

偃麦草 E 染色体组特异 RAPD 和 SCAR 标记的建立

尤明山* 李保云 唐朝晖 刘守斌 宋健民 毛善锋 刘广田

(中国农业大学 作物学院, 北京 100094)

摘要 用 100 条 10 碱基随机引物, 以普通小麦中国春、中间偃麦草为材料进行 RAPD 分析, 筛选到一个偃麦草染色体组特异引物 OPF03, 并从中间偃麦草中克隆了该引物的特异 DNA 片段 OPF03₁₂₉₁。将该片段与比萨偃麦草中的 OPF03₁₂₉₆ (GenBank 序号 U 43516) 比较, 同源性为 88%。根据 OPF03₁₂₉₁ 的序列, 设计了 2 对 SCAR 引物, 利用 OPF03 和引物 P3、P4 对普通小麦、普通小麦-中间偃麦草的部分双二倍体、长穗偃麦草、中间偃麦草、小麦-二倍体长穗偃麦草代换系、附加系共 6 类材料进行了 RAPD 和 SCAR 分析, 发现 RAPD 标记 OPF03₁₂₉₁ 没有出现在含 E^c 染色体组的材料中, 而标记 SCAR₉₈₂ 则出现于所有含 E 染色体组的材料中。说明, 根据 E^b 染色体组特异 RAPD 标记转化的 SCAR 标记, 可以同时检测小麦背景下的 E^c 染色体。

关键词 偃麦草; 染色体组; RAPD; SCAR

中图分类号 S512

Establishment of E-Genome-Specific RAPD and SCAR Markers for *Thinopyrum* spp

You Mingshan Li Baoyun Tang Zhaohui Liu Shoubin Song Jianmin

Mao Shanfeng Liu Guangtian

(College of Crop Science, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract A total of 100 decamer oligonucleotides were used as primers to perform random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis on *Triticum aestivum* var. Chinese Spring and *Thinopyrum intermedium*. Out of these primers, one could amplify a specific DNA fragment in the accession SZ of *Th. intermedium*. This fragment, OPF03₁₂₉₁, was cloned and sequenced. Sequence data searching in GenBank showed that this fragment had a homologous degree of 88% to a RAPD marker OPF03₁₂₉₆ (GenBank accession U 43516) in *Th. bessarabicum*. Based on the sequence of OPF03₁₂₉₁, two pairs SCAR primers were designed. With OPF03 and primers P3 and P4, RAPD and SCAR analyses were performed on *T. aestivum*, *T. aestivum*-*Th. intermedium* partial amphidiploid, *Th. elongatum*, *Th. intermedium*, wheat-*Th. elongatum* substitution and addition lines. The results of PCR amplification showed that the RAPD marker was not appeared in materials with genome E^c, whereas SCAR marker was appeared in all E-genome possessed materials. The SCAR marker derived from the E^b-genome-specific RAPD fragment could be used in the meantime to detect the chromosome of E^c genome under common wheat background.

Key words *Thinopyrum* spp.; genome; RAPD; SCAR

根据染色体组分类体系, 原来属于冰草属 (*Agropyron*)、偃麦草属 (*Elytrigia*) 和类麦属 (*Lophopyrum*) 中含 E 染色体组的大约 25 个种组成薄冰草属 (*Thinopyrum*)^[1]。由于分类体系

收稿日期: 2002-02-25

国家自然科学基金重点资助项目 (39930110) 和北京市自然科学基金重大资助项目 (6990001)

* 尤明山, 博士, 研究方向为小麦品质育种。北京圆明园西路 2 号

的差别,偃麦草属物种常常应用不同的学名。我国小麦族植物的分类体系中,该属物种的中文名仍然使用“偃麦草”,而学名在不同文献中仍有 *Elytrigia* 和 *Thinopyrum* 之别^[2,3]。该属植物中,十倍体长穗偃麦草(*Th. ponticum*)和六倍体中间偃麦草(*Th. intermedium*)是应用于小麦遗传改良最成功的2个种,人们从中获得了多个抗秆锈、叶锈及黄矮病基因,并选育了一批附加系、代换系、易位系材料及一些优质、抗病、丰产小麦新品种^[4-7]。

建立在PCR扩增基础上的RAPD技术具有操作简单、模板DNA用量少、要求纯度低、扩增产物多态性高、经济快捷等优点,因而被广泛应用于遗传多样性分析、分子标记辅助育种、品种鉴定、基因定位及遗传图谱构建等多个研究领域^[8,9]。而将RAPD标记转化为SCAR标记后,其特异性和稳定性均大幅度提高,可以更方便快捷地应用于异源染色体的检测^[10]。

本试验筛选,获得了E染色体组特异RAPD标记,将其转换为SCAR标记后,对不同来源的长穗偃麦草(*Th. elongatum*)和中间偃麦草(*Th. intermedium*)进行了标记鉴定。

1 材料和方法

1.1 植物材料

普通小麦(*Triticum aestivum*)品种中国春和京411来源于本研究室。普通小麦-中间偃麦草部分双二倍体中2和中间偃麦草(SZ)由山西农科院孙善澄先生提供。长穗偃麦草(RM 1119, RM 1123, RM 1935)和中间偃麦草(RM 1130, RM 1937, RM 1938, RM 1940, RM 1941, RM 1942, RM 1943, RM 1944, RM 1948)引自中国农科院品种资源研究所。

长穗偃麦草(*Elytrigia elongata*) (P I179162, P I251443, P I276709, P I308591, P I308592, P I380626, P I469212, P I547326)引自美国国家植物种质库。

长穗偃麦草901由中科院遗传所贾旭先生惠赠。

中国春-二倍体长穗偃麦草代换系DS1E (1A、1B、1D), DS2E (2A、2B、2D), DS3E (3A、3B、3D), DS4E (4A、4D), DS6E (6A、6B、6D), DS7E (7A、7B、7D)由中科院遗传所李振声院士提供;附加系DA1E-DA7E由西北农林科技大学吉万全先生提供。

1.2 实验方法

1.2.1 DNA提取 用幼苗叶片提取,参照Saghai-Maroof CTAB方法略加改动。

1.2.2 RAPD分析 RAPD扩增引物为上海生工公司合成的10碱基核苷酸,100条引物分别对应Operon D、E、F、G、J引物组。反应体系为1×PCR Buffer, MgCl₂ 2.5 mmol·L⁻¹, dNTP 200 mol·L⁻¹, 1.0 U Taq酶(上海Promega), 40 ng引物, 40 ng模板DNA, 反应体积25 μL。扩增反应在GeneAmp PCR System 2400上进行,反应条件为94℃ 预变性2 min, 每个循环94℃ 变性15 s, 36℃ 复性30 s, 72℃ 延伸45 s, 46个循环后在72℃ 延伸5 min。扩增产物在1.2%的琼脂糖凝胶上电泳检测。

1.2.3 RAPD产物的克隆 利用DNA快速回收试剂盒,从0.8%的琼脂糖凝胶中回收RAPD特异片断,纯化后,用PGEM-T easy载体连接,转化于大肠杆菌(*E. coli*)DH5α菌株。测序由上海生工公司完成。

1.2.4 SCAR分析 除将RAPD扩增条件调整为MgCl₂ 1.5 mmol·L⁻¹, 68℃ 复性, 35个循环外,其他同RAPD分析。

2 结果与分析

2.1 RAPD引物的筛选与偃麦草特异RAPD标记分析

利用普通小麦中国春和中间偃麦草(SZ)为材料,对100条RAPD引物进行筛选,结果98

个引物有扩增产物, 其中在 2 材料间表现多态性的引物有 68 个。选用 12 个在中间偃麦草能扩增出特异片段而中国春无此片段的引物, 利用长穗偃麦草 RM 1119, RM 1123, RM 1935, 中间偃麦草 RM 1130, RM 1941 对其进行进一步扩增鉴定, 发现引物 OPF03 能在所有 5 份偃麦草材料中稳定扩增出一条 1 300 bp 左右的特异片段, 然后用此引物对所有供试材料进行了 RAPD 分析(图 1)。



图 1 引物 OPF03 在普通小麦、中 2、长穗偃麦草及中间偃麦草中的扩增结果

M: M marker; 1: 中国春; 2: 京 411; 3: 中 2 4: RM 1119; 5: RM 1123;
 6: RM 1935 7: P1179162; 8: P1251443; 9: P1276709; 10: P1308591; 11: P1308592;
 12: P1380626; 13: P1469212; 14: P1547326; 15: 901; 16: RM 1130; 17: RM 1937;
 18: RM 1938; 19: RM 1940; 20: RM 1941; 21: RM 1942; 22: RM 1943; 23: RM 1944;
 24: RM 1948; 25: SZ 箭头所指为偃麦草特异片段 OPF03₁₂₉₁

由图 1 可以发现, 除 2 份小麦和长穗偃麦草 901 外, 在其他长穗偃麦草和所有中间偃麦草以及中 2 中都有一条 1 300 bp 左右的特异片段。中 2 是普通小麦与中间偃麦草之间的部分双二倍体, 附加了 1 套 E 染色体组^[11], 特异标记在中 2 出现, 表明该标记可以作为 E 染色体组的特异标记。有研究证明, OPF03 是比萨偃麦草(*Th. bessarabicum* 2n= 14, E^bE^b)的特异引物, 利用该引物可以将其与亲缘关系很近的二倍体长穗偃麦草(*Th. elongatum* 2n= 14, E^eE^e)区别开来^[12]。在供试的偃麦草材料中, 901 为确定的二倍体长穗偃麦草, 根据前人及本研究结果, 我们推断 901 可能只含有 E^e 染色体组。而长穗偃麦草和 *Elytrigia elongata* 这一种名以前一直共用于二倍体、十倍体和其他倍性的偃麦草种, 而多倍体偃麦草的 E 染色体组常由 E^e、E^b 组成^[13], 本试验的结果显示其他长穗偃麦草中可能含有 E^b 染色体组。中间偃麦草是六倍体种, 染色体组组成为 E^eE^bSt, 因此所有中间偃麦草出现此片段是必然的。

2.2 偃麦草染色体组特异 RAPD 片段的序列分析

我们从中间偃麦草(SZ)中回收、克隆了上述片段, 在上海生工测序后得到了该片断的全长序列(图 2)。图中 5 端和 3 端有下划线的 10 个碱基分别为引物 OPF03 的碱基序列及其反向互补序列。该片段长 1 291 bp, 故命名为 OPF03₁₂₉₁。

用 GenBank 查询的结果显示, OPF03₁₂₉₁586~ 1291 之间的 706 个碱基与一比萨偃麦草的 RAPD 标记 1~ 706 碱基序列同源性达 88%。该标记为比萨偃麦草的特异 RAPD 片段 OPF03₁₂₉₆(GenBank 序号 U 43516)^[3]。这一结果表明, 该引物在 2 种偃麦草中的扩增片段存在差异。同一引物对存在于不同物种中的同一染色体组扩增片段存在长度和序列上的差异, 这说明在物种进化过程中, 该染色体组结构已经发生了变化。

2.3 偃麦草染色体组 SCAR 标记的建立

将 OPF03₁₂₉₁ 序列输入 Primer Premier 5.0 软件, 设计了 2 对 PCR 引物, 其序列分别为: P1: 5'-CCTGGCAA GGCTAA TGTGA TGG-3'; P2: 5'-TTGTTCTTCGGCGTGTTGGA TA-3'; P3: 5'-GCTGAA TCTGCGTA TCGTCCC-3'; P4: 5'-GACTTGTTCTTCGGCGTGTTG-3'。这

```

1 CCTGA TCA CC AAA GCTTGAA GTA TTTA TTC ACTCA GCCGG A TCTTAA TCT
51 CCGTCAACAA CGA TGGTTGG AAACAAT TAC TGAA TA TGAC TGCGGTA TTT
101 CTTA TACCCC TGGCAA GGCT AA TGTGA TGG CTGA TGCCTT GA GTCGCAA G
151 TCA TA TTGCA A TAA TCTCAA GGT TAA GCGA GCTCAA CCTC GTCTTTA TGA
201 A GA GCTGA GC AA GCTGAA TC TGC GTA TCGT CCCACA GGGT TCGCTTAA TG
251 ACCTTGTGA T ACA GCCA GA T CTTGA GAA GG CTGTCAA GGA TGCGCAA GCC
301 AAA GA TGCTA AAA TTGA TCT CA T GAA GAAA GAACTTCA TC TTCCGAA GTA
351 CA GGGG TTTC TCGA TA TTTG AA GA TGAAAC CTTGTA TTTC CGA GA CCGCA
401 TCA TGGTAA C TCGTTTCGA G CTTA TGA CTG ACAA GGTCA T GAA GGA GGCA
451 CA TGA TACAC CACTGTCTA T TCA TCCTGGT A GCA CCAA GA TGTA TCGTGA
501 TCTCCGAA CAA A GGTA CTGGT GGTCTAA GA T GAA GCA GGA T A TCGCTCGA T
551 A TGTTGCTGA GTGCGA TGTC TGTCGTCGCG TGAAA GCA GA ACA TCA GAA G
601 CA TGCTGAA TTCTGCAACC TCTTCCTA TC CCGCTGTGGA AA TGGGA TAA
651 GGTTCA GA TG GA TTTCA TTA CTGGTCTTCC CAA GTCGCA G AA GGGTCA CG
701 ATGCCA TTCT TGTCGTCGTC GA CCAACTCT CTAAA GTTGC ACA CTTCAG
751 CCA GTGAA GG A GACTA TCAC TGCTA GCCA G TTA GCA GA GT TGTA TA TCTC
801 CA GAA TTGTT TCCCTCCAG GTA TTCCGAA GGA GA TCTGT TCGGACCGTG
851 GCGTCCTTTT CACTTCCAA G TTCTGGGAAA GCTTCCAA GA A GCCA TGGGA
901 ACTCA TA TTA CTTGGA GTTC A GCTTA TCAC CCCC GTCCC AA GGCCAA GT
951 CGAA TGA GTC AA TCAA GTGC TTGAA GA TA T GCTGCGA GCT TGTGTTA TA T
1001 CCTTCGGTAA GAAA TGGGA G GAA TCTCTCC TGTA TGCCGA GTTCTCTTA T
1051 AAACA CA GCT GTCAA GCTA G CTTGAA GA TG GCTCCA TTTG AA GTGCTA TA
1101 TGGA TTTAA G TGTCGAA CCC CTCTGAA CTG GTCA GAAACT GGGGAA CCGC
1151 CACTTGTTGG TCCTGA TA TT A TCCAACACG CCGAA GAA CA A GTCCGTA TA
1201 GTGCGTGAAA A TCTCAA GGC GGCTCAA GAC CGCCA GAA GA GCAA CTA TGA
1251 TCGAAACGA TGGGGTTTGA CA TA TCAACC CGGTGA TCA G G

```

图2 OPF03₁₂₉₁的核苷酸序列

二对引物分别包含序列长度 1 083 bp 和 982 bp (含引物)。其中 P1、P2 在小麦和偃麦草中都能扩增出一条与目标片段长度相符的片段,因而无法作为偃麦草染色体组的 SCAR 标记,而引物 P3、P4(图2 箭头下划线部分)获得了很好的预期结果,其在供试材料中的扩增结果见图3。

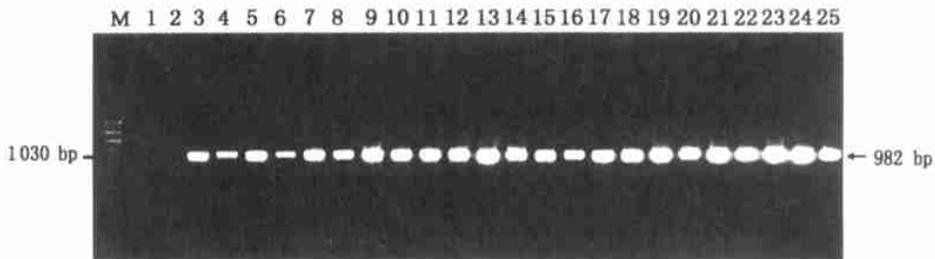


图3 小麦、中2、长穗和中间偃麦草 SCAR 扩增结果(材料编号同图1)

在普通小麦中国春和京411中无任何扩增产物,而在中2和所有长穗偃麦草、中间偃麦草中都有1条很强的扩增片段。虽然在长穗偃麦草901中无特异RAPD片段OPF03₁₂₉₁,但有与其他偃麦草同样的SCAR产物。关于这一结果的原因,有研究证明,大多数染色体组特异的RAPD标记,其染色体组特异性主要决定于引物结合位点,而非引物之间的DNA序列^[14]。引

物 P1、P2 在小麦中能扩增出与偃麦草相同的 SCAR 产物,也验证了这一结论。而 E^a 和 E^b 是亲缘关系非常近的 2 个染色体组,虽然这 2 物种中 RAPD 引物配对位点不同,但根据这一结论,2 染色体组完全可能具有相同的 SCAR 引物匹配位点。

2.4 RAPD 和 SCAR 标记的验证

为了进一步验证上述结果,用 RAPD 引物 OPF03 和 SCAR 引物 P3、P4 对小麦-二倍体长穗偃麦草异代换系、异附加系进行了扩增。结果发现,代换系、附加系材料同小麦一样,并没出现 RAPD 引物的特异扩增片断 OPF03₁₂₉₁,进一步证明了该引物在二倍体长穗偃麦草 E^a 染色体组中没有特异匹配位点。而标记 SCAR₉₈₂ 则出现在所有代换系和附加系材料中,表明该标记位于偃麦草 E^a 染色体组的所有染色体上,为偃麦草 E^a 染色体组的特异 SCAR 标记。这一结果也进一步验证了对偃麦草材料的 SCAR 扩增结果。

3 讨 论

高等真核生物基因组的重要组成部分是中度和高度重复序列。研究表明,高等植物中,相对于单拷贝和低拷贝数 DNA 在不同物种中的高度保守性,重复 DNA 序列在进化过程中会发生更快的变化,从而产生更多的遗传变异^[15,16]。因此,很多重复 DNA 序列是物种或染色体组特异的。这些重复 DNA 序列在远缘杂交过程中异源遗传物质的检测、物种系统发育关系研究等许多领域都是很有用的工具^[14,17]。

小麦族植物 70% 以上的基因组 DNA 是重复序列,其中大约 16%~45% 基因组 DNA 具有物种或基因组特异性,而扩增很强的 RAPD 片断常常来自重复 DNA 序列,并且 RAPD 标记克隆较为容易,又可作为 Southern 和原位杂交的适宜探针,因此寻找并克隆一些基因组特异的 RAPD 片断,对研究物种的起源、进化及远缘杂交育种中外缘遗传物质导入后的检测是很有意义的^[3,12]。

RAPD 在小麦中检测到的多态性较低,限制了其在小麦中的广泛应用。虽然如此,通过 RAPD 还是获得了一些重要性状的分子标记,其中一些标记已转化为 SCAR^[18]。此外,RAPD 标记在外源种属中能够检测到较为广泛的多态性,在研究这些异源植物的遗传多样性方面,RAPD 标记是一个很有效的手段^[19]。而通过 RAPD 标记检测小麦中的外源遗传物质并将其转化为 SCAR 标记的研究,在最近的文献中也有许多报道^[20-23]。RAPD 在许多研究领域应用的优越性,决定了它仍是一个非常具有应用前景的分子标记形式。

4 结 论

小麦族植物染色体组间都存在着部分同源关系,但不同染色体组间亲缘关系远近不同,E^a 和 E^b 是亲缘关系非常近的 2 个染色体组。本研究将一个偃麦草 E^b 染色体组特异 RAPD 标记转换为 SCAR 标记后,可以同时作为 E^a 染色体组的标记,为小麦与偃麦草种间杂交后代中偃麦草遗传物质的快速检测提供了一条新途径。

参 考 文 献

- 1 Dewey D R. The genomic system of classification as a guide to intergeneric hybridization with the perennial *Triticeae*. In: Gustafson, ed. Gene Manipulation in Plant Improvement. New York: Plenum

- Press, 1984, 209~ 279
- 2 吉万全 中间偃麦草及其与小麦衍生后代的分子细胞遗传学研究: [学位论文] 北京: 中国农业大学, 2001
 - 3 张学勇, 董玉琛, 李培, RR-C Wang E 和 St 基因组特异 RAPD 片断在小麦族植物中的分布 遗传学报, 1998, 25(2): 131~ 141
 - 4 张学勇, 董玉琛 偃麦草基因组组成及新物种形成规律的研究 云南大学学报(自然科学版), 1999, 21: 66~ 67
 - 5 孙善澄 小偃麦新品种与中间类新的选育途径、程序和方法 作物学报, 1981, 7(1): 52~ 58, 173~ 178
 - 6 何孟元, 徐宗尧, 邹明谦, 等 两套小冰麦异附加系的建立 中国科学(B 辑), 1988, 11: 1161~ 1168
 - 7 谢皓, 陈孝, 张增艳, 等 抗黄矮病小麦新品系 Yw 243 的选育和细胞分子生物学鉴定 作物学报, 2000, 26(6): 687~ 691
 - 8 刘雄伦, 李枸 RAPD 技术在植物遗传育种中的应用 生物工程进展, 2000, 20(5): 21~ 24
 - 9 Zhang X Y, Dong Y S, Wang R R C. Characterization of genomes and chromosomes in partial amphiploids of the hybrid *Triticum aestivum* × *Thinopyrum ponticum* by *in situ* hybridization, isozyme analysis and RAPD. *Genome*, 1996, 39: 1062~ 1071
 - 10 陈其军, 韩玉珍, 傅永福, 等 大麻性别的 RAPD 和 SCAR 分子标记 植物生理学报, 2001, 27(2): 173~ 178
 - 11 祁适雨, 肖志敏, 辛文利, 等 “远中”号小偃麦在小麦育种中的应用 麦类作物学报, 2000, 20(1): 10~ 15
 - 12 Wei J Z, Wang R R-C. Genome- and species-specific markers and genome relationships of diploid perennial species in *Triticeae* based on RAPD analysis *Genome*, 1995, 38: 1230~ 1236
 - 13 Wang R R-C, von Bothmer J, Dvorak G Fedak, et al Genome symbols in the *Triticeae* (*Poaceae*). In: Proc 2nd Inter *Triticeae* Symp Wang R R -C, Jensen K B, Jaussi C, eds 1994, 29~ 34
 - 14 Svitashv S K, T Bryngelsson X L i, Wang R R-C. Genome-specific repetitive DNA and RAPD markers for genome identification in *Elymus* and *Hordeum* *Genome*, 1998, 41: 120~ 128
 - 15 Anamthawat-Jonsson K, Heslop-Harrison J S. Species specific DNA sequences in the *Triticeae* *Hereditas*, 1992, 116(1- 2) : 49~ 54
 - 16 Anamthawat-Jonsson K, Heslop-Harrison J S. Isolation and characterization of genome-specific DNA sequences in *Triticeae* species *Molecular and General Genetics* [MOL. GEN. GENET.], 1993, 240(2): 151~ 158
 - 17 Dvorak J, Zhang H B. Application of molecular tools for study of the phylogeny of diploid and polyploid taxa in *Triticeae* *Hereditas*, 1992, 116(1- 2): 37~ 42
 - 18 Gupta P K, Varshney, R K Shama P C, Ramesh B. Molecular markers and their applications in wheat breeding *Plant Breed*, 1999, 118: 369~ 390
 - 19 Guadagnuolo R, Bianchi D S, Felber F. Specific genetic markers for wheat, spelt, and four wild relatives: comparison of isozymes, RAPDs, and wheat microsatellites *Genome*, 2001, 44: 610~ 621
 - 20 Liu Zhiyong, Sun Qixin, Ni Zhongfu, et al Development of SCAR markers linked to the Pm21 gene conferring resistance to powdery mildew in common wheat *Plant Breeding*, 1999, 118: 215~ 219
 - 21 Robert O, A belard C, Dedryver F. Identification of molecular markers for the detection of the yellow rust resistance gene Yr17 in wheat *Molecular Breeding*, 1999, 5 (2) : 167~ 175
 - 22 Stoutjesdijk P, Kamholz S J, Kleven S, et al PCR-based molecular marker for the Bdv2 *Thinopyrum intermedium* source of barley yellow dwarf virus resistance in wheat *Austra Agri Resear*, 2001, 52(11-12): 1383~ 1388
 - 23 Zhang Z Y, Xin Z Y, Larkin P J. Molecular characterization of a *Thinopyrum intermedium* Group 2 chromosome (2A i-2) conferring resistance to barley yellow dwarf virus *Genome*, 2001, 44(6): 1129~ 1135