

小麦-冰草附加系 II-21-2 的细胞遗传学与分子标记分析

杨国辉, 杨欣明, 王睿辉, 李立会, 高爱农, 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)

摘要:在本研究室获得的一套小麦-冰草附加系材料中, 附加了冰草(1·4)重组 P 染色体的附加系 II-21-2 出现了较高频率的多价体。对小麦-冰草附加系 II-21-2 的 10 个不同株系花粉母细胞减数分裂进行观察与统计, 结果表明, 不同株系均存在低频率的单价体, 染色体异常联会主要表现为出现六价体和四价体, 其中株系 1-7-3 出现六价体频率较高, 出现六价体的花粉母细胞为 41%, 而株系 1-7-7 有 13% 的花粉母细胞出现四价体。小麦 SSR 标记分析表明, 不同株系存在小麦基因组或 P 基因组的多态性。小麦-冰草附加系 II-21-2 染色体异常联会可能与附加的 P 染色体有关, 而其分子水平的多态性和重组可能对于遗传改良具有潜在的意义。

关键词:小麦-冰草附加系; P 染色体; 多价体; 多态性

The Analysis of Cytogenetics and Molecular Markers on Wheat-*Agropyron* Addition Line II-21-2

YANG Guo-hui, YANG Xin-ming, WANG Rui-hui, LI Li-hui, GAO Ai-nong, LIU Wei-hua

(National Key Facilities for Crop Gene Resources and Genetic Improvement/Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081)

Abstract: The high frequency of multivalents was found in wheat-*Agropyron* addition line II-21-2 which was added(1·4)recombinant P chromosome of *A. cristatum* (L.) Beauv. The meioses of 10 different plants of wheat-*Agropyron* addition line II-21-2 were observed. The result showed that there was low-frequency of univalent in all plants and the abnormal chromosome synapses mainly were s and quadrivalents. 41% pollen-mother cells in 1-7-3 line hads, while 13% pollen-mother cells in 1-7-7 line had quadrivalents. The analysis of SSR primers from wheat showed that there was polymorphism in wheat genome or P genome of the different plants. Our results suggested that P chromosomes may influence the chromosome synapsis of wheat-*Agropyron* addition line II-21-2 and the molecular polymorphism and recombination of wheat-*Agropyron* addition line II-21-2 may be useful in genetic improvement of wheat.

Key words: wheat-*Agropyron* addition lines; P chromosome; multivalent; polymorphism

冰草属 (*Agropyron* Gaertn) 是小麦族中的一个多年生近缘种属, 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^[1-2]。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 染色体可能存在促进部分同源染色体联会的遗传系统^[2-8], 但究竟哪条 P 染色体起主要作用缺乏更进一步的研究。

收稿日期: 2009-05-04

修回日期: 2010-01-04

基金项目: 国家科技支撑计划 (2006BAD13B02)

作者简介: 杨国辉, 在读硕士, 研究方向为小麦染色体工程。E-mail: 1982417417@sohu.com

通讯作者: 刘伟华, 博士, 教授。E-mail: liuw@caas.net.cn

李立会等^[9-10]利用普通小麦 Fukuho 与四倍体冰草 [*A. cristatum* (L.) Beauv.] 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。中国农业科学院作物科学研究所作物种质资源研究中心小麦研究室(本实验室)在一整套小麦-冰草附加系中发现,只有附加了冰草(1·4)重组 P 染色体的附加系 II-21-2 的花粉母细胞减数分裂存在多价体的异常联会现象。本文对该附加系不同株系的花粉母细胞减数分裂进行细胞学观察与分子标记分析,为冰草 P 染色体可能具有促进部分同源染色体联会效应的推测提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

小麦-冰草二体附加系 II-21-2、亲本四倍体冰草 Z559 和附加系受体普通小麦 Fukuho,均由中国农科院作科所种质资源研究中心小麦室提供。附加系 II-21-2 所附加的 P 染色体因具有多个小麦 1 和 4 同源群的特异 SSR 标记被确定为(1·4)重组 P 染色体,附加系遗传稳定,且育性和结实率正常。

1.2 方法

1.2.1 花粉母细胞(PMC)减数分裂中期 I (MI) 染色体制片 选取小麦 4~5cm 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 48h,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。

1.2.2 原位杂交检测 原位杂交程序参照 Friebe 等^[11]和 Le 等^[12]的方法,分别采用冰草 P 基因组 DNA 以及质粒 pHvG39 作为检测冰草和小麦染色体的探针。质粒 pHvG39 是来自大麦微卫星序列的克隆,在小麦的 A、B、D 3 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,探针标定采用 Dig-Nick-Translation Mix、Bio-Nick-Translation Mix (Roche, Germany) 试剂盒,OLYMPUS AX80 荧光显微镜照相。

1.2.3 分子标记检测 结合本实验室以往的 SSR 标记筛选结果,共选用分布在小麦 7 个同源群上的 300 对 SSR 引物对附加系 II-21-2 不同株系进行检测,其中分布在第 1 同源群上的引物有 35 对,第 2 同源群 40 对,第 3 同源群 65 对,第 4 同源群 30 对,

第 5 同源群 60 对,第 6 同源群 31 对,第 7 同源群 39 对。引物由上海生工生物工程有限公司合成,以四倍体冰草 Z559、Fukuho 作对照。SSR 扩增反应体系为 20μl,其中 10 × PCR 缓冲液 2.0μl, dNTP 0.2mmol/L, Mg²⁺ 2mmol/L, 引物 0.25μmol/L, TaqDNA 聚合酶 1.25U,模板 DNA 70ng,在 PTC-200 扩增仪上进行。反应程序为:94℃ 预变性 5min; 94℃ 变性 1min, 50~60℃ 1min, 72℃ 延伸 1min, 35 循环; 72℃ 延伸 10min。SSR 扩增产物经 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,银染显影^[13]。

2 结果与分析

2.1 附加系 II-21-2 不同株系的细胞学鉴定

对附加系 II-21-2 的 10 个不同株系的幼穗花粉母细胞减数分裂进行细胞学观察与统计,结果见表 1 和图 1。附加系不同株系存在低频率的单价体;在株系 1-7-3 中发现了较高频率的六价体,统计的 44 个花粉母细胞中有 18 个细胞出现了六价体,六价体出现的频率为 41%;在株系 1-7-7 中,统计的 31 个花粉母细胞中有 4 个细胞出现了四价体,四价体出现的频率为 13%,株系 1-7-4 和 1-7-15 分别有低频率(3%)的花粉母细胞出现四价体或六价体。

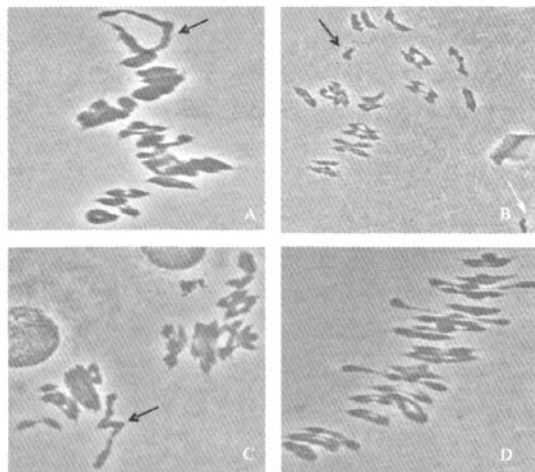


图 1 附加系 II-21-2 不同株系花粉母细胞减数分裂中期 I 染色体

Fig. 1 Chromosomes of meiotic metaphase I from different plants of II-21-2 addition line

A: 株系 1-7-3 减数分裂中期 I 六价体(箭头所示); B: 株系 1-7-1 减数分裂中期 I 单价体(箭头所示); C: 株系 1-7-7 减数分裂中期 I 四价体(箭头所示); D: 株系 1-7-11 减数分裂中期 I 无多价体

表 1 附加系Ⅱ-21-2 不同株系的花粉母细胞减数分裂统计
Table 1 Statistics of PMC meiosis in different plants of Ⅱ-21-2 addition line

| Ⅱ-21-2 株系 Ⅱ-21-2lines | 统计细胞数 Cell number | 平均每个细胞染色体数目 (The average chromosome number of per cell) | | | | | | 含多价体细胞数 Cells with multivalents |
|--------------------------|----------------------|---|-----------------|------------------|-------------------|-------------------------|-----------------------|------------------------------------|
| | | 单价体 I Univalent | 棒状二价体 Rod II | 环状二价体 Ring II | 二价体合计 Total II | 四价体 IV Quadrivalents | 六价体 VI Hexavalents | |
| 1-7-1 | 31 | 0.06 | 3.70 | 18.24 | 21.94 | | | |
| 1-7-2 | 30 | 0.13 | 4.30 | 17.57 | 21.87 | | | |
| 1-7-3 | 44 | 0.27 | 4.03 | 17.29 | 21.32 | | 0.41 | 18 |
| 1-7-4 | 31 | 0.06 | 4.28 | 17.63 | 21.91 | 0.03 | | 1 |
| 1-7-5 | 30 | 0.13 | 4.43 | 17.44 | 21.87 | | | |
| 1-7-6 | 34 | 0.12 | 4.58 | 17.30 | 21.88 | | | |
| 1-7-7 | 31 | 0.19 | 4.26 | 17.42 | 21.66 | 0.13 | | 4 |
| 1-7-8 | 30 | 0.07 | 4.30 | 17.63 | 21.93 | | | |
| 1-7-11 | 33 | 0.06 | 4.24 | 17.7 | 21.94 | | | |
| 1-7-15 | 33 | 0.24 | 4.60 | 17.13 | 21.73 | | 0.03 | 1 |

2.2 附加系Ⅱ-21-2 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,在小麦 B 染色体组着丝粒部位具有较强的杂交信号,检测表明两条 P 染色体能够很好的配对形成环状二价体,没有观察到涉及冰草染色体与小麦染色体的联会,多价体由小麦自身染色体形成,P 染色体没有参与多价体的构成(图 2)。

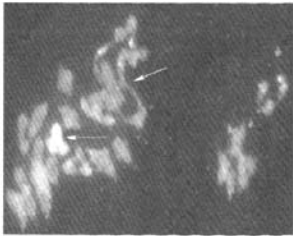


图 2 附加系Ⅱ-21-2 花粉母细胞减数分裂
中期 I GISH/FISH 检测
Fig.2 Identification of PMC meiotic metaphase
I in Ⅱ-21-2 addition line by GISH/FISH

检测 P 染色体的 P 基因组 DNA 标记为红色信号(左侧箭头所示),检测 B 组染色体的 pHvG39 标记为绿色信号,右侧箭头所示为六价体

2.3 分子标记检测

对附加系部分株系进行 SSR 标记分析,其中引物 *Barc44* (5D)、*Xgdm 3* (5B、5D)、*Xgdm 72* (3D)、*Xgdm 93* (2A、2B、4D)、*Xwmc 766* (1B)、*Xgwm161* (3D)、*Xgwm268* (1B) 和 *Xwmc662* (7B) 的扩增表现

明显的多态性,结果见表 2 和图 3。
表 2 附加系Ⅱ-21-2 不同株系 SSR 标记多态性检测
Table 2 The polymorphism detecting of different plants of Ⅱ-21-2 addition line by SSR primers

| SSR 标记 SSR markers | Z559 | Fukuho | 1-7-3 ^a | 1-7-7 ^a | 1-7-1 ^b | 1-7-11 ^b |
|--------------------------|------|--------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------|
| <i>Barc44</i> (5D) | + | + | + | + | + | + |
| <i>Xgdm3</i> (5B、5D) | | + | | + | | |
| <i>Xgdm72</i> (3D) | + | + | | + | | |
| <i>Xgdm93</i> (2A、2B、4D) | + | + | +, + | + | +, + | + |
| <i>Xwmc766</i> (1B) | + | + | + | + | | |
| <i>Xgwm161</i> (3D) | + | + | + | | + | + |
| <i>Xgwm268</i> (1B) | | + | + | + | | |
| <i>Xwmc662</i> (7B) | | + | + | | | + |

^a减数分裂异常株系,多价体频率较高;^b减数分裂正常株系;+^a、+^b分别表示冰草 Z559 和 Fukuho 的不同阳性扩增带
^adenoted the plant of abnormal meiosis,and the frequency of multivalents was high;^b denoted the plant of normal meiosis; +^a、+^b denoted the band of Z559 and Fukuho respectively

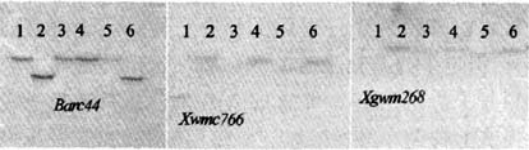


图 3 附加系Ⅱ-21-2 不同株系部分 SSR 标记检测
Fig.3 The detection of some plants of Ⅱ-21-2 addition line by SSR primers
1:冰草 Z559;2:Fukuho;3:株系 1-7-1;4:株系 1-7-3;5:株系 1-7-11;6:株系 1-7-7

标记 *Barc44* 在附加系Ⅱ-21-2 不同株系中扩增出冰草特异的差异条带,株系 3、4、5 能扩增出冰

草的条带,而株系 6 则不能扩增出冰草的条带。其他标记的差异更多的是表现在小麦染色体上,比如标记 *Xwmc766*、*Xgwm268* 在 Fukuho 和株系 4、6 中扩增出的条带不同于在株系 3、5 中扩增出的条带,而株系 4、6 的花粉母细胞减数分裂异常,出现较高频率的多价体。可见附加系 II-21-2 不同株系无论在花粉母细胞减数分裂方面是否存在异常,其分子标记均表现一定的多态性。

3 讨论

已有报道表明,在冰草中存在抑制小麦 *Ph* 基因遗传系统的作用^[1,6,7,15,17]。在小麦与沙生冰草(4x)、小麦与根茎冰草(4x)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^[5,7,14]。在小麦与西伯利亚冰草(*A. fragile*, 2n = 4x = 28)的杂种中,出现了接近六价体的构型^[15]。至于这种遗传系统是由 P 染色体组内哪条染色体控制以及这种抑制作用强度如何,目前的研究较少。

小麦-冰草二体附加系是本实验室于 1999 年前后陆续选育获得的,已连续套袋自交多年,附加系 P 染色体遗传稳定。细胞学检查发现在所有的附加系中,只有附加了(1·4)重组 P 染色体的附加系 II-21-2 在减数分裂过程中染色体联会异常,出现了较高频率的六价体和四价体,其他附加系没有高频率的多价体出现。其中六价体的出现可能涉及到 3 对染色体的联会。原位杂交结果表明,小麦-冰草附加系 II-21-2 没有涉及到冰草染色体与小麦染色体的联会,多价体的形成是小麦部分同源染色体联会和重组的结果。研究发现附加系 II-21-2 的不同株系虽在形态学表现未见差异,但是在染色体和分子水平存在遗传多样性,或具有一定的遗传分化。前人推测冰草中的两个 P 基因组可能是遗传上有修饰的两个 P 基因组,如 P1 和 P2^[16]。在本实验中也观察到附加系 II-21-2 中多价体频率较高的株系与减数分裂正常的株系在 P 染色体标记上存在差异,但更多的差异表现在小麦基因组上,这种染色体和分子标记的差异可能与该 P 染色体具有在一定程度上抑制小麦 *Ph* 基因的作用有关,而这种抑制作用较 *Ph* 基因缺失或突变的作用要弱,因而不足以引起小麦染色体与冰草 P 染色体发生联会。由于小麦部分同源染色体之间存在功能互补,因此上述遗

传重组现象对小麦遗传改良可能具有一定的意义。

参考文献

- [1] Chen Q, Jahier J, Cauderon Y. Production and cytogenetic studies of hybrids between *Triticum aestivum* (L.) Thell and *Agropyron cristatum* (L.) Gaertn [J]. C R Acad Sci Ser III-Vie, 1989, 308: 411-416
- [2] 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[J].中国科学(B辑),1990,20(5):492-496
- [3] 李立会,董玉琛,周荣华,等.普通小麦与冰草属间杂种的细胞遗传学及其自交可育性[J].遗传学报,1995,22(2):109-114
- [4] 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 [J]. Plant Breed, 1991, 106: 275-283
- [5] Chen Q, Jahier J, Cauderon Y. Intergeneric hybrids between *Triticum aestivum* and three crested wheatgrasses: *Agropyron mongolicum*, *A. michnoi* and *A. desertorum* [J]. Genome, 1990, 33: 663-667
- [6] Jauhar P P. Chromosome pairing in hybrids between hexaploid bread wheat and tetraploid crested wheatgrass (*Agropyron cristatum*) [J]. Hereditas, 1992, 116: 107-110
- [7] Li L H, Dong Y S. Hybridization between *Triticum aestivum* L. and *Agropyron michnoi* Roshev. I. Production and cytogenetic study of F₁ hybrids [J]. Theor Appl Genet, 1991, 81: 312-316
- [8] Limin A E, Foeler D B. An interspecific hybrid and amphiploid produced from *Triticum aestivum* crosses with *Agropyron cristatum* and *Agropyron desertorum* [J]. Genome, 1990, 33: 581-584
- [9] 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 [J]. 遗传学报, 1997, 24(2): 154-159
- [10] 李立会,杨欣明,周荣华,等.小麦-冰草异源附加系的创建. II. 异源染色质的检测与培育途径分析 [J]. 遗传学报, 1998, 25(6): 538-544
- [11] Friebe B, Jiang J, Gill B S, et al. Radiation-induced nonhomoeologous wheat-*Agropyron* intermedium chromosomal translocations conferring resistance to leaf rust [J]. Theor Appl Genet, 1993, 86(2-3): 141-149
- [12] 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 [J]. Plant Mol Biol Rep, 1989, 7: 150-158
- [13] Wu J, Yang X M, Li L H, et al. The introgression of chromosome 6P specifying for increased numbers of florets and kernels from *Agropyron cristatum* into wheat [J]. Theor Appl Genet, 2006, 114: 13-20
- [14] Li L H, Dong Y S. Production and cytogenetic study of interspecific hybrids between *Triticum aestivum* L. and *Agropyron desertorum* [J]. Sci China, 1991, 34: 421-427
- [15] 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 [J]. Plant Breed, 1991, 106: 275-283
- [16] Martin A, Cabrera A, Esteban E, et al. A fertile amphiploid between diploid wheat (*Triticum tauschii*) and crested wheatgrass (*Agropyron cristatum*) [J]. Genome, 1999, 42: 519-524
- [17] Li Y C, Korol A B, Fahima T, et al. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms [J]. Molecular Ecology, 2002, 11: 2453-2465

小麦-冰草附加系 II-21-2 的细胞遗传学与分子标记分析

作者: 杨国辉, 杨欣明, 王睿辉, 李立会, 高爱农, 刘伟华, YANG Guo-hui, YANG Xin-ming, WANG Rui-hui, LI Li-hui, GAO Ai-nong, LIU Wei-hua
作者单位: 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
刊名: 植物遗传资源学报 ISTIC PKU
英文刊名: JOURNAL OF PLANT GENETIC RESOURCES
年, 卷(期): 2010, 11(3)

参考文献(17条)

1. 李立会;李秀全;李培 小麦-冰草异源附加系的创建. I. F3、F2BC1、BC4和BC3F1世代的细胞学 1997(02)
2. Limin A E;Foeler D B An interspecific hybrid and amphiploid produced from Triticum aestivum crosses with Agropyron cristatum and Agropyron desertorum 1990
3. Li L H;Dong Y S Hybridization between Triticum aestivum L. and Agropyron michnoi Roshev. I, Production and cytogenetic study of F1 hybrids 1991
4. Jauhar P P Chromosome pairing in hybrids between hexaploid bread wheat and tetraploid crested wheatgrass (Agropyron cristatum) 1992
5. Chen Q;Jahier J;Cauderon Y Intergeneric hybrids between Triticum aestivum and three crested wheatgrasses: Agropyron mongolicum, A. michnoi and A. desertorum 1990
6. 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[外文期刊] 1991
7. 李立会;董玉琛;周荣华 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 1995(02)
8. 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 1990(05)
9. Li Y C;Korol A B;Fahima T Microsatellites: genomie distribution, putative functions and mutational mechanisms 2002
10. Martin A;Cabrera A;Esteban E A fertile amphiploid between diploid wheat(Triticum tauschii) and crested wheatgrass (Agropyron cristatum) 1999
11. 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[外文期刊] 1991
12. Li L H;Dong Y S Production and cytogenetic study of interspecific hybrids between Triticum aestivum L. and Agropyron desertorum 1991
13. Wu J;Yang x M;Li L H The introgression of chromosome 6P specifying for increased numbers of florets and kernels from Agropyron cristatum into wheat[外文期刊] 2006(1)
14. Le H T;Armstrong K C;Miki B Detection of rye DNA in wheatrie hybrids and wheat translocation stocks using total genomic DNA as a probe[外文期刊] 1989
15. Friebe B;Jiang J;Gill B S Radiation-induced nonhomoeologous wheat-Agropyron intermedium chromosomal translocations conferring resistance to leaf rust 1993(2-3)
16. 李立会;杨欣明;周荣华 小麦-冰草异源附加系的创建. II. 异源染色质的检测与培育途径分析 1998(06)
17. Chen Q;Jahier J;Cauderon Y Production and cytogenetic studies of hybrids between Triticum aestivum (L.) Thell and Agropyron cristatum(L.) Gaertn 1989

引证文献(1条)

1. 高海娟. 柴凤久. 刘泽东. 尤海洋. 刘学良 冰草属植物遗传多样性研究进展[期刊论文]-草业与畜牧 2011 (6)

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zwyczyxb201003010.aspx