

节节麦 D 染色体组特异 RAPD 标记(简报)

孙其信

(中国农业大学植物遗传育种系,北京 100094)

J. D. Procnier T. Aung

(Winnipeg Research Centre, Agriculture Canada, Winnipeg, R3T 2M9)

Identification of D-Genome Specific RAPD Markers in *Triticum tauschii*

Sun Qixin

(Dept. of Plant Genetics & Breeding, CAU, Beijing 100094)

J. D. Procnier T. Aung

(Winnipeg Research Centre, Agriculture Canada, Winnipeg, R3T 2M9)

节节麦(*Triticum tauschii*, $2n=14, DD$)被认为是普通小麦(*Triticum aestivum*, $2n=42, AABBDD$)D 染色体组的供体,节节麦具有许多对小麦育种有益的性状,如抗病虫,优质等,这些有利性状可通过有性杂交直接导入普通小麦中,因此,节节麦是小麦遗传改良十分有价值的近缘种质。

建立重要育种目标性状的分子标记是开展标记辅助选择育种的基础。RAPD 是利用 PCR 扩增技术和单一随机引物检测核酸多态性的分子标记技术,由于其操作简单,快速,所需 DNA 数量少,因此用于标记辅助选择有独特的用途。目前 RAPD 技术已应用于构建连锁图,品种鉴别,遗传差异评价,植物分类以及标记基因等。Devos 和 Gale 利用中国春缺体一四体系(NT)和双端体系(DT)鉴定出位于小麦 4 条染色体上的 RAPD 标记。Wang 等利用硬粒小麦 Langdon 的 D 染色体组二体代换系以及中国春双端体系将 11 个 RAPD 标记定位在 9 条染色体上。

由于节节麦具有一系列有益基因可以用于小麦改良,本研究利用硬粒小麦和节节麦与硬粒小麦杂交人工合成的六倍体小麦来鉴定节节麦 D 染色体组特异的 RAPD 标记,为进一步建立节节麦有益性状的分子标记奠定基础。

供试材料为硬粒小麦品种 St63($2n=28, AABB$),硬粒小麦与节节麦杂交人工合成的六倍体小麦($2n=42, AABBDD$)和二者杂交获得的五倍体($2n=35, AABB$),上述材料均经过细胞学验证。

(下转第 42 页)

收稿日期: 1995-12-05

(上接第34页)

DNA 提取:取鲜叶在冷冻干燥器中干燥过夜,放在-20℃冷库中备用。冷冻干燥的叶片在15 mL 离心管中粉碎后加6 mL 预热(65℃)CTAB 提取缓冲液(27.5 mL 1.0 mol/L Tris-HCl, pH 8.7, 27.5 mL 0.5 mol/L EDTA, pH, 8.0, 77.0 mL 5.0 mol/L NaCl, 27.5 mL 10% CTAB, 90.5 mL 无离子水), 30 μL 1%蛋白酶 K 和 660 μL 的 20%SDS, 倒置离心管数次使之混匀后在65℃水浴中保温2 h, 其间要倒转离心管数次, 取出离心管冷却至30℃左右, 加入约5 mL 氯仿/异戊醇(24/1), 水平低速振荡20 min, 在6000 转/分离心20 min, 取出上清液, 加入上清液 2/3 体积的异丙醇沉淀 DNA, 用细玻璃棒绕出沉淀 DNA, 用70% 预冷乙醇冲洗2~2次, 用无离子水稀释。

DNA 扩增及琼脂糖凝胶电泳:采用热启动 PCR 技术用 Perkin-Elmer Thermal Cycler 480 进行 PCR 扩增, 反应总体积 50 μL。在 0.5 mL 离心管中加入 14 μL 底部反应液, 底部反应液含 1 μL 10 X PCR 缓冲液(0.50 mol/L KCl, 100 mmol · L⁻¹ Tris-HCl, pH 9.0 和 1% Triton X-100), 3 μL 25 mmol · L⁻¹ MgCl₂, 5 μL 2.5 mmol · L⁻¹ 每种 dNTP 和 5 μL 引物(10 ng/μL), 加入适量蜡, 将离心管加热到 78℃ 12 min, 等蜡融化后冷却后加入上部反应液。上部反应液(36 μL)含 4 μL 10 X PCR 缓冲液, 4 μL 模板 DNA(20 ng/μL), 0.5 μL Taq 酶(5 单位/μL)和 29 μL 无离子水。扩增前在 94℃ 融蜡和初始变性 3 min, PCR 扩增 45 循环, 每循环在 94℃ 变性 1 min, 35℃ 退火 2 min, 72℃ 延伸 2 min, 最后一个循环结束后, 在 72℃ 延伸 10 min。扩增产物用 1.4% 琼脂糖凝胶电泳分离, 溴化乙锭染色, 在紫外检测仪上观察照相。

利用 116 个 UBC+ 聚体随机引物进行 PCR 扩增, 发现有 10 个引物(附表)扩增产物在硬粒小麦(AABB)和人工合成的六倍体小麦(AABBDD)之间可检测到多态性, 用这 10 个引物共扩增出 47 条带, 其中 12 条带为节节麦 D 染色体组特异 RAPD 标记, 片段长度在 558 bp ~ 1412 bp 之间, 上述引物都进行了 2 次以上扩增均能检测到这 12 个特异 RAPD 标记。

由于这些 RAPD 标记是节节麦染色体特异的, 今后可以定位在节节麦连锁图上, 并用来标记节节麦有关基因。另外, 在五倍体(AABB)和六倍体(AABBDD)之间扩增产物没有差异, 说明 RAPD 不存在剂量效应。

本研究所筛选的 116 个引物中只有约 9%(10 个)引物能扩增节节麦 D 染色体特异 RAPD 标记, 其余 106 个引物扩增产物在硬粒小麦(AABB)和人工合成的六倍体小麦(AABBDD)之间不存在多态性, 这可能是由于这些引物扩增 A, B 染色体组特异片段, 也可能是由于 D 染色体组与 A 或 B 染色体部分同源性所致, 在这 3 个染色体中都能扩增出片段长度相同的序列。

附表 能扩增节节麦 D 染色体组特异 RAPD 标记的引物及 D 染色体特异 RAPD 标记

引物	序列(5'-3')	扩增带数	多态性带数	片断长度(bp) *
UBC721	CCCTTCCCTC	4	1	1037
UBC723	CCCTCTCCTC	3	1	660
UBC741	CCTCCCTCTC	3	1	558
UBC742	CCTCCCTCCT	7	2	817, 683
UBC768	TCCCTCCTCC	3	1	1062
UBC787	CCCTTCTTCC	6	1	1315
UBC788	CCTTCCCTCT	6	1	1412
UBC792	CAACCCACAC	5	1	1315
UBC796	AGAGGGAGGA	5	2	920, 743
UBC514	CGGTTAGACG	5	1	798

* 片断长度为估计值