

利用分子标记将 2Ai-2 染色体转移到 小麦 ph1b 遗传背景的研究

雷 昊, 张 悦, 林志珊, 徐琼芳, 叶兴国

(中国农业科学院作物科学研究所/农业部作物遗传育种重点开放实验室/国家作物基因资源和基因改良重大科学工程, 北京 100081)

摘要: 小麦 ph1b 突变体可诱导部分同源染色体配对和交换, 产生遗传上较为稳定、补偿性较好的重组体。将外源染色体引入 ph1b 的小麦遗传背景是产生目标染色体重组体的基础, 但 ph1b 植株没有明显而稳定的表型性状, 难以从表型上进行选择。本研究利用 CSph1b 缺失区中的分子标记 Mads 及外源染色体特异的分子标记 P4 和 P68, 对小麦-中间偃麦草 2Ai-2(2B) 异代换系 N420 与 CSph1b 的杂种 F₂ 群体及其衍生的 F₅ 株系进行 ph1b-2Ai-2 染色体综合体的选择, 高效地获得了目标基因型。

关键词: 小麦; 分子标记; ph1b; 外源染色体; 部分同源染色体

Transferring of the 2Ai-2 Chromosome into Wheat ph1b Genetic Background by Using Related Molecular Markers

LEI Hao, ZHANG Yue, LIN Zhi-shan, XU Qiong-fang, YE Xing-guo

(National Key Facility for Crop Genetic Resources and Genetic Improvement/Key Laboratory of Crop Genetics and Breeding,
Ministry of Agriculture/Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081)

Abstract: Incident of homeologous chromosome pairing and exchange often occur in hexaploid wheat with ph1b genetic background which can produce compensable and genetic stable recombinants. Therefore, transferring alien chromosomes into a wheat material with ph1b background is the basis of generating translocations between the target chromosomes. However, it is difficult to identify ph1b genotype according to its phenotype. In present study, some target plants with ph1b and the alien chromosome 2Ai-2 were selected effectively by using molecular markers Mads (on the deletion region of ph1b) for ph1b, P4 and P68 (on the alien chromosome) for 2Ai-2 in the F₂ population of CSph1b crossed with N420, a wheat-*Thinopyrum intermedium* 2B(2Ai-2) substitution line, and their derivative F₅ lines.

Key words: Wheat; Molecular marker; ph1b; Alien chromosome; Homeologous chromosome

2Ai-2 是中间偃麦草一条携带抗黄矮病基因的染色体。研究表明, 2Ai-2 的黄矮病抗性除由短臂上的主效基因控制外, 可能还受长、短臂间基因互作的影响而呈现较为复杂的遗传特性^[1]。为了进一步明确抗病基因的染色体区域并评价其利用价值, 需要创造各类小片段的目标染色体易位材料。本课题组曾开发了 15 个 2Ai-2 染色体特异的 EST-PCR 标记^[1], 这为研究其在小麦遗传背景中的遗传行为

及结构变异提供了可靠的跟踪检测手段^[2]。

CSph1b 是 1977 年由 Sears^[3] 利用辐射方法创造的一个以小麦中国春为遗传背景的 5BL 染色体区域缺失突变体, 其缺失区大小包括 *Ph1* 基因在内约 70Mb 的片段^[4]。CSph1b 丧失了由 *Ph1* (pairing homoeologous gene) 控制的对多倍体小麦中部分同源染色体配对的抑制作用, 导致部分花粉母细胞产生多价体和单价体。利用这一遗传效应, 将外源染色体导入 ph1b 的遗传背

收稿日期: 2011-09-09 修回日期: 2011-11-19

基金项目: 国家自然科学基金 (30571159)

作者简介: 雷昊, 专科, 研究方向: 小麦分子标记辅助育种。E-mail: leihao222luotuo@126.com

张悦为同等贡献第一作者。

通讯作者: 林志珊, 副研究员。研究方向: 小麦遗传育种。E-mail: linzs@caas.net.cn

景,可诱导外源染色体与小麦部分同源染色体间的配对与交换,从而获得有用的易位材料。

虽然 CSph1b 突变体与正常的中国春相比,其育性有所下降^[5],但这一性状难以应用于其杂种后代的选择过程。准确的缺失体选择尚需借助分子标记。*Mads* 是位于 CSph1b 缺失区的一个基因^[6],可作为鉴定该区存在与否的分子标记。

本研究利用已开发的位于 2Ai-2 染色体长、短臂的分子标记 P68、P4 和 ph1b 的特异标记 *Mads* 对杂种后代进行选择,成功地将 2Ai-2 染色体转移到 ph1b 缺失的遗传背景中,为进一步的遗传研究及易位材料的鉴定奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 普通小麦中 8601,是由中国农业科学院作物科学研究所原春麦育种课题组培育的春小麦品系,是育成异代换系 N420、N439 的小麦亲本之一^[7];中国春(CS)由本课题组收集、保存,CSph1b 以及小麦中国春缺体/四体 N5A/T5B、N5B/T5D、N5D/T5A、山羊草-硬粒小麦 5D(5B)代换系 W433、硬粒小麦 W405,分别由山东农业大学孔令让教授及美国农业部的许树军博士惠赠,小麦-中间偃麦草 2Ai-2(2B)二体代换系 N420、N439 由本课题组培育^[7]并保存。

1.1.2 引物 P4、P68 是分别由物理定位于小麦第 2 同源群染色体短臂和长臂上的 EST 序列 BG607186(2BS3-0.84-1.00)和 BQ170567(C-2BL2-0.36、2DL3-0.49-0.76)(http://wheat.pw.usda.gov/cgi-bin/westsql/map_locus.cgi)转化而来的 PCR 标记,可分别特异扩增出 2Ai-2 染色体短、长臂上的特异带^[1]。*Mads* 是 ph1b 缺失体中的缺失区内插入在 *Ph1* 基因的候选基因-类 Cdk 基因簇中的亚端异染色质片段中的一个基因^[6],LJC2 是 2A 染色体上由 RFLP 标记 Xpsr137 转化而来的 PCR 标记^[8],*actin* 基因是真核生物中普遍存在的细胞骨架主要成分肌动蛋白的编码基因,本研究将 LJC2 和 *actin* 基因扩增产物作为阳性标记。各标记的引物序列如下。

1.2 方法

所有引物序列由北京奥科鼎盛生物科技有限公司合成,DNA 提取、PCR 反应参照 Wang 等^[1]和张悦等^[2]的方法和条件(表 2)进行,PCR 产物在含 EB 染料的 2% 的琼脂糖凝胶中进行电泳,115V 的电压下,电泳约 35min,紫外凝胶成像系统中照相。

表 1 本研究所用标记的引物序列

Table 1 Sequences of primer pairs used in this study

标记/基因名称	引物序列
Marker/Gene name	Primer sequence
<i>actin</i>	F:5'-CTCACTGAGGCTCCTTTGAAC-3'; R:5'-CGAGATCCAAACGAAGAATG-3'
LJC2	F:5'-ACTGGATACAAGCAGGTCC-3'; R:5'-ACCCGTGGTGAAATAAG-3'
<i>Mads</i>	F:5'-CTCCGCGTGCCTTTCTGC-3'; R:5'-GTGGCAACTGCCGGAAGA-3'
P4	F:5'-TGA CTCCAGCATTTTATGGGTG-3'; R:5'-CAACATGACAAGTGTGCGTTCCT-3'
P68	F:5'-TGTGCTAACTGGGCAAAACC-3'; R:5'-GAAGGCAAACGAAGCTATAAA-3'

表 2 本研究引物扩增的 PCR 条件

Table 2 PCR amplification condition in the study

标记/基因名称	PCR 条件	PCR condition
Marker/Gene name		
TaActin, <i>Mads</i> , LJC2	94℃ 5min, 94℃ 30s, 56℃ 30s, 72℃ 45s, 35 个循环, 72℃ 10min	
P4, P68	94℃ 5min, 94℃ 30s, 55℃ 40s, 72℃ 45s, 35 个循环, 72℃ 10min	

2 结果与分析

2.1 *Mads* 和 P68 对亲本 CSph1b 及其 F₂ 杂交群体的检测

图 1 显示了利用分子标记 *Mads* 和 P68 分子标记对小麦亲本 CSph1b 及其与异代换系 N420 杂交 F₂ 群体部分植株的扩增图谱。从图 1a 可见,*Mads* 在 CS、小麦的缺体/四体 N5A/T5B、N5D/T5A 中均扩增出了 323bp 的目的片段,而 N5B/T5D 及 CSph1b 无此扩增条带,由于在相同的扩增体系中,阳性标记 LJC2 在包括 N5B/T5D 及 CSph1b 在内的所有样品中都扩增出 138bp 的目的片段,排除了由于样品 DNA 质量问题导致无扩增的可能。表明 *Mads* 在 N5B/T5D 及 CSph1b 无扩增,是由于 *Mads* 基因在这些样品 DNA 中的缺失,这与二者缺失 5B 或 5BL 包括 *Ph1* 基因座位在内的区域的本质相吻合。根据这一结果,我们对 N420 × CSph1b 的 F₂ 群体进行了鉴定筛选,同时,利用 2Ai-2 染色体的特异标记 P68 跟踪选择外源目标染色体。图 1b、1c 显示 *Mads* 和 P68 对部分 F₂ 群体的扩增结果。从图 1 可知,样品 A3-2 既缺失了 *Mads* 特异带,又具有 P68 对 2Ai-2 的特异扩增带,为选择的目标基因型。据此,从 F₂ 72 个单株中,筛选获得了 12 株具有目标基因型的单株。

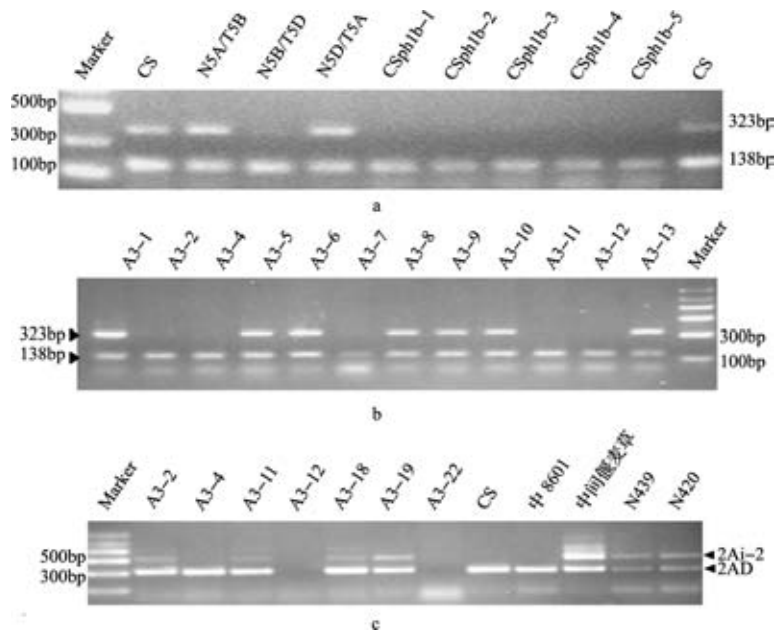


图 1 分子标记对 CSph1b 及 F₂ 群体部分植株的检测

Fig. 1 Detection of CSph1b and some F₂ generation plants by molecular markers

a,b: Mads/ LJC2 对 CS ph1b 及 F₂ 部分群体中缺失体的扩增图谱;c: P68 对 F₂ 群体部分植株的扩增图谱
a,b. Electrophoresis pattern of CSph1b and ph1b in F₂ population amplified by Mads/LJC2 for ph1b;
c: Electrophoresis pattern of some F₂ population amplified by P68 for the alien chromosome

2.2 利用 Mads/P4/P68 对 F₅ 株系部分植株的检测
将 F₂ 选择获得的目标基因型植株连续自交 3 代,F₃与 F₄通过田间黄矮病抗性的鉴定与筛选。利用 Mads/Actin、P4 和 P68 对 F₅株系中的部分植株进行进一步的检测。共检测了 8 个株系中的 56 个单株,其中 6 个株系的单株均为 ph1b 缺失体,2

个株系的大部分单株可扩增出 Mads 特异带(图 2a),可能是其自交过程中由于未套袋而接受了外来花粉所致。大部分植株可同时扩增 P4/P68 的外源染色体特异带(图 2b,图 2c),少数植株 P68 扩增带消失(图 2c),表明外源染色体该 2 个位点变异频率较低。

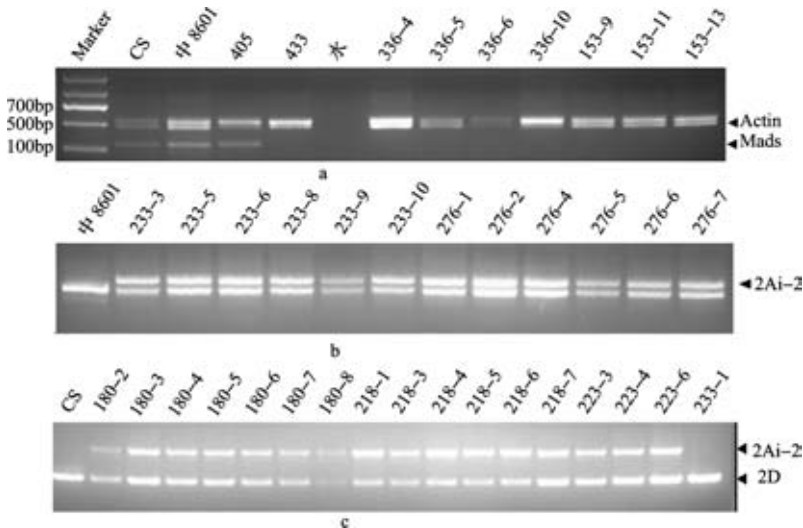


图 2 利用分子标记对 F₅ 株系部分植株的检测

Fig. 2 Detection of part of F₅ plants deriving from F₂ target genotypes by molecular markers

a: Mads 对 F₅ 部分群体中 ph1b 缺失体的检测;b: P4 对 F₅ 群体部分植株中外源染色体短臂的检测;
c: P68 对 F₅ 群体部分植株中外源染色体长臂的检测
a: Detection of ph1b homozygous genotype by Mads. b: Detection of short arm of the alien chromosome by P4.
c: Detection of long arm of the alien chromosome by P68

2.3 F₅ 部分 ph1b-2Ai-2 综合体植株主要农艺性状

源于 F₂ 不同株系的 F₅ 群体植株在株高、穗型及育性等农艺性状上都表现出较大的差异,从通过分子标记检测获得的 ph1b-2Ai-2 综合体植株中随机抽取了部分植株,调查了其穗部的主要农艺性状。

从图 3 可知,不同植株穗部性状如穗长、小穗密度、芒的长短及有无均差异较大,表 3 对这些植株育性的调查结果也显示,不同植株间育性存在较大差异。以上结果表明 ph1b-2Ai-2 综合体缺失没有明显而稳定的共同性状。



图 3 F₅ 群体中不同 ph1b-2Ai-2 综合体植株穗部性状的差异
Fig. 3 Differential character of spikes of F₅ plants with ph1b-2Ai-2

表 3 F₅ 群体中 ph1b-2Ai-2 综合体植株穗部农艺性状

Table 3 Agronomic traits of spikes from F₅ plants with ph1b-2Ai-2

植株编号 Plant code	小穗数 Spikelet No.	小花数 [☆] Floret No.	结实粒数(结实率 [★]) Seed-set No. (setting rate [★])	芒 Awn	穗形 Spike shapes
W153-13	18	36	30(83. 3%)	无	棒状
W153-16	17	34	33(97. 1%)	短	纺锤形
W180-3	18	36	24(66. 7%)	无	棒状
W180-4	18	36	8(22. 2%)	无	棒状
W218-7	13	26	0(0)	长	纺锤形
W233-1	19	38	32(84. 2%)	短	纺锤形
W233-10	20	40	37(92. 5%)	长	纺锤形
W155-10	20	40	38(95. 0%)	长	纺锤形
W361-1	12	24	2(8. 3%)	短	棒状
W276-2	18	36	16(44. 4%)	短	棒状
W328-10	25	50	18(36. 0%)	无	纺锤形
W276-6	20	40	8(20. 0%)	长	棒状

☆:小花数=每穗小穗数×2;★:结实率=每穗小穗基部2朵小花的结实粒数之和/小花数×100%
☆: Floret numbers = Spikelet numbers × 2 ; ★: Setting rate = ∑ Seed-setting numbers in the first and second florets on each spikelet/ Floret numbers × 100 %

3 讨论

对 F₅ 群体的观察表明,不同株系或同一株系不同单株的株高、穗型、育性等均出现较大的变异,显示出双亲杂种后代性状的广泛分离。尽管一般认

为,在 ph1b 的遗传背景中,染色体的重排经过几个世代的累积将产生不育现象^[9],但在 F₅ 群体中观察到,不同的 ph1b-2Ai-2 综合体植株之间育性的差异依然较大。因此,育性无法作为选择 ph1b 的依据,由于没有稳定的农艺性状可供间接选择,分子标记

辅助选择十分必要。

异源六倍体小麦中存在 ABD 3 个亲缘关系密切的基因组。它们含有相同的染色体基数 7, 各染色体组间相应的染色体(相同的部分同源群)具有相似的基因含量和基因排列顺序, 因此具有相互配对的潜在能力。然而, 在减数分裂时每条染色体仅与真正的同源染色体配对。这种二倍体化减数分裂行为主要受 5BL 上的 *Ph1* 基因所控制。当 *Ph1* 基因缺失或被抑制时, 部分花粉母细胞减数分裂中期 I 将出现多价体或单价体, 这是由于部分同源染色体间相互配对的缘故。

ph1b 正是缺失了包括 *Ph1* 基因在内的一个小区域。由于 ph1b 的遗传效应主要是引起部分花粉母细胞减数分裂中期 I 部分同源染色体产生联会与配对, 因此, 对 ph1b 传统的鉴定方法是通过细胞学观察花粉母细胞减数分裂的配对行为来加以判断。这需要花费大量的时间并进行大量的细胞学工作。Gill 等^[4] 1991 年通过 RFLP 分析鉴定出一个位于 ph1b 缺失区的标记 XksuS1-5, 成为 ph1b 缺失区第一个分子标记。Qu 等^[8] 1998 年利用 AFLP 技术筛选到一个与该缺失区相关的标记, 并将其转化成一个简单、易操作的 PCR 标记, 这些工作为取代繁重的细胞学鉴定提供了手段。随着分子生物学和比较基因组学的进步及相关技术的发展, *Ph1* 基因座位被进行了剖析^[6,10-13]。已经证明, *Ph1* 位点是一个伴随着小麦多倍体化进程而产生的复杂基因座, 由 7 个类 cdk 基因组成的基因簇和 1 个亚端异染色质片段所构成, 该片段插入在类 cdk 基因 B6 和 B7 之间。最近的研究表明^[14], *Ph1* 基因的缺失将导致 *Asynapsis 1* (*ASY1*) 基因转录水平的提高。在拟南芥和水稻中, *ASY1* 编码轴心元件相关蛋白, 该蛋白对联会和交叉的形成至关重要。这些结果不仅为我们进一步理解 *Ph1* 基因的转录、表达与调控等的作用机制奠定了基础, 也提供了可用于准确跟踪这一基因的分子标记。本研究利用的标记 Mads 正是 *Ph1* 基因座位中插入在 cdk 基因簇中的亚端异染色质片段上的一个基因。

本研究在 F_3/F_4 2 个世代未进行分子标记筛选, 但 2 个世代均在黄矮病的诱发条件下进行了抗

病性的选择。因此, F_3 中无论外源染色体长臂标记 P68, 还是短臂标记 P4 的检出率很高, 仅在个别单株中发现 P68 特异带的缺失。表明大多数植株中依然携带着外源染色体。从物理图谱看, P68 在长臂上较靠近着丝粒, 而交换事件一般具有越靠近端部出现的频率越高的趋势。在 ph1b 缺失背景中外源染色体与小麦部分同源染色体间是否发生配对与交换, 尚需要利用靠近端部的分子标记包括外源及小麦染色体特异的分子标记进行进一步检测, 并结合 GISH 技术进行验证。

参考文献

- [1] Wang M J, Zhang Y, Lin Z S, et al. Development of EST-PCR markers for Thinopyrum intermedium chromosome 2Ai-2 and their application in characterization of novel wheat-grass recombinants [J]. Theor Appl Genet, 2010, 121: 1369-1380
- [2] 张悦, 林志珊, 曹保久, 等. 2Ai-2 染色体在小麦部分同源染色体代换背景中的遗传 [J]. 作物学报, 2009, 35 (3): 424-431
- [3] Sears E R. An induced mutant with homoeologous pairing in common wheat [J]. Can J Genet Cytol, 1977, 19: 585-593
- [4] Gill K S, Gill B S. A DNA fragment mapped within the submicroscopic deletion of *Ph1*, a chromosome pairing regulator gene in polyploid wheat [J]. Genet, 1991, 149: 257-259
- [5] 吴兰佩. 小麦的 *Ph* 基因及其应用 [J]. 遗传, 1986, 8 (1): 6-8
- [6] Griffiths S, Sharp R, Foote T N, et al. Molecular characterization of *Ph1* as a major chromosome pairing locus in polyploid wheat [J]. Nature, 2006, 439: 749-752
- [7] Lin Z S, Cui Z F, Zeng X Y, et al. Analysis of wheat-Thinopyrum intermedium derivatives with BYDV-resistance [J]. Euphytica, 2007, 158: 109-118
- [8] Qu L J, T Foote N, Roberts M A, et al. A simple PCR-based method for scoring the ph1b deletion in wheat [J]. Theor Appl Genet, 1998, 96: 371-375
- [9] Yousafzai F K, Kaff N A, Moore G. The molecular features of chromosome pairing at meiosis: the polyploid challenge using wheat as a reference [J]. Funct Integr Genom, 2010, 10: 147-156
- [10] Gill K S, Gill B S, Endot T R, et al. Fine physical mapping of *Ph1*, a chromosome pairing regulator gene in polyploid wheat [J]. Genetics, 1993, 134: 1231-1236
- [11] Foote T, Roberts M, Kurata N, et al. Detailed comparative mapping of cereal chromosome regions corresponding to the *Ph1* locus in wheat [J]. Genetics, 1997, 147: 801-807
- [12] Kaff N A, Knight E, Bertin I, et al. Detailed dissection of the chromosomal region containing the *Ph1* locus in wheat *Triticum aestivum*; with deletion mutants and expression profiling [J]. Ann Bot, 2007, 1: 1-10
- [13] 张悦, 林志珊, 叶兴国, 等. 小麦染色体配对基因 *Ph1* 结构剖析及调控机理研究进展 [J]. 科技导报, 2009 (27): 110-115
- [14] Boden S A, Langridge P, Spangenberg G, et al. TaASY1 promotes homologous chromosome interactions and is affected by deletion of *Ph1* [J]. Plant J, 2009, 57 (3): 487-497