

T. Spelta 1Bs 染色体育性基因 Rf₃ 和 rfk₁ 的分子标记*

胡银岗¹, 马翎健¹, 宋喜悦¹, 方 鹏¹, 何蓓如¹, 张文俊²

(1 西北农林科技大学 农学院, 陕西 杨凌 712100;

2 中国科学院遗传研究所 植物细胞与染色体工程重点实验室, 北京 100101)

[摘 要] 为了建立 *T. Spelta* 1Bs 染色体育性基因 Rf₃ 和 rfk₁ 的分子标记辅助选育技术体系, 提高选育效率, 对 *T. Spelta* 1Bs 染色体上育性基因 Rf₃ 和 rfk₁ 进行 AFLP 分子标记研究。结果表明, 利用 AFLP 技术对小麦进行分子标记研究可获得 50~100 条清晰、稳定的带纹, 多态性较高, 重复性好。根据 T 型细胞质的育性, 对 TSP3314/绵阳 26 的 F₂ 群体采用集群分类的方法构建等基因池, 利用 AFLP 技术筛选 16 个 Pst I/Taq I 引物组合, 然后对 F₂ 群体进行 AFLP 分析, 获得 2 个引物组合 P3-T2, P4-T3, 其与 *T. Spelta* 1Bs 染色体有关育性片段 Rf₃ 基因和 rfk₁ 基因连锁。然后结合 TSP3314/绵阳 26 的 F₂ 群体在 T 型细胞质下的育性结果, 和可育株与 K3315A 测交后代的育性分离所得的 K 型细胞质下的育性结果, 运用 Mapmaker 软件进行分析, 找到了与 *T. Spelta* 1Bs 染色体育性基因 Rf₃ 和 rfk₁ 连锁的分子标记。

[关键词] 小麦分子标记; AFLP; Rf₃ 和 rfk₁ 基因; *T. Spelta* 1Bs 染色体

[中图分类号] S512.103.53

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2004)01-0015-04

近年来, DNA 分子标记技术的研究和发展十分迅速^[1~4], 以此为基础的分子标记辅助选育技术也在不断完善, 为杂交小麦研究及生产应用提供了新的活力。何蓓如等^[5~7]设计了以 T 型细胞质为背景, Rf₃ 基因作为 *T. Spelta* 1Bs 染色体有关育性片段的标记, 通过染色体转移方法将其转移到栽培品种中选育非 1B/1R 类型 K 型小麦雄性不育保持系。利用这一方法能将任意适于作杂交小麦亲本的品种(品系)改良为 K 型保持系, 进而转育成 K 型小麦雄性不育系。但是该方法在转育过程中会发生染色体片段的交换, 产生一定频率的在 T 型细胞质背景下育性恢复但不含 rfk₁ 基因的材料, 不利于前期选择^[7]。本研究对 *T. Spelta* 1Bs 染色体上育性基因 Rf₃ 和 rfk₁ 基因进行分子标记, 以期建立分子标记辅助选育技术体系, 有利于前期的准确选择, 提高选育效率。

1 材料与方法

1.1 材 料

用于分子标记的材料为具 *T. Spelta* 1Bs 染色

体有关育性片段 Rf₃ 和 rfk₁ 基因的 TSP 材料 TSP3314(T 型细胞质), 非 1B/1R 类型的 K 型恢复系绵阳 26, TSP3314 去雄做母本与绵阳 26 杂交的 F₂ 群体, 及其 F₂ 群体中可育株做父本与 K3315A (K 型细胞质, 雄性不育)测交的后代群体。

1.2 方 法

从 TSP3314 × 绵阳 26 的 F₂ 群体中, 随机选取 60 株, 每株取 2~3 g 新鲜叶片提取 DNA 进行 AFLP 分析, 结合其在 T 型细胞质下的育性表现和在 K 型细胞质下的育性分离情况进行归类分析, 确定与其连锁的 AFLP 的分子标记, 同时用 Mapmaker 3.0^[8]遗传分析软件分析其连锁值。

植物 DNA 的提取采用剑桥实验室提出的 CTAB 法进行^[9,10]。

AFLP 程序参照文献[11~13]的方法并有所改进: 用 Pst I 和 Taq I 内切酶组合消化基因组 DNA, 分别连上各自的接头(表 1), 其接头用量适当过量, 以此为引物进行第 1 次 PCR 预扩增(94 2 min; 94 30 s; 56 30 s; 72 60 s, 30 个循环; 72 5 min)。然后, 在接头的基础上分别随机加上

* [收稿日期] 2002-12-18

[基金项目] 国家 863 计划基础研究项目(2001AA 241043)

[作者简介] 胡银岗(1967-), 男, 陕西韩城人, 副教授, 博士, 主要从事 K 型杂交小麦与作物分子遗传育种研究。

E-mail: Huyingang@126.com

3 个碱基得到引物, *Pst* I 和 *Taq* I 各有 4 条引物, 配成 16 对引物组合(表 1), 将第 1 次预扩增产物稀释 20 倍作为模板, 进行第 2 次 PCR 选择性扩增(94 2 m in; 94 30 s, 65 30 s, 每个循环降低 1 , 72 60 s, 9 个循环; 然后 94 30 s, 56 30 s, 72 60 s, 23 个循环, 最后 72 5 m in), 扩增产

物与等量的上样缓冲液(体积分数 98% 去离子甲酰胺, 0.05 g/L 二甲苯氰和 0.05 g/L 溴酚兰)混合后变性, 质量分数 6% 的 PAGE 变性序列胶 70 W 恒功率下电泳 3 h。电泳完后进行银染, 干燥后用数码相机照相。

表 1 AFLP 分析所用的接头和引物

Table 1 Adapters and primers used in AFLP

接头/引物 Adapter/ Primer	<i>Pst</i> I 序列 Sequence	接头/引物 Adapter/ Primer	<i>Taq</i> I 序列 Sequence
接头 Adapter	5'CTCGTAGACTGCGTACATGCA3'	接头 Adapter	5'GACGATGACTCCTGAG3'
	5'TGTACGCA GTCTAC3'		5'CGCTCAGGACTCAT3'
P1	5'GACTGCGTACATGCA G-ATG3'	T1	5'GATGAGTCCTGAGCGA-ACC3'
P2	5'GACTGCGTACATGCA G-ACG3'	T2	5'GATGAGTCCTGAGCGA-ACT3'
P3	5'GACTGCGTACATGCA G-ACC3'	T3	5'GATGAGTCCTGAGCGA-ACA3'
P4	5'GACTGCGTACATGCA G-CTG3'	T4	5'GATGAGTCCTGAGCGA-ATG3'

2 结果与分析

2.1 亲本间的多态性

采用 16 对引物对亲本材料 *T. Spelta* 1Bs, TSP3314, 绵阳 26 间的多态性进行分析。结果表明, AFLP 扩增带纹非常稳定、清晰, 16 对引物共扩增出 758 条带, 平均每个引物扩增 47.5 条带, 45 条表现为多态性, 多态性频率为 5.94%, 表明 AFLP 技术可以用于本研究。

2.2 构建等基因池筛选引物

对 TSP3314/绵阳 26 的 F_2 群体在 T 型细胞质下的可育株和不育株, 随机分别各取 5 株的等量 DNA 构建等基因池, 然后用该等基因池和亲本共同进行 AFLP 分析, 16 个引物均发现数目不等的多态性差异。然后用多态性较多、等基因池和亲本间多态性差异一致的引物对该等基因池和隐性个体进行 AFLP 分析, 寻找与 Rf_3 连锁的引物及标记, 结果发现 10 号(P3-T2)和 15 号(P4-T3)两个引物组合有与 Rf_3 连锁的多态性差异带, 据此确定 P3-P2, P4-P3 两个引物组合可以用于 F_2 群体 AFLP 标记的分析。

2.3 F_2 群体 AFLP 标记

2.3.1 与 Rf_3 基因连锁的 AFLP 标记 用 P3-T2, P4-T3 两个引物组合对 F_2 群体的个体进行 AFLP 分析, 结合其在 T 型细胞质下的育性表现, 发现多态性差异确实存在。

用 P3-T2 组合的引物对 TSP3314/绵阳 26 的

F_2 群体的个体分别进行 AFLP 分析, 发现与 Rf_3 基因连锁的 AFLP 标记有 4 个, 分别记为 B_{10-1} , B_{10-2} , B_{10-3} , B_{10-4} , 用 M apmaker 3.0 进行分析, 这些多态性差异与 Rf_3 的连锁距离在 TSP3314/绵阳 26 的 F_2 群体分别为 4.8, 15.1, 4.0, 12.1 cM, 表明 B_{10-1} , B_{10-3} 和 Rf_3 基因连锁。

用 P4-T3 组合的引物对 TSP3314/绵阳 26 的 F_2 群体的个体分别进行 AFLP 分析, 发现与 Rf_3 基因连锁的 AFLP 标记有 4 个, 分别记为 B_{15-1} , B_{15-2} , B_{15-3} , B_{15-4} , 用 M apmaker 3.0 进行分析, 这些多态性差异与 Rf_3 的连锁距离在 TSP3314/绵阳 26 的 F_2 群体分别为 7.2, 0.0, 3.6, 7.2 cM, 表明 B_{15-2} 和 B_{15-3} 与 Rf_3 基因连锁。

2.3.2 与 rfk_1 基因连锁的 AFLP 标记 同样, 可根据 TSP3314/绵阳 26 的 F_2 群体可育株与 K 型不育系测交后代的育性分离确定与 rfk_1 连锁的 AFLP 标记。通过对 TSP3314/绵阳 26 的 F_2 分离群体的 P3-T2, P4-T3 引物组合扩增结果, 与其在 K 型细胞质下的育性结果用 M apmaker 软件进行分析, 得到与 rfk_1 基因连锁的 AFLP 标记: P3-T2 引物组合时与 B_{10-1} 和 B_{10-3} 两个特征带连锁, P4-T3 引物组合时与 B_{15-3} 和 B_{15-4} 两个特征带连锁。

2.3.3 Rf_3 与 rfk_1 的连锁关系分析 对 TSP3314/绵阳 26 的 F_2 分离群体的 P3-T2, P4-T3 引物组合扩增结果, 结合其在两种细胞质下的育性结果, 利用 M apmaker 软件进行分析, 分别得出 Rf_3 和 rfk_1 及各特异扩增带间的连锁关系, 结果表明, Rf_3 与 rfk_1

的连锁距离为 24 和 29.9 cM (图 1)。这一结果与田间试验所得的交换值相比, 较为接近, 但有些偏大^[14], 其原因是分子标记所用群体较小。

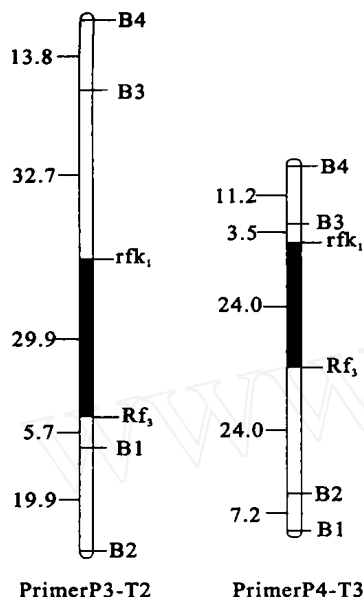


图 1 *Rf₃*, *rfk₁* 与 AFLP 引物组合 P3-T2 和 P4-T3 分析的特异标记的连锁图

Fig 1 Linkage map of *rfk₁* and *Rf₃* with AFLP markers derived from primer combination of P3-T2 and P4-T3

3 结论与讨论

3.1 AFLP 标记

AFLP 标记是近年来由 Vos 等发展起来的分子标记, 是选择性扩增酶解的 DNA 片段的一种分子标记技术^[11, 12, 15]。由于 AFLP 技术具有高度的多态性, 所需 DNA 量少, 重复性强, 因而被广泛用于基因作图、基因定位、亲缘关系鉴定等方面^[15~18]。从本研究结果看, AFLP 技术确实具有多态性多、稳定性好、可重复性强, 一次扩增可产生 50~100 条带,

因而可以较好地用于分子标记。

对 TSP3314/绵阳 26 的 F_2 群体根据 T 型细胞质下的育性, 采用集群分类的方法构建等基因池, 利用 AFLP 技术筛选 16 个 *Pst* I/*Taq* I 引物组合, 然后用 F_2 群体进行 AFLP 分析, 获得 2 个引物组合 P3-T2, P4-T3, 其与 *T. Spelta* 1Bs 染色体有关育性片段 *Rf₃* 基因和 *rfk₁* 基因有关。然后结合 TSP3314/绵阳 26 的 F_2 群体在 T 型细胞质下的育性, 和可育株与 K3315A 测交后代的育性分离所得的 K 型育性基因的结果, 运用 Mapmaker 软件进行分析, 结果表明, P3-T2/*B₁₀₋₁* 和 P3-T2/*B₁₀₋₃* 与 *Rf₃* 基因连锁, P3-T2/*B₁₀₋₁* 和 P3-T2/*B₁₀₋₃* 与 *rfk₁* 基因连锁; P4-T3/*B₁₅₋₂* 和 P4-T3/*B₁₅₋₃* 与 *Rf₃* 基因连锁, P4-T3/*B₁₅₋₃* 和 P4-T3/*B₁₅₋₄* 则与 *rfk₁* 基因连锁。

3.2 分子标记应用于辅助选择

利用分子标记辅助选育是一个热门的领域, 给传统的育种工作带来重大变化, 但是由于条件所限或者现有分子标记技术的问题, 分子标记辅助选育还很落后, 利用分子标记辅助选育要求分子标记与目的基因是紧密连锁的, 这样选择的可靠性会更大。目前分子标记辅助选育主要用于有利基因转移。在育种工作中, 为了改良品种的某一性状, 通常是以该品种作轮回亲本, 以具有目的性状的另一品种或材料为供体进行杂交, 再经多次回交选育而获得。回交育种存在的主要问题是目的性状的丢失和不利性状基因的连锁, 因而工作量较大且不易获得性状改良的优株优系, 而利用分子标记辅助选育可保证所选个体目的基因的存在, 便于早代选择, 促进有利基因尽早纯和, 避免不利基因连锁的影响。

从目前应用情况来看, 便于应用辅助选择的分子标记主要有 RFLP, AFLP, RAPD, SCAR 等, 而且从生产实用角度来考虑, 主要是针对一些在育种中不便于把握的性状, 特别是有利基因为隐性基因时, 如小麦的抗白粉病基因^[18]。

[参考文献]

- [1] 沈法富, 刘凤珍. 分子标记在植物遗传育种中的应用[J]. 山东农业大学学报, 1997, 28(1): 83-90
- [2] 钱惠荣, 郑康乐. DNA 分子标记和分子育种[J]. 生物工程进展, 1998, 18(3): 12-18
- [3] Law C N. 遗传操作在植物育种上应用的局限及前景[J]. 麦类文摘, 1997, 17(2): 3-8
- [4] 赵惠青, 许喜堂. 麦类作物分子标记研究新进展[J]. 西北农业大学学报, 1997, 25(5): 89-95
- [5] 何蓓如. 一种选育小麦雄性不育保持系和不育系的方法[P]. 中国专利: ZL 94116837. X, 1996
- [6] 何蓓如, 李宏斌. 选育非 1B/1R 类型 K 型不育系的染色体转移方法[J]. 中国学术期刊文摘——科技快报, 1997, (4): 61
- [7] He Pei-ru, Li Hong-bin, Ma Ling-jian, et al. Breeding of non-1B/1R K-type male sterile wheat lines by means of chromosome transfer[A]. Hybrid Wheat- A New Crop Going to Farmer The Proceeding of 1st International Workshop on Hybrid Wheat[C]. Beijing:

China Agricultural University Press, 1998 57- 63

- [8] Stephen E L, Mark J D, Eric S L. Constructing genetic linkage maps with MAPMAKER/EXP version 3.0: a tutorial and reference manual[M]. Whitehead Institute for Biomedical Research, 1992
- [9] 王新望. 小麦 Ph1 基因的分子标记及其在创造农艺性状优良的冬小麦 Ph1b 系中的应用[D]. 北京: 中国农业大学, 1998
- [10] Clark M S. 植物分子生物学实验手册[M]. 顾红雅, 瞿礼嘉, 译. 北京: 高等教育出版社, 施普林格出版社, 1998
- [11] Vos P, Hogers R, Bleeker M, et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting[J]. Nucleic Acids Res, 1995, 23: 4407- 4417.
- [12] Qi X, Lindhout P. Development of AFLP markers in barley[J]. Mol Gen Genet, 1997, 254: 330- 336
- [13] Reamon-Buttner S M, Schonellaier J, Jung C. AFLP markers tightly linked to the *L* locus in *Asparagus officinalis* L. [J]. Molecular Breeding, 1998, 4: 91- 98
- [14] 何蓓如, 宋喜悦, 马翎健, 等. *T. Spelt* 1B 染色体 Rf₃ 基因与 rfv₁ 基因重组率研究[Z]. 北京: 亚洲染色体研究讨论会, 2001
- [15] Bradeen J M, Simon P W. Conversion of an AFLP fragment linked to the carrot Y2 locus to a simple, codominant, PCR-based marker form [J]. Theor Appl Genet, 1998, 97: 960- 967.
- [16] Mackill D J, Zhang Z, Redona E D, et al. Level of polymorphism and genetic mapping of AFLP markers in rice[J]. Genome, 1996, 39(9): 969- 977.
- [17] Barret B A, Kichell K K, Fox P N. Comparison of AFLP and pedigree-based genetic diversity assessment methods using wheat cultivars from the pacific northwest[J]. Crop Sci, 1998, 38: 1271- 1278
- [18] 何光华, 裴炎, 杨光伟, 等. 野败型杂交水稻恢复基因 AFLP 标记研究[J]. 遗传学报, 2000, 27(4): 304- 310
- [19] 刘金元, 刘大钧. 分子标记辅助育种的新尝试——与 Pm2 及 Pm4a 基因紧密连锁 RFLP 标记在小麦抗白粉病育种中的应用[J]. 南京农业大学学报, 1997, 20(2): 1- 5

Molecular markers of the fertility genes Rf₃ and rfk₁ in the 1BS chromosome of *T. Spelta*

HU Yin-gang¹, MA Ling-jian¹, SONG Xi-yue¹, FANG Peng¹, HE Pei-ru¹, ZHANG Wen-jun²

(1 North West Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 PCCCLab, Institute of Genetics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract: To breed non 1B/1R K type male sterile wheat lines, He Peiru designed a chromosome transfer method to transfer the fertility fragments in the 1Bs of *T. Spelta* (which including Rf₃ and rfk₁ genes) to common wheat, during this process, Rf₃ gene was used as the marker of the presence of rfk₁ gene under the background of *T. timopheeva* cytoplasm. However, exchanges of the chromosome fragments were observed during the transformation progress, some materials were fertile male under the *T. timopheeva* cytoplasm but did not carry the rfk₁ gene with them, it is necessary to study the molecular marker for the fertility fragments in the 1Bs of *T. Spelta*, which could be used in marker-assisted breeding of the non 1B/1R K type male sterile wheat lines. AFLP was used in the marker analysis of the fertility genes Rf₃ and rfk₁, which are located in the 1Bs chromosome of *T. Spelta*, the results showed that two primer combinations P3-T2 and P4-T3 could give 4 very good polymorphism bands respectively to the Rf₃ and rfk₁ genes based on the fertility of the F₂ individuals under both of the *T. timopheeva* and *Aegilops kotschy* cytoplasm.

Key words: wheat molecular marker; AFLP; Rf₃ and rfk₁ gene; *T. Spelta* 1Bs chromosome