组上有一些微弱的信号分布. 克隆 pSc119.2 可识别小麦 B 染色体组及部分 A, D 组染色体. 探针标定采用 Dig-Nick-Translation Mix, Bio-Nick-Translation Mix (Roche, Germany) 试剂盒, OLYMPUSAX80 荧光显微镜照相。

(v) 小麦 *Ph* 基因扩增. *Ph1* 基因特异的 PCR 引物 WPG90^[19] (左, 5'-TAATTAGAAAGAATCTAATACGT TAGT-3'; 右, 5'-TTTCTGAGATCTGTTAAGTTAAT TTT-3')、Mads^[20] (左, 5'-CTCCGCGTGCCTTTCTGC-3'; 右, 5'-GTGGCAACTGCCGAAGA-3') 由上海生工生物工程公司合成, PCR 扩增程序参照文献^[19,20]。

2 结果与分析

2.1 小麦-冰草附加系 II-21-2 的细胞学鉴定

对小麦-冰草附加系 II-21-2 花粉母细胞减数分裂进行观察与统计, 染色体异常联会主要表现为出现四价体和六价体, 平均每个花粉母细胞出现四价体或六价体的数目分别为 0.13 和 0.41 (图 1), 而附加系受体小麦 Fukuho 减数分裂无异常联会或多价体出现。

2.2 *Ph1* 基因特异 PCR 标记检测

以 *Ph1* 基因特异的 PCR 引物 WPG90 及 Mads 对

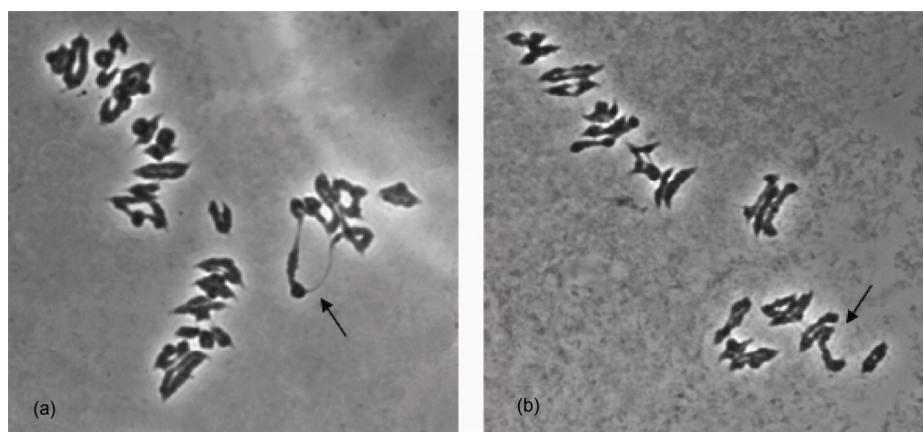


图 1 小麦-冰草附加系 II-21-2 花粉母细胞减数分裂中期 I 的多价体
(a) 六价体(箭头所示); (b) 四价体(箭头所示)

中国春、附加系受体小麦 Fukuho、附加系供体冰草 Z559、中国春 *ph1b* 突变体、中国春 5B 缺体 5D 四体(N5BT5D)以及附加系 II -21-2 不同株系进行检测, 结果表明, 中国春、Fukuho 和附加系 II -21-2 能扩增出正常的 *Ph1* 基因特异片段, 而冰草 Z559、中国春 *ph1b* 突变体、N5BT5D 则不能扩增出相应的片段(图 2). 这表明在附加系 II -21-2 中 *Ph1* 基因未发生缺失.

2.3 附加系 II -21-2 花粉母细胞减数分裂的原位杂交分析

以 P 基因组/pHvG39 为探针, 对附加系 II -21-2 减数分裂中出现的多价体进行双色 GISH/FISH 分析. 质粒 pHvG39 是来自大麦微卫星序列的克隆, 在 B 染色体组着丝粒部位具有较强的杂交信号, 检测结果表明 P 染色体没有参与多价体的组成, 两条 P 染色体能够很好的配对形成环状二价体(图 3). 小麦染色体除了形成多价体, 其他染色体配对正常, 为环状或棒状二价体.

2.4 附加系 II -21-2 及受体小麦 Fukuho 根尖细胞原位杂交分析

以冰草 P 基因组和 pHvG39 DNA 为探针对附加系 II -21-2 根尖进行双色 GISH/FISH 鉴定, 检测表明附加系 II -21-2 的 P 染色体没有发生易位或缺失, P 染色体是完整的(图 4(a)); 以 pHvG39 和 pAs1 DNA 为探针, 对附加系 II -21-2 受体小麦 Fukuho 进行检测表明, Fukuho 中没有发现部分同源染色体之间的易位(图 4(b)); 而附加系 II -21-2 的小麦染色体间存在易位, 结合 pSc119.2 和 pAs1 为探针的鉴定结果(图 4(c)和(d), 依据 MuKai 等人^[17]和 Pedersen 等人^[18]的鉴定标准, 确定附加系 II -21-2 的小麦部分同源染色体 3B 和 3D 之间存在易位, 这种部分同源染色体易位的产生是部分同源染色体联会引起的重组.

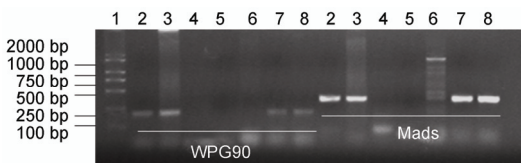


图 2 *Ph1* 基因特异 PCR 标记检测

1, DNA marker (DL 2000); 2, 中国春; 3, Fukuho; 4, 冰草 Z559; 5, N5BT5D; 6, 中国春 *ph1b* 突变体; 7 和 8, 附加系 II -21-2 不同株系

3 讨论

以往的研究表明, 在冰草属中可能存在抑制小麦 *Ph* 基因作用的遗传系统(Chen 等人^[5]; Jauhar^[10]; Li 等人^[11]). 在小麦与沙生冰草(*A. desertorum* (Fisch.) Schult., $2n = 4X = 28$)、小麦与根茎冰草(*A. michnoi*. Roshev., $2n = 4X = 28$)等的杂种 F₁ 中均出现了高于理论值(7 个)的二价体和不同频率的多价体(Chen 等人^[9]; Li 等人^[11,21]). 在小麦与西伯利亚冰草(*A. fragile* (Roth.) Candargy., $2n = 4X = 28$)的杂种中, 出现了六价体的构型(Ahmad 和 Comeau^[8]). 但究竟是冰草哪条 P 染色体起主要作用并没有进一步的研究和明确的结论.

本研究室获得的一套附加系材料中只有附加了冰草 1·4 重组 P 染色体的附加系 II -21-2 出现了一定频率的多价体. 其中六价体的出现涉及到 3 对染色体的联会. 原位杂交结果表明, II -21-2 的体细胞没有涉及到冰草染色体与小麦染色体的易位, 附加系受体小麦 Fukuho 的减数分裂没有多价体和异常联会的出现, 双色 FISH 鉴定也没有发现 Fukuho 存在染色体结构变异, 因此多价体的产生与附加的 P 染色体有关. 对出现较高频率六价体的附加系 II -21-2 株系进行双色 FISH 鉴定, 发现其中 3B 染色体与 3D 染色体发生端部易位, 由于原位杂交检测变异存在局限性, 因此

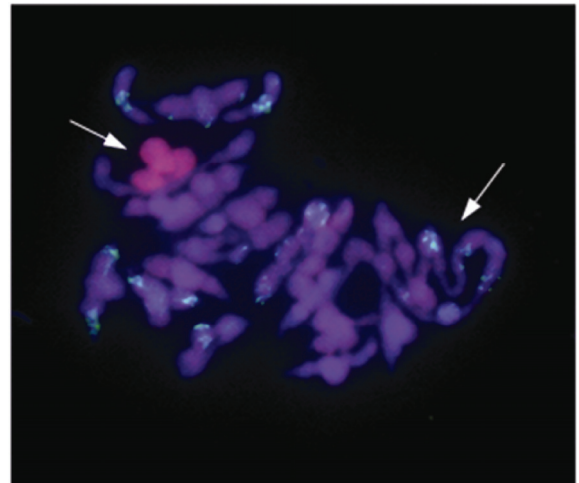


图 3 附加系 II -21-2 花粉母细胞减数分裂中期 I GISH/FISH 检测

检测 P 染色体的 P 基因组 DNA 标记为红色, 检测小麦 B 组染色体的 pHvG39 DNA 标记为绿色. 箭头 1 所示为 P 染色体二价体, 箭头 2 所示为六价体

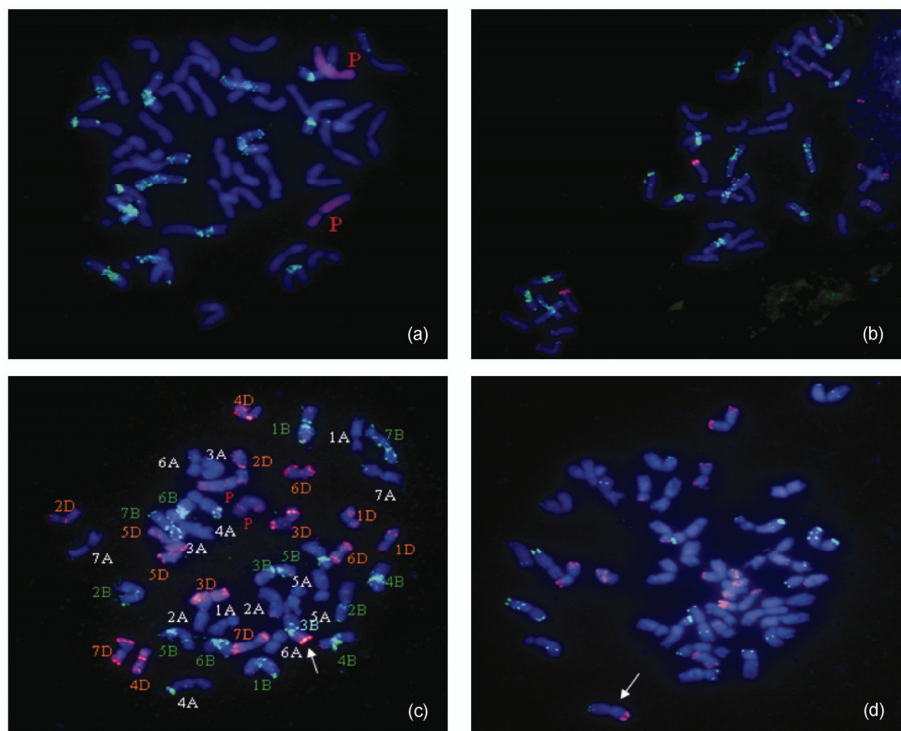


图4 附加系 II-21-2、Fukuho 根尖细胞染色体的 GISH/FISH 检测

(a) 附加系 II-21-2 的双色 GISH/FISH 鉴定, 检测 P 染色体的 P 基因组 DNA 标记为红色信号, 检测小麦 B 组染色体的 pHvG39 标记为绿色信号; (b) Fukuho 的双色 FISH 检测, pHvG39 标记为绿色信号, pAs1 标记为红色信号. (c)和(d) 附加系 II-21-2 的双色 FISH 检测. (c) 采用 pHvG39 (绿色)和 pAs1(红色)为探针; (d) 采用 pAs1 (红色)和 pSc119.2 (绿色)为探针, 箭头指示小麦 3B-3D 端部易位染色体

可能还存在其他染色体易位.

关于小麦-冰草附加系 II-21-2 的 1·4 重组 P 染色体对 Ph 基因的作用机制, 笔者分析认为, 附加系 II-21-2 的 1·4 重组 P 染色体可能含有对小麦 Ph 基因具有抑制作用的相关基因, 这种抑制作用较 Ph1 基因缺失或突变的作用可能要弱, 因此不足以引起小麦与冰草染色体间的联会, 仅能够引起小麦自身部分

同源染色体之间发生联会和重组^[22], 并产生小麦部分同源染色体的易位. 由于小麦部分同源染色体间存在功能补偿, 这种小麦自身染色体间的易位在增加基因重组和遗传多样性的同时, 不会造成大的遗传失衡, 因此冰草 P 染色体能够促进小麦部分同源染色体联会的作用和特性可能在未来的小麦遗传改良中得以应用.

致谢 感谢中国农业科学院作物科学研究所马有志博士和中国科学院遗传与发育生物学研究所安调过博士提供 FISH 检测探针.

参考文献

- 1 Okamoto M. Asynaptic effect of chromosome V. *Wheat Information Service*, 1957, 5: 6—8
- 2 Riley R, Chapman V. Genetic control of the cytologically diploid behaviour of hexaploid wheat. *Nature*, 1958, 182: 713—715
- 3 Mcintosh R A, Hart G E, Gale M D. Catalogue of gene symbols for wheat. *Proceedings of the 8th International Wheat Genetics Symposium*, 1993, July 20—25. Beijing: China Agricultural Sciencetech Press, 1993. 1366
- 4 Mello-Sampayo T. Promotion of homeologous pairing in hybrids of *Triticum aestivum* × *Aegilops logissima*. *Genet Iber*, 1971, 23: 1—9
- 5 Chen Q, Jahier J, Cauderon Y. Production and cytogenetic studies of hybrids between *Triticum aestivum* (L.) Thell and *Agropyron cristatum* (L.) Gaertn. *C R. Acad Sci Ser*, 1989, 308: 411—416

- 6 李立会, 董玉琛. 普通小麦与沙生冰草属间杂种的产生及其细胞遗传学研究. 中国科学(B 辑), 1990, 20: 492—496
- 7 李立会, 董玉琛, 周荣华, 等. 普通小麦与冰草间属间杂种的细胞遗传学及其自交可育性. 遗传学报, 1995, 22: 109—114
- 8 Ahmad F, Comeau A. A new intergeneric hybrid between *Triticum aestivum* L. and *Agropyron fragile* (Roth.) Candargy: variation in *A. fragile* for suppression of the wheat *Ph*-locus activity. *Plant Breed*, 1991, 106: 275—283
- 9 Chen Q, Jahier J, Cauderon Y. Intergeneric hybrids between *Triticum aestivum* and three crested wheatgrasses: *Agropyron mongolicum*, *A. michnoi* and *A. desertorum*. *Genome*, 1990, 33: 663—667
- 10 Jauhar P P. Chromosome pairing in hybrids between hexaploid bread wheat and tetraploid crested wheatgrass (*Agropyron cristatum*). *Hereditas*, 1992, 116: 107—110
- 11 Li L H, Dong Y S. Hybridization between *Triticum aestivum* L. and *Agropyron michnoi* Roshev. I. Production and cytogenetic study of F₁ hybrids. *Theor Appl Genet*, 1991, 81: 312—316
- 12 Limin A E, Foeler D B. An interspecific hybrid and amphiploid produced from *Triticum aestivum* crosses with *Agropyron cristatum* and *Agropyron desertorum*. *Genome*, 1990, 33: 581—584
- 13 李立会, 李秀全, 李培, 等. 小麦-冰草异源附加系的创建 I. F₃, F₂BC₁, BC₄ 和 BC₃F₁ 世代的细胞学. 遗传学报, 1997, 24: 154—159
- 14 李立会, 杨欣明, 周荣华, 等. 小麦-冰草异源附加系的创建 II. 异源染色体的检测与培育途径分析. 遗传学报, 1998, 25: 538—544
- 15 Friebe B, Jiang J, Gill B S. et al. Radiation-induced nonhomoeologous wheat-*Agropyron intermedium* chromosomal translocations conferring resistance to leaf rust. *Theor Appl Genet*, 1993, 86: 141—149
- 16 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
- 17 MuKai Y, Nakahara Y. Simultaneous discrimination of the three genomes in hexaploid wheat by multicolor fluorescence in situ hybridization using total genomic and highly repeated DNA probes. *Genome*, 1993, 36: 489—494
- 18 Pedersen C, Langridge P. Identification of the entire chromosome complement of bread by two-colour FISH. *Genome*, 1997, 40: 589—593
- 19 Segal G, Liu B, Vega J M, et al. Identification of a chromosome-specific probe that maps within the *Ph1* deletions in common and durum wheat. *Theor Appl Genet*, 1997, 94: 968—970
- 20 Griffiths S, Sharp R, Foote T N, et al. Molecular characterization of *Ph1* as a major chromosome pairing locus in polyploid wheat. *Nature*, 2006, 439: 749—752
- 21 Li L H, Dong Y S. Production and cytogenetic study of interspecific hybrids between *Triticum aestivum* L. and *Agropyron desertorum*. *Sci China*, 1991, 34: 421—427
- 22 Jubault M, Tanguy A M, Abélard P, et al. Attempts to induce homoeologous pairing between wheat and *Agropyron cristatum* genomes. *Genome*, 2006, 49: 190—193