

大赖草总 DNA 转化小麦的 RAPD 分析

赵民安¹, 刘敏¹, 曹玉锦^{1,2,*}

¹中国科学院新疆理化技术研究所, 乌鲁木齐 830011; ²中国科学院研究生院, 北京 100049

摘要: 用 160 个随机引物对不同性状转基因小麦、受体‘春麦 761’和大赖草等进行随机扩增多态性 DNA (RAPD) 分析, 筛选出 5 个重复性好和多态性高的引物。转基因小麦的扩增图谱中出现供体大赖草的特异性条带, 简单遗传相似系数和聚类的分析结果均表明, 大赖草基因片段已整合到转化的小麦基因组中。

关键词: 大赖草; RAPD; 转基因小麦

RAPD Analysis of Transgenic Wheat (*Triticum aestivum* L.) with Total DNA of *Leymus racemosus* (Lam.) Tzvel.

ZHAO Min-An¹, LIU Min¹, CAO Yu-Jin^{1,2,*}

¹Xinjiang Technical Institute of Physics & Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Urumqi 830011, China; ²Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: Genetic diversity of transgenic wheat with different phenotypes, ‘spring wheat 761’ and *Leymus racemosus* was analyzed by random amplified polymorphic DNA (RAPD) with 160 arbitrary oligonucleotide primers. Five primers with good repetition and high polymorphism were screened. There were several special bands the same as the donor in the transgenic wheat. The genetic similarity coefficient and clustering analysis also confirmed that the gene fragments of *L. racemosus* had been integrated into the genome of transgenic wheat.

Key words: *Leymus racemosus*; RAPD; transgenic wheat

大赖草是新疆和中亚地区特有的禾本科小麦亚族赖草属植物, 是培育小麦新品种的优良亲本。由于远源杂交困难, 上世纪 90 年代, 我们用大赖草总 DNA 通过花粉管通道法转化栽培品种‘春麦 761’并获得大穗、高蛋白和抗病的变异植株, 以后经多年自交, 其遗传性已趋于稳定, 统计学分析变异极显著($P < 0.01$)。

外源 DNA 导入受体植物后可以引起后代的大量变异, 这在农业分子育种的实践中已经得到证明(Cheah 和 Son 2006), 我们实验室采用 DNA 杂交手段, 在转基因小麦中发现受体‘春麦 761’中所没有的条带(缪军等 2000)。近年来, 随机扩增多态性 DNA (RAPD) 技术在遗传育种中逐渐得到应用(Teklewoold 和 Becker 2006), 用 RAPD 检测技术寻找受体和变异体的差异条带, 已成为证实外源基因导入受体的有效手段(Atienzar 和 Jha 2006)。本文对不同性状转基因小麦及其受体进行了 RAPD 分析, 进一步证实大赖草基因片段已整合到转化小麦基因组中。

材料与方法

小麦(*Triticum aestivum* L.)的不同转基因株系由我们实验室保存。其中大穗和高蛋白株系为转化后自交稳定后的株系, 冬性大穗为转基因大穗冬性化之后的株系, 小穗株系为转基因大穗与受体‘春麦 761’杂交后筛选出的株系。受体‘春麦 761’、供体大赖草[*Leymus racemosus* (Lam.) Tzvel.]和小麦‘新春 6 号’由新疆农业科学院提供。

采用 SDS 法(王关林和方宏筠 2001)提取各种植株幼苗叶片的总 DNA。选用 Operon 公司生产的 A、D、E、F、G、M、S、T 组的 160 个随机引物进行 DNA 的 PCR 扩增, 筛选清晰、多态性明显的引物作为扩增引物。PCR 反应体系总

收稿 2007-10-17 修定 2008-01-03

资助 新疆维吾尔自治区专利实施项目(2004201072916)。

* 通讯作者(E-mail: caoyj@ms.xjb.ac.cn; Tel: 0991-3813610)。

体积 50 μL : 5 μL 10 \times PCR 缓冲液、3 μL 25 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MgCl_2 、1 μL 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ dNTP、2 μL 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 引物、模板 DNA 至终浓度 1 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 、1 μL 5U $\cdot\mu\text{L}^{-1}$ Taq 酶, 补加双蒸水至 50 μL 。PCR 反应程序为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 37 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1.5 min, 45 个循环; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。

扩增反应结束后, 用 3% 聚丙烯酰胺凝胶, 以 15 $\text{V}\cdot\text{cm}^{-1}$ 的电压梯度进行电泳, 待 DNA 片段在凝胶上按分子量大小分离后用银氨染色法(李宏业等 1999)染色。统计各株系转基因小麦、受体‘春麦 761’和供体大赖草的扩增条带, 按照公式: 相似系数 = $2 \times M_{xy} / (M_x + M_y)$ 计算它们之间的简单遗传相似系数。式中, M_x 表示 x 物种条带总和, M_y 表示 y 物种条带总和, M_{xy} 表示 x 和 y 物种共有谱带总和。

根据 RAPD-PCR 扩增条带的有无, 以 1 和 0 记数, 统计稳定、清晰出现的条带, 采用 NTsys-pc 软件包中的 UPGMA 分析法进行聚类分析

(Galván 等 2006), 并建立进化树图。

实验结果

1 引物的扩增和筛选

用 160 个不同的引物扩增不同植株总 DNA 的结果表明, OPA11、OPD20、OPE02、OPG10、OPM13 (表 1) 等 5 个引物扩增条带差异显著, 经 3 次重复能够得到稳定的谱带。图 1 为 5 个引物的扩增图谱, 其中转基因高蛋白株系、冬性大穗株系和转基因大穗株系出现了数条受体‘春麦

表 1 多态性较好的 5 个随机引物

Table 1 Five random primers with high polymorphism

编号	序列	总条带数	多态性条带数
OPA11	CAATCGCCGT	13	9
OPD20	ACCCGGTCAC	11	9
OPE02	GGTGC GGAA	13	12
OPG10	AGGGCCGTCT	9	7
OPM13	GGTGGTCAAG	10	9

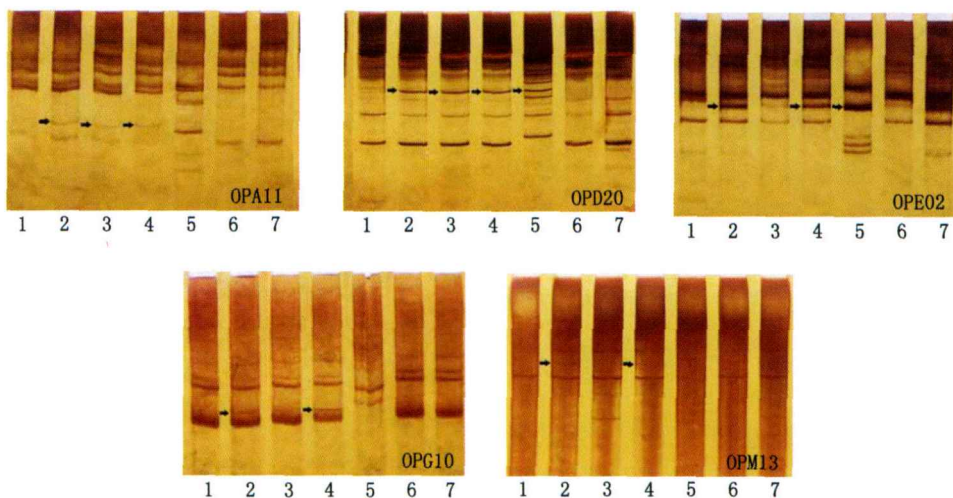


图 1 5 个不同引物的 RAPD 扩增图谱

Fig.1 The RAPD amplification graph of 5 primers

1: ‘春麦 761’; 2: 转基因高蛋白; 3: 冬性大穗; 4: 转基因大穗; 5: 大赖草; 6: 转基因小穗; 7: ‘新春 6 号’。箭头处为各株系转基因小麦中的特异条带。

761’中没有的条带, 并且这些条带中有大赖草也扩增出的特异条带。

2 相似系数的计算

根据大穗小麦、‘春麦 761’和大赖草的扩增条带计算它们之间的简单遗传相似系数(表 2)。通过统计分析可以看出, 大穗小麦转化株与新疆

大赖草之间的遗传相似系数比‘春麦 761’与新疆大赖草高出 0.014 (1.4%), 这从侧面反映出供体新疆大赖草基因组中的部分成分已进入受体‘春麦 761’从而形成大穗转化株。

3 聚类分析

应用 NTsys-PC 软件包中的 UPGMA 聚类法构

表2 大赖草、‘春麦761’和转基因
大穗小麦之间的相似系数

Table 2 Genetic similarity coefficient among *L. racemosus*,
‘spring wheat 761’ and transgenic long-ear wheats

品种	引物数	M_x	M_y	M_{xy}	相似系数
大穗 × ‘春麦761’	133	1275	1275	1156	0.907
大穗 × 大赖草	44	528	529	195	0.369
大赖草 × ‘春麦761’	44	513	529	185	0.355

建‘春麦761’、大赖草和各株系转基因小麦的分子系统关系的结果(图2)表明,大赖草与各种小麦株系之间遗传距离很远,这与它们分属不同属的分类学地位是相应的。‘春麦761’和‘新春6号’归为同一类群,这两个品种均为新疆农业科学院经杂交育种培育的优良小麦品系,‘新春6号’为‘春麦761’的改进型,目前在新疆地区广泛种植。4种不同株系的转基因小麦归属

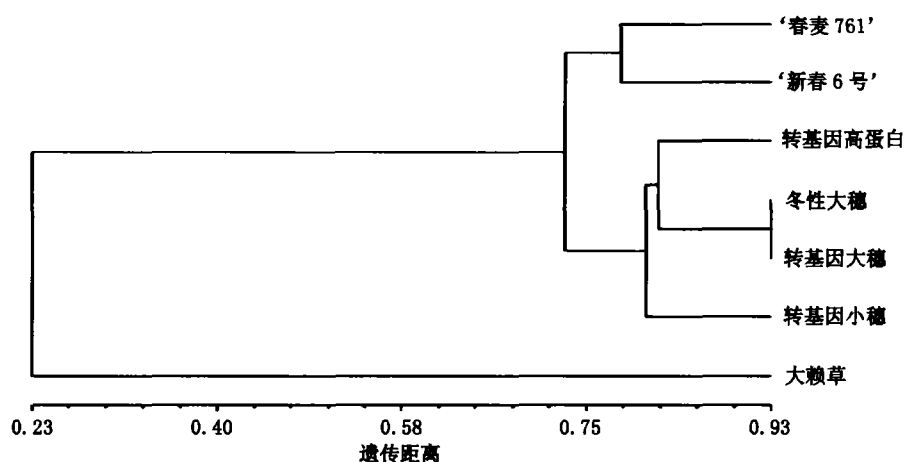


图2 大赖草及各种株系小麦的 RAPD 聚类树状图

Fig.2 Dendrograms of *L. racemosus* and different kinds of wheat by RAPD analysis

同一个类群,与它们的受体‘春麦761’已有较大的遗传距离,由此可见,由于大赖草DNA的导入,转基因小麦与受体之间产生了一定的基因型的差别,这种差别远大于传统的杂交育种。

讨 论

上世纪90年代,由于农杆菌侵染的方法对小麦等禾本科植物的转化并不理想,在转基因小麦的研究中,花粉管通道法得到广泛应用(王秀玲等2003)。我们实验室采用与小麦同亚族的、且具有多种小麦不具有的优良性状的大赖草总DNA对小麦进行转化,获得了一系列的转基因新株系。本文中遗传相似系数和聚类分析的结果表明,转基因小麦中确实已经含有大赖草的基因组片段;同时RAPD扩增图谱中发现了数条转基因小麦和大赖草中的特异条带,这些条带的克隆和SCAR分析正在进行中。

传统的RAPD分析一般用琼脂糖凝胶电泳检测(黄亚红等2002;曹天旭等2007),本文采用改

进的聚丙烯酰胺电泳并配合银染法,大大增加了PCR产物分析的灵敏度和分辨率,在原来无差别的产物中发现新的差别,有的甚至是单拷贝的差别。

通过花粉管通道导入法获得的转基因小麦株系具有一系列的优良性状,但由于大赖草自身具有分蘖多、无法密植、单穗结实少等缺点,我们所获得的转基因小麦也有这些性状,以致这些转基因新株系的实际种植价值不大。分离大穗小麦中转入的大赖草基因片段,并克隆其中与大穗性状相关的基因,对于研究小麦穗形性状的分子机制以及在生产实践中的应用都有意义。

参考文献

- 曹天旭,朴炫春,吴松全,王守明,廉美兰(2007). 满天星试管苗与其玻璃化苗的RAPD指纹图谱分析. 植物生理学通讯, 43 (2): 288~290
- 黄亚红,方显出,梁婉琪,方平夷,陈建秀,张大兵(2002). 体细胞培养获得的水稻农艺性状突变种及其DNA RAPD分析. 植物生理学通讯, 38 (1): 30~32

- 李宏业, 范树国, 刘玉乐, 陈刚, 王寰宇(1999). 改良聚丙烯酰胺凝胶电泳检测 DNA. 细胞生物学杂志, 21 (4): 201~203
- 缪军, 赵民安, 李维琪(2000). 大赖草总 DNA 转化小麦的分子证据. 遗传学报, 27 (7): 621~627
- 王关林, 方宏筠(2002). 植物基因工程(第2版). 北京: 科学出版社, 742~743
- 王秀玲, 卢茜, 刘君, 刘桂琴, 岳慧琴, 张丰德(2003). 野生大豆 DNA 导入小麦及 RAPD 分子验证. 南开大学学报(自然科学版), 36 (6): 37~40
- Atienzar FA, Jha AN (2006). The random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay and related techniques applied to genotoxicity and carcinogenesis studies: a critical review. *Mutation Res*, 613: 76~102
- Cheah YK, Son R (2006). Random amplified polymorphic DNA analysis of genetically modified organisms. *J Biotechnol*, 127: 161~166
- Galván MZ, Menéndez-Sevillano MC, De Ron AM, Santalla M, Balatti PA (2006). Genetic diversity among wild common beans from northwestern argentina based on morpho-agronomic and RAPD data. *Genet Resour Crop Evol*, 53 (5): 891~900
- Teklewold A, Becker HC (2006). Geographic pattern of genetic diversity among 43 Ethiopian mustard (*Brassica carinata* A. Braun) accessions as revealed by RAPD analysis. *Genetic Resour Crop Evol*, 53: 1173~1185