

小麦抑制部分同源染色体 配对 (Ph 1)基因的研究

王新望¹ 赖菁茹² 宋希云¹ 孙 辉¹ 李保云¹ 刘广田¹

(1 中国农业大学植物科技学院, 北京 100094

2 河南省农科院小麦研究所, 郑州 450002)

摘 要 小麦育种的主要途径之一就是利用其近缘野生种的外源有益基因, 但由于普通小麦 5B 染色体长臂上存在抑制部分同源染色体配对 (Ph 1) 基因, 使得在普通小麦的远缘杂交中外源有益基因不能通过易位方式直接转移到普通小麦中。若使 Ph 1 基因发生突变或缺失, 这种直接遗传转移外源有益基因即可成为现实。通过对 Ph 1 基因的性质、作用机理及其突变体 ph 1b 基因的利用进行综述, 最后提出了 Ph 1 基因的分子生物学研究方向。

关键词 小麦 同源配对基因 (Ph 1) 直接遗传转移 分子标记

小麦是世界上重要的粮食作物之一。在现代农业系统下栽培小麦的遗传变异已越来越狭窄, 其产量和品质的育种进展已达到某一高原。普通小麦近缘野生种存在大量遗传变异, 将其中的有利基因转入普通小麦已成为一种有效的育种途径。但由于普通小麦与其近缘野生种杂交 F₁ 部分同源染色体难以有效配对而产生易位系, 因而近缘野生种的有益基因不能有效地转移到普通小麦的染色体上, 原因是这些亲本的基因组中存在控制染色体配对的基因。到目前为止, 已发现普通小麦三个同源群的染色体上及其近缘野生种基因组中存在许多这种控制配对基因。本文仅对其中作用最大、研究得最多的存在于普通小麦 5BL 上的 Ph 1 基因的研究结果进行综述。

1 Ph 1 基因的发现及其性质

早在 1957 年 Okamoto^[19] 首先发现普通小麦 (*T. aestivum*) 的 5B 染色体携带有抑制部分同源染色体配对的基因, 其后 Sears 和 Okamoto^[27] 及 Riley 和 Chapman^[23] 分别在密苏里和英格兰几乎同时独立证明这种抑制部分同源染色体配对的基因位于 5B 染色体的长臂上。1971 年 Wall 等^[28] 根据重组率测得该基因与着丝粒间约有 50 个遗传单位, 并命名为 Ph 基因 (即 pairing homologous gene)。后来在 3DS 上也发现了一个类似的弱的抑制部分同源染色体配

对基因^[25, 26, 28], 为了便于区别, 将 5BL 上的抑制基因称为 Ph1 基因, 而 3DS 上的制基因称为 Ph2 基因。

Ph1 基因为一显性基因, 主要作用是使多倍体小麦三个同源群染色体细胞学上类似于二倍体行为^[21], 即它抑制部分同源染色体配对而允许同源染色体正常配对, 这样减数分裂只有二价体形成, 使普通小麦象典型的同源多倍体。若 Ph1 基因发生突变或缺失, 则有少量部分同源染色体发生配对, 形成一个或几个多价体, 但小麦单倍体或其杂种若缺失该基因, 仍然抑制部分同源染色体配对^[23]。

2 Ph1 基因的剂量效应及其作用体系

上面已经知道 Ph1 基因的主要作用是抑制部分同源染色体配对而保证同源染色体正常配对, 然而, 最近有资料表明 Ph1 基因不仅抑制部分同源染色体配对, 而且超剂量也影响同源染色体配对^[29]。当 Ph1 基因不存在 (剂量为零) 时, 部分同源体染色体和同源染色体都能相互结合而配对; 当有一个剂量的 Ph1 基因时, 只有同源染色体能结合配对, 而部分同源染色体不能配对; 当有两个剂量的 Ph1 基因时, 同源染色体配对基本上不受影响, 但部分同源染色体发生分离; 当 Ph1 基因超过两个剂量时, 同源染色体在减数分裂前凝聚导致其距离增加而影响配对, 这时会形成互锁的二价体 (interlocking bivalent) 在 5B 二体植株中, 两个剂量的 Ph1 基因的作用可能被 5AL 和 5DL 上的部分同源等位基因所抵消, 因而只抑制部分同源染色体配对, 但 Ph1 基因超过两个剂量时, 5AL 和 5DL 上的部分同源等位基因不能完全抑制 Ph1 基因的作用, 因而同源染色体配对受到影响, 不过偶然也会出现多价体和异形二价体 (heteromorphic bivalent)^[7, 13]。Ph1 基因的这种剂量效应在 5B 二体及等臂的 5BL 二体和三体减数分裂偶线期和粗线期即能表现出来^[17]。

Ph1 基因的作用除了与其自身的剂量有关外, 还表现与其它染色体上的控制配对基因间的相互作用。在普通小麦三个同源群中除了 5BL 上的 Ph1 基因外, 还在其它染色体上发现了别的控制配对基因, 如 5AL 和 5DL 上的促进配对基因^[12], 3DS^[18] 和 3AS^[6] 上的弱抑制配对基因以及第 5 同源群染色体短臂^[12, 18] 和第 3 同源群染色体长臂^[6] 上的促进配对基因。所有这些促进配对基因与抑制配对基因并不是相互独立控制染色体配对的, 而是相互作用的, 因此, 小麦染色体配对的控制实际上是一整套遗传体系, 在这个体系中, Ph1 基因是主导基因, 但普通小麦染色体配对控制取决于这些抑制基因 (5BL, 3DS 和 3AS 上) 和促进基因 (5AL, 5DL, 5AS, 5BS, 5DS, 3AL, 3BL 和 3DL 上) 之间的平衡^[11]。当然, 已经证实小麦近缘种的基因组中也存在许多调控配对的基因^[1], 有研究结果表明这些调控配对基因与小麦染色体上的配对基因之间也存在相互作用, 例如 Dvorak^[9] 发现 *T. speltoides* 4D 上有促进部分同源染色体配对的基因, 而且可能有两个基因, 有人^[5] 证实这些基因对普通小麦 5BL 上的 Ph1 基因有上位性, 故命名为 Ph¹, 即使在 Ph1 基因存在的情况下, Ph¹ 基因也能使部分同源染色体配对, 并比 Ph1 基因突变体 (见下述) 及 5B 缺体更容易使外源有益基因转移到普通小麦染色体上。

此外, Ph1 基因的作用还与环境条件有关, 尤其是与温度的关系更为密切, 在常温下 (15~30℃), 二个剂量的 Ph1 基因抑制部分同源染色体配对; 然而当温度达到 30℃ 以上时, 同样是两个剂量的 Ph1 基因则能促进部分同源染色体配对; 而当温度低于 15℃ 时, Ph1 基因的作用

几乎不明显。最近还发现一些抗纺锤丝微管蛋白化学药物也具有 Ph1基因的作用^[11]。

3 Ph1基因的作用方式

Ph1基因是怎样抑制部分同源染色体配对的?直到现在还没有公认的合理解释,仅有几种假设试图解释 Ph1基因的作用方式。

1960年 Riley^[21]首先提出 Ph1基因的作用是降低染色体配对能力,他认为部分同源染色体彼此间的吸引力小于同源染色体,当 Ph1基因存在时,部分同源染色体就不能有效接近而配对,然而同源染色体却能相互配对。但这种假设不能解释某些部分同源染色体偶然聚合在一起而发生配对的事实。后来 Riley^[22]根据同源染色体和部分同源染色体配对在减数分裂前期发生分离这一观点提出“两步”染色体配对假设。第一步(即吸引阶段)不管染色体间有无同源关系均可能结合在一起,而第二步(配对阶段)只有同源染色体才能精确配对。根据这一假设 Ph1基因就是通过调节第一步的有效时间而起作用的。Upadhyia和 Swaminathan认为 Ph1基因有利于染色体的浓缩,当 Ph1基因缺失时,染色体浓缩的程度和速度下降,从而使部分同源染色体有时间相互靠近而发生配对^[3],但到目前为止还没有找到这方面的实验证据。Feldman等^[12]认为 Ph1基因对部分同源染色体配对的抑制作用是通过体细胞染色体联会实现的。有证据表明这种作用发生在减数分裂前的有丝分裂期^[30]。在体细胞里,部分同源染色体不象同源染色体那样紧密排列在一起,但比非同源染色体间的排列要紧密些,这种排列顺序正是由 Ph1基因决定的。这种假设为后来的一些实验结果所证实,如 Driscoll等^[7]发现同源染色体在减数分裂的配对取决于减数分裂前的结合,我国学者吴兰佩^[3]利用重双端体(Double-Difelo-centrics)3A、3B、3D和5A、5B、5D等与春黑麦杂交发现 F₁减数分裂染色体配对也是以体细胞联会为基础的。但后来 Driscoll等^[8]提出相反看法,认为 Ph1基因在有丝分裂并不起作用,而是在减数分裂前期I使多价体发生分离。

因此,可以将以上各种假设归纳为两类:一类假设认为 Ph1基因只在联会开始之后发生作用,从而影响联会和交叉的过程^[8,17];另一类假设认为 Ph1基因在联会开始之前影响同源染色体和部分同源染色体的凝集,从而控制配对的整齐性和配对方式^[13]。由此看来,Ph1基因发生作用的时间是一个争论的焦点,其作用方式还有待进一步用实验手段来证实,但有一点是可以肯定的,那就是 Ph1基因并不仅仅是影响配对本身,而是通过其它方式发生作用而影响配对。

4 Ph1基因的一些突变体

自从 Ph1基因发现以来,人们希望在普通小麦利用外源有益基因的远缘杂交中利用 Ph1基因,这就要设法改造此基因,因为 Ph1基因若发生突变或缺失即表现隐性,失去了 Ph1的抑制作用,使部分同源染色体发生配对,从而实现外源基因以易位方式直接转移到普通小麦中。

为了获得 Ph1基因的突变体,Okamoto首先用 X 射线处理小麦去雄穗子,并授以黑麦花粉,杂种后代有 3.42% 的个体发生部分同源染色体配对,他认为这是 Ph1基因缺失的结果,但未能诱导染色体加倍以获得该缺失突变体^[3]。后来,Wall和 Riley^[28]用 EMS 处理小麦种子,再

以黑麦授粉, 成功地获得一个突变体, 认为该突变发生于 Ph1 基因位点上并将该突变体命名为 $ph1a$ 它能诱导种间杂种中等程度的部分同源染色体配对。Sears^[24]用 X 射线处理六倍体小麦中国春 (CS), 得到两个不同的突变体, 经细胞学鉴定, 一个为 5BL 上 Ph1 基因缺失突变体, 称为 $ph1b$, 另一个为 3DS 上 Ph2 基因的缺失突变体, 称为 $ph2$ 后来根据基因定位, 确证 Wall 等的 $ph1a$ 突变体和 Sears 的 Ph2 突变体属于 Ph2 基因不同位点的突变, 并重新命名为 $ph2a$ 和 $ph2b$ 基因^[26]。Giorgi 和 Barbera^[16]采用同样的方法在四倍体小麦品种“Capelli”中也获得一个突变体 Ph1c Dvorak 等^[10]认为这可能是由于染色体不对等交换的结果 已经证明 $ph1b$ 和 Ph1c 分别是 Ph1 基因两个位点的中间缺失^[15]。

到目前为止, 所有这些突变体都被证明能不同程度地诱导部分同源染色体配对, 但其程度大小如何? Sears^[25]在不同条件下比较研究了 $ph1b$ $ph2a$ 和 $ph2b$ 三个突变体小麦与粘果山羊草 (*Ae. kotschy i*) 杂交 F₁ 染色体配对程度, 发现 $ph1b > ph2a > ph2b$ 但叶兴国等^[4]在相同条件下比较这三个突变体分别与黑麦、粘果山羊草、易变山羊草、卵穗山羊草和小伞山羊草杂交 F₁ 染色体配对情况, 发现 $ph1b > ph2b > ph2a$ 这说明 $ph1b$ 基因在诱导普通小麦与这些近缘种杂交染色体配对的作用最大。至于说 $ph2b$ 和 $ph2a$ 的诱导作用大小, 不同试验有不同结果, 一方面可能是不同作者的杂交方式及试验的环境条件不同, 另一方面所用的试验材料的遗传背景也可能有很大关系。当然叶兴国等^[4]还同时发现这些突变体与离果山羊草杂交染色体配对顺序是 $ph2b > ph2a > ph1b$ 不过 $ph2b$ 和 $ph2a$ 诱导部分同源染色体配对的程度也很低; 与中间偃麦草、柱穗山羊草、粗厚山羊草杂交 F₁ 染色体配对程度顺序是 $ph2b > ph1b > ph2a$, 说明遗传背景对染色体配对影响较大。因此, 要从不同的近缘种中转移有益基因, 可利用不同的突变体。

5 $ph1b$ 基因在外源有益基因转移中的利用

利用近缘野生种的有益基因是目前小麦产量和品质育种的有效途径之一。在小麦的远缘杂交中首先要设法排除 Ph1 基因的抑制作用, 国内外主要是应用 Ph1 和 Ph2 基因的几个突变体, 其中应用最多的还是 $ph1b$ 基因。

利用 $ph1b$ 基因转移外源有益基因有两种主要方法。其中之一是间接遗传转移, 这种方法首先要获得异附加系或异代换系, 再培育易位系, 其主要缺点是工作量大, 程序繁琐, 周期较长。另一种方法是直接遗传转移, 即用中国春 $ph1b$ 突变体与野生种杂交, 再用中国春回交, 通过易位方式将野生种的有益基因转移到普通小麦中。樊路等^[2]用中国春小麦与中国春 $ph1b$ 突变体 \times *Ae. turcomanica* 的 F₁ 回交, 第一次成功地把 *Ae. turcomanica* 的抗白粉病基因转移到普通小麦中, 从而证实利用 $ph1b$ 突变种从山羊草属的一些种“直接遗传转移”有益基因到普通小麦中的可能性。

尽管如此, 这种直接遗传转移实践上仍然面临三个主要困难: (1) 普通小麦与其近缘种属间杂交比较困难; (2) 即使杂交成功, 杂种 F₁ 中双亲的部分同源染色体配对程度较低; (3) 最大的困难就是杂种 F₁ 回交结实困难。为了克服这三个方面的困难, 樊路等^[2]利用带有太谷核不育基因 (Ta1) 的普通小麦与中国春 $ph1b$ 突变体杂交, 再用中国春 $ph1b$ 突变体连续回交, 成功地培育出了中国春 Ta1 $kr ph1b$ 基因综合体。这三个基因能完全独立作用, 互不干扰, kr 基因是普通小麦中国春第 5 同源群染色体上的可交配基因, 有 $kr1$ $kr2$ 和 $kr3$ 三个基因, 分别位于

5B 5A 和 5D 上^[12]。该综合体的培育成功,可以有效地解决上面三个困难中的前两个困难,但第三个困难仍然需要做大量回交,而中国春 *Talkr ph 1b* 基因综合体为回交提供了便利条件。利用中国春 *Talkr ph 1b* 综合体在不用人工去雄的情况下与山羊草属和偃麦草属的一些种杂交,再用中国春回交已获得普通小麦-山羊草属和普通小麦-偃麦草属染色体易位系^[2]。实践证明,与间接遗传转移相比,直接遗传转移不仅节省大量劳力,而且时间至少要少花 4~5 年。而利用中国春 *Talkr ph 1b* 综合体是一个极有潜力的远缘杂交及外源有益基因转移的工具。

6 利用分子标记对 *Ph1* 基因进行分子生物学研究

分子生物学在谷类作物改良中的应用一直很慢,但最终还是被接受了,其中最近几年比较热门的课题是利用分子标记进行植物育种,常用的有 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism, 即限制性片段长度多态性)、RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA, 即随机扩增多态性 DNA) 和 AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism, 即扩增片段长度多态性) 等。对小麦 *Ph1* 基因进行分子操作首先要对该基因进行定位,构建 *Ph1* 基因区的遗传图谱,从而发现与该基因紧密连锁的分子标记,最终目的是利用分子生物学手段获得 *Ph1* 基因的突变体,并用分子标记快速鉴定分离群体中的 *ph1b* 个体,从而加快育种进程。

Sears^[24]通过端着丝粒或具多态性的 C 带分析,估计 *Ph1* 基因距离着丝粒 1~5 μ m 处,后来 Sears^[26]根据重组率测得 *Ph1* 基因距离着丝粒大约 1 μ m。Gill 等^[14]利用来自 *Ae squarrosa* 的 *Pst*I 基因组 DNA 文库的一个探针 *Xksu S1-5* 检测到了 *Ph1b* 和 *ph1c* 在 *Ph1* 基因上的缺失 DNA 片段,这说明 *Ph1* 基因位点内有 *Xksu S1-5* 的同源序列。1993 年 Gill 等^[15]利用 20 个探针对 5BL 的 C 带进行原位分子杂交,有三个探针即 *Xksu S1*、*Xpsr128* 和 *Xksu75* 能检测到 *ph1b* 在 5BL 上的缺失片段,与 C 带比较,推测 *Xksu S1* 位于 *ph1b* 的缺失染色体片段上,而 *Xpsr128* 和 *Xksu75* 在 *Ph1* 基因两侧,前者距着丝粒较近,后者距着丝粒较远,而 *Xksu S1* 与 *Xksu75* 之间的距离 1.8 μ m,推算 *Ph1* 基因大小在 3 Mb 以内。

找到了合适的分子标记 (如 *Xksu S1*), 通过染色体步行来克隆 *Ph1* 基因就有可能成为现实,但由于 *Ph1* 基因较大 (约 3 Mb), 且还不知道其翻译产物,这样克隆 *Ph1* 基因相对较困难,但应用近等基因系 (NIL) 通过“反向遗传学”方法^[20]克隆 *Ph1* 基因应是可行的。我们实验室正着手这方面的研究。与此同时我们正试图通过细胞遗传学方法按照染色体工程操作技术将中国春的 *ph1b* 基因转移到大田栽培的冬小麦品种中,以期更好地利用 *ph1b* 基因来有效地转移普通小麦近缘野生种的有益基因。因为目前国内外应用 *ph1b* 基因转移外源有益基因都是以中国春为遗传背景的,而中国春小麦属春性,且农艺性状较差,不利于大田利用。因此,通过染色体工程技术或分子生物学技术创造一个冬小麦的优良 *ph1b* 系是一个很有前途的研究课题。

参 考 文 献

- 1 樊路,韩敬花. 普通小麦近缘种属中的控制染色体配对基因. 北京农业科学, 1994 12(1): 9~10
- 2 樊路,韩敬花,邓景扬等. 中国春 *Talkr ph 1b* 综合体的培育、鉴定及在外源基因导入中的作用. 中国科学 (B 辑), 1989, (11): 1156~1160

- 3 吴兰佩. 小麦的 Ph 基因及其应用. 遗传, 1986 8(1): 6~ 8
- 4 叶兴国, 樊路. ph1b ph2a ph2b 基因在小麦与卵穗山羊草、小伞山羊草、离果山羊草 F₁ 杂种中的作用. 作物杂志, 1993 (1): 16~ 17
- 5 Chen DP, Tsujimoto H, Gill BS. Transfer of Ph¹ genes promoting homeologous pairing from *Triticum speltoides* to common wheat. Theor Appl Genet, 1994 88: 97~ 101
- 6 Driscoll JC. Minor genes affecting homeologous pairing in hybrids between wheat and related genera. Genetics, 1973, 74: 566
- 7 Driscoll JC, Darvey JN. Chromosome pairing effect of colchicine on an isochromosome. Science (Washington), 1970 167: 290~ 291
- 8 Driscoll JC, Bieligm L, Darvey N L. An analysis of frequencies of chromosome configurations in wheat and wheat hybrids. Genetics, 1979 91: 755~ 767
- 9 Dvorak J. Genetic variability in *Aegilops speltoides* affecting homeologous pairing in wheat. Can J Genet Cytol, 1976 14: 371~ 380
- 10 Dvorak J, Chen CK, Giorgi B. The C-banding pattern of a Ph-mutant of durum wheat. Can J Genet, 1984 26: 360~ 363
- 11 Feldman M. Cytogenetic activity and mode of action of the pairing homeologous (Ph1) gene of wheat. Crop Sci, 1993 33: 894~ 897
- 12 Feldman M. The effect of chromosomes 5B, 5D and 5A on Chromosomal pairing in *Triticum aestivum*. Proc Natl Acad Sci USA, 1966 55: 1447~ 1453
- 13 Feldman M, Aivi L. Genetic control of bivalent pairing in common wheat: the mode of Ph1 action. Kew Chromosome Conference III, HMSO, Royal Botanic Gardens, 1988: 269~ 279
- 14 Gill SK, Gill SB. A DNA fragment mapped within the submicroscopic deletion of Ph1, a chromosome pairing regulator gene in polyploid wheat. Genetics, 1991, 129: 257~ 259
- 15 Gill KS, Gill BS, Endo TR, et al. Fine physical mapping of Ph1, a chromosome pairing regulator gene in polyploid wheat. Genetics, 1993, 134: 1231~ 1236
- 16 Giorgi B, Barbera F. Increase of homeologous pairing in hybrids between a ph mutant of *T. turgidum* L. var *dum* and two tetraploid species of *Aegilops*. *Ae. kotschy* and *Ae. cylindrica*. Cereal Res Commun, 1981, 9: 205~ 211
- 17 Hobolth R. Chromosome pairing in allohexaploid wheat var Chinese Spring: transformation of multivalents into bivalents: a mechanism for exclusive bivalent formation. Carlsberg Res Commun, 1981, 46: 129~ 173
- 18 Melb-Sampayo T. Compensated monosomic 5B-trisomic 5A plants in tetraploid wheat. Can J Genet Cytol, 1972 14: 463~ 475
- 19 Okamoto M. A synaptic effect of chromosome V. Wheat Inf Serv, 1957, 5: 6
- 20 Orkin HS. Reverse genetics and human disease. Cell, 1986 47: 845~ 850
- 21 Riley R. The diploidization of polyploid wheat. Heredity, 1960 15: 407~ 429
- 22 Riley R. The basic and applied genetics of chromosome pairing. In: Proc of the 3rd Intl Wheat Genet Symp. Australian Academy of Science, Canberra, 1968: 185~ 195
- 23 Riley R, Chapman V. Genetic control of the cytologically diploid behaviour of hexaploid wheat. Nature (London), 1958 182: 713~ 715
- 24 Sears RE. An induced mutant with homeologous pairing in common wheat. Can J Genet Cytol,

- 1977, 19: 585– 593
- 25 Sears RE. A wheat mutation conditioning an intermediate level of homoeologous chromosome pairing. *Can J Genet Cytol* 1982, 24: 715– 719
 - 26 Sears RE. Mutations in wheat that raise the level of meiotic chromosome pairing. In: Gustafson PJ (ed) *Gene manipulation in plant improvement*. Stadler Genetics Symposium, 16th Plenum Press, New York, 1984
 - 27 Sears ER, Okamoto M. Intergenomic chromosome relationships in hexaploid wheat. In: *Proc Tenth Intl Congr Genet* 1958, Vol 2: 258– 259
 - 28 Wall MA, Riley R, Gale DM. The position of a locus on chromosome 5B of *Triticum aestivum* affecting homoeologous meiotic pairing. *Genet Res Camb* 1971, 18: 329– 339
 - 29 Wang R, R-C. Understanding the effect of the Ph gene of wheat on chromosome pairing and its implications. In: Kimber (ed) *Proc Intl Symp on Chromosome Eng in Plants*. 2nd Columbia, 1990, 259– 263
 - 30 Yacobi YZ, Levany H, Feldman M. An ordered arrangement of bivalents at first meiotic metaphase of wheat. *J Hexaploid Wheat Chromosome* 1985, 9: 347– 354

Studies on the Pairing Homoeologous(Ph1) Suppressor Gene in Common Wheat

Wang Xinwang Song Xinyun Sun Hui Li Baoyun Liu Guangtian

(College of Plant Science and Technology, China Agricultural University, Beijing 100094)

Abstract One of the ways of wheat breeding is using desirable alien genes transferred from distantly-related species into wheat. But it is very difficult to directly transfer these alien genes into wheat by translocation because of the presence of Ph1 (Pairing homoeologous) gene that is located on the long arm of chromosome 5B in common wheat. This direct transfer method will be valuable if using the mutant that is deleted in Ph1 gene. The characters and interaction mechanisms of Ph1 gene and the usage of the mutant ph1b arose from a submicroscopic deletion in Ph1 gene are reviewed. The future outlook for the studies of molecular biology of Ph1 gene in wheat is also discussed.

Key words Common wheat Pairing homoeologous (Ph1) gene Direct genetic transfer Molecular marker