

[文章编号] 1000-2782(1999)04-0001-06

大赖草和新麦草物种专化 DNA 重复序列研究 II 在小麦族中分布的多态性

柴守诚, 刘大钧, 陈佩度, 李万隆, 齐莉莉, 曹明树, 刘金元

(南京农业大学农业部作物细胞遗传重点开放实验室, 南京 210095)

[摘 要] 大赖草和新麦草中克隆的 5 个 DNA 重复序列与小麦族不同物种 DNA 进行 Southern 杂交。结果表明, 这 5 个重复序列在 *Leymus* 属(赖草属)和 *Psathyrostachys* 属(新麦草属)中的丰度与小麦、大麦和黑麦相差悬殊, 可以作为这 2 个属染色体的分子标记检测其导入小麦、大麦和黑麦后的踪迹, 尤其是 pLr647 对这 2 个属专化性更强, 应优先选用。另外, 结合本研究结果对小麦族有关种属染色体组的进化问题进行了讨论。

[关键词] 大赖草; 新麦草; 小麦族; DNA 重复序列

[中图分类号] S512.1 [文献标识码] A

据柴守诚等^[1]研究报道, 已在 2 种小麦近缘植物——大赖草和新麦草中克隆到 15 个强阳性物种专化 DNA 重复序列, 并从中选定 5 个进行了同源性测定, 结果表明, 选自新麦草的 2 个 DNA 重复序列 pPj205 和 pPj605 间有序列同源性, 而选自大赖草的 3 个重复序列, pLr344, pLr426 和 pLr647 相互间以及与 pPj205 和 pPj605 间均无序列同源性。

物种专化 DNA 重复序列不仅在不同种属间量的分布不均衡, 即存在丰度多态性, 而且还可能象单(低)拷贝序列一样具有限制性长度片段多态性(RFLP)。正因为如此, 物种专化 DNA 重复序列才被用于物种进化研究^[2,3]和栽培种中外源种质的鉴定^[4~7]等方面。点渍杂交分析能够揭示丰度多态性, 但不能揭示 RFLP; 而 Southern 杂交分析则能同时揭示两者, 且准确性更高。为此, 笔者利用这 5 个重复序列与小麦族不同物种的酶切 DNA 进行了 Southern 杂交, 其目的在于进一步探讨这些重复序列是否能够用于检测导入小麦族栽培种, 特别是小麦中的赖草属、新麦草属和其他种属的染色质; 用于研究小麦族有关种属的染色体组进化。

1 材料与方法

本研究所用 DNA 重复序列除 pLr344, pLr647, pLr426, pPj205 和 pPj605 外, 还包括本实验室李万隆等^[7]从簇毛麦中克隆到的 1 个物种专化 DNA 重复序列 pHv 62。所选用的植物材料除少数引自西北植物所陈淑阳和中国农科院贾继增外, 其他均为本实验室保

[收稿日期] 1998-12-29

[基金项目] 高等学校博士点基金(970205)

[作者简介] 柴守诚(1960—), 男, 副教授, 博士, 现工作单位: 西北农业大学农学系, 陕西杨陵 712100

© 1999-2010 China Academic Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

存材料,具体材料参见图 1 和图 2。

植物和质粒 DNA 的提取分别按 CTAB 法^[8]和微量碱裂法^[9]进行。植物 DNA 的酶切采用 *EcoR* V 酶在 37℃ 下过夜。DNA 电泳的琼脂糖凝胶浓度为 10 g/L, 缓冲液为 1× TAE。Southern 转移按碱转移法^[9]进行,持续时间为 20 h 左右。Southern 杂交及随后的洗膜参照 Sharp 等^[10]使用的方法。放射自显影在- 20℃ 条件下进行 3 d。

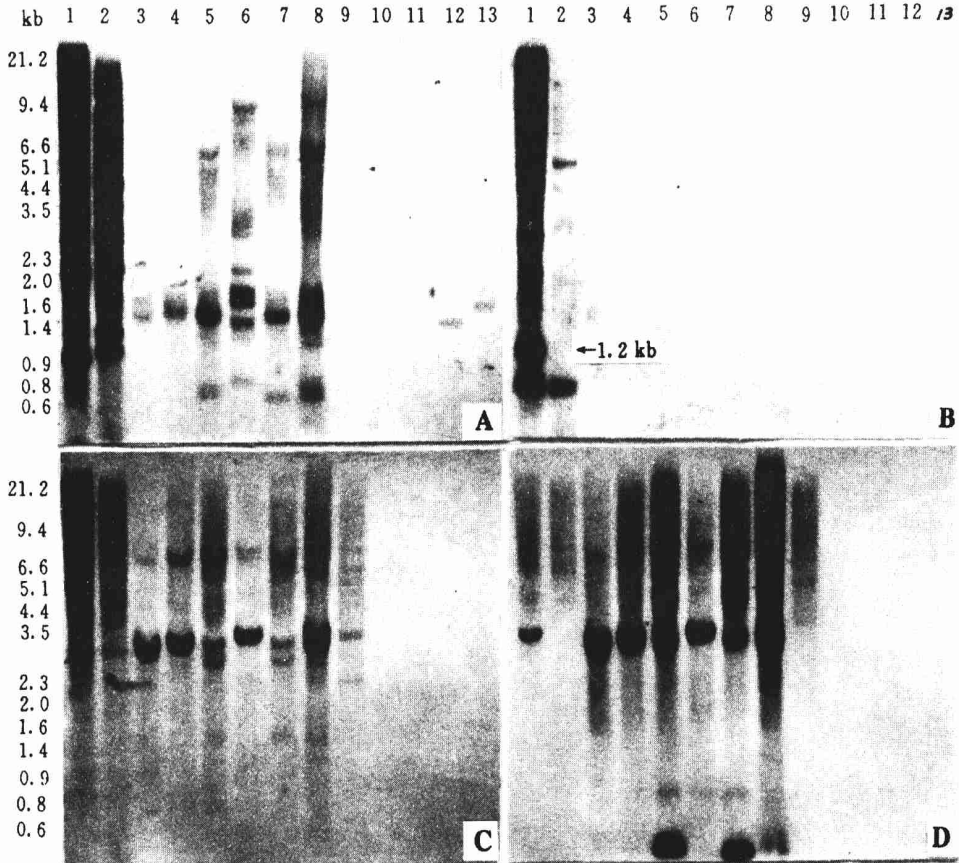


图 1 小麦族植物 *EcoR* V 酶切 DNA 与物种专化 DNA 重复序列 Southern 杂交

pPj605 的杂交结果与 pPj205 相同, 故略去; DNA 用量为每个染色体组 5 μg;

分子质量标记由 λDNA *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切及 λDNA *Hind* III 单酶切产物混合而成;

- | | | | |
|-----------------------------|--|-----------------------------------|---------------------------|
| 1. <i>L. racemosus</i> ; | 2. <i>Psa. juncea</i> ; | 3. <i>Th. bessarabicum</i> -C. S; | 4. <i>Th. elongatum</i> ; |
| 5. <i>Pse. spicata</i> ; | 6. <i>C. violaceum</i> ; | 7. <i>E. ciliaris</i> ; | 8. <i>E. kamoji</i> ; |
| 9. <i>A. g. cristatum</i> ; | 10. <i>H. villosa</i> ; | 11. <i>S. cereale</i> ; | 12. <i>H. vulgare</i> ; |
| 13. <i>T. aestivum</i> ; | A. pLr344; B. pLr647; C. pLr426; D. pPj205 | | |

2 结果与分析

小麦族不同物种 *EcoR* V 酶切 DNA 与不同重复序列 Southern 杂交的结果(图 1, 图 2)表明, 这些重复序列在不同物种间既存在明显丰度多态性, 也存在许多限制性长度片段多态性, 现分述如下:

pLr344 该重复序列主要分布在 *Leymus* (NX) 和 *Psathyrostachys* (N) 2 属的物种中, 在 *Pseudoroegneria spicata* (S), *Critiesion violaceum* 和 *Elymus* 的一些物种中分布很少, 其他种属中(包括大麦、黑麦和小麦等)分布更少。*Leymus* 属 4 个种的杂交带谱基本相同, *Psa.juncea* 和 *Psa.stolniformis* 的带谱完全相同(图 2)。

Psathyrostachys 属被认为是赖草属两染色体组(NX)中 N 组的供体种。在利用 pLr344 作探针对 *EcoR* V 酶切 DNA 进行 Southern 杂交时, *Psathyrostachys* 属与小麦族其他物种相比, 确与 *Leymus* 属相似性最大, 但 2 属间在带型上仍有差异。*Th.bessarabicum* 含有 J 染色体组, Love 曾认为^[11], 它可能是 *Leymus* 属的另一染色体组的来源, 但普通小麦-*Th.bessarabicum* 的双二倍体与普通小麦的杂交带谱完全相同, 而与 *Legmus* 属相差甚远, 说明 J 组与 *Leymus* 属的染色体组不同。*Pse.spicata*(S) 和 *C.violaceum*(H) 与 pLr344 都有杂交信号, 但杂交带型不同。*E.ciliaris* (SY) 的杂交带谱与 *Pse.spicata* 相同。*E.kamoji* (SHY) 的杂交带型相当于 *Pse.spicata* 和 *C.violaceum* 杂交带型的相加(图 1)。

pLr647 该重复序列在赖草属中分布最多, 新麦草属次之, 但要比赖草属少得多。在所采用的小麦族其他物种中几乎检测不到。

Leymus 属 4 个种的杂交带谱完全相同。*Psathyrostachys* 属 2 个种的杂交带谱也完全相同。*Leymus* 属与 *Psathyrostachys* 属除杂交信号的总强度有明显区别外, 杂交带谱也有明确区别。*Leymus* 属中有 1 条 1.2 kb 的特强带, 而在 *Psathyrostachys* 属中却没有(图 1)。

pLr426 该重复序列在小麦族中的分布物种谱比 pLr344 和 pLr647 重复序列更广。在 *Leymus*, *Psathyrostachys*, *Thinopyrum*, *Pseudoroegneria*, *Critiesion*, *Elymus* 和 *Agropyron* 等属中都有分布, 但在大麦、黑麦和小麦中分布极少。

Leymus 属 4 个种与 *Psathyrostachys* 属 2 个种的杂交信号分布基本相同。普通小麦-*Th.bessarabicum* 双二倍体与 *Th.elongatum* 的杂交带型基本相同。*Pse.spicata* (S) 与 *C.violaceum* (H) 的杂交带型有区别, *E.ciliaris* 的杂交带型与 *pse.spicata* 相同。*E.kamoji* 的杂交带谱又一次等于 S 和 H 组的相加(图 1)。

pPj205 该重复序列分布的物种范围与 pLr426 相同。*Leymus* 属的 4 个种中, *L.racemosus*, *L.angustus* 和 *L.corelinii* 的杂交带型完全相同, 杂交信号主要表现为弥散状, 但同时也有 1 条约 3.0 kb 的明显杂交带。*L.chinensis* 中则没有 3.0 kb 的杂交主带, 其他杂交信号分布与前三者相同。*Psathyrostachys* 属 2 个种的杂交信号分布与 *L.chinensis* 相同。普通小麦-*Th.bessatabicum* 双二倍体与 *Th.elongatum* 的带型基本相同。*Pse.spicata* (S) 和 *C.violaceum* (H) 与 pPj205 的杂交带型不同, 但 *E.ciliaris* 与 *Pse.spicata* 的杂交带谱相同。*E.kamoji* 的杂交带型又一次等于 *Pse.spicata* 与 *C.violaceum* 的相加。

pPj605 该重复序列与 pPj205 的物种分布范围和杂交带谱相同。

pHv62 根据李万隆等^[7]的研究, pHv62 除富含于簇毛麦中外, 在 *L.racemosus*, *Th.bessarabicum* (J) 中也有大量分布, 但在 *Psa.juncea* (N) 中却没有分布。在这一点上 J 与 N 染色体组有明显的区别, 而这 2 个染色体组恰好又是涉及赖草属染色体组起源的 2 个关键染色体组。由于这个原因, 笔者认为 pHv62 可能对研究赖草属的染色体组起源有用。为此用 pHv62 对 *Leymus* 属的 4 个种、*Psathyrostachys* 属的 2 个种进行了 Southern 杂交, 结

果发现 pHv62 与 *L. racemosus* 和 *L. angustus* 有强杂交信号, 而与 *L. chinensis*, *L. corelinii*, *Psa. juncea* 和 *Psa. stolniformis* 没有杂交信号。由此可见, 赖草属不同物种在这一重复序列上有明显区别。

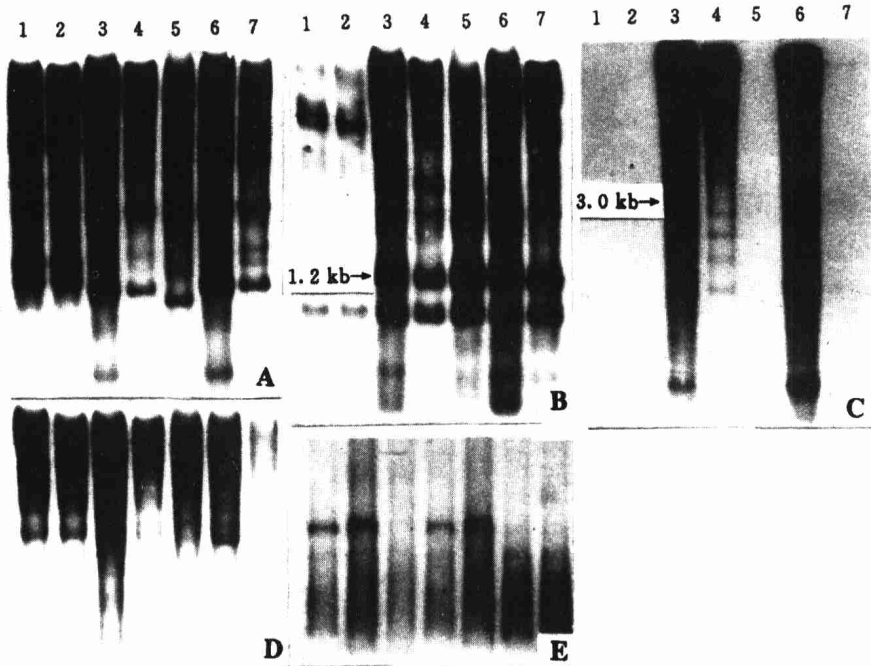


图 2 赖草属、新麦草属植物 *E. coR V* 酶切 DNA 与物种专化 DNA 重复序列 Southern 杂交 pPj605 的杂交结果与 pPj205 相同, 故略去; DNA 用量为每泳道 5 μ g;

1. *Psa. juncea*; 2. *Psa. stolniformis*; 3. *L. racemosus* (Xinjiang); 4. *L. racemosus*; 5. *L. chinensis*; 6. *L. angustus*; 7. *L. corelinii*; A. pLr344; B. pLr647; C. pHv62; D. pLr426; E. pPj205

3 结论与讨论

由于本研究新近克隆的 5 个 DNA 重复序列在赖草属和新麦草属中的丰度与小麦、大麦和黑麦相差悬殊, 因此, 其可以作为这 2 个属染色体的分子标记检测其导入小麦、大麦和黑麦中的行踪, 其中 pLr647 的专化性更强, 应优先考虑使用。同样由于丰度的差异, pLr426, pPj205 和 pPj605 还可能用于检测 J, E, S, H 组的染色质。

根据重复序列的比较, 在小麦族中与 *Leymus* 属最相似的是 *Psathyrostachys* 属, 但两属间仍有明显区别。 *Thinopyrum*, *Pseudoroegneria* 和 *Critiesion* 属与 *Leymus* 属相差甚远, *Agropyron*, *H. ordeum*, *Secale* 和 *Triticum* 属与 *Leymus* 属相差更远。

Leymus 属不同种间在重复序列上既有许多相同之处, 又有一些明显的区别。在用 pLr344, pLr426 和 pLr647 作探针进行杂交时, *L. racemosus*, *L. angustus*, *L. chinensis* 和 *L. corelinii* 基本相同。但在用 pPj205 和 pHv62 杂交时, *L. chinensis* 与 *L. racemosus* 和 *L. angustus* 有显著区别, 却与 *Psathyrostachys* 属相同。鉴于 *Leymus* 属不同种间的明显分化, 笔者认为 *Leymus* 属可能是多重起源。 *Psathyrostachys* 属内不同变异类型间, *Psathy-*

rostachys 属与其他种属间杂交形成多倍体的情况可能都有, 这些多倍体形成后, 有的可能独自演化而形成一个进化分枝, 有的可能相互间还发生了再次杂交, 并伴随有染色体组重组, 沿不止一个方向演化形成不同的进化分枝。就本研究采用的 *Leymus* 属 4 个种而言, 考虑到 *L. chinensis* 与其他种在 DNA 重复序列上有较大的区别, 且又主要分布在中国及其邻近国家^[12], 因此可能代表一个进化分枝, 而 *L. racemosus* 和 *L. angustus* 可能属另一个进化分枝。两进化分枝相比, 前者与 *Psathyrostachys* 属的相似程度更高。

以 pLr344, pPj205 和 pPj605 为探针时, *Pse. spicata*(S) 与 *C. violaceum*(H) 的 Southern 杂交带谱明显不同, 但 *Pse. spicata* 与 *E. ciliaris*(SY) 的杂交带谱完全相同, *E. kamoji*(SHY) 的杂交带谱等于 *Pse. spicata* 与 *C. violaceum* 杂交带谱的相加。这一方面说明, 在这 2 个多倍体的形成和进化过程中, 这些重复序列在 S 和 H 组上基本保持稳定, 另一方面也可能意味着这 2 个多倍体种是新近起源的, 同时还暗示未知来源的 Y 组与 S 组可能相似。

Thinopyrum 属的 J 和 E 组是否相同尚有争议, 一种观点认为两者有区别^[13], 另一种观点认为两者没有多少区别应合并^[14]。本试验结果表明, 这 2 个染色体组与 5 个新克隆的重复序列探针 Southern 杂交的结果一致, 反映了两者之间的相似性。

[参考文献]

- [1] 柴守诚, 刘大钧, 陈佩度, 等. 大赖草和新麦草物种专化 DNA 重复序列研究 I 分离和鉴定[J]. 西北农业大学学报, 1999, 27(3): 33~37.
- [2] Dvorak J, Appels R. Chromosome and nucleotide sequence differentiation in genomes of polyploid Triticum species[J]. Theor Appl Genet, 1982, 63: 349~360.
- [3] Xin Z Y, Appels R. Occurrence of rye (secale cereale) 350-family DNA sequences in Agropyron and other Triticeae[J]. Plant Syst Evol, 1988, 160: 65~76.
- [4] Bournival B, Obanni M, Abad A, et al. Isolation of a new species-specific repetitive sequence from Thinopyrum elongatum and its use in the studies of alien translocations[J]. Genome, 1994, 37: 97~104.
- [5] Guidet F, Rogowsky P, Taylor C, et al. Cloning and characterisation of a new rye specific repeated sequence[J]. Genome, 1991, 34: 81~87.
- [6] Koebner R M D. Generation of PCR-based markers for the detection of rye chromatin in a wheat background[J]. Theor Appl Genet, 1995, 90: 740~745.
- [7] Li W L, Chen P D, Qi L L, et al. Isolation, characterization and application of a species-specific repeated sequence from *H. aynaldia villosa*[J]. Theor Appl Genet, 1995, 90: 526~533.
- [8] Gill K S, Lubbers E L, Gill B S, et al. A genetic linkage map of Triticum tauschii (DD) and its relationship to the D genome of bread wheat (AABBDD)[J]. Genome, 1991, 34: 362~374.
- [9] Sambrood J, Frisch E F, Maniates T. Molecular Cloning: A laboratory manual[M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor, 1989.
- [10] Sharp P J, Kreis M, Sehwy P R, et al. Identification of D-genome chromosomes on Chinese spring of southern blots using genome-specific repetitive DNA[J]. J Hered, 1991, 82: 509~512.
- [11] Love A. Conspectus of Triticeae[J]. Feddes Repert, 1984, 95: 425~521.
- [12] 卢生莲, 郭永华, 郭本兆, 等. 中国植物志[M]. 第9卷. 第3分册. 北京: 科学出版社, 1987. 61.
- [13] Jauhar P P. Dilemma of genome relationship between Thinopyrum bessarabicum and T. elongatum[J]. Genome, 1990, 33: 144~146.
- [14] 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http

- [14] Wang P R C, Hsiao C. Genome relationship between *Thinopyrum bessarabicum* and *T elongatum*: revisited[J]. *Genome*, 1989, 32: 802~809.

A Study on Species-Specific DNA Repeats from *Leymus racemosus* and *Psathyrostachys juncea*

II Polymorphism among the Species of *Triticeae*

CHAI Shou-cheng, LIU Da-jun, CHEN Pei-du, LI Wan-long,
QI Li-li, CAO Ming-shu, LIU Jing-yuan

(Key Laboratory of Crop Cytogenetics of the Ministry of Agriculture,
Nanjing Agricultural University, Jiangsu, Nanjing 210095, China)

Abstract: The abundance and RFLP of 5 DNA repeats, pLr344, pLr647, pLr426, pPj205 and pPj605 appearing in various species of tribe *Triticeae* were tested by Southern blot hybridization. The big differences among species of *Triticeae* in abundance of the five DNA repeats made it possible that they could be used as molecular markers to monitor *Leymus* and *Psathyrostachys* chromatins transferred to wheat, barley and rye. Owing to being more strictly species-specific, pLr647 was particularly recommended for this purpose. The evolution of some genera in wheat tribe was also discussed.

Key words: *Triticeae*; *Leymus racemosus*; *Psathyrostachys juncea*; repeated DNA sequence