

小麦-簇毛麦染色体代换系、易位系 V 染色体 RAPD 标记筛选

洪敬欣, 彭永康

(天津师范大学 生物系, 天津 300074)

摘要:利用 105 条 S 系列和 100 条 Operon 随机引物, 对小麦-簇毛麦代换系(6V/6A)、两个易位系(6VS/6AL, 6VS/6DL)及亲本簇毛麦(VV)、硬粒小麦(AABB)、栽培小麦(AABBDD)的多态性进行了筛选分析。80.95% 的 S 系列引物扩增出了结果, 且条带较清晰; 在 100 条 OP 系列引物中均扩增出结果, 条带清晰可见。从 205 个随机引物中发现, 只有 1 个引物 OPW03 在含有簇毛麦 V 染色体的 4 个材料中均扩增出 1 条约 570 bp 的谱带, 而在栽培小麦和硬粒小麦中没有发现。因此, 可以推测这个分子标记(OPW03-₅₇₀)是位于簇毛麦 V 染色体短臂上的。

关键词:簇毛麦; *Pm21* 基因; 小麦; 代换系; 易位系; 抗白粉病基因; RAPD 标记

中图分类号:Q343.1⁺7 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-7091(2004)03-0103-04

The Screening of RAPD Markers in V Chromosome of Wheat-*Haynaldia villosa* Substitution Line and Translocation Lines

HONG Jing-xin, PENG Yong-kang

(Biology Department of Tianjin Normal University, Tianjin 300074, China)

Abstract: This study screened and analyzed the polymorphism of a wheat-*Haynaldia villosa* substitution line (6V/6A) and two wheat-*Haynaldia villosa* translocation lines and parental *Haynaldia villosa* (VV) and *Triticum durum* by using 105 pieces of S-series random primers and 100 pieces of Operon random primers. 80.95 percent of S-series random primers amplified the polymorphism and its bands are clear. In all 100 pieces of Operon random primers amplified the polymorphism and its bands can be seen clearly. In 205 pieces of primers, only one primer OPW03 amplified the 570 bp band in four materials contained V chromosome of *Haynaldia villosa*, but this band don't exist in common wheat and *Triticum durum*. Therefore, this molecular marker (OPW03-₅₇₀) may locate in the short arm of *Haynaldia villosa*'s V chromosome.

Key words: *Haynaldia villosa*; *Pm21* gene; Wheat; Substitution lines; Translocation lines; Powdery mildew resistance gene (*Pm*); RAPD markers

白粉病是小麦生产中的一种全球性病害^[1], 在国际上已经正式定名的 32 个小麦主效抗白粉病基因中^[2,3], 只有来自于簇毛麦的 *Pm21* 抗性最强、抗谱最广, 它能抗中国所有白粉菌及生理小种, 对欧洲 120 个生理小种也具很强抗性^[4,5]。小麦-簇毛麦染色体代换系 6V/6A 是通过簇毛麦(VV)与硬粒小麦(AABB)杂交, F₁ 与栽培小麦(AABBDD)自由授

粉培育而成的。两个易位系 6VS/6AL, 6VS/6DL 则是代换系与农艺亲本杂交结合辐射诱变方法在后代中选择得到的^[6]。根据细胞遗传学研究, *Pm21* 位于簇毛麦 6V 染色体短臂上。为了能够克隆出 *Pm21* 基因以及代换系、易位系在小麦抗病育种中的应用, 许多研究者以 6V/6A, 6VS/6AL, 6VS/6DL 等为材料, 开展了 6VS 遗传传递及其所携 *Pm21* 基

收稿日期: 2004-04-10

基金项目: 国家重大基础研究前期研究专项基金(2003CCC00200)资助

作者简介: 洪敬欣(1978-), 女, 天津市人, 硕士, 主要从事小麦白粉病分子标记方面的研究工作; 彭永康为通讯作者。

因的遗传稳定性分析^[7]、分子标记辅助选择等^[8]。但到目前为止,虽然与 *Pm21* 基因相连锁的分子标记或簇毛麦染色体组特异性分子标记已经被筛选得到^[9,10],进一步筛选位于簇毛麦 V 染色体或短臂上与白粉病抗性基因相连锁的分子标记,对于最终克隆出 *Pm21* 基因及抗性基因的结构、功能研究仍有重要意义。本研究以栽培小麦、小麦-簇毛麦代换系 6V/6A、两个易位系 6VS/6AL、6VS/6DL 及簇毛麦、硬粒小麦为材料,用 RAPD 方法筛选位于簇毛麦 V 染色体短臂上的分子标记,为小麦抗病育种的抗性亲本选择提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试材料 染色体代换系 6V/6A、易位系 6VS/6AL、6VS/6DL、簇毛麦、四倍体硬粒小麦、普通栽培小麦京 411。

1.1.2 引物 采用上海生工生物公司的 S 系列引物 105 条和美国 Operon 公司的 RAPD 引物 100 条(OPH,OPK,OPW,OPY,OPZ 各 10 mer)。

1.2 方法

1.2.1 植物总 DNA 的提取 将上述 6 种供试材料各取 10 粒,经安替福民消毒,自来水浸泡使之吸涨后于 24 ℃ 闭光培养 7 d 左右。DNA 的提取参阅卢圣栋主编的《现代分子生物学实验技术》酚、氯仿抽提和乙醇沉淀法,略作改动。取黄化苗于液氮中研磨成粉末,放入事先预冷的 DNA 提取缓冲液(pH 8.0 Tris-HCl, pH8.0 EDTA, ddH₂O, NaCl)中,用酚、氯仿抽提以除去蛋白质,无水乙醇沉淀;用 RNase 消化 1 h,再用酚、氯仿抽提,无水乙醇沉淀。即可得到植物总 DNA。

1.2.2 模板 DNA 的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 的比值均在 1.7

表 1 栽培小麦、簇毛麦、硬粒小麦及代换系、易位系 RAPD 扩增结果

引物	出现频率 (%)	最多谱带 (条)	最少谱带 (条)	平均谱带 (条)	分子量范围 (kb)	检测位点 (个)
S 系列(105 条)	80.95	8	3	6	0.5~3.0	2 042
OP 系列(100 条)	100.00	10	2	6	0.2~2.0	2 146

2.2 位于簇毛麦 V 染色体短臂(VS)RAPD 标记筛选

利用簇毛麦、含有簇毛麦 6V 染色体的代换系和 2 个含有簇毛麦 6V 染色体短臂(6VS)的易位系及不含簇毛麦染色体的栽培小麦、硬粒小麦为材料,从 205 个随机引物中发现只有 1 个引物 OPW03 在

~1.8 之间,0.7% 琼脂糖凝胶电泳检测总体 DNA 比较完整,符合扩增反应要求。

1.2.3 RAPD 扩增 扩增反应体系为 25 μL,反应液组成为 MgCl₂ 3 mmol/L,1 × PCR buffer,4 种 dNTP 各为 200 μmol/L,引物为 1 μmol/L,基因组 DNA 40 ng,1U 的 *Taq* 酶,反应程序为:96 ℃ 变性 1 min,35 ℃ 退火 1 min,72 ℃ 延伸 2 min,4 个循环;94 ℃ 变性 45 s,36 ℃ 退火 1 min,72 ℃ 延伸 90 s,45 个循环;最后 72 ℃ 延伸 10 min。

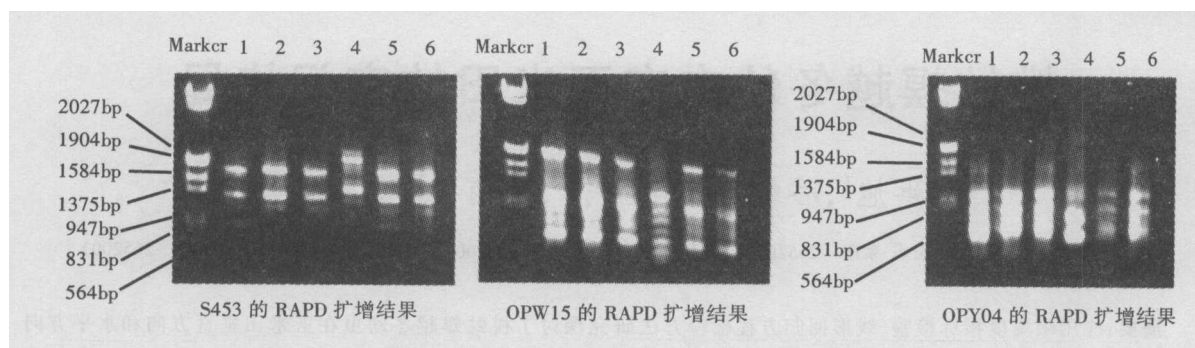
扩增反应在 PTC-150 Minicycler 上进行。扩增产物在 1.2% 的琼脂糖凝胶中电泳 1.5 h,电泳缓冲液为 50 × TAE,溴化乙锭中染色,紫外灯下观察并照相。

2 结果与分析

2.1 染色体代换系、易位系及簇毛麦、硬粒小麦、栽培小麦的 RAPD 分析

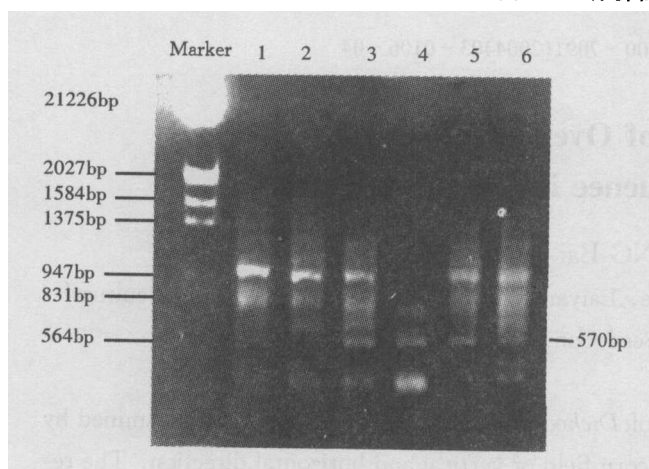
利用 105 条 S 系列和 100 条 Operon 随机引物,对小麦-簇毛麦代换系 6V/6A、两个易位系 6VS/6AL、6VS/6DL 及亲本簇毛麦、硬粒小麦、栽培小麦的多态性进行了筛选分析。105 个 S 系列引物中,有 85 个引物扩增出较为清晰的 RAPD 谱带,谱带数量最多的为 8 条,最少为 3 条,平均 6 条,分子量为 0.5~3.0 kb,对 2 042 个位点进行了分析。在 100 个 Operon 系列引物中,全部扩增出 RAPD 谱带,谱带最多为 10 条,最少为 2 条,平均 6 条,分子量为 0.2~2.0 kb,对 2 146 个位点进行了检测(表 1)。从扩增到的谱型看,栽培小麦、代换系和易位系的谱型较为接近,簇毛麦、硬粒小麦的谱型与栽培小麦、代换系、易位系有较大差别(图 1)。这一结果可能与不同物种基因组组成的差异有关。

含有簇毛麦 V 染色体的 4 个材料中均扩增出 1 条约 570 bp 的谱带(图 2),而在栽培小麦和硬粒小麦中没有发现这条谱带。这一结果表明,由于在两个染色体易位系中均含有簇毛麦的 VS,因此,可以推测这个分子标记(OPW03-₅₇₀)是位于簇毛麦 V 染色体短臂上的。



Marker(λ DNA/ EcoR I + Hind III); 1. 栽培小麦; 2. 硬粒小麦; 3. 代换系 6V/6A; 4. 簇毛麦; 5. 易位系 6VS/6AL; 6. 易位系 6VS/6DL

图 1 几种引物的 RAPD 扩增结果



Marker(λ DNA/ EcoR I + Hind III) 1. 栽培小麦; 2. 硬粒小麦; 3. 代换系 6V/6A; 4. 簇毛麦; 5. 易位系 6VS/6AL; 6. 易位系 6VS/6DL

图 2 含簇毛麦 V 染色体材料中的
OPW03-570 特异片段

3 讨论

Pm21 是目前对白粉病抗性最强的基因,它是由我国学者从簇毛麦中通过杂交而转移到栽培小麦中来的。通过细胞遗传学鉴定, Pm21 位于簇毛麦的 6V 染色体上。一些研究者以小麦-簇毛麦染色体代换系 6V/6A、易位系 6VS/6AL 和 6VS/6DL 为材料,通过分子标记方法已经证实 Pm21 位于 6V 染色体的短臂 6VS 上^[9]。同时,已有 2 个 SCAR 标记被定位于 VS 上^[10]。这一试验结果的获得极大地鼓舞了广大从事于小麦抗白粉病育种及抗白粉病基因克隆的研究者们,虽然迄今为止 Pm21 基因还没有被克隆。本工作利用小麦-簇毛麦染色体代换系、易位系为材料,筛选出一个位于 VS 上的 RAPD 标记—OPW03-570。虽然我们还没有完成该标记与小麦白粉病抗性基因的连锁性鉴定,但这是一个新的位于 VS 上的分子标记。目前,我们正在对该标记与抗白粉病间的连锁性进行鉴定,如果证明该标

记与抗性基因相连锁,这对于克隆抗白粉病基因及分子标记辅助选择育种都有重要意义。

参考文献:

- [1] Zhang Q S, Li Z S. Present status of wheat breeding and related genetic study in China[J]. Wheat Inform Science, 1993, 76: 1-15.
- [2] McIntosh R A, Hart G E, Devos K M, et al. Catalogue of gene symbols for wheat[J]. Wheat Inform Service, 1996, 83 (Suppl): 47-105.
- [3] McIntosh R A. Catalogue of gene symbols for wheat[A]. In: Slinkard A E. Proc 9th Int Wheat Genetics Symp [C]. Saskatoon: Saskatoon University Extension Press, 1998. 123-127.
- [4] 齐丽丽, 陈佩度, 刘大钧, 等. 小麦白粉病新抗源-基因 Pm21[J]. 作物学报, 1995, 21(3): 257-262.
- [5] Huang X Q, Hsam S L K, Zeller F J. Identification of powdery mildew resistance genes in common wheat (*Triticum aestivum* L. em Thell.). IX. Cultivars, land races and breeding lines grown in China[J]. Plant Breed, 1997, 116: 233-238.
- [6] Chen P D, Qi L L, Zhou B, et al. Development and molecular cytogenetic analysis of wheat - *Haynaldia villosa* 6VS/6AL translocation lines specifying resistance to powdery mildew[J]. Theor Appl Genet, 1995, 91: 1125-1128.
- [7] 刘金元, 陶文静, 刘大钧, 等. 小麦-簇毛麦易位系 6VS/6AL 中 6VS 的遗传传递及其所携 Pm21 基因的遗传稳定性分析[J]. 植物学报, 1999, 41(10): 1058-1060.
- [8] 刘志勇, 孙其信, 李洪杰, 等. 小麦抗白粉病基因 Pm21 的分子鉴定和标记辅助选择[J]. 遗传学报, 1999, 26(6): 673-682.
- [9] 刘守斌, 唐朝晖, 尤明山, 等. 簇毛麦染色体组特异性 RAPD 标记的筛选、定位和应用[J]. 遗传学报, 2002, 29(5): 453-457.
- [10] Liu Z, Sun Q, Ni Z, et al. Development of SCAR markers linked to the Pm21 gene conferring resistance to powdery mildew in common wheat[J]. Plant Breeding, 1999, 118: 215-219.