

小麦株高近等基因系的 RAPD 标记研究

郭北海¹, 张艳敏¹, 李洪杰¹, 王子宁¹, 石云素¹,
张忠廷², 李松涛², 王 斌², 杜立群³, 朱至清³

(1 河北省农林科学院粮油作物研究所, 河北 石家庄 050031; 2 中国科学院
遗传研究所, 北京 100101; 3 中国科学院植物研究所, 北京 100093)

摘要: 采用 RAPD 技术, 以 4 个小麦株高基因近等基因系(分别含有 *rht*、*Rht*1、*Rht*2、*Rht*3)为材料, 对 296 个单一随机引物(10 个核苷酸)进行了筛选。发现 25 个引物的扩增产物在近等基因系间表现出特异性。在 6 次重复试验中, 有 18 个引物的特异扩增片段不能重复, 6 个引物可以重复 2~3 次, 唯有 OPAM01 在全部试验中均能稳定重复, 其特异扩增片段 OPAM01₁₈₆₀ 可以作为 *rht* 基因的 RAPD 标记。

关键词: 小麦; 基因标记; *rht* 基因; RAPD

中图分类号: S512.103 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2000)01-0007-05

PCR 技术的发展已为遗传学家提供了一些新的分子标记方法, 由 Welsh 和 McClland 以及 Williams 等提出的 RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA)技术便是其中发展最快、应用最广的方法之一^[1,2]。小麦株高与产量有着极为重要的相关性, 已发现并命名的小麦矮秆基因多达 20 多个^[3], 在品种中发挥重要作用的有 *Rht*1、*Rht*2、*Rht*8 和 *Rht*10 等, 但有关这些基因的基因标记研究很少见报道。另外, 小麦是六倍体作物, 由于其染色体组的多倍性和部分同源性, 用片段大小为 10 个核苷酸的单一引物扩增出的 DNA 片段表现出相对不稳定性^[4]。因此, 有关小麦基因的 RAPD 标记研究也还存在争议。但最近的一些研究表明 RAPD 标记可以在小麦上应用^[5~10]。本研究采用一套小麦株高基因近等基因系(*rht*、*Rht*1、*Rht*2、*Rht*3)为材料, 针对重要农艺性状进行 RAPD 标记研究, 获得了一个与 *rht* 基因紧密连锁的 RAPD 标记, 并进一步证实可以在小麦中获得稳定的 RAPD 标记。

1 材料和方法

1.1 材料

试验材料为普通小麦品种 Bersee 的一套矮秆基因近等基因系(分别含有 *rht*、*Rht*1、*Rht*2、*Rht*3 基因), 由 Gale M D 博士提供, 系回交 7 代的后代材料。

1.2 DNA 提取

取上述 4 个材料的黄化苗 5~6 g, 在液氮中研成粉末, 移入离心管, 加入 20 mL 预热(65℃)提取缓冲液(42% Urea, 0.3 mol/L NaCl, 50 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 20 mmol/L

收稿日期: 1999-02-19

基金项目: 河北省自然科学基金资助项目。

作者简介: 郭北海, 男, 1958 年生, 研究员, 理学博士, 主要从事小麦生物技术研究工作。

EDTA, 2% Sarcosyl, 5% Phenol)和 0.75 mL 20% SDS, 60 ℃下保温 10 min; 加入 15 mL 氯仿/异戊醇(24:1), 60 ℃下保温 15 min, 6 000 r/min 离心 15 min, 取上层水相; 加入等体积酚/氯仿抽提, 用冷乙醇沉淀 DNA; 将 DNA 溶于 2 mL TE 缓冲液, 加入 RNase A (10 μg/mL), 37 ℃下保温 30 min; 先后用酚、酚/氯仿、氯仿再抽提一次; 用冷乙醇沉淀 DNA, 风干后溶于 1 mL TE 缓冲液。该 DNA 作为 PCR 反应的模板。

1.3 RAPD 反应

PCR 反应总体积为 25 μL, 含有 10 mmol/L Tris-HCl(pH 8.8), 50 mmol/L KCl, 2 mmol/L MgCl₂, 4 种 dNTP 各为 0.15 mmol/L, 0.2 μmol/L 引物, 1.25 单位 Taq DNA 聚合酶和 10~20 ng DNA 模板。全部扩增共 40 个循环。前 3 个循环 97 ℃变性 1 min, 36 ℃复性 1 min, 72 ℃延伸 5 min。后 37 个循环 94 ℃变性 1 min, 37 ℃复性 1 min, 72 ℃延伸 5 min。全部循环结束后, 72 ℃保温 5 min。用 1.4% 琼脂糖凝胶电泳分离扩增产物, 经溴化乙锭染色后, 在紫外灯下观察结果并拍照。分子量标准为 Lambda DNA/ Hind III+ E ω RI。

本研究所用的 296 个随机引物为 Operon 公司生产的, 这些引物长度均为 10 个核苷酸。

2 结果与分析

在本研究所用的 296 个引物中, 有 23 个引物未扩增出任何产物, 约占总数的 7.8%, 其余 273 个引物均扩增出产物。从电泳结果看, 扩增产物最少的仅 1 个片段, 多的达到 7~8 个片段, 但大多数引物扩增产物为 4~5 片段。虽然大多数引物均可产生扩增物, 但在初次扩增筛选试验中只有 25 个引物(约占 8.5%)的扩增产物在近等基因系间表现出特异性。在对这 25 个引物的 6 次重复扩增试验中, 有 18 个引物在近等基因系间的特异性不能重复, 可以重复的 7 个引物是:

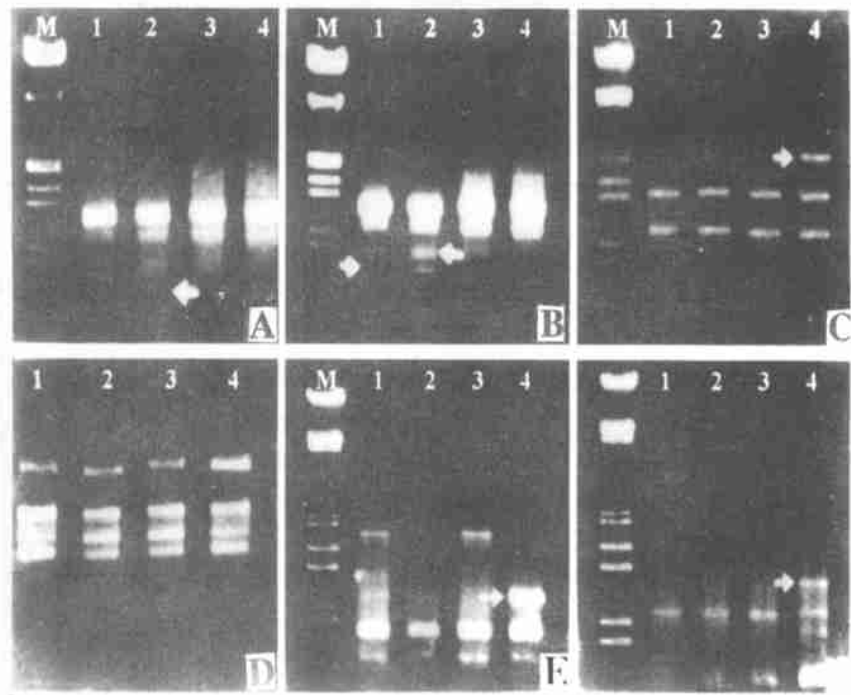
OPAH04, OPAK12, OPAM01, OPAM04, OPAM14, OPAN05, OPAN06(图 1), 其序列列于表 1。

表 1 表现出扩增特异性的几个引物碱基序列

引物	序列
OPAH04	5' CTCCCCAGAC3'
OPAK12	5' AGTGTAGCCC3'
OPAM01	5' TCACGTACGG3'
OPAM04	5' GAGGGACCTC3'
OPAM14	5' TGGTTGCGGT3'
OPAN05	5' GGGTGCAGTT3'
OPAN06	5' GGAACCCGT3'

除 OPAM01 外, 其余 6 个引物在 6 次重复试验中仅有 2~3 次可以重复扩增出特异产物, 图 1—C 和图 1—D 是 OPAK12 在不同重复试验中的结果。由于在不同重复试验中表现出不稳定性, 这 6 个引物的扩增片段很难用作小麦株高基因的标记。唯有 OPAM01 在全部 6 次试验中均能稳定扩增出特异片段(图 1—E), 其扩增片段在含有 *Rht1*, *Rht2*, *Rht3* 基因的材料上表现一致, 含有 *rht* 基因的材料则多扩增出 1 个片段, 该片段大小为 1.86 kb。因此, OPAM01₁₈₆₀ 可以作为 *rht* 基因的 RAPD 标记。

虽然本试验所用的引物近 300 个, 但绝大多数引物都无法检测出近等基因系间的遗传差异。即使是扩增出特异片段的 25 个引物, 多数在近等基因系间表现出的特异性较为相似, 即含有 *rht* 基因的材料比含有 *Rht1*, *Rht2*, *Rht3* 基因的材料多出一个扩增片段, 而含有 *Rht1*, *Rht2* 和 *Rht3* 的材料的扩增产物表现较一致(图 1—C、图 1—E、图 1—F)。这一结果表明 4 个近等基因系材料的遗传背景极为一致, 特别是含有 *Rht1*, *Rht2*, *Rht3* 的 3 个近等基因系材料



A, B 引物 OPAM04 的扩增结果; C, D 引物 OPAM12 的扩增结果;
E 引物 OPAM01 的扩增结果; F 引物 OPAN05 的扩增结果。
M 分子量标准; 1 *Rht*1 系; 2 *Rht*2 系; 3 *Rht*3 系; 4 *rht* 系

图 1 引物 **OPAM04**、**OPAM12**、**OPAM01**、**OPAN05** 扩增结果

遗传差异很小, 而含有这些显性矮秆基因的材料又与含有 *rht* 基因的材料遗传差异相对较大。根据小麦育种目标和小麦株高的演变历史, 从本试验结果可以看出 *Rht*1, *Rht*2, *Rht*3 矮秆基因有可能是从 *rht* 基因突变而来, 并且基因序列相当一致。

3 讨论

小麦株高近等基因系对研究这些基因的标记非常有效。本研究筛选了 296 个随机引物, 按每个引物平均扩增出 5 个片段计算, 全部试验共扩增出约 1 500 个片段, 但只有其中 1 个引物的 1 个片段在近等基因系间表现出稳定差异。因此, 可能推断近等基因系间全部 DNA 序列中有差异的片段是很少的。在对部分引物的 6 次重复扩增试验中, 唯有 OPAM01 引物能够稳定地在 *rht* 系上多扩增出 1 条大小为 1.86 kb 的特异片段。由于这一结果的高度重复性, OPAM01₁₈₆₀ 可以作为 *rht* 基因紧密连锁的标记。至于 OPAM01 的碱基序列是否就是 *rht* 基因序列的一部分, 现在还不能肯定, 也可能是 *rht* 基因序列以外与其相距很近的一段 DNA 序列。另外, 尽管筛选了近 300 个引物, 但未能找到 *Rht*1, *Rht*2 和 *Rht*3 的 RAPD 标记, 表明这 3 个基因及其邻近区域的 DNA 序列可能非常接近。

RAPD 分析目前在作物遗传学研究中应用主要有以下几个方面: ①遗传图谱绘制; ②特定

基因标记和染色体片段识别;③指纹分析及品种鉴别;④遗传相似性分析与物种分类。但对于小麦来说, Devos 和 Gale⁴ 认为: 由于试验条件不同而引起的 RAPD 标记具有多变性, RAPD 标记的染色体位置很难确定以及 RAPD 标记表现为显性等原因, 目前 RAPD 标记在构建遗传图谱方面还毫无价值。随后的一些研究工作也确实表明, 尽管 RAPD 技术已经用于绘制许多二倍体作物的遗传图谱, 但小麦的 RAPD 图谱还未见报道。近几年, 许多研究都成功地将 RAPD 技术用于小麦^[5~10]。但这些研究有两个明显特征: 一是利用 RAPD 标记来识别某一特定基因或较小外源染色体片段; 二是利用近等基因系来研究基因标记。本研究结果与这些研究有相似之处, 就是成功利用近等基因系找到了 *rht* 基因的 RAPD 标记。所有这些意味着只要选取合适的试验材料, RAPD 技术在小麦某一特定基因标记和外源染色体片段鉴定方面是很有用的。

值得注意的是, 如果将 RAPD 特异扩增片段克隆、测序, 标记成特异探针^[7] 或合成新的特定引物^[11], 可以快速、大量鉴别有用基因或外源染色体。这对 RAPD 技术在小麦遗传学研究中应用具有重要意义。

参考文献:

- [1] Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers [J]. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18: 7213—7218
- [2] Williams J G K, Kubelik A R, Livak K J, *et al.* DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers [J]. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18: 6531—6535
- [3] McIntosh R A, Hart G E, Gale M D. Catalogue of gene symbols for wheat [A]. In: Li Z S, Xin Z Y eds. *Proceedings of the Eight International Wheat Genetics Symposium* [C]. 1993. 2: 1333—1500
- [4] Devos K M, Gale M D. The use of random amplified polymorphic DNA markers in wheat [J]. *Theor Appl Genet*, 1992, 84: 567—570
- [5] Schachermay G, Siedler H, Gale M D, *et al.* Identification and localization of molecular markers linked to the *Lr9* leaf rust resistance gene of wheat [J]. *Theor Appl Genet*, 1994, 88: 110—115
- [6] 钟少斌, 张德玉, 姚景侠, 等. 小麦抗白粉病近等基因系的 RAPD 分析 [J]. *江苏农业学报*, 1993, 9(1): 51—54
- [7] 朱其洪, 贾旭, 王京兆, 等. 用 RAPD 方法获得与小麦 BYDV 抗性基因连锁的分子标记 [J]. *科学通报*, 1995, 40: 1799—1801
- [8] 陈建莉, Wang R C, 薛秀庄, 等. 用 Langdon 二体代换系统建立小麦染色体 RAPD 标记 [J]. *遗传学报*, 1996, 23: 32—39
- [9] Hartl L, Weiss H, Stephan U, *et al.* Molecular identification of powdery mildew resistance genes in common wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. *Theor Appl Genet*, 1995, 90: 601—606
- [10] Dedryver F, Jubier M F, Thouvenin J, *et al.* Molecular markers linked to the leaf rust resistance gene *Lr24* in different wheat cultivars [J]. *Genome*, 1996, 39: 830—835
- [11] Schachermayr G M, Messmer M M, Feuillet C, *et al.* Identification of molecular markers linked to the *Aegropyron elongatum*-derived leaf rust resistance gene *Lr24* in wheat [J]. *Theor Appl Genet*, 1995, 90: 982—990

Detection of a RAPD Marker Linked to *rht* Gene in Wheat (*Triticum aestivum* L.)

GUO Bei-hai¹, ZHANG Yan-min¹, LI Hong-jie¹, WANG Zi-ning¹, SHI Yun-su¹,
ZHANG Zhong-ting², LI Song-tao², WANG Bin², DU Li-qun³, ZHU Zhi-qing³

(1 Institute of Cereal and Oil Crops, Hebei Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Shijiazhuang 050031;

2 Institute of Genetic, The Chinese Academy of Sciences; 3 Institute of Botany, The Chinese Academy of Sciences)

Abstract: Four near-isogenic lines which contained *rht*, *Rht1*, *Rht2*, *Rht3* respectively were used for polymorphic analysis at molecular level by RAPD technique. Out of 296 10-mer oligonucleotide primers screened, 25 showed polymorphism among near-isogenic lines. During 6 repeat tests of these primers, 18 could not give the repeat results, 6 could repeat 2 to 3 times, only primer OPAM01 showed the stable results in which a 1.86 kb additional band was found in *rht* line. OPAM01₁₈₆₀ could be identified as a RAPD marker linked to *rht* gene in wheat.

Key words: *Triticum aestivum* L; Gene marker; *rht* gene; RAPD