

载有抗逆性基因的多枝赖草染色体连锁群的特定 TAC 克隆的鉴定

张 艳^{1,2}, 赵茂林², 孙 淼^{1,2}, 徐粤宇³

(1. 首都师范大学 生命科学学院, 北京 100037; 2. 北京市农林科学院 农业生物技术
研究中心, 北京 100097; 3. 湖南工程学院, 湖南 湘潭 411104)

摘要: 分别以耐黄矮病耐蚜虫小麦附加系 Line24、耐盐耐旱小麦附加系 Line15、耐盐小麦易位附加系 Line14 为材料, 以它们各自所附加的含有相应抗逆基因的多枝赖草染色体(简称为抗逆染色体)的 6 个特定 SSR 分子标记为探针, 通过两轮菌落杂交法筛选多枝赖草基因组可转化人工染色体(TAC)文库, 最终得到经过验证的阳性克隆 77 个, 它们分别对应于 3 个(易位)附加系中所附加抗逆染色体(臂)连锁群的 6 个特定 SSR 标记, 每一标记所对应的 TAC 克隆数目变化在 5~19 个, 平均约 13 个。进一步从来自 Line24 的抗逆染色体连锁群的同一个探针筛选到的阳性克隆中抽查 2 个 TAC 克隆 15J18 和 09I02, 通过双色荧光原位杂交技术(Double-color FISH)进行初步定位, 直观地证明了文库筛选结果的准确性。为各条抗逆染色体的识别鉴定和相关抗逆基因的精细定位奠定了基础。

关键词: 多枝赖草; TAC 克隆; 二体(易位)附加系; 抗逆性; 双色荧光原位杂交

中图分类号: Q781; Q243; S812.8 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7091(2008)05-0006-07

Identification of the Transformation-competent Artificial Chromosome(TAC) Clones Specific to the Linkage Group of Chromosomes Containing Stress-tolerant Genes of *Leymus multicaulis*

ZHANG Yan^{1,2}, ZHAO Mao-lin², SUN Miao^{1,2}, XU Yue-yu³

(1. Capital Normal University, Beijing 100037, China; 2. Beijing Academy of Agriculture and Forestry
Science, Beijing 100097, China; 3. Hunan Institute of Engineering, Xiangtan 411104, China)

Abstract: *Leymus multicaulis* ($2n=4X=28$, X_mX_mNsNs) is one of benefit native grass species in Xinjiang, which has many excellent traits such as immune or highly resistant to BYDV (Barley yellow dwarf virus), and highly tolerant to salt, drought, leanness, pollution, aphids and so on. So it is very important to isolate and clone genes controlling these traits in *Leymus multicaulis*. In this research, the transformation-competent artificial chromosome (TAC) genomic libraries of *Leymus multicaulis* were screened through the method of colony blot hybridization in two steps with the probes of specific SSR molecular markers from stress-tolerance chromosomes, which contained stress-tolerant genes of *Leymus multicaulis* respectively added to wheat alien disomic addition line. Line 24, tolerant to BYDV and aphids; Line 15, tolerant to salt and drought, and wheat alien disomic translocation-addition line; Line 14, tolerant to salt. As a result, a total of 77 positive clones respectively specific to six SSR markers from three stress-tolerance chromosome linkage groups were identified. The accuracy of the screening results was verified visually by physical localization of two TAC clones 15J18 and 09I02 from the positive clones specific to a SSR marker of the same linkage group using double-color fluorescent in situ hybridization (Double-color FISH). The research results will play a pivotal role in identifying individual stress-tolerance chromosome of *Leymus multicaulis* and constructing high-resolution physical map.

Key words: *Leymus multicaulis*; TAC clones; Disomic alien (translocation) addition line; Stress-tolerance; Double-color fluorescent in situ hybridization

收稿日期: 2008-04-10

基金项目: 国家自然科学基金(30370905, 30571135); 北京市自然科学基金(5032009)

作者简介: 张 艳(1983-), 女, 山东潍坊人, 在读硕士, 主要从事分子与细胞遗传学方面的研究。

通讯作者: 赵茂林(1965-), 男, 山西原平人, 研究员, 研究生导师, 主要从事植物分子细胞遗传学与育种学方面的研究。

多枝赖草 (*Leymus multicaulis*) ($2n = 4x = 28 = 14II$, $XmNs$) 是禾本科小麦族大麦亚族赖草属小粒种子类型的一个种, 目前已被证实具有突出的耐干旱、耐盐碱、耐黄矮病、耐蚜虫、耐瘠薄、耐污染等优异抗逆特性^[1]。这些抗逆特性都是目前种植的大多数农作物如小麦等本身缺乏的, 是在当今世界人口增长、可耕(牧)地减少、环境恶化形势下急需改良的特性。因此, 获得这些具有优异抗逆特性的功能基因, 明确它们的抗逆作用机理, 对于农业、畜牧业和草坪业中植物的抗逆遗传育种极为重要。

关于将多枝赖草应用于小麦的研究国外报道很少, Plourde 等^[2] 1989 年首次报道获得了多枝赖草与小麦间的远缘杂种及其回交一代和二代, 并发现多枝赖草对黄矮病毒 PAV 株系的抗性能够传递给杂种后代, 以后再无相关报道。国内董玉琛等^[3] 于 1985 年首先成功地进行了多枝赖草与小麦 ($2n = 6x = 42 = 21II$, AABBDD) 远缘杂交; 赵茂林等^[4-6] 首次从中选育出普通小麦-多枝赖草 12 种(缺少第 4, 5 同源群)15 个互不相同的二体异附加系(简称小赖麦附加系), 初步鉴定出高度耐黄矮病耐蚜虫以及耐盐的几种小赖麦附加系, 并在 2001 年通过基因组原位杂交技术明确小赖麦附加系 Line24 与小麦杂交形成的小麦-多枝赖草单体异附加材料中, 减数分裂期的细胞中含有完整的一条外源多枝赖草染色体(图 3-A)^[7]; 采用生物学和血清学(ELISA)相结合的鉴定方法证明了多枝赖草对我国大麦黄矮病毒(BYDV)PAV 和 GAV 株系免疫或高抗, 小赖麦附加系 Line24 高耐这 2 种株系^[8]; 采用 SSR 技术确定了微卫星引物对 wms133、wms190、wms314、wms400 扩增出的特异带可以作为 Line24 中多枝赖草染色体的特定 SSR 分子标记^[9]。利用含 0.4% (m/m) NaCl 的人工模拟盐池鉴定出一个高度耐盐的小赖麦附加系 Line15, 通过荧光原位杂交技术表明其细胞中附加有一对完整的多枝赖草染色体(图 3-B)^[10], 采用 SSR 技术确定了微卫星引物对 wms674、wms400、wms382、wms501 扩增出的特异带可以作为 Line15 中多枝赖草染色体的特定 SSR 分子标记。还鉴定出 Line14 是一个耐盐的易位断裂发生在着丝点处的小麦-多枝赖草臂间易位附加系(图 3-C), 并利用 SSR 技术确定了微卫星引物对 wms156 扩增出的特异带可以作为 Line14 中多枝赖草染色体臂的特定 SSR 分子标记^[11]。对所有附加系进行模拟旱池的耐旱鉴定试验, 发现 Line14 和 Line15 都耐旱, 在定期缺水后, 浇水恢复迅速; Line15 的耐旱性更加显著, 在种植后全生育期不灌溉的情况下, 产量与正常灌溉

的相差不大。2006 年首次构建了多枝赖草基因组可转化人工染色体(TAC)文库^[12], 该文库以 pYL-TAC17 和 pYL-TAC747H 为载体, 平均插入片段长度约 50 kb, 总克隆数为 40 多万个, 至少覆盖了 3~5 倍多枝赖草基因组, 为多枝赖草抗性基因的克隆与物理作图奠定了基础。

在上述研究基础上, 分别以耐黄矮病耐蚜虫小赖麦附加系 Line24、耐盐耐旱小赖麦附加系 Line15、耐盐小赖麦易位附加系 Line14 中所附加的含有各自相应抗逆基因的多枝赖草染色体(简称为抗逆染色体)的特定 SSR 分子标记为探针, 通过菌落原位杂交法筛选多枝赖草基因组 TAC 文库, 以获得分属于不同附加系中所附加的抗逆染色体(臂)连锁群中的阳性克隆, 并利用双色荧光原位杂交(Double-color FISH)技术对所筛选阳性克隆的可靠性进行鉴定。

1 材料和方法

1.1 材料

小赖麦附加系 Line24 和 Line15(中国春/多枝赖草//中国春///丰抗 13), 小赖麦易位附加系 Line14(中国春/多枝赖草//中国春///丰抗 10)是赵茂林于 1991—1993 年在中国农业科学院董玉琛院士指导下所创制和繁殖保存; 其有关抗性亲本多枝赖草和普通小麦亲本中国春、丰抗 10 和丰抗 13, 由赵茂林研究员保存提供。除多枝赖草是多年生田间宿根生长外, 其余材料均于秋末播种前切取根尖固定供有丝分裂期染色体制片, 播种出苗后拔节前的分蘖嫩叶供提取 DNA, 植株孕穗期花药供减数分裂期染色体制片。

多枝赖草基因组可转化人工染色体(TAC)文库由赵茂林研究员的实验室构建保存, 本研究选用备份于 14 块 384 孔板的 5 376 个单克隆, 其中以 pYL-TAC17 和 pYL-TAC747H 为载体的各有 2 496 和 2 880 个。

1.2 方法

1.2.1 筛选文库的高密度克隆膜的制备 借助 GeneTACTMG3 将 14 块 384 孔板的 5 376 个单克隆按 4×4 的排列方式, 每一克隆重复 3 次接种于 3 张 $8 \text{ cm} \times 12 \text{ cm}$ 的硝酸纤维素膜(Whatman)上。将接种面向上置于含 $25 \mu\text{g/mL}$ 卡那霉素、5% 的蔗糖和 0.3 mmol/L IPTG 的 LB 平板上, 菌斑长至 $0.5 \sim 1 \text{ mm}$ 约 14 h。膜的菌落面向上小心置于用 10% SDS 溶液浸透了的滤纸(Whatman 3 mm)上 4 min, 同样方法依次用变性液 (1.5 mol/L NaCl , 0.5 mol/L NaOH) 5 min, 中和液 (1.5 mol/L NaCl , $0.5 \text{ mol/L Tris-HCl}$,

1 mmol/L EDTA)5 min 2 次, 含 0. 1 %SDS 的 2×SSC 5 min, 2×SSC 5 min, 0. 4 mol/L NaOH 20 min 处理后, 在滤纸晾干, 放 CL-1000 UV crosslinker 机中能量为 1 200×100 μJ/cm²紫外线下交联 4 min, 每张膜单放一个盒中漂洗, 菌面向下轻微振荡, 依次再经 5×SSC、0. 1 %SDS 中 20 min 2 次, 2×SSC 中 10 min 2 次, 室温下风干。制备好的高密度克隆膜可直接用于杂交分析或-20℃干燥保存。

1.2.2 筛选文库的探针制备 选用小赖麦附加系 Line24 的 2 个 SSR 分子标记引物对 wms133 和 wms190^[9], Line15 的 2 个 SSR 分子标记引物对 wms400 和 wms674^[10], 小赖麦易位附加系 Line14 的 SSR 分子标记引物对 wms156^[11], 对相应的小赖麦附加系及其抗性亲本多枝赖草和非抗性亲本小麦品种(中国春、丰抗 10 和丰抗 13)进行 PCR 扩增, 扩增所需的模板 DNA 从叶片中提取^[13]。SSR 反应主要参照 Röder 等^[14], PCR 反应体系含 2 μL 10×PCR Buffer, 0. 2 μL 25 mmol/L MgCl₂, 2 μL 2 mmol/L dNTP, 2. 5 μL 2 μmol/L 引物, 0. 4 μL 2. 5 U/μL Taq 酶, 50~100 ng DNA 模板, 加 ddH₂O 到 20 μL。扩增程序为: 94℃预变性 4 或 5 min, 再按每个循环 94℃1 min, 55 或 60℃1 min, 72℃1 或 2 min 扩增 30 或 35 个循环, 最后 72℃延伸 10 min。PCR 扩增在 PTC-100-16MS 原位 PCR 仪(MJ Research)上进行。

扩增产物利用聚丙烯酰胺凝胶电泳检测: 20 μL PCR 反应产物中加入 6 μL 变性载样缓冲液(98%无离子甲酰胺, 10 mmol/L EDTA (pH 8. 0), 0. 25%溴酚蓝), 94℃变性 5 min, 立即冰浴冷却备用, 样品上样量为 5 μL, 95 W 恒功率电泳(2 h 左右), 银染。胶板晾干后回收差异片段二次 PCR 扩增。

二次扩增产物利用琼脂糖凝胶电泳检测后, 回收各 SSR 扩增特征片段, 分别按照 DIG-High Prime

DNA Labeling and Detection Starter Kit II (Roche)说明书程序采用随机引物标记法进行 Digoxigenin-dUTP 标记, 制备成杂交筛选探针。

1.2.3 阳性 TAC 克隆的筛选验证 采用两轮菌落杂交法对 TAC 文库进行筛选。首先各探针分别与 2 份高密度克隆膜按照 DIG-High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II (Roche)说明书程序进行第一轮杂交, 将每个探针在 2 次杂交结果中都显示为阳性和仅显示 1 次阳性的克隆点进行分别统计, 从中选取都显示为阳性和仅显示 1 次阳性但杂交信号最强的克隆, 按探针不同每一克隆重复 2 次手工接种于硝酸纤维素膜上, 利用第 1 轮杂交回收的探针对手工点膜进行第 2 轮杂交筛选验证。

1.2.4 染色体制片与双色荧光原位杂交(Double-color FISH) 染色体制片程序参考葛荣朝等^[10]的方法。从任意一个探针筛选文库所获得的阳性克隆中, 选取 2 个 TAC 克隆用碱裂解法提取质粒 DNA 后, 采用缺口平移法分别用 Biotin-11-dUTP (Bio-nick translation mix, Enzo, Roche)和 Digoxingenin-11-dUTP (dig-nick translation mix, Enzo, Roche)参照试剂盒说明书进行标记, 制备成 FISH 探针。

双色荧光原位杂交参阅 Liu 等^[15]的程序, 稍有修改。不同材料的杂交液成分不同(表 1), 每张染色体制片加杂交液 40 μL, 加塑料盖片后, 放入 PTC-100-16MS 原位 PCR 仪(MJ Research), 变温处理过夜(75℃5 min, 60℃2 min, 55℃2 min, 50℃30 s, 45℃1 min, 42℃2 min, 40℃5 min, 38℃5 min, 37℃18 h)。检测时每张制片滴加 5%BSA 配制的 2 μg/mL Anti-dig 溶液和 2 μg/mL avidin-rhodarmine 溶液各 50 μL, 加塑料盖片, 置于原位 PCR 仪 37℃, 1 h 或更长时间, 最后滴加 DAPI II (Abbott Molecular Inc.) 20 μL/片, 封片。

表 1 3 种试验材料的杂交液成分

Tab. 1 The hybridization solutions of three different materials

	多枝赖草 <i>Leymus multicaulis</i>	小赖麦附加系 Line24	中国春 Chinese spring
100%去离子甲酰胺/μL 100% deionized formamide	20	20	20
80%硫酸葡聚糖/μL 80% sodium dextran sulphate	5	5	5
20×SSC/μL	4	4	4
10%SDS/μL	1	1	1
鲑鱼精 DNA/μg Salmon sperm DNA	5	5	5
小麦封阻 DNA/μg Wheat blocking DNA	—	1	1
多枝赖草 Cot-1 DNA/μg <i>Leymus multicaulis</i> blocking Cot-1 DNA	1	1	—
标记的 TAC 克隆探针/ng Labeled TAC DNA	各 50	各 50	各 50

2 结果与分析

2.1 筛选文库探针的获得

用 3 条抗逆染色体的 5 对特定 SSR 分子标记引

物分别对相应的小赖麦(易位)附加系及其抗性亲本多枝赖草和非抗性亲本小麦品种中国春、丰抗 10、丰抗 13 进行 PCR 扩增, 鉴定出各小赖麦(易位)附加系和多枝赖草都能够扩增的 6 个特异性条带(谱

带图同文献[9—11]), 即 SSR 分子标记 wms133—310 bp, wms190—175 bp, wms165—150 bp, wms165—170 bp, wms400—123 bp 和 wms674—125 bp(表 2), 回收

后进行二次扩增(图 1), 经随机引物标记法标记后作为筛选文库的探针。

表 2 筛选以单克隆形式保存的多枝赖草基因组 TAC 文库所确定的阳性克隆

Tab. 2 Positive clones identified by screening clones of the <i>Leymus multicaulis</i> TAC libraries stored individually					
探针 Probes	来源 Source	抗逆相关性 Stress resistance	筛选阳性 克隆数 Number of hits	阳性克隆 Positive clones	
				pYITAC17 载体 Vector of pYITAC17	pYITAC747H 载体 Vector of pYITAC747H
wms133—310 bp	Line 24	耐黄矮病耐蚜虫	19	03M11, 03M14, 03N21, 03O08, 05G08, 15H19, 15K16, 20B19, 20C05, 20C08, 20C09, 20D17, 34D03 ^b , 15J18	02L04, 06H09, 09I02, 09J06, 20L20
wms190—175 bp	Line 24	耐黄矮病耐蚜虫	5	03D06, 05G02	06J18, 06B12, 06B13
wms156—150 bp	Line 14	耐盐	10	23L04 ^a , 34I09 ^c	31O06 ^c , 02N01, 04I05, 06H06, 09E04, 09M07, 31M07 ^a , 20M12 ^c 02K01, 06B12, 06K04, 09B09, 09M12, 31O06 ^c , 20M12 ^c , 31M07 ^a 06G22, 04J09 ^a , 20I04, 20N02, 23M12, 31N01, 02H10 ^a , 02M04 ^a , 31L06, 34K03
wms156—170 bp	Line 14	耐盐	12	03D06, 20D16, 23L04 ^a , 34I09 ^c	04J09 ^a , 04L11, 06C15, 06G22 20M12 ^c , 20P16, 31H06, 31O05, 31O06 ^c , 31O07, 34K12, 02H10 ^a , 02M04 ^a
wms400—123 bp	Line 15	耐盐耐旱	12	26B14, 34D03 ^b	
wms674—125 bp	Line 15	耐盐耐旱	19	15E13, 20E18, 20G06, 20H10, 20H11, 34I09 ^c	
总计 Total			77	30	47

注: a. 由分布于同一连锁群内的不同探针所筛选到的相同克隆; b. 由分布于不同连锁群内的探针筛选的相同克隆; c. 由分布于不同连锁群和同一连锁群内的不同探针筛选到的相同克隆。

Note: a. Clones hit by different probes from the same linkage group; b. Clones hit by probes from the different linkage groups; c. Clones hit by different probes both from the same linkage group and different linkage groups.

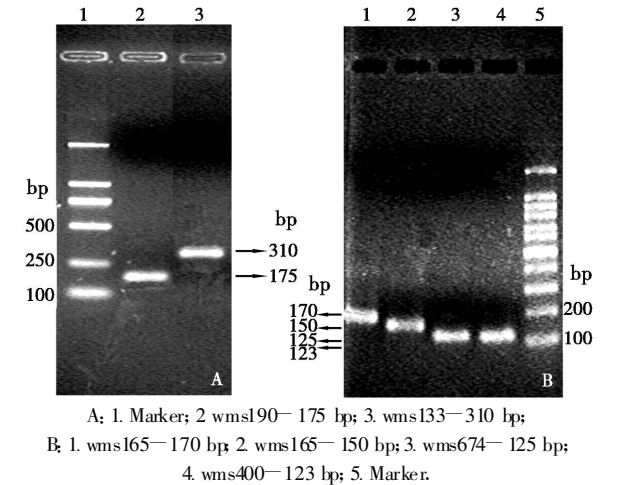


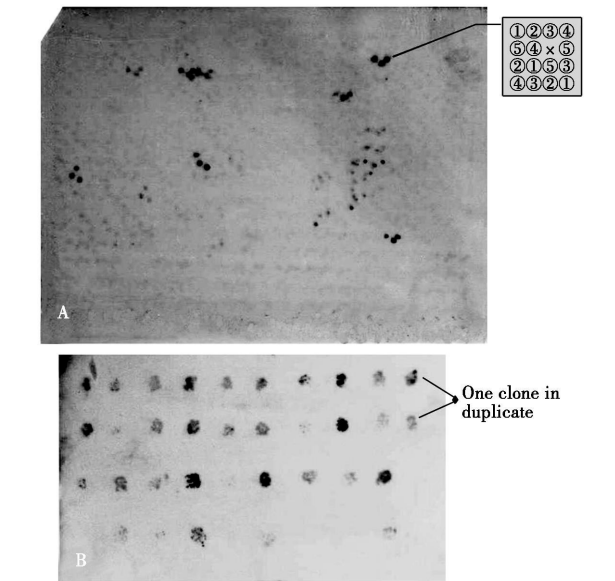
图 1 回收特异性条带二次扩增结果

Fig. 1 The amplified products of specific fragments extracted from gel

2.2 抗逆染色体连锁群的特定 TAC 克隆的筛选

本研究中首先将保存于 14 块 384 孔板的 5 376 个单克隆按 4×4 的排列方式, 每一克隆重复 3 次接种于 3 张 8 cm×12 cm 的硝酸纤维素膜上。由于杂交信号强度会随着杂交与洗涤次数的增加而逐渐降低^[6], 考虑到本试验中需要进行杂交的探针有 6 个, 我们制备了 4 份高密度克隆膜。为了使杂交结果全面而准确, 在进行第一轮原位杂交时, 6 个标记探针分别与 2 份高密度克隆膜进行了原位杂交(图

2-A), 将每个探针在 2 次杂交结果中都显示为阳性



A. 第 1 轮, 图中箭头标示的是探针 wms133—310 bp(表 2)筛选到的一个阳性克隆(来自于 5 号板的 20B19); B. 第 2 轮, 箭头指示的是探针 wms133—310 bp(表 2)筛选到的一个阳性克隆(来自于 9 号板的 09J06), 2 次重复均呈阳性。

A. Partial results of the first step colony hybridization a positive clone(20B19 from plate #5)hybridized to the probe wms133—310 bp(Tab. 2)is shown;
B. Partial results of the second step colony hybridization, a positive clone (09J06 from plate #9)hybridized to the probe wms133—310 bp(Tab. 2)is shown, which is also positive in duplicate.

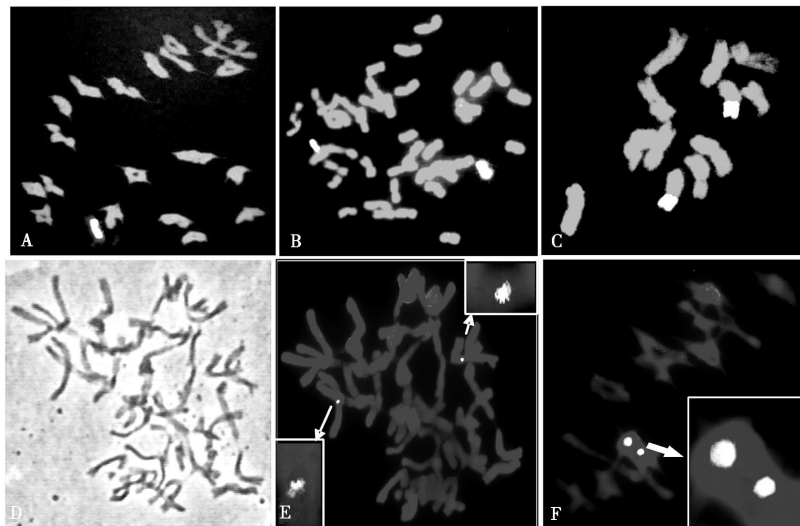
图 2 两轮菌落杂交的部分结果
Fig. 2 Partial results of two-step colony hybridizations

和仅显示一次阳性的克隆点进行分别统计。从第 1 轮杂交结果中选取都显示为阳性和仅显示一次阳性但杂交信号最强的克隆,按探针不同每一克隆重复 2 次手工接种于 6 张硝酸纤维素膜上,利用第 1 轮杂交回收的探针对手工点膜进行第 2 轮杂交筛选(图 2-B),最终得到经过验证的阳性克隆 77 个,它们分别对应于 3 个(易位)附加系中所附加抗逆染色体(臂)连锁群的 6 个特定 SSR 标记(表 2),每一标记所对应的 TAC 克隆数目为 5~19 个,平均约 13 个。

对表 2 进一步分析可以发现,77 个阳性克隆中,有 88.31%(68/77)的克隆各自被唯一的一个探针筛选到;而剩余 11.69%(9/77)的克隆,则同时为分布于不同连锁群间或同一连锁群内的不同探针筛选到,可以归纳成 3 类:①同时为分布于同一连锁群内的不同探针所筛选到,如 04J09、02H10 和 02M04 为分布于连锁群 Line15 的 wms400—123 bp 和

wms674—125 bp 两个探针所共同筛选到,23L04 和 31M07 为分布于连锁群 Line14 的 wms156—150 bp 和 wms156—170 bp 两个探针所共同筛选到;②同时为分布于不同连锁群间的探针所共同筛选到,如 34D03 为分布于连锁群 Line24(wms133—310 bp)和连锁群 line15(wms400—123 bp)的两个探针所共同筛选到;③同时为分布于不同连锁群间和同一连锁群内的不同探针同时共同筛选到,如 20M12、31O06 和 34I09 为分布于连锁群 Line14(wms156—150 bp 和 wms156—170 bp)和连锁群 Line15(wms674—125 bp)间的 3 个探针所共同筛选到。

根据多枝赖草基因组 TAC 文库构建时所用的两种 TAC 载体分别统计,发现最终得到的 77 个阳性克隆中,以 pYLTAC17 和 pYLTAC747H 为载体的阳性克隆各有 30、47 个,与筛选文库时 2 种载体各自的单克隆总数 2 496、2 880 个的比例基本相当。



A. 小赖麦附加系 Line24 与小麦杂交形成的小麦-多枝赖草单体异附加系减数分裂中期 I 分裂相 FISH 结果^[7],黄色染色体为附加的一条外源多枝赖草染色体;B. 小赖麦附加系 Line15 有丝分裂中期分裂相 FISH 结果^[10],黄色染色体为附加的一对外源多枝赖草染色体;C. 小赖麦易位附加系 Line14 有丝分裂中期分裂相 FISH 结果^[11],黄色部分为易位附加的一对外源多枝赖草染色体臂;D. 小赖麦附加系 Line24 有丝分裂中期相差显微镜下普通细胞学分析图片;E. TAC 克隆 15J18(红色)和 09I02(绿色)对小赖麦附加系 Line24 有丝分裂中期分裂相 FISH 结果;F. TAC 克隆 15J18(红色)和 09I02(绿色)对多枝赖草减数分裂中期 I 分裂相 FISH 结果。箭头所指为杂交信号点。

A. The FISH result at meiosis metaphase I of wheat-*Leymus multicaulis* monosomic addition lines formed by cross between Line24 and wheat^[7], a single chromosome of *Leymus multicaulis* shows yellow; B. The FISH result at mitosis metaphase of Line15^[10], a pair of chromosomes of *Leymus multicaulis* show yellow; C. The FISH result at mitosis metaphase of Line14^[11], a pair of chromosome arms of *Leymus multicaulis* show yellow; D. The cytological figure at mitosis metaphase of Line24 under phase-contrast microscope; E. The FISH result at mitosis metaphase of Line24 with the probes of *Leymus multicaulis* TAC clones 15J18 (red) and 09I02 (green); F. The FISH result at meiosis metaphase I of *Leymus multicaulis* with the probes of *Leymus multicaulis* TAC clones 15J18 (red) and 09I02 (green). Arrows indicate the hybridization signals.

图 3 小赖麦(易位)附加系 Line24、Line15 和 Line14 的荧光原位杂交(FISH)图以及 TAC 克隆 15J18(红色)和 09I02(绿色)对小赖麦附加系 Line24 和多枝赖草的双色荧光原位杂交图

Fig. 3 The FISH results of Line24, Line15 and Line14 and the double-color FISH results of *Leymus multicaulis* and Line24 with the probe of *Leymus multicaulis* TAC clones 15J18 (red) and 09I02 (green)

2.3 TAC 克隆 15J18 和 09I02 在多枝赖草和小赖麦附加系 Line24 染色体上的定位

从连锁群 Line24 的 wms133—310 bp 标记为探针筛选到的全部 19 个阳性克隆中,任意选取分别以 pYLTAC17、pYLTAC747H 为载体的克隆各 1 个,即

15J18、09I02,按照宋琳琳^[17]的方法扩大培养提取质粒 DNA,分别以 Biotin-11-dUTP(红)和 Digoxigenin-11-dUTP(绿)进行缺口平移法标记,同时与小赖麦附加系 Line24、多枝赖草以及小麦亲本的细胞分裂期染色体制片进行双色荧光原位杂交(Double-color

FISH)。结果(图 3-E, F)显示, 在小赖麦附加系 Line24 与多枝赖草的有丝分裂和减数分裂中期分裂相中, 均有 2 条染色体的近着丝粒处显示出杂交信号点, 且红色信号点和绿色信号点距离很近, 部分重叠处显示为黄色信号点, 从而直观地表明 TAC 克隆 15J18(红)和 09I02(绿)确实是对应于同一个 SSR 标记的 2 个克隆; 与此同时, 小麦亲本中国春和丰抗 13 的分裂相上却没有任何杂交信号点, 说明小赖麦附加系 Line24 中所显示杂交信号的 2 条染色体(图 3-E)与多枝赖草中显示杂交信号的 1 对染色体(图 3-F)确实是同一对多枝赖草染色体, 特定对应于 wms133—310 bp 的 TAC 克隆 15J18(红)和 09I02(绿)就位于附加在 Line24 的该对多枝赖草染色体连锁群上。此结果直观地验证了文库筛选结果的准确性, 肯定了该文库的前期构建和筛选工作, 并为各条抗逆染色体的识别鉴定和相关抗逆基因的精细定位奠定了基础。

3 讨论

对基因组文库进行筛选, 目前基本有两种策略。大多数研究者所采用的策略, 是每次只针对某种目标基因, 用与其密切相关的探针对文库进行筛选。目前利用 TAC 载体已成功构建的拟南芥^[18]、普通小麦中国春(AABBDD)^[19]、小麦簇毛麦 6VS/6AL 易位系^[20]、抗黄矮病小麦—中间偃麦草易位系 HW642^[21]、百脉根^[22]、番茄^[23]、桃^[24] 等的基因组文库, 其筛选过程均采用这种策略。

另一种筛选策略, 则是首先针对整个基因组中的所有连锁群而进行系统筛选。如 Feng Jiuhan 等^[25] 在建好向日葵($X=17$)的 BAC 和 BIBAC 基因组文库后就根据分布于全部 19 个连锁群(超出的 2 个有疑问)上的 RFLP 标记设计了 36 个重叠寡核苷酸(Overlapping oligonucleotides, Overgos)探针, 对所建文库进行系统筛选获得了对应于其中 33 个探针的特定分布于各连锁群上的 195 个阳性克隆, 为向日葵基因组的全面研究提供了基本资源。

本研究综合考虑这两种筛选策略, 针对多枝赖草($X=14$)全部 14 个连锁群中载有 4 种抗逆基因的 3 对抗逆染色体连锁群, 同时以耐黄矮病耐蚜虫小赖麦附加系 Line24、耐盐耐旱小赖麦附加系 Line15、耐盐小赖麦易位附加系 Line14 中附加的多枝赖草染色体上分别涉及 3 个抗逆基因的 6 个 SSR 分子标记为探针, 对 TAC 文库进行筛选, 最终在同一批试验中获得了分属于 3 个抗逆染色体连锁群的 77 个阳性克隆, 既保证抗逆性重点, 又提高了文库筛选的

效率, 为明确不同抗逆基因之间的相互关系, 揭示多枝赖草适应逆境的分子细胞遗传学机制奠定了基础。

从筛选结果发现, 77 个阳性克隆中, 有 88.31% (68/77) 的克隆各自被唯一的一个探针筛选到; 而剩余 11.69% (9/77) 的克隆, 则同时为分布于不同连锁群间或同一连锁群内的不同探针筛选到。这一结果与 Romanov^[26] 和 Feng^[25] 的研究结果相似, 他们认为这些共有的克隆可能代表了基因组中的重复区域或者只是杂交筛选操作过程中的偶然失误。我们在赞同这种分析的同时, 还猜想在本研究中的这些共有克隆或许正是相关抗逆基因的集中分布所在, 是研究不同抗逆基因之间相互关系的重要克隆, 这有待今后研究中重点关注与加以验证。

致谢: 衷心感谢中科院遗传发育所景健康老师为本研究供高密度克隆膜的制备提供检测设备和大力指导, 中国农业科学院作物科学研究所张学勇研究员为本研究中的 FISH 试验提供检测设备和宝贵经验, 衷心感谢中国农业科学院作物科学研究所陆昆同学在 FISH 实验检测过程中提供的帮助。

参考文献:

- [1] 葛荣朝, 赵茂林, 李国亮. 赖草属的优良基因导入小麦的研究进展[J]. 河北师范大学学报: 自然科学版, 2001, 25(4): 512—516.
- [2] Plourde A, Comeau A, Fedak G, *et al.* Intergenic hybrids of *Triticum aestivum* \times *Leymus multicaulis* [J]. *Genome*, 1989, 32(2): 282—287.
- [3] 董玉琛, 郑殿升. 中国小麦遗传资源[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000: 149—206.
- [4] 赵茂林. 普通小麦-多枝赖草二体附加系的选育与鉴定[D]. 北京: 中国农业科学院, 1993.
- [5] 赵茂林, 周荣华, 董玉琛. 普通小麦-多枝赖草二体附加系的创建及其细胞遗传学研究[C]//何中虎. 第三届全国青年作物遗传育种学术会论文集. 北京: 中国农业科技出版社, 1994: 82—85.
- [6] Zhao M L, Zhou R H, Jia J Z, *et al.* Isolation and identification of wheat-*Leymus multicaulis* addition lines by use of biochemical markers [C]//Proceeding of 8th International Wheat Genetics Symposium. Beijing: China Agricultural Science Press 1995: 827—32.
- [7] 赵茂林, 李瑞芬, 梁宏霞, 等. 小麦-多枝赖草单体异附加材料减数分裂期外源染色体的行为研究[J]. 自然科学进展, 2001, 11(9): 945—949.
- [8] 刘 艳, 钱幼亭, 赵茂林, 等. 多枝赖草及其转育后代对大麦黄矮病毒 PAV 和 GAV 株系的抗性研究[J]. 植物病理学报, 2002, 32(3): 247—251.
- [9] 郭光艳, 李瑞芬, 张敬原, 等. 利用 SSR 鉴定普通小麦-多枝赖草二体异附加系 Line24 中外源染色体同源群的

- 归属[J]. 华北农学报, 2004, 19(4): 14—17.
- [10] 葛荣朝, 张敬原, 赵宝存, 等. 一个耐盐小麦-多枝赖草二体异附加系外源染色体的鉴定[J]. 中国农业科学, 2006, 39(1): 193—198.
- [11] 张敬原, 赵茂林, 葛荣朝, 等. 普通小麦-多枝赖草耐盐易位系的鉴定[C]//中国的遗传学研究-中国遗传学会第七次全国代表大会暨学术讨论会论文摘要汇编. 北京: 中国遗传学会编, 2003: 91—92.
- [12] 徐粤宇, 周玉雷, 宋琳琳, 等. 多枝赖草基因组可转化人工染色体(TAC)文库的构建和鉴定[J]. 中国科学: C 辑, 2008, 38(4): 1—9.
- [13] Röder M S, Korzun V, Wendehake K, *et al.* A microsatellite map of wheat[J]. *Genetics*, 1998, 149: 2007—2023.
- [14] Röder M S, Plaschke J, König S U, *et al.* Variability and chromosomal location of microsatellites in wheat[J]. *Molecular and General Genetics*, 1995, 246: 327—333.
- [15] Liu Zhao, Yue Wei, Dong Yu-shen, *et al.* Identification and preliminary analysis of several centromere-associated bacterial artificial chromosome clones from a diploid wheat library[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2006, 48(3): 348—358.
- [16] J 萨姆布鲁克, 黄培堂译. 分子克隆实验指南[M]. 3 版. 北京: 科学出版社, 2002: 508.
- [17] 宋琳琳. 可转化人工染色体(TAC)文库载体 DNA 制备的研究[D]. 北京: 首都师范大学, 2006: 24—27.
- [18] LIU Yao-guang, Shirano Y, Fukaki H, *et al.* Complementation of plant mutants with large genomic DNA fragments by a transformation-competent artificial chromosome vector accelerates positional cloning[J]. *Proc Natl Acad Sci USA (Plant Biology)*, 1999, 96: 6535—6540.
- [19] LIU Yao-Guang, Nagaki K, Fujita M, *et al.* Development of an efficient maintenance and screening system for large-insert genomic DNA libraries of hexaploid wheat in a transformation-competent artificial chromosome (TAC) vector[J]. *Plant J*, 2000, 23(5): 687—695.
- [20] 秦跟基, 陈佩度, 刘耀光, 等. 用克隆池 PCR 法筛选小麦-簇毛麦易位系 6VS/6AL 基因组 TAC 文库获得抗病基因候选克隆[J]. 生物工程学报, 2002, 18(3): 313—317.
- [21] 王晓萍, 张增艳, 张群宇, 等. 抗黄矮病小麦—中间偃麦草易位系基因组可转化人工染色体文库的构建及初步筛选[J]. 遗传学报, 2002, 29(8): 712—718.
- [22] 郭熙志, 刘耀光, 罗 达. 以可转化人工染色体(TAC)载体为基础的百脉根基因组文库的构建及筛选[J]. 植物生理与分子生物学学报, 2004, 30(2): 234—238.
- [23] Qu S, Coaker G, Francis D, *et al.* Development of a new transformation-competent artificial chromosome (TAC) vector and construction of tomato and rice TAC libraries[J]. *Molecular Breeding*, 2003, 12: 297—308.
- [24] Liang F S, Zhang K C, Yu Z W, *et al.* Construction, characterization, and screening of a Transformation-Competent Artificial Chromosome library of peach[J]. *Plant Molecular Biology*, 2004, 22(3): 37—48.
- [25] Feng Jiu-huan, Vick, Brady A, Lee Mi-Kyung, *et al.* Construction of BAC and BIBAC libraries from sunflower and identification of linkage group-specific clones by overgo hybridization[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2006, 113(1): 23—32.
- [26] Romanov M N, Price J A, Dodgson J B. Integration of animal linkage and BAC contig maps using overgo hybridization[J]. *Cytogenet Genome Res*, 2003, 101: 277—281.