

# 加拿大披碱草与老芒麦及其杂种后代同工酶和 RAPD 遗传分析

李景环<sup>1,2</sup>, 云锦凤<sup>1</sup>, 吕天池<sup>2</sup>, 周碧柳<sup>2</sup>

(1. 内蒙古农业大学 生态环境学院, 内蒙古 呼和浩特 010019; 2. 内蒙古师范大学 生命科学与技术学院, 内蒙古 呼和浩特 010022)

**摘要:**对加拿大披碱草、老芒麦、杂种  $F_1$ 、 $C_0$ 、 $C_1$ 、 $C_0$  和  $C_1$  7 种材料进行了同工酶和 RAPD 的分析,旨在通过分子标记方法探讨供试材料的亲缘关系。结果表明:在不同的生育期,EST 同工酶酶谱具有较高的多态性,酶谱差异较大,在分蘖期杂种的 EST 酶谱偏向母本加拿大披碱草,根据该生育时期的酶谱特征可以鉴定杂种后代的真实性,其他生育时期,EST 酶带偏向父本老芒麦,而且没有明显的差异。SOD 酶谱的差异只是体现在表达量的多少上,并没有出现特异性的条带。RAPD 分析表明,加拿大披碱草与老芒麦的遗传一致度为 0.72,遗传距离为 0.328 5,在 7 种材料中亲缘关系最远;杂种后代与母本加拿大披碱草的遗传距离较近,而与父本老芒麦的亲缘关系相对较远;因此用 RAPD 分析材料的遗传关系更为合适。

**关键词:**加拿大披碱草;老芒麦;杂交后代;遗传分析

**中图分类号:**S543.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-7091(2009)06-0038-08

## Genetic Analysis on Isozymes and RAPD of *E. canadensis*, *E. sibiricus* and Their Hybrids

LI Jing-huan<sup>1,2</sup>, YUN Jin-feng<sup>1</sup>, LU Tian-chi<sup>2</sup>, ZHOU Bi-liu<sup>2</sup>

(1. College of Ecology Environment, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010019, China;

2. College of Life Science and Technology, Inner Mongolia Normal University, Huhhot 010022, China)

**Abstract:** Genetic analysis on isozymes and RAPD of *E. canadensis*, *E. sibiricus*,  $F_1$ ,  $C_0$ ,  $C_1$ ,  $C_0$  and  $C_1$  were done. The results showed that the polymorphism of EST isozymes were much more than that of SOD during the four breeding periods. At tillering stage, the results of esterase isozymes also showed that true hybrid could be identificate, and zymogram characteristics of esterase isozymes tended to that of female parent *E. canadensis*. At other three breeding periods, zymogram characteristics of esterase isozymes tended to that of male parent and there were little differences. Differences of SOD isozyme only lied in expression level, and there were no specific band. Analysis on RAPD showed that genetic identity and genetic distance of *E. canadensis* and *E. sibiricus* were 0.72 and 0.328 5. Their genetic relationship was most furthest among 7 materials. And genetic relationship between hybrids and parents showed that hybrids tended to female parent *E. canadensis*. But that was very far to male *E. sibiricus*. It was much appropriate that RAPD was used to analyze genetic relationship.

**Key words:** *E. canadensis*; *E. sibiricus*; Hybrids; Genetic analysis

我国生态建设和畜牧业发展急需耐寒、耐旱、产量高的优质牧草品种,远缘杂交育种是从根本上改良牧草的有效手段。加拿大披碱草(*Elymus canadensis*)是禾本科披碱草属多年生草本植物,产于北美,茎秆直立,疏丛型,叶宽大;适应性强,抗旱、抗寒、耐盐碱、抗风沙,适口性好,是优良的牧草。老芒麦

(*Elymus sibiricus*)别名:西伯利亚披碱草、叶老芒麦,是禾本科披碱草属多年生疏丛型禾草。根系发达,呈须状,茎秆直立。主要分布于西伯利亚、远东以及蒙古、日本等国。在中国东北、华北、西北和西藏高原等地都有分布,抗寒力强,能耐湿,抗旱力稍差,土壤适应性较广,分蘖力强。适口性好,草食家畜喜

收稿日期:2009-08-27

基金项目:“十一五”科技支撑项目(2008BADB3B02);内蒙古自治区重大科技项目(20071923)

作者简介:李景环(1972-),女,内蒙古赤峰人,讲师,博士,主要从事植物分子生物学的教学与科研工作。

通讯作者:云锦凤(1941-),女,内蒙古土默特左旗人,教授,博士生导师,主要从事牧草育种的科研与教学工作。

食。最宜调制干草。因此加拿大披碱草与老芒麦是适合作为远缘杂交的原始材料,加拿大披碱草与老芒麦杂交已获得  $F_1$  植株,并且通过育性恢复手段获得了  $F_1$  加倍当代株系 ( $C_0$ )、 $F_1$  加倍一代株系 ( $C_1$ )、 $F_1$  加倍当代株系 ( $C_0$ )以及  $F_1$  加倍一代株系 ( $C_1$ )。

本试验利用酯酶同工酶 (EST),超氧化物歧化酶 (SOD)同工酶和 RAPD 标记对以上材料进行遗传分析。以便能有目的选择优良单株作为育种材料,为培育优质的牧草新品种奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验地概况

试验地设在内蒙古农业大学牧草试验站。该站地处内蒙古呼和浩特市,位于东经  $111^{\circ}42'$ ,北纬  $40^{\circ}49'$ ,海拔 1 063 m,属典型大陆性气候,年平均降水 400 mm 左右,无霜期 140 d。试验地属暗栗钙土,砂壤质,肥力条件中等,土壤 PH 值 7.5 左右,具备灌溉条件。

### 1.2 试验材料及方法

1.2.1 供试材料的准备 材料为加拿大披碱草、老芒麦、杂交后代  $F_1$ 、 $C_0$ 、 $C_1$ 、 $C_0$ 、 $C_1$ 。2005 年 3 月将供试材料播种于内蒙古农业大学生态环境学院温室花盆中,2005 年 5 月将材料分株栽种在内蒙古农业大学牧草试验站,株距和行距都为 60 cm,每穴 1 株(表 1)。

表 1 材料的基本情况

材料 Material	来源 Origin	染色体数 Chromosome No.	基本特征 Biological trait
加拿大披碱草(母本) <i>Elymus canadensis</i>	北美	2n = 28	高产,叶量大,抗寒,抗虫,抗病
老芒麦(父本) <i>Elymus sibiricu</i>	中国	2n = 28	结实率高,抗寒抗旱,草质好
$F_1$		2n = 28	高度不育,生长势好
$C_0$		2n = 56	有一定的育性,茎叶量丰富
$C_1$			生长速度快,产草量高,生长势好
$C_0$			有一定的育性,生长缓慢
$C_1$			生长速度快,产草量高,生长势好

1.2.2 同工酶的测试和分析 分别在返青期,孕穗期,抽穗期和开花期剪取 7 种材料的叶片提取酶液。分析 EST,SOD 同工酶的遗传与变异,加拿大披碱草、老芒麦、杂种  $F_1$ 、 $C_0$ 、 $C_1$ 、 $C_0$  植株群体的样本来自于 10 个单株, $C_1$  群体的样本为 70 个单株。取各个生育期的材料 1 g,加 4 mL Tris-甘氨酸电极缓冲液(pH8.3)、4 mL 40 %甘油,将上述每种材料的单株样品分别在冰浴下迅速研磨成匀浆,移至 10 mL 离心管,10 000 r/min 冷冻离心 20 min,取上清液置 - 20 冰箱内保存放置。

采用聚丙烯酰胺凝胶垂直板电泳法<sup>[7-12]</sup>,胶版厚 1.5 mm,浓缩胶浓度 4 %,pH 6.7,分离胶浓度 7.5 %,pH8.9,电极缓冲液为 Tris-甘氨酸(pH8.3),每样槽进样量 60  $\mu$ L (材料取单株酶液等量混合,形成混合酶液,再从混合酶液中取 60  $\mu$ L),在 4 冰箱中电泳,初始电压 80 V,当前沿指示剂走出浓缩胶时稳压 250 V,直至电泳结束。

酯酶同工酶 (EST) 采用醋酸萘酯-坚牢蓝 RR 盐染色法,染色后的胶板用 7 %的冰醋酸固定。SOD 同工酶采用醋酸 NBT 溶液染色法<sup>[13-17]</sup>。在凝胶成像系统下照相记录谱带。按迁移率  $R_f$  值 ( $R_f$  = 酶带迁移距离/ 前沿指示剂距离),酶带染色深浅,标定每条酶带位置。

### 1.2.3 RAPD 分子标记法

1.2.3.1 DNA 的提取与检测 DNA 的提取: 材料为加拿大披碱草、老芒麦、杂种  $F_1$ 、 $C_0$ 、 $C_1$ 、 $C_0$  的各 10 个单株和  $C_1$  的所有植株(70 个单株)。取供试材料新鲜嫩叶片 0.5 g,先用自来水洗掉杂质,然后用双蒸水冲洗 3 次,再用无菌滤纸吸干叶片上的水分,剪成 2 ~ 3 cm 的小段并用保鲜膜包好,放在 - 78 冰箱备用。上述处理好的叶片样品按编号放入 - 20 预冷的研钵中,加液氮研磨成粉末,转入 10 mL 离心管中(以下均为 5 mL 的离心管),迅速加入 3 mL 65 预热的 CTAB 提取液,65 温浴 90 min。加等体积的氯仿 异戊醇(24 1)充分混匀,4 12 000 r/min 离心 10 min。取上清,再加入等体积的氯仿 异戊醇(24 1)充分混匀,4 12 000 r/min 离心 10 min。取上清,加 2/3 体积 - 20 异丙醇,混匀,4 12 000 r/min 离心 10 min。得沉淀加 1.5 mL 65 预热的 CTAB 提取液,65 温浴 30 min。加等体积的氯仿 异戊醇(24 1)充分混匀,4 12 000 r/min 离心 10 min。取上清,加 2/3 体积 - 20 异丙醇,混匀,- 20 沉淀 2 h;4 12 000 r/min 离心 10 min,沉淀用 70 %乙醇洗涤 2 次,干燥;将沉淀用 100  $\mu$ L TE 回溶,加 RNase 3  $\mu$ L,37 放置 1 h,4 冰箱保存<sup>[18,19]</sup>。

DNA 检测:将上述提取到的加拿大披碱草、老芒麦、杂种  $F_1$ 、 $C_0$ 、 $C_1$ 、 $C_0$  和  $C_1$  的每一份 DNA 分别等量混合,取 DNA 混合液各一份,进行琼脂糖凝胶电泳,稳压 80 V,以 1 kb Plus ladder 为 Marker,利用天能凝胶成像系统检测是否提取到目的 DNA,照相,并用紫外分光光度仪确定其浓度。

1.2.3.2 PCR 反应条件与反应体系 参照 Williams 等<sup>[18,19]</sup>方法,进行 PCR 试验。

聚合酶链式反应(PCR)的条件设置为:94 预变性 3 min,94 变性 1 min,37 退火 1 min,72 延伸 1.5 min,40 次循环,最后 72 延伸 5 min,4 保存。

反应体系 12  $\mu$ L:20 ng/ $\mu$ L 的基因组 DNA 1  $\mu$ L (混合样),10  $\times$ PCR Buffer 1.5  $\mu$ L (已包含  $Mg^{2+}$ ,其原浓度为 15 mmol),0.2  $\mu$ mol/ $\mu$ L 引物 0.5  $\mu$ L,5 U/ $\mu$ L Taq 酶 0.1  $\mu$ L,10 mmol/L dNTPs 1  $\mu$ L,ddH<sub>2</sub>O 7.9  $\mu$ L。RAPD 反应在 Biometrer 热循环仪上进行。每次 PCR 做一个阴性对照(不加模板)。PCR 做重复试验。

电泳及照相:PCR 产物在 1.2 % 的琼脂糖凝胶上电泳,以 1 kb Plus ladder 为 Marker,稳压 80 V,然后在天能凝胶成像系统下照相。

1.2.4 同工酶电泳和 RAPD 结果的分析方法 同工酶电泳的电泳结果通过分析电泳条带的区别,来分析不同生育期内同工酶的表达情况。

RAPD 电泳结果用 20 个随机引物进行 PCR 扩增,引物为上海 Sangon 生产的 S5、S48、S52、S67、S126、S127、S131、S133、S134、S138、S140、S141、S156、S318、S442、S447、S456、S459、S484、S489,电泳结果采用加拿大 Alberta 大学的 Popgen32 分析软件计算遗传一致度和遗传距离。分析杂种后代和双亲的亲缘关系。构建聚类树。

## 2 结果与分析

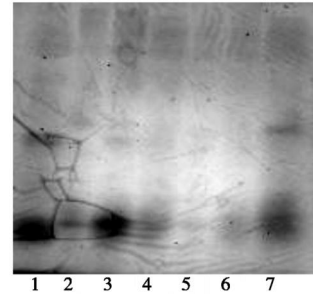
### 2.1 不同生育期酯酶同工酶(EST)的遗传分析

由图 1~4 和表 2 可知,在不同的生育期,EST 的表达不同,而且差异很大,可见 EST 的表达是受生长发育调控的。

在春季分蘖期 EST 酶谱较多,共有 7 条酶带,亲本加拿大披碱草和老芒麦有 2 条相同的基带(Rf 为 0.1 和 0.8),加拿大披碱草有 4 条特征带(Rf 为 0.2,0.3,0.5 和 0.88),老芒麦有 2 条特征带(Rf 为 0.02 和 0.72)。F<sub>1</sub> 共有 7 条酶带,其中有 2 条来自父本老芒麦的特征带(Rf 为 0.02 和 0.72),同时还丢失了 1 条来自母本的带(Rf 为 0.3),剩余的条带来自于双

亲,这证明 F<sub>1</sub> 是真正的杂种,而且偏向于母本。

$C_0$  和  $C_1$  与 F<sub>1</sub> 基本相同,只是  $C_0$  比 F<sub>1</sub> 少了 1 条 Rf 为 0.72 的酶带, $C_1$  比 F<sub>1</sub> 少了 1 条 Rf 为 0.02 的酶带; $C_1$  和  $C_0$  比 F<sub>1</sub> 少了 3 条酶带(Rf = 0.2,0.5,0.72),剩下的酶带与 F<sub>1</sub> 的相同;由此可知这些杂种后代都来自于双亲加拿大披碱草和老芒麦。



1. 加拿大披碱草;2. 老芒麦;3. F<sub>1</sub>;4. C<sub>0</sub>I;  
5. C<sub>1</sub>I;6. C<sub>0</sub>II;7. C<sub>1</sub>II,下同。  
1. *E. canadensis*;2. *E. Sibiricus*;3. F<sub>1</sub>;4. C<sub>0</sub>I;  
5. C<sub>1</sub>I;6. C<sub>0</sub>II;7. C<sub>1</sub>II. The same below.

图 1 返青期的 EST 图谱

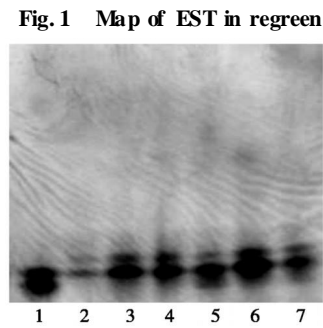


图 2 孕穗期的 EST 图谱

Fig.2 Map of EST in booting

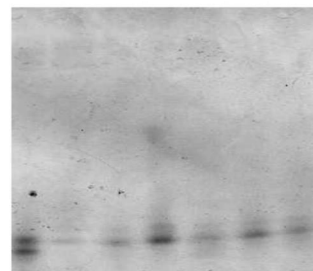


图 3 抽穗期的 EST 图谱

Fig.3 Map of EST in heading

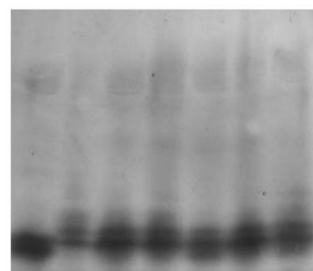


图 4 开花期的 EST 图谱

Fig.4 Map of EST in flowering

孕穗期的酶带有所减少,一共只有 4 条,而且分

布较分散,双亲共有 1 条共同的酶带( $R_f$  为 0.8),加拿大披碱草和老芒麦各只有 1 条特征带( $R_f$  为分别 0.88,0.72); $F_1$ 、 $C_0$ 、 $C_0$ 、 $C_1$  各有 3 条酶带,而且都是来自双亲的酶带; $C_1$  除了上述酶带外,比其他 6 个群体多出 1 条  $R_f$  为 0.5 的酶带。因此在这个时期可以利用 EST 来鉴定杂种。

抽穗期也只有 4 条酶带,双亲共有的基带为 1 条( $R_f$  = 0.8),加拿大披碱草有 1 条特征带( $R_f$  = 0.88),老芒麦有 1 条特征带( $R_f$  = 0.72); $F_1$ 、 $C_0$ 、 $C_0$ 、 $C_1$  都只剩下 2 条酶带( $R_f$  = 0.72,0.8); $C_1$  有 3 条酶带,比  $F_1$ 、 $C_0$ 、 $C_0$ 、 $C_1$  多出 1 条  $R_f$  为 0.5 的酶带。此生育期杂种后代的酶谱与父本老芒麦的相同,因此该生育期不能用 EST 鉴定杂种。

开花期酶带也是 4 条,与孕穗期的酶带相同,在这个时期也可以利用 EST 来鉴定杂种。

在 4 个生育期中只有  $R_f$  = 0.8 的酶带一直存在。但是在不同的生育期出现了差异表达,在分蘖期,杂种后代的 EST 酶谱偏向加拿大披碱草,即 EST 的遗传继承了母本的特征;在孕穗期、开花期 EST 酶谱很少,但是含概了双亲的所有酶带;抽穗期杂种后代的 EST 酶谱基本与老芒麦的相同。所以利用 EST 酶谱鉴定加拿大披碱草与老芒麦的杂种的最佳生育期是春季分蘖期,孕穗期、开花期也可以。

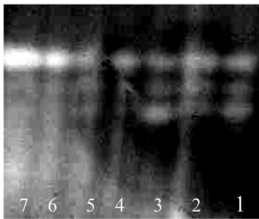


图 5 分蘖期的 SOD 图谱

Fig. 5 Map of SOD in tiller

2.2 不同生育期 SOD 同工酶的遗传分析

由图 5~8 和表 3 可知,在 4 个生育期中 SOD

的表达的酶带数量上没有差异,只是在抽穗期老芒麦的 SOD 酶带多了 1 条( $R_f$  = 0.44),其他条带都相同。从条带的亮度上看,前 3 个生育期双亲第 1 条酶带的亮度稍亮些,说明 SOD 的浓度较大,表达的量多,到了开花期  $C_0$  和  $C_1$  的第 1 条酶带较亮。由此看来,SOD 表达的差异只是体现在表达量的多少上。

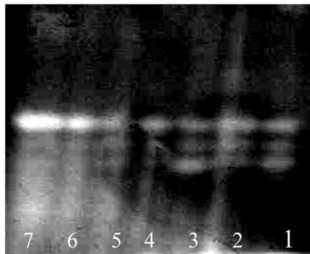


图 6 孕穗期的 SOD 图谱

Fig. 6 Map of SOD in booting

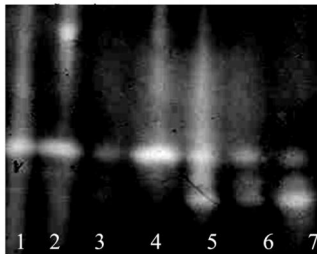


图 7 抽穗期的 SOD 图谱

Fig. 7 Map of SOD in heading

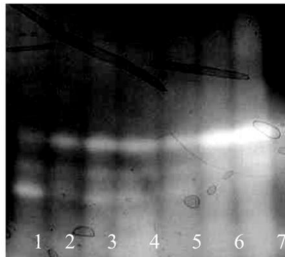


图 8 开花期的 SOD 图谱

Fig. 8 Map of SOD in flowering

表 2 加拿大披碱草和老芒麦及其杂种后代不同生育期 EST 同工酶酶带位置(  $R_f$  )

材料		酶带顺序( $R_f$ 值) Isozyme band No.							
Material		0.02	0.10	0.20	0.30	0.50	0.72	0.80	0.88
分蘖期 Tiller	加拿大披碱草	0	1	1	1	1	0	1	1
	老芒麦	1	1	0	0	0	1	1	0
	$F_1$	1	1	1	0	1	1	1	1
	$C_0$	1	1	1	0	1	0	1	1
	$C_1$	0	1	1	0	0	0	1	1
	$C_0$	0	1	1	0	0	0	1	1
	$C_1$	0	1	1	0	1	1	1	1
孕穗期 Booting	加拿大披碱草	0	0	0	0	0	0	1	1
	老芒麦	0	0	0	0	0	1	1	0
	$F_1$	0	0	0	0	0	1	1	1
	$C_0$	0	0	0	0	0	1	1	1
	$C_1$	0	0	0	0	0	1	1	1
	$C_1$	0	0	0	0	0	1	1	1

续表

材料 Material		酶带顺序 (Rf 值) Isozyme band No.							
		0.02	0.10	0.20	0.30	0.50	0.72	0.80	0.88
抽穗期 Heading	C <sub>0</sub>	0	0	0	0	0	1	1	1
	C <sub>1</sub>	0	0	0	0	1	1	1	1
	加拿大披碱草	0	0	0	0	0	0	1	1
	老芒麦	0	0	0	0	0	1	1	0
	F <sub>1</sub>	0	0	0	0	0	1	1	0
开花期 Flowering	C <sub>0</sub>	0	0	0	0	0	1	1	0
	C <sub>1</sub>	0	0	0	0	1	1	1	0
	C <sub>0</sub>	0	0	0	0	0	1	1	0
	C <sub>1</sub>	0	0	0	0	0	1	1	0
	加拿大披碱草	0	0	0	0	0	0	1	1
	老芒麦	0	0	0	0	0	1	1	0
	F <sub>1</sub>	0	0	0	0	0	1	1	1
	C <sub>0</sub>	0	0	0	0	0	1	1	1
	C <sub>1</sub>	0	0	0	0	0	1	1	1
	C <sub>0</sub>	0	0	0	0	0	1	1	1
	C <sub>1</sub>	0	0	0	0	1	1	1	1

注:1 代表有;0 代表无。表 3 同。  
Note :Number 1 and 2 mean yes and no representatively. The same as Tab. 3.

表 3 加拿大披碱草和老芒麦及其杂种后代不同生育期 SOD 同工酶酶带位置( RF)

Tab.3 SOD isozyme PAGE maps of parents and its hybrids

材料 Material		酶带顺序 (Rf 值) Isozyme band No.			
		0.44	0.50	0.64	0.72
分蘖期 Tiller	加拿大披碱草	0	1	1	1
	老芒麦	0	1	1	1
	F <sub>1</sub>	0	1	1	1
	C <sub>0</sub>	0	1	1	1
	C <sub>1</sub>	0	1	1	1
	C <sub>0</sub>	0	1	1	1
	C <sub>1</sub>	0	1	1	1
	加拿大披碱草	0	1	1	1
孕穗期 Booting	老芒麦	0	1	1	1
	F <sub>1</sub>	0	1	1	1
	C <sub>0</sub>	0	1	1	1
	C <sub>1</sub>	0	1	1	1
	C <sub>0</sub>	0	1	1	1
	C <sub>1</sub>	0	1	1	1
	加拿大披碱草	0	1	1	1
	老芒麦	1	1	1	1
抽穗期 Heading	F <sub>1</sub>	0	1	1	1
	C <sub>0</sub>	0	1	1	1
	C <sub>1</sub>	0	1	1	1
	C <sub>0</sub>	0	1	1	1
	C <sub>1</sub>	0	1	1	1
	加拿大披碱草	0	1	1	1
	老芒麦	0	1	1	1
	F <sub>1</sub>	0	1	1	1
开花期 Flowering	C <sub>0</sub>	0	1	1	1
	C <sub>1</sub>	0	1	1	1
	C <sub>0</sub>	0	1	1	1
	C <sub>1</sub>	0	1	1	1
	加拿大披碱草	0	1	1	1
	老芒麦	0	1	1	1
	F <sub>1</sub>	0	1	1	1
	C <sub>0</sub>	0	1	1	1

2.3 加拿大披碱草与老芒麦及其杂种后代 RAPD 分析

在 40 个引物中筛选出 20 个引物 ,引物、扩增的条带、基因位点多态性位点百分率见表 4。遗传距离见表 5。

由表 4 可知 ,20 个引物共扩增出 1 485 条带 ,基

因位点为 257 个 ,多态性位点的百分率为 17.24 %。由此看来 ,种间的多态性并不是很高 ,说明亲本与后代之间基因的同源性很高。由电泳图可知除了 C<sub>1</sub> 群体内的多态性较高外 ,其他种内基因位点的一致性很高 ,每个单株的图谱基本一样。

由表 5 可知 ,加拿大披碱草与老芒麦的遗传一致

度为 0.72 ,遗传距离为 0.328 5 ,是 7 个 群体中亲缘关系最远的一对。杂种后代与双亲的亲缘关系表现为与母本加拿大披碱草较近 ,而与父本老芒麦的亲缘关系相对较远。由图 9 可知 7 个群体中 ,杂种后代先聚到一起 ,然后才和亲本聚为一类 ,说明后代之间的关系较近。后代与母本的亲缘关系比与父本的近。

表 4 引物及其序列和扩增结果

Tab.4 List of primer labels ,primer sequences and amplification results				
引物 Primer	序列 (5 - 3 ) Sequence	总扩增带数 Total loci	多态性扩增带数 Polymorphism loci	多态位点百分率/ % Polymorphism percentage
S5	TCCGCTCTGG	104	17	16.34
S48	GTGTGCCCCA	82	14	17.07
S52	CACCGIATCC	84	13	15.48
S67	GTCCCACGA	68	13	19.11
S126	GGGAATTCGG	82	13	15.85
S127	CCGATATCCC	82	16	19.51
VS131	TTGGTACCCC	82	10	12.19
S133	GGCTGCAGAA	63	11	17.46
S134	TGCTGCAGGT	48	9	36.21
S138	TTCCCGGGIT	69	15	21.73
S140	GGICTAGAGG	66	11	16.67
S141	CCCAAAGTCC	73	15	20.54
S156	GGTGA CTGTG	74	12	17.57
S318	GACTAGGTGG	58	13	22.41
S442	ACGTACCGTC	67	10	14.92
S447	CACCACTGAC	84	15	17.86
S456	TCGGCGGGTTC	53	13	24.53
S459	GGTGCACGTT	78	13	16.67
S484	AGTGCCTGA	92	14	15.22
S489	GGCTAACCGA	76	10	13.16
Total	20	1 485	257	17.24

表 5 双亲及杂交后代遗传一致度和遗传距离的计算结果

Tab.5 Measures of genetic identity and genetic distance							
pop ID	1	2	3	4	5	6	7
1	****	0.720 0	0.752 9	0.754 3	0.794 8	0.772 8	0.776 4
2	0.328 5	****	0.746 7	0.747 9	0.784 3	0.722 1	0.774 9
3	0.284 5	0.292 0	****	0.842 5	0.772 2	0.783 8	0.844 5
4	0.285 4	0.290 4	0.171 4	****	0.810 3	0.801 8	0.868 9
5	0.241 3	0.243 0	0.258 5	0.210 3	****	0.792 5	0.857 2
6	0.257 7	0.325 5	0.252 6	0.220 9	0.232 5	****	0.784 4
7	0.251 1	0.255 1	0.169 0	0.140 5	0.154 0	0.242 8	****

注 :1. 加拿大披碱草 ;2. 老芒麦 ;3. 杂种 F<sub>1</sub> ;4. C<sub>0</sub> ;5. C<sub>1</sub> ;6. C<sub>0</sub> ;7. C<sub>1</sub> ;左下角遗传距离 ,右上角遗传一致度。  
Note :Numbers from 1 to 7 are *E. canadensis* , *E. sibiricus* ,F<sub>1</sub> ,C<sub>0</sub> ,C<sub>1</sub> ,C<sub>0</sub> and C<sub>1</sub> representatively. Numbers under star are genetic distance and that up star are genetic identity.

由电泳图可以看出 (图 9 ~ 15) ,老芒麦扩增的条带比加拿大披碱草扩增的条带数要丰富的多 ,在杂种后代的条带中 ,除了新增的特异条带外 (S5、S52、S67、S126、S127、S133、S141、S156、S318、S459、S484) ,还出现了互补双亲的条带 (除了 S134 外 ,在所有的引物中都均有分布) 。在引物 S5 下 F<sub>1</sub> 出现了分子量为 200 bp 左右和接近 500 bp 的 2 条特异带 ,C<sub>0</sub> 出现了分子量为 200 bp 左右的一条带。S52 的产物中 ,F<sub>1</sub> 和 C<sub>1</sub> 出现了分子量为 600 bp 左右的条带。S67 的产物中 ,F<sub>1</sub> 和 C<sub>0</sub> 出现了分子量为约 1 000 ~ 1 600 bp 的 2 条带。S126 的产物中 F<sub>1</sub> 和 C<sub>0</sub> 出现了分子量约为 1000 bp 和 500 bp 的 2 条带。S127 的产物中 ,F<sub>1</sub> 和 C<sub>0</sub> 出现了分子量约为 2 000 ,

200 ,100 kb 的特异条带。S133 的产物中 F<sub>1</sub> 和 C<sub>0</sub> 出现了分子量接近 700 bp 和接近 400 bp 的特异条带。S141 的产物中 ,F<sub>1</sub> 和 C<sub>0</sub> 和 C<sub>1</sub> 出现了 900 bp 的一条带 C<sub>0</sub> 还出现了 1 000 bp 多一点的条带 ,C<sub>1</sub> 还出现了 1 700 bp 左右的条带。S156 的产物中 ,C<sub>0</sub> 出现了接近 400 bp 一条特异带 ,C<sub>1</sub> 出现了接近 400 bp 和接近 1 000 bp 的 2 条带。S318 的产物中 ,出现了接近 400 bp 和接近 500 bp 的 2 条特异条带。S459 的产物中 ,F<sub>1</sub> 出现了接近 500 bp 的特异条带。S484 的产物中 ,F<sub>1</sub> 出现了 600 bp 左右的特异条带。在 C<sub>1</sub> 中 ,由于样本容量大 ,再加上该群体本身是性状分离程度大的一代 ,基因丰富 ,含概了以上所有的特异性的条带。这些特异性条带的出现 ,可

能与杂种后代的杂种优势和育性有一定的关系。

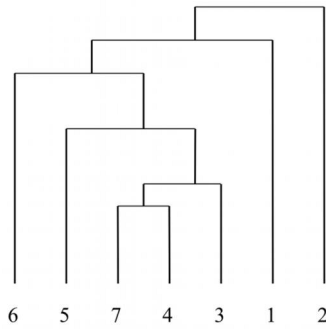


图 9 7 个群体的 RAPD 聚类图

Fig. 9 RAPD Classific figure of 7 population

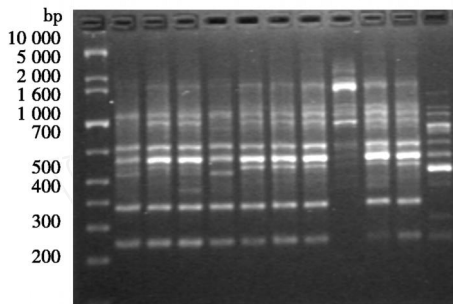


图 10 加拿大披碱草引物 S5 扩增图谱

Fig. 10 PCR amplification results of S5 on *E. canadensis*

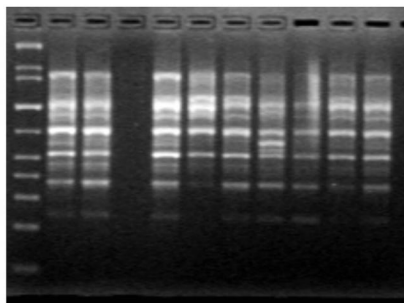


图 11 老芒麦引物 S5 扩增图谱

Fig. 11 PCR amplification results of S5 on *E. sibiricus*

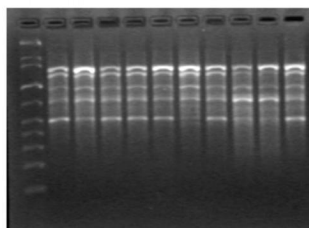


图 12  $F_1$  引物 S48 扩增图谱

Fig. 12 PCR amplification results of S48 on  $F_1$

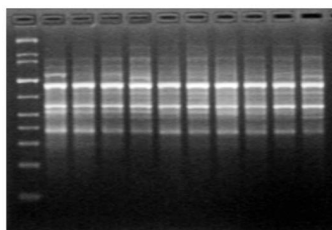


图 13  $C_1$  引物 S127 扩增图谱

Fig. 13 PCR amplification results of S127 on  $C_1$

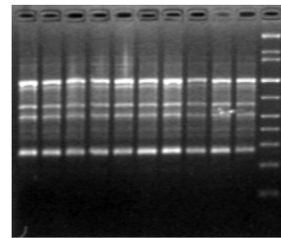


图 14  $C_0$  引物 S127 扩增图谱

Fig. 14 PCR amplification results of S127 on  $C_0$

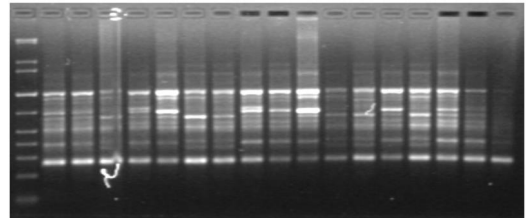


图 15  $C_1$  引物 S127 扩增图谱

Fig. 15 PCR amplification results of S127 on  $C_1$

### 3 讨论

#### 3.1 同工酶的表达与生育期的关系

从本试验的结果看,EST 的表达,在不同的生育期酶谱的差异很大,这一点既体现在同种内,也体现在亲本和杂交后代之间,而且无规律可寻。用 EST 谱带特征可以鉴定杂种,但是要选择合适的生育期,否则很难鉴定。而 SOD 的谱带的特征在所有生育期都一样,只是表达的量有多有少。不能用来鉴定杂交种的真实性。

#### 3.2 RAPD 标记在育种中的应用

RAPD 技术是基于聚合酶链式反应原理,通过运用不同核苷酸序列的随机引物(通常为 10 个碱基)对基因组进行扩增,对扩增产物进行电泳,寻找多态性标记。这类标记通常是显性遗传,由于它在技术上简单,也无需对基因组序列有多少了解,只要合成一套随机引物就可用于作物物种,因而应用最为广泛。张立异等经过大量引物筛选,应用 RAPD 技术证实节节麦和野燕麦的六倍体与八倍体杂种的真实性。利用 RAPD 技术证实显性效应是水稻杂种优势形成的遗传基础。RAPD 分子标记作为一种快速简捷、有效的检测手段,已被广泛应用于植物种子纯度及杂交后代的鉴定和杂种优势的预测上<sup>[20-23]</sup>。

### 4 结论

EST 同工酶在 4 个生育期中共表达 8 条酶带,无规律的分布在各个生育期,具有较高的多态性,在分蘖期杂种的 EST 酶谱偏向母本,在该生育期内可以用酶谱的特征来鉴定杂种的真实性。而在另外的

3 个生育期中,酶谱的特征偏向父本,光从谱带的特征上都不能很好地鉴定杂种。SOD 的表达的酶带数量上没有差异。只是在抽穗期老芒麦的 SOD 酶带多了 1 条( $R_f = 0.44$ ),其他条带都相同,差别在于酶的浓度大小。

在 RAPD 分析表明,加拿大披碱草与老芒麦的遗传一致度为 0.72,遗传距离为 0.328 5,是 7 个群体中亲缘关系最远的。杂种后代之间的遗传距离相对较近这些可为加拿大披碱草与老芒麦的遗传改良提供科学依据和理论指导。

老芒麦扩增的条带比加拿大披碱草 RAPD 扩增的条带数要丰富的多,在杂种后代的条带中,除了新增的特异条带外(S5、S52、S67、S126、S127、S133、S141、S156、S318、S459、S484),还出现了互补双亲的条带(除了 S134 外,在所有的引物中都均有分布)。这些特异性条带的出现,可能与杂种后代的杂种优势和育性有一定的关系。由于 RAPD 所用的随机引物是 10 bp 的寡聚核苷酸,同时,扩增反应还受到模板 DNA 用量、dNTP、 $Mg^{2+}$  及 *Taq* 酶浓度等诸多因素的影响,因而 RAPD 技术较其他分子标记(如 RFLP)稳定性差,限制了它更广泛的应用。要想得到很好的试验结果,必须对 RAPD 的 PCR 反应体系和条件进行筛选与优化。

#### 参考文献:

- [1] 朴春根,唐文华,曾士迈,等. RAPD 技术和聚类分析在小麦条锈病菌生理小种研究中的应用[J]. 植物病理学报,1996,26(3):205 - 210.
- [2] 吴卫,郑有良,魏育明,等. 利用 RAPD 技术分析小麦强优势组合亲本遗传差异[J]. 四川农业大学学报,1999,17(2):123 - 129.
- [3] 陈新平,闫玲,丁毅,等. 湖北大麦品种资源的 RAPD 分析[J]. 武汉大学学报:自然科学版,2000,46(2):249 - 252.
- [4] 海林,翁跃进. 小麦耐盐种质遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 西北植物学报,2000,20(6):92 - 94.
- [5] 武波,韦东,秦学毅,等. 野生稻和栽培稻的随机多态 DNA (RAPD) 分析[J]. 广西植物,2001,21(4):339 - 343.
- [6] Dudley J M, Sayhai M A, Rufener G K. Molecular markers in formation and selection of parents in corn breeding programs[J]. Crop Science,1992,32(2):301 - 304.
- [7] 李造哲,马青枝,云锦凤,等. 加拿大披碱草和老芒麦及其杂种 F1 代同工酶分析[J]. 中国草地,2000(5):28 - 31.
- [8] 郭海林,刘建秀,朱雪花,等. 结缕草属植物杂交育种及其杂种鉴定——同工酶的变异分析[J]. 草业学报,2006,15(6):101 - 108.
- [9] 乌仁其木格,于卓,云锦凤. 几种小麦族禾草及其杂种酯酶同工酶研究[J]. 内蒙古农业大学学报,1999,20(4):49 - 53.
- [11] 邵雪玲,郭一清. 生物化学与生物学实验指导[M]. 武汉:武汉大学出版,2003:38 - 43,173 - 174.
- [12] 李建武. 生物生化实验原理及方法[M]. 北京:北京大学出版社,1994:185 - 195.
- [13] 马艳红,于卓,赵晓杰. 加拿大披碱草 - 三倍体杂种加倍植物同工酶分析[J]. 草地学报,2004,12(3):98 - 102.
- [14] 罗广华,王爱国. 植物 SOD 的凝胶电泳及活性的显示[J]. 植物生理学通讯,1983(6):44 - 45.
- [15] 张楚富. 生物化学原理[M]. 北京:高等教育出版社,2003:149 - 250.
- [16] 陈匀辉,陶力. 生物化学实验[M]. 北京:科学出版社,2003:110 - 114.
- [17] 李运朝,范妍芹,郭锋,等. 甜椒雄性不育两用系 AB91 不育株与可育株花药同工酶分析[J]. 植物遗传资源学报,2007,8(1):102 - 105.
- [18] 韩冰. 针茅属植物基因组 DNA 提取方法的研究[J]. 内蒙古农业大学学报,2002,23(4):32 - 35.
- [19] Williams J G K, Kubelik A R, Livak K J, et al. DNA polymorphism amplified by arbitrary primer are useful as genetic markers[J]. Nucleic Acid Res,1990,18:6531 - 6535.
- [20] 周永红,郑有良,杨俊良,等. 10 种披碱草属植物的 RAPD 分析及其系统学意义[J]. 植物分类学报,1999,37(5):425 - 432.
- [21] 刘丽,朱永清,王幼芳. 鼠尾藓不同居群间形态及 RAPD 分析[J]. 云南植物研究,2006,28(6):570 - 574.
- [22] 周永红,郑有良,杨俊良,等. 鹅观草属、披碱草属、猬草属和仲彬草属植物的 RAPD 分析及其系统学意义[J]. 四川农业大学学报,2001,19(1):14 - 19.
- [23] 孔令让,董玉琛,贾继增. 粗山羊草随机多态性 DNA 研究[J]. 植物学报,1998,40(3):223 - 227.