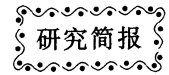


DOI: 10.3724/SP.J.1006.2013.00727



基于 SLAF-seq 技术开发长穗偃麦草染色体特异分子标记

陈士强 秦树文 黄泽峰 戴毅 张璐璐 高营营 高勇 陈建民*

扬州大学生物科学与技术学院, 江苏扬州 225009

摘要: 长穗偃麦草 1E 及 7E 染色体上带有重要的抗赤霉病基因, 开发大量相关染色体特异分子标记有助于准确定位抗性基因及获得可用于辅助育种紧密连锁的标记。基于 SLAF-seq 技术, 获得了 368 个长穗偃麦草 1E 染色体特异片段, 随机选取 80 个特异片段设计引物, 开发了 20 个长穗偃麦草 1E 染色体特异分子标记、2 个长穗偃麦草基因组特异分子标记及 26 个其他特异分子标记, 效率达 60%。用这些特异标记能稳定检测出不同小麦–长穗偃麦草衍生材料中的 1E 染色体或片段。通过标记与优良性状的共分离特性, 获得与相关基因紧密连锁的标记, 将为小麦抗性育种中的分子标记辅助选择提供依据。

关键词: 长穗偃麦草; SLAF-seq 技术; 染色体特异分子标记; 小麦赤霉病; 分子标记辅助选择

Development of Specific Molecular Markers for *Thinopyrum elongatum* Chromosome Using SLAF-seq Technique

CHEN Shi-Qiang, QIN Shu-Wen, HUANG Ze-Feng, DAI Yi, ZHANG Lu-Lu, GAO Ying-Ying, GAO Yong, and CHEN Jian-Min*

College of Bioscience and Biotechnology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China

Abstract: The 1E and 7E chromosomes of *Thinopyrum elongatum* carry important resistance genes to wheat *Fusarium* head blight. Mapping and utilization of these resistance genes require numerous molecular markers specific to the 1E or 7E chromosome. In this study, we developed 368 specific fragments of *Thinopyrum elongatum* 1E chromosome using SLAF-seq technique, and randomly selected 80 fragments to design specific primers. Finally, 20 1E-specific, 2 genome-specific, and 26 other specific molecular markers were obtained, with the efficiency up to 60%. All the newly developed markers could amplify the specific bands in different lines derived from wheat–*Th. elongatum* progenies. According to the cosegregation of the specific markers and elite traits, some markers detected could be closely linked to the genes corresponding to target traits.

Keywords: *Thinopyrum elongatum*; SLAF-seq technique; Chromosome specific molecular marker; Wheat *Fusarium* head blight; Marker-assisted selection

长穗偃麦草(*Thinopyrum elongatum*, syn. *Lophopyrum elongatum*, *Agropyron elongatum*)是重要的小麦近缘种, 一般认为有二倍体($2n=2x=14$, EE 或 E^eE^e 或 E_1E_1)、四倍体($2n=4x=28$, $E^eE^eE^bE^b$ 或 $E_1E_1E_2E_2$)及十倍体($2n=10x=70$, $E^eE^eE^bE^bE^xStStStSt$ 或 $EEE_1E_1E_2E_2E_4E_4E_5E_5$) 3 种类型, 但也有人认为存在六倍体长穗偃麦草($2n=6x=42$)^[1], 二倍体长穗偃麦草的 E 基因组是该物种的基本基因组^[2–3]。长穗偃麦草主要分布于温带和寒带, 为多年生草本, 具有长穗、多花、籽粒蛋白含量高、适应性和繁殖力强等优良性状, 其基因组中蕴含着丰富的抗病、抗寒、抗旱、耐盐碱等对小麦改良极为有用的基因^[4–6]。由于其 E 基因组与小

麦 A、B、D 基因组的遗传分化程度较小, 在进化上与小麦亲缘关系较近, 与小麦易于杂交结实, 一直被认为是小麦的宝贵外源基因资源库, 已成为小麦遗传改良的重要野生种质资源^[7–10]。李振声等利用长穗偃麦草与小麦杂交育成了小偃 6 号为代表的系列小麦品种, 美国科学家也获得了大量表现优良的长穗偃麦草与小麦杂交后代^[11], 充分证明其在小麦遗传改良中的重要作用。普通小麦中国春–二倍体长穗偃麦草染色体异附加系、代换系的培育成功, 使二倍体长穗偃麦草的抗病、抗逆和品质特性在染色体水平上得以广泛深入研究^[12–13]。

小麦赤霉病(*Fusarium* head blight, FHB)是由禾谷镰

本研究由国家自然科学基金项目(31071406, 31101093)和江苏省普通高校研究生科研创新计划项目(立项类, 2011-997)资助。

* 通讯作者(Corresponding author): 陈建民, E-mail: jmchen@yzu.edu.cn, Tel: 0514-87979286

第一作者联系方式: E-mail: sqchen1116@163.com, Tel: 18752741813

Received(收稿日期): 2012-11-15; Accepted(接受日期): 2013-01-16; Published online(网络出版日期): 2013-01-00.

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20130100.0000.000.html>

刀菌(*Fusarium graminearum* Seh.)等多种镰刀菌引起的小麦主要病害之一, 尽管小麦自身种质中有一些抗性资源^[14-16], 但仍然难以满足小麦抗赤霉病育种的需要。长穗偃麦草因其基因组中存在大量优良抗病基因而备受关注。目前的研究发现, 长穗偃麦草的 1E^[9,11,17-18]和 7E 染色体^[8-9,19-21]上带有小麦赤霉病抗性基因, 因此, 充分挖掘和利用这些抗性基因, 将丰富小麦育种中的抗性基因资源。

分子标记辅助选择(MAS)是基于分子标记筛选有利的连锁基因或培育多基因品种的技术, 开发与优良基因紧密连锁的分子标记对分子标记辅助选择育种意义重大^[22]。由于长穗偃麦草染色体上具有抗病基因, 开发大量长穗偃麦草染色体特异分子标记, 将提高获得与抗病基因紧密连锁的分子标记概率, 加快小麦抗性育种进程。目前, 已利用 RAPD^[23-24]、SSR^[2,11,19,25-26]、RFLP^[27-28]、AFLP^[29-30]、SCAR^[24,31-32]、CAPS^[19,33]、RGAP^[34]、STS^[30]、TRAP^[11]、SSH^[35]等技术开发了一些长穗偃麦草特异分子标记。然而, 小麦和长穗偃麦草的基因组序列的同源性较高, 加之目前还没有小麦和长穗偃麦草基因组的全序列信息, 开发长穗偃麦草的特异分子标记普遍存在成本高、周期长、效率低等缺点, 难以获得大量染色体特异分子标记。获得与抗性基因紧密连锁的分子标记用于辅助选择, 必须建立在大量的分子标记可供选择的基础上。因此, 开发大量长穗偃麦草染色体特异分子标记, 将为小麦育种中导入长穗偃麦草优良基因进行分子标记辅助选择提供重要基础。

SLAF-seq (specific length amplified fragment sequencing)技术是由高通量测序技术发展而来。通过生物信息学进行实验方案系统设计, 构建 SLAF-seq 文库, 筛选特异长度 DNA 片段, 以高通量测序技术获得海量序列, 利用软件进行数据分析比对, 获得大量特异 DNA 片段, 进而依据其序列发展出特异分子标记。SLAF-seq 技术具有通量高、准确性高、成本低、周期短等突出优势, 依其测序结果可直接开发大量特异分子标记。该技术可用于单体型图谱、遗传图谱、关联性图谱、多态性图谱的构建, 为分子育种、系统进化、种质资源鉴定提供重要技术保障。本文首次利用 SLAF-seq 技术获得大量长穗偃麦草 1E 染色体特异片段, 开发了一批特异性强、稳定性高的 1E 染色体特异分子标记, 其开发效率明显提高。SLAF-seq 技术的应用为丰富植物染色体特异分子标记提供了一个便捷途径。

1 材料与方法

1.1 植物材料

二倍体长穗偃麦草(*Th. elongatum*, $2n=2x$)、普通小麦中国春、中国春-长穗偃麦草 1E~7E 染色体异附加系(DA 系列)、部分中国春-长穗偃麦草 1E~7E 染色体异代换系(DS 系列)、四倍体小麦 Langdon、Langdon-长穗偃麦草双二倍体(8801)、四倍体长穗偃麦草(*Th. elongatum*, $2n=4x$)及十倍体长穗偃麦草(*Th. elongatum*, $2n=10x$)(PI179162/PI204383)用于长穗偃麦草 1E 染色体特异标记开发及其稳定性检测,

由加拿大农业部的 Fedak 博士惠赠。普通小麦品种扬麦 10 号、扬麦 14、扬麦 16、扬麦 18、扬麦 158、宁麦 13、安农 8455 和苏麦 3 号用于特异分子标记的稳定性检测, 由江苏省里下河地区农业科学研究所程顺和院士提供。安农 8455 与 DS1E(1D)正交 F_1 (AD- F_1)及 F_2 代 (AD- F_2)用于特异标记的稳定性检测, 由本实验室通过杂交获得。

1.2 长穗偃麦草 1E 染色体特异 SLAF 片段的获得

取两叶一心期的各材料嫩叶, 采用改良的 SDS 法提取其基因组 DNA^[36]。经 0.8%琼脂糖电泳检测浓度, 稀释至 $100 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ 。利用酶切预测软件 SLAF_Predict (北京百迈客公司开发, 北京市顺义区空港科技创业园)系统分析小麦基因组, 根据其 GC 含量、重复序列和基因特点等确定酶切方案、切胶范围及测序量, 以保证分子标记的密度和均匀性。

分别取中国春、长穗偃麦草($2n=2x$)及附加系 DA1E 的基因组 DNA 各 500 ng, 加 0.6 U *Mse* I (NEB, Hitchin, Herts, UK)、T4 DNA 连接酶(NEB)、ATP (NEB)和 *Mse* I 接头(NEB)在 37°C 下反应 15 h, 65°C 退火 1 h, 然后加限制性内切酶 *Hae* III 和 *Bfa* I 在 37°C 下反应 3 h。反应结束后用 Quick Spin column (Qiagen)纯化酶切产物, 并用 $33 \mu\text{L}$ EB 回溶。

以回收的酶切产物为模板进行 PCR 反应, 反应体系 $25 \mu\text{L}$, 包括模板 DNA 100ng、 $10\times$ buffer $2.5 \mu\text{L}$ 、 2.5 mmol L^{-1} dNTP $2 \mu\text{L}$ 、 $5 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$ 的 *Taq* DNA 合成酶(NEB) $0.3 \mu\text{L}$ 、 $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ *Mse* I 引物 $2 \mu\text{L}$ 、 ddH_2O 加至 $25 \mu\text{L}$ 。PCR 产物经 E.Z.N.A. Cycle Pure Kit (Omega)纯化后, 加入 *Mse* I、T4 DNA 连接酶、ATP 及 Solexa 接头, 37°C 下反应 5 h。利用 Quick Spin Column (Qiagen)纯化产物, 2%琼脂糖胶电泳。利用 Gel Extraction Kit (Qiagen)回收琼脂糖胶中 300~500 bp 的条带, 并以其为模板, 在含 Phusion Master Mix (NEB)和 Solexa 引物混合物中进行 PCR 扩增, 扩增产物经纯化后用 Illumina GAIIx (Illumina, San Diego, CA, USA)测序。

每个样品的测序有效数据量需达到 50 000 个以上, 测序深度 $5\times$ 以上。利用软件 SLAF_Poly.pl (北京百迈客公司开发)对测序结果进行识别和低质量过滤, 得到中国春、长穗偃麦草($2n=2x$)及 DA1E 的有效原始 DNA 序列数据, 再利用比对软件 BLAT^[37]将各样品有效数据分别进行相似度聚类, 并通过深度识别, 纠正测序错误, 得到各样品有效序列。

以 DA1E 及长穗偃麦草($2n=2x$)的测序结果分别与所获得的中国春的 DNA 序列、北京百迈客公司的小麦 BAC 数据库及 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>和 <http://www.cerealsdb.uk.net/>网站上公布的小麦 DNA 序列进行比对, 获得与小麦同源性小于 50%的特异片段, 可分别视为长穗偃麦草 E 基因组和 1E 染色体特异片段, 再将上述片段进行序列比对, 获得同源性高于 80%的序列, 即为长穗偃麦草 1E 染色体特异片段。

1.3 长穗偃麦草染色体特异分子标记的开发及稳定性检测

根据长穗偃麦草 1E 染色体特异序列设计引物, 在

DA1E 及中国春中进行 DNA 扩增。PCR 体系 25 μL , 含 100 ng μL^{-1} 模板 DNA 1 μL 、10 \times buffer 2.5 μL 、2.5 mmol L^{-1} dNTP 2 μL 、10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 正向和反向引物各 1 μL 、5 U μL^{-1} *Taq* DNA 合成酶 0.3 μL 、ddH₂O 17.2 μL 。PCR 程序为 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 45 s, 45~60 $^{\circ}\text{C}$ (依引物而定) 退火 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1.5 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 终延伸 10 min。用 0.8% 琼脂糖胶电泳检测扩增产物。将只在 DA1E 中有扩增产物而在中国春中没有扩增产物的标记作为长穗偃麦草 1E 染色体特异分子标记。

为了验证这些标记的重复性、稳定性及特异性, 将其在长穗偃麦草二倍体 ($2n=2x$)、四倍体 ($2n=4x$) 和十倍体 ($2n=10x$)、中国春、DA 系列、DS 系列、Langdon、扬麦 10 号、扬麦 14、扬麦 16、扬麦 18、扬麦 158、宁麦 13、安农 8455、苏麦 3 号、8801 及 AD-F₁ 和 AD-F₂ 中进行扩增, 用 0.8% 琼脂糖胶电泳检测结果。特异扩增条带经切胶回收、重测序, 将其 DNA 序列再次与已知小麦的 DNA 序列比对, 检测其特异性。

2 结果与分析

2.1 长穗偃麦草 ($2n=2x$) 基因组及其 1E 染色体特异序列的筛选

采用 SLAF-seq 技术, 获得中国春、长穗偃麦草 ($2n=2x$) 及 DA1E 的原始序列。经测序, 3 个样品的 Raeds 数分别达 1 038 100、459 827 和 516 390, 有效 SLAF 片段数为 70 152、49 848 和 51 852, 平均测序深度均在 5 \times 以上, 达到预期目标。

测序得到的长穗偃麦草 ($2n=2x$) 和 DA1E 的有效 SLAF 片段, 其 DNA 序列经与中国春及其他已知小麦 DNA 序列比对, 初步获得 20 170 个长穗偃麦草基因组特异片段和 3257 个长穗偃麦草 1E 染色体特异片段。进一步比对两者, 最终获得同源性高于 80% 的序列 368 个, 即长穗偃麦草 1E 染色体特异序列。

2.2 引物设计与长穗偃麦草染色体特异分子标记的开发

根据长穗偃麦草 1E 染色体特异 SLAF 序列的筛选结果, 任意选择 80 个序列分别设计 1 对引物, 以中国春、长穗偃麦草 ($2n=2x$)、DA1E~DA7E 的基因组 DNA 为模板进行扩增, 共开发了 48 个长穗偃麦草特异分子标记 (表 1), 效率达 60%。其中, 1E 染色体特异分子标记 20 个 (图 1-A), 效率为 25%; 基因组特异分子标记 2 个 (图 1-B); 其他染色体的特异标记 26 个, 包括 17 个仅出现在 1E 和 5E 染色体上的标记 (图 1-C)。

2.3 长穗偃麦草染色体特异分子标记的重复性、稳定性及特异性检测

对中国春-长穗偃麦草 DA 系列和 DS 系列、8801、多倍体长穗偃麦草、不同小麦品种及安农 8455 与 DS1E (1D) 杂交后代的分子标记特异性和稳定性鉴定。表明本研究开发的长穗偃麦草染色体特异分子标记具有很高的重复性、稳定性和特异性。以标记 M1E_No.1 为例, 其在

7 份 DA 系列材料中, 仅出现在 DA1E 中 (图 1-A); 在 19 份 DS 系列材料中, 仅在含有 1E 染色体的材料中检测到特异扩增片段 (图 2); 在 8801 及长穗偃麦草二倍体、四倍体和十倍体中均有稳定的扩增产物, 但在四倍体小麦 Langdon 及普通小麦品种扬麦 10 号、扬麦 14、扬麦 16、扬麦 18、扬麦 158、宁麦 13、安农 8455、苏麦 3 号中没有检测到目标片段 (图 3); 在安农 8455 与 DS1E (1D) 杂交后代中, 目标片段出现在 AD-F₁ 中, 而在 60 个 AD-F₂ 单株中表现分离 (图 4), 其中有扩增片段的单株 42 个, 没有扩增片段的单株 18 个, 符合 3:1 的分离比 ($\chi^2=0.800$, $P=0.371$)。

随机选取 10 个长穗偃麦草染色体特异分子标记, 经 PCR 扩增、切胶回收、重新测序, 其所对应的 DNA 序列在 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> 和 <http://www.cerealsdb.uk.net/> 进行比对, 结果这些标记与已知小麦序列均无同源性或同源性低于 50%, 而与所获得长穗偃麦草 ($2n=2x$) 序列的同源性均高于 80%。

3 讨论

3.1 SLAF-seq 技术在分子标记开发上的可行性及优势

长穗偃麦草是小麦近缘种, 其 DNA 序列与小麦存在很高的同源性, 利用常规方法开发长穗偃麦草基因组特异分子标记难度较大, 开发其染色体特异分子标记难度更大, 从而影响了长穗偃麦草特异分子标记的开发及其优良基因的利用。SLAF-seq 技术是基于生物信息学、高通量测序仪等的高度自动化技术, 获得的海量序列信息可满足任何密度的全基因组分布, 以实现候选功能区域的精细定位, 数字化信号和高覆盖保证了获得标签的准确性, 高通量分子标记开发成本低于常规分子标记, 可以一次性获得大量的特异 DNA 序列, 为开发大量的特异分子标记提供了序列基础。本研究利用 SLAF-seq 技术获得 368 个长穗偃麦草 1E 染色体特异片段, 利用其中 80 个序列成功开发出 48 个长穗偃麦草特异分子标记, 其中包括 20 个长穗偃麦草 1E 染色体特异分子标记, 成功效率高达 25%。而通过常规方法开发长穗偃麦草染色体特异分子标记效率很低, 如刘树兵等^[23]利用 26 对 RAPD 引物获得 94 个长穗偃麦草特异条带, 仅获得 3 个长穗偃麦草 1E 及 3E 染色体特异分子标记; 尤明山等^[24]利用 100 对 RAPD 引物仅获得 1 个长穗偃麦草特异 SCAR 标记, 利用 40 对 SSR 引物获得 108 个长穗偃麦草特异位点, 但发展了 1 个长穗偃麦草基因组特异分子标记^[25]; 张丽等^[30]利用 5 对 AFLP 引物进行分析, 共筛选出 28 个长穗偃麦草特异片段, 仅发展了 4 个长穗偃麦草染色体特异分子标记; 葛江燕等^[35]利用 SSH 方法获得 65 个长穗偃麦草特异序列, 仅发展了 1 个长穗偃麦草染色体特异分子标记。另据北京百迈客公司统计, SLAF-seq 技术开发分子标记的平均成本不到 AFLP 技术的 1/8, 而其效率却高近 27 倍 (<http://www.biomarker.com.cn/>)。可见, SLAF-seq 技术不仅可以很好地

表 1 长穗偃麦草染色体特异分子标记及其引物
Table 1 Chromosome specific molecular markers and primers of *Th. elongatum*

标记 Marker	引物 Primer	引物序列 Sequences of primer (5'-3')		扩增染色体 Amplified chromosome	原始片段 Original fragment
		正向引物 Forward primer	反向引物 Reverse primer		
M1E_No.1	SP1E_No.1	TATCAAATAATATGTGCATG	CATGACAGAGATATGAAAAG	1E	SLAF17868
M1E_No.2	SP1E_No.2	GGGACCATGATTTTGTGTGA	TGCCCATCCCCTCAAA	1E, 5E	SLAF219201
M1E_No.3	SP1E_No.3	TGATCTTGTGTCGAAGTAGG	CCCCTACTTGTGATTATGA	1E, 5E	SLAF10586
M1E_No.4	SP1E_No.4	AGTACAACCACATATGCTCA	AATCTCAAAGACGTAACC	1E, 5E	SLAF17577
M1E_No.5	SP1E_No.5	ATCTACTTTACTGCATTACC	AGCACTTTATCTGGGAAC	1E-7E	SLAF4683
M1E_No.6	SP1E_No.6	TTAGTATTGTTACATCATCA	CGTGTATTCTTAGAAGTTA	1E, 5E	SLAF143423
M1E_No.7	SP1E_No.7	ATAAAAGAATCAACTAAAAAT	GTTCATTTATATAAAGTGTA	1E, 5E	SLAF235277
M1E_No.8	SP1E_No.8	AATATTTATGGCGCACGCAG	TCATCAGGGGAGTGAGGAGC	1E	SLAF16627
M1E_No.9	SP1E_No.9	ACCACAGGGAAATCA	CCAGAACTTCTTGCA	1E, 5E	SLAF44229
M1E_No.10	SP1E_No.10	CTGTGGAAATAGGAAGGATG	ATCCCAACATTGGCTATTTA	1E, 5E	SLAF28060
M1E_No.11	SP1E_No.11	TTTTTTCGCAAGTTCAAGTA	TGCTCAGTGGCTTTGTAATA	1E, 5E	SLAF23072
M1E_No.12	SP1E_No.12	GCCAACTCTTAGCTTATAT	CTGCACATTTTATAGAGCC	1E, 5E	SLAF145543
M1E_No.13	SP1E_No.13	AATGCTTAGACCTTTGTATC	TGACATTACAACAACAACCTG	1E-7E	SLAF33256
M1E_No.14	SP1E_No.14	CATCCAGATACTTGATTACT	ATGTCAACTTTTGTATTTTC	1E, 5E	SLAF83735
M1E_No.15	SP1E_No.15	GGAATCTCGTCCAAAA	AAAATGAACCAAAACCC	1E, 5E	SLAF13551
M1E_No.16	SP1E_No.16	TGACTGCCTTTGGTTG	CGTAGTGATGATGGAGC	1E, 2E, 5E	SLAF74711
M1E_No.17	SP1E_No.17	TACTCTTGAGTTACCACCAC	ATGTACATATTGTCTTTTG	1E, 5E	SLAF128326
M1E_No.18	SP1E_No.18	AACCCCGAAATAGAATAAAC	TGATCCTTTAGATATTTGCA	1E, 3E, 5E	SLAF15991
M1E_No.19	SP1E_No.19	GTCTGAATAGCACTCTGTTA	TGTTTCTGATGTAAGATGTT	1E, 5E	SLAF183157
M1E_No.20	SP1E_No.20	TCACCGATAAATAACAAGAG	ATATGATATACAACAACGCG	1E, 5E	SLAF230456
M1E_No.21	SP1E_No.21	CATCATATAAGAATGCAGGA	TCAACAGCACGCCAAC	1E	SLAF10897
M1E_No.22	SP1E_No.22	AGCACATTCTGAAGTTGAT	GCCATCAATAATATCCAGTG	1E, 2E, 5E, 6E	SLAF352
M1E_No.23	SP1E_No.23	TAGGAAAGAAATCTGAAATA	TGAGACAGCAGCAAAA	1E	SLAF44318
M1E_No.24	SP1E_No.24	GTGTTATTTTGTGCCA	AGCAAAGAATAGCATG	1E, 5E	SLAF21954
M1E_No.25	SP1E_No.25	GCTACTGGGATGGTTA	TGTTCTGTCTTTGAC	1E, 5E	SLAF732
M1E_No.26	SP1E_No.26	CTGGTAATTCTAATTTGGTA	TGCGAATAAAATTTGATC	1E, 5E	SLAF29540
M1E_No.27	SP1E_No.27	GGCTGATGCACTGACGT	TCCGAAATCTGAAAAGGAG	1E	SLAF35023
M1E_No.28	SP1E_No.28	GAGGGGTTCAGTTCT	ATGTCTAATCAATCTTCT	1E, 4E, 6E	SLAF17880
M1E_No.29	SP1E_No.29	ACTGTTTTTTTTTCGAG	AGCGCACAGATGAGAC	1E	SLAF15923
M1E_No.30	SP1E_No.30	TTAGAAAAATTCAACCCG	AATCTTGAACATGGGAG	1E	SLAF235066
M1E_No.31	SP1E_No.31	CCGGTTTGAAAGAAGAGA	CAACAAGCAAATGAGGGA	1E	SLAF186552
M1E_No.32	SP1E_No.32	GAGCCTGTGGGTGATAG	TGTGTCGTAGAGAGGTGTT	1E, 2E, 4E, 5E, 7E	SLAF2934
M1E_No.33	SP1E_No.33	TCACCTATGAGATCGCT	TATCCGAAGAACCTGTAC	1E	SLAF6492
M1E_No.34	SP1E_No.34	TGTTCTTGCATCATCT	AACTCACCTATCGGTCTAT	1E	SLAF125713
M1E_No.35	SP1E_No.35	TTGACAACCCAATCTG	TCCTGATAAATAACAAGAG	1E	SLAF16723
M1E_No.36	SP1E_No.36	TGACGGCAACGGAGTG	TCTGCCGAACATGGAATC	1E	SLAF33089
M1E_No.37	SP1E_No.37	AGCACTTGGGTTTTCAT	GGATTGGAGGGTCACTA	1E	SLAF13087
M1E_No.38	SP1E_No.38	TTCAAGAAGTATAGCTCGTT	AACCATAAAGTCCCAACA	1E	SLAF26496
M1E_No.39	SP1E_No.39	GAAAACCTTAGACTTACATC	TTCTATTGAAAGTTGGACT	1E, 2E, 6E	SLAF25800
M1E_No.40	SP1E_No.40	GGAATTCAAAGAAGAACA	TTCTGTCATATCCTATTT	1E, 2E, 4E	SLAF24694
M1E_No.41	SP1E_No.41	GGAAAGGGCACTCCAACC	GCGTCACATCCTGGTTTCG	1E	SLAF210166
M1E_No.42	SP1E_No.42	CTCCATCCCTCCACTT	AACATCAGCAGTTGGG	1E	SLAF19498
M1E_No.43	SP1E_No.43	TTAGCGAAATACGGACAC	TCTGAAAAAGAGCTCGTT	1E, 3E, 4E	SLAF21191
M1E_No.44	SP1E_No.44	TTGACTTCTCCCAAGTTG	AATGGAAAGGAAAACTG	1E	SLAF7533
M1E_No.45	SP1E_No.45	TCTATTTTGCTATTTGCC	TTTTGTCTTCATCACCAT	1E	SLAF6377
M1E_No.46	SP1E_No.46	AAATACACTTTGGGCACC	TCTGAATTGGATGTTGGA	1E, 4E, 5E, 6E	SLAF40734
M1E_No.47	SP1E_No.47	TACTCGCTACTTACAATCT	GAACATTATTGTGAAGCA	1E	SLAF14535
M1E_No.48	SP1E_No.48	CGGAATGTCTCACA	ATTGGCTAATGCTATGA	1E	SLAF33510

标记名称由 M (表示分子标记)、1E (表示长穗偃麦草 1E 染色体)和标记顺序号构成。引物名称由 SP (表示特异引物)、1E (长穗偃麦草 1E 染色体)和引物排序编号构成。原始片段名称由 SLAF (表示特异长度扩增片段)和编号组成。

The marker name is composed of "M" for molecular marker, "1E" for *Th. elongatum* chromosome 1E, and the marker series number. The primer number is composed of "SP" for specific primer, "1E" for *Th. elongatum* chromosome 1E, and the series number of the primer. The name of original fragment is composed of "SLAF" for specific length of amplified fragment and its number.

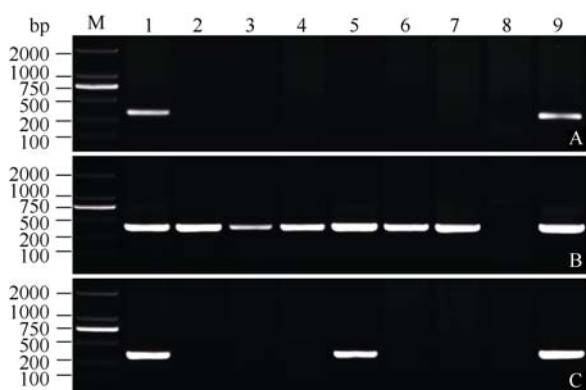


图 1 长穗偃麦草特性标记在中国春、长穗偃麦草及其附加系中的扩增结果

Fig. 1 Amplification result of *Th. elongatum* specific primers in Chinese Spring, *Th. elongatum* ($2n=2x$), and addition lines
A: M1E_No.1; B: M1E_No.5; C: M1E_No.14. M: DL2000; 1~7: 中国春-长穗偃麦草 1E~7E 染色体附加系; 8: 中国春; 9: 二倍体长穗偃麦草。

A: M1E_No.1(A); B: M1E_No.5(B); C: M1E_No.14. M: DL2000; 1~7: DA1E to DA7E; 8: Chinese Spring; 9: *Th. elongatum* ($2n=2x$).

应用于植物染色体特异分子标记开发, 并且其效率远远高于 RAPD、SSR、AFLP、SSH 等常规分子标记技术。

3.2 SLAF-seq 技术开发长穗偃麦草染色体特异分子标记的可靠性

本研究所开发的特异分子标记经在 DA 系列、DS 系列、8801、不同类型的长穗偃麦草($2n=2x$, $2n=4x$, $2n=10x$)、普通小麦品种及安农 8455 与 DS1E(1D)杂交 F_1 及 F_2 中的

检测, 表明利用 SLAF-seq 技术所开发的长穗偃麦草染色体特异分子标记具有很高的重复性、稳定性及特异性。其中, 在 60 个 AD- F_2 中有扩增与无扩增的比例经 χ^2 检测符合 3:1 的理论值, 即符合孟德尔遗传规律。通过对长穗偃麦草染色体特异标记所对应的 DNA 序列与已知小麦序列的比对, 均表明利用 SLAF-seq 技术所获得的特异片段与中国春及其他已知小麦的 DNA 序列无同源性或同源性很低, 而与所获得的长穗偃麦草($2n=2x$)的 DNA 序列的同源性很高, 这与预期结果是一致的。

研究还发现, 根据 SLAF-seq 技术获得的染色体特异片段所开发的特异标记中有许多不仅特异出现在 1E 染色体上, 还会出现在其他染色体上。由于本研究只对 DA1E 及其亲本中国春和长穗偃麦草($2n=2x$)测序与比对, 排除与中国春及其他小麦的同源性大于 50% 的序列, 获得与长穗偃麦草($2n=2x$)同源性高于 80% 的序列, 这些序列被视为长穗偃麦草 1E 染色体特异序列, 因此无法排除长穗偃麦草 7 条染色体中的同源性很高的序列, 导致有些标记不仅出现在 1E 染色体上还出现在其他染色体上。在 48 个长穗偃麦草特异标记中, 只有 20 个特异出现在 1E 染色体上, 而 28 个不仅出现在 1E 染色体上还出现在其他染色体上, 说明长穗偃麦草各染色体的 DNA 序列存在不同程度的同源性。所发展的标记中, 能够同时出现在 1E 和 5E 染色体上的标记有 24 个, 意味着长穗偃麦草的 1E 和 5E 染色体的 DNA 序列的同源性较高, 这与长穗偃麦草的染色体间可能发生过重排有关^[28]。该结果不仅表明长穗偃



图 2 长穗偃麦草 1E 染色体分子标记 M1E_No.1 在中国春-长穗偃麦草代换系中的特异性和稳定性

Fig. 2 Specification and stability of marker M1E_No.1 in CS-*Th. elongatum* substitution lines
M: DL2000; 1: DS1E(1A); 2: DS1E(1B); 3: DS1E(1D); 4: DS2E(2A); 5: DS2E(2B); 6: DS2E(2D); 7: DS3E(3A); 8: DS3E(3B); 9: DS3E(3D); 10: DS4E(4A); 11: DS4E(4B); 12: DS4E(4D); 13: DS5E(5B); 14: DS5E(5D); 15: DS6E(6A); 16: DS6E(6D); 17: DS7E(7A); 18: DS7E(7B); 19: DS7E(7D); 20: CS; 21: *Th. elongatum* ($2n=2x$).



图 3 长穗偃麦草 1E 染色体分子标记 M1E_No.1 在不同遗传背景长穗偃麦草和小麦品种中的特异性和稳定性

Fig. 3 Specification and stability of marker M1E_No.1 in *Th. elongatum* and common wheat materials with different backgrounds
M: DL2000; 1: Landon; 2: Yangmai 10 号; 3: Yangmai 14; 4: Yangmai 16; 5: Yangmai 18; 6: Yangmai 158; 7: Ningmai 13; 8: Anong 8455; 9: Sumai 3 号; 10: Landon-长穗偃麦草双二倍体 8801; 11: 四倍体长穗偃麦草; 12: 十倍体长穗偃麦草(PI179162); 13: 十倍体长穗偃麦草(PI204383); 14: 中国春; 15: 二倍体长穗偃麦草。

M: DL2000; 1: Landon; 2: Yangmai 10; 3: Yangmai 14; 4: Yangmai 16; 5: Yangmai 18; 6: Yangmai 158; 7: Ningmai 13; 8: Anong 8455; 9: Sumai 3; 10: Landon-*Th. elongatum* amphidiploid 8801; 11: *Th. elongatum* ($2n=4x$); 12: *Th. elongatum* ($2n=10x$, PI179162); 13: *Th. elongatum* ($2n=10x$, PI204383); 14: Chinese Spring; 15: *Th. elongatum* ($2n=2x$).

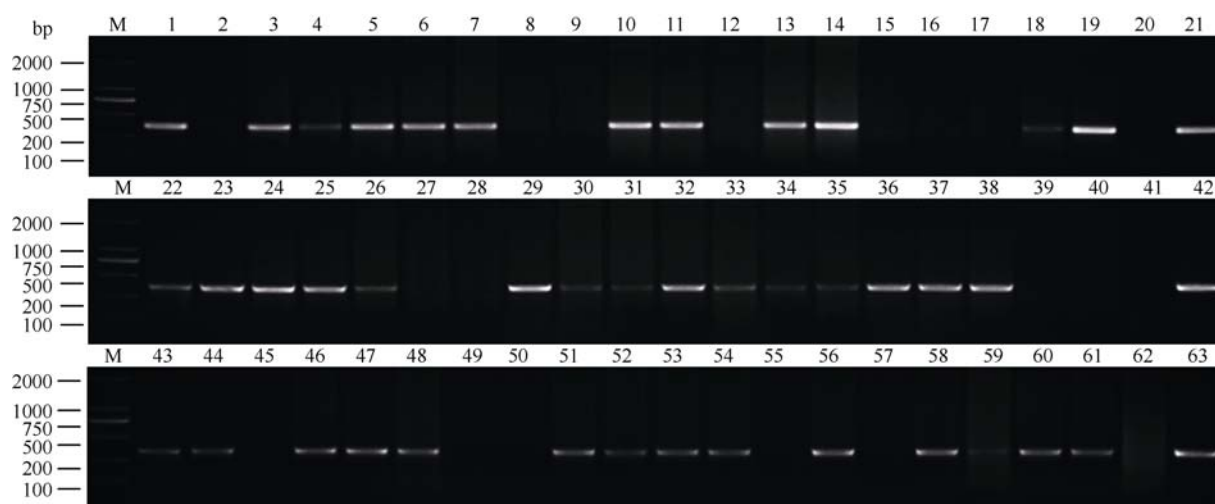


图4 长穗偃麦草 1E 染色体分子标记 M1E_No.1 在 AD-F₁ 及 AD-F₂ 中的扩增特异性和稳定性

Fig. 4 Specification and stability of M1E_No.1 in AD-F₁ and AD-F₂

M: DL2000; 1: 安农 8455 与 DS1E(1D)杂交 F₁ 代; 2~61: 安农 8455 与 DS1E(1D)杂交 F₂ 代; 62: 安农 8455; 63: DS1E(1D)。

M: DL2000; 1: AD-F₁; 2~61: AD-F₂; 62: Annon 8455; 63: DS1E(1D)。

麦草染色体特异分子标记的开发难度较大,也说明用 SLAF-seq 技术开发长穗偃麦草染色体特异分子标记的高效性及可靠性。

3.3 长穗偃麦草染色体特异分子标记的应用

本研究所开发的长穗偃麦草染色体特异分子标记为显性标记,为其后续应用提供了良好的基础。利用所开发的长穗偃麦草 1E 染色体特异分子标记对具有 1E 染色体的相关群体进行分析,结合对不同个体进行表型鉴定,依据分子标记与相关性状的共分离,既可以获得与抗性基因紧密连锁的标记,又可以精确定位优良基因,不仅加快了相关基因的研究,还为分子标记辅助育种提供重要途径^[8]。利用长穗偃麦草代换系与栽培小麦的杂交及反复回交,或借助 *Ph* 基因突变系获得含有长穗偃麦草 E 组染色体的小片段交换重组个体,使长穗偃麦草中抗病基因的片段导入小麦基因组,通过抗性鉴定和染色体特异分子标记筛选,可准确快速获得具有抗病性的后代^[11,38]。利用长穗偃麦草代换系与栽培小麦杂交的后代进行辐射,促使染色体片段的断裂和重接,获得具有长穗偃麦草不同染色体片段长度的易位系,通过发展的特异分子标记进行选择,可获得具有优良性状的易位系作为亲本用于小麦育种,确保准确获得理想的后代^[11,39],该工作正在进行中。

本研究所开发的一些标记不仅在长穗偃麦草 1E 染色体上出现,也在 5E 染色体上出现,它们也可作为特异标记用于含 5E 染色体的相关群体的分析。因此,开发大量长穗偃麦草染色体特异分子标记不仅可快速便捷地检测不同背景中的长穗偃麦草染色体,而且可促进长穗偃麦草中优良基因的挖掘和利用,不断丰富小麦优良抗性基因资源,为进一步加快抗病、抗逆小麦育种步伐提供强有力的保障。

References

- [1] Mao P S, Huang Y, Wang X G, Meng L, Mao P C, Zhang G F. Cytological evaluation and karyotype analysis in plant germplasms of *Elytrigia* Desv. *Agric Sci China*, 2010, 9: 1553–1560
- [2] Li N(李娜), Wang X-P(王献平), Cao S-H(曹双河), Zhang X-Q(张相岐). Genome constitution of *Agropyron elongatum* 4x by biochemical and SSR markers. *Acta Genet Sin* (遗传学报), 2005, 32(6): 571–578 (in Chinese with English abstract)
- [3] Yan X-D(闫小丹), Li J-L(李集临), Zhang Y-M(张延明). Application study of genetic resources in *Elytrigia*. *Biotechnol Bull* (生物技术通报), 2010(6): 18–21 (in Chinese with English abstract)
- [4] Chen S Y, Xia G M, Quan T Y, Xiang F N, Jin Y, Chen H M. Introgression of salt-tolerance from somatic hybrids between common wheat and *Thinopyrum ponticum*. *Plant Sci*, 2004, 167: 773–779
- [5] Li Z, Li B, Tong Y. The contribution of distant hybridization with decaploid *Agropyron elongatum* to wheat improvement in China. *J Genet Genomics*, 2008, 35: 451–456
- [6] Garg M, Tanaka H, Ishikawa N, Takata K, Yanaka M, Tsujimoto H. *Agropyron elongatum* HMW-glutenins have a potential to improve wheat end-product quality through targeted chromosome introgression. *J Cereal Sci*, 2009, 50: 358–363
- [7] Lammer D, Cai X W, Arterburn M, Chatelain J, Murray T, Jones S. A single chromosome addition from *Thinopyrum elongatum* confers a polycarpic, perennial habit to annual wheat. *J Exp Bot*, 2004, 55: 1715–1720
- [8] Zhang X L, Shen X R, Hao Y F, Cai J J, Ohm H W, Kong L R. A genetic map of *Lophopyrum ponticum* chromosome 7E harboring resistance genes to *Fusarium* head blight and leaf rust. *Theor*

- Appl Genet*, 2011, 122: 263–270
- [9] Fu S L, Lü Z L, Qi B, Guo X, Li J, Liu B, Han F P. Molecular cytogenetic characterization of wheat-*Thinopyrum elongatum* addition, substitution and translocation lines with a novel source of resistance to wheat *Fusarium* head blight. *J Genet Genomics*, 2012, 39: 103–110
 - [10] Hu L J, Liu C, Zeng Z X, Li G R, Song X J, Yang Z J. Genomic rearrangement between wheat and *Thinopyrum elongatum* revealed by mapped functional molecular markers. *Genes Genomics*, 2012, 34: 67–75
 - [11] Jauhar P P, Peterson T S, Xu S S. Cytogenetic and molecular characterization of a durum alien disomic addition line with enhanced tolerance to *Fusarium* head blight. *Genome*, 2009, 52: 467–483
 - [12] Dvorák J, Knott D R. Disomic and ditelosomic additions of diploid *Agropyron elongatum* chromosomes to *Triticum aestivum*. *Can J Genet Cytol*, 1974, 16: 399–417
 - [13] Dvorák J, Sosulski F W. Effects of additions and substitutions of *Agropyron elongatum* chromosomes on characters in wheat. *Can J Genet Cytol*, 1974, 16: 627–637
 - [14] Cuthbert P A, Somers D J, Thomas J, Cloutier S, Brule-Babel A. Fine mapping *Fhb1*, a major gene controlling *Fusarium* head blight resistance in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor Appl Genet*, 2006, 112: 1465–1472
 - [15] Cuthbert P A, Somers D J, Brule-Babel A. Mapping of *Fhb2* on chromosome 6BS: a gene controlling *Fusarium* head blight field resistance in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor Appl Genet*, 2007, 114: 429–437
 - [16] Qi L L, Pumphrey M O, Friebe B, Chen P D, Gill B S. Molecular cytogenetic characterization of alien introgressions with gene *Fhb3* for resistance to *Fusarium* head blight disease of wheat. *Theor Appl Genet*, 2008, 117: 1155–1166
 - [17] Liu D-C(刘登才), Zheng Y-L(郑有良), Wang Z-R(王志容), Hou Y-C(侯永翠), Lan X-J(兰秀锦), Wei Y-M(魏育明). Distribution of chromosomes in diploid *Lophopyrum elongatum* (Host) A. Love that influences resistance to head scab of common wheat. *J Sichuan Agric Univ* (四川农业大学学报), 2001, 19(3): 200–205 (in Chinese with English abstract)
 - [18] Chen S-Q(陈士强), Huang Z-F(黄泽峰), Zhang Y(张勇), Ge J-Y(葛江燕), Zhu X(朱雪), Gao Y(高勇), Chen J-M(陈建民). Chromosomal location of the genes associated with FHB resistance of *Lophopyrum elongatum* in Chinese Spring background. *J Triticeae Crops* (麦类作物学报), 2012, 32(5): 839–845 (in Chinese with English abstract)
 - [19] Shen X R, Kong L R, Ohm H. *Fusarium* head blight resistance in hexaploid wheat (*Triticum aestivum*)-*Lophopyrum* genetic lines and tagging of the alien chromatin by PCR markers. *Theor Appl Genet*, 2004, 108: 808–813
 - [20] Shen X R, Ohm H. *Fusarium* head blight resistance derived from *Lophopyrum elongatum* chromosome 7E and its augmentation with *Fhb1* in wheat. *Plant Breed*, 2006, 125: 424–429
 - [21] Wang J R, Wang L, Gulden S, Rocheleau H, Balcerzak M, Hattori J, Cao W, Han F, Zheng Y L, Fedak G, Ouellet T. RNA profiling of *Fusarium* head blight-resistant wheat addition lines containing the *Thinopyrum elongatum* chromosome 7E. *Can J Plant Pathol*, 2010, 32: 188–214
 - [22] Du J-K(杜军凯), Yu G-H(余桂红), Wang X-E(王秀娥), Ma H-X(马鸿翔). Development and validation of a SSCP marker for *Fusarium* head blight resistance QTL region in wheat. *J Triticeae Crops* (麦类作物学报), 2010, 30(5): 829–834 (in Chinese with English abstract)
 - [23] Liu S-B(刘树兵), Jia J-Z(贾继增), Wang H-G(王洪刚), Kong L-R(孔令让), Zhou R-H(周荣华). Special chromosome markers for E genome and DNA polymorphism between *Agropyron elongatum* ($2n = 14$) and common wheat detected by RAPD markers. *Acta Agron Sin* (作物学报), 1998, 24(6): 687–690 (in Chinese with English abstract)
 - [24] You M-S(尤明山), Li B-Y(李保云), Tang Z-H(唐朝晖), Liu S-B(刘守斌), Song J-M(宋健民), Mao S-F(毛善峰). Establishment of E-genome specific RAPD and SCAR markers for *Thinopyrum* spp. *J China Agric Univ* (中国农业大学学报), 2002, 7(5): 1–6 (in Chinese with English abstract)
 - [25] You M-S(尤明山), Li B-Y(李保云), Tian Z-H(田志会), Tang Z-H(唐朝晖), Liu S-B(刘守斌), Liu G-T(刘广田). Development of specific SSR marker for E^c-genome of *Thinopyrum* sp. by using wheat microsatellites. *J Agric Biotechnol* (农业生物技术学报), 2003, 11(6): 577–581 (in Chinese with English abstract)
 - [26] Wang R R, Larson S R, Jensen K B. Analyses of *Thinopyrum bessarabicum*, *T. elongatum*, and *T. junceum* chromosomes using EST-SSR markers. *Genome*, 2010, 53: 1083–1089
 - [27] Autrique E, Tanksley S D, Sorrells M E, Singh R P. Molecular markers for four leaf rust resistance genes introgressed into wheat from wild relatives. *Genome*, 1995, 38: 75–83
 - [28] Liu S-B(刘树兵), Jia J-Z(贾继增), Wang H-G(王洪刚), Kong L-R(孔令让), Zhou R-H(周荣华). Identification of homoeology between the *Elytrigia elongatum* ($2n = 14$, EE) and wheat chromosomes using biochemical and molecular markers. *Acta Agron Sin* (作物学报), 1999, 26(1): 37–42 (in Chinese with English abstract)
 - [29] Prins R, Groenewald J Z, Marais G F, Snape J W, Koebner R M D. AFLP and STS tagging of *Lr19*, a gene conferring resistance to leaf rust in wheat. *Theor Appl Genet*, 2001, 103: 618–624
 - [30] Zhang L(张丽), Yan Z-H(颜泽洪), Zheng Y-L(郑有良), Liu D-C(刘登才), Dai S-F(代寿芬), Zhang L-Q(张连全), Wei Y-M(魏育明). Development of E^c-chromosome specific AFLP and STS molecular marker for *Lophopyrum elongatum* in Chinese

- Spring wheat background. *J Agric Biotechnol* (农业生物技术学报), 2008, 16(3): 465–473 (in Chinese with English abstract)
- [31] Prabhu K V, Gupta S K, Charpe A, Koul S. SCAR marker tagged to the alien leaf rust resistance gene *Lr19* uniquely marking the *Agropyron elongatum*-derived gene *Lr24* in wheat: a revision. *Plant Breed*, 2004, 123: 417–420
- [32] Yan H-F(闫红飞), Yang W-X(杨文香), Chen Y-F(陈云芳), Meng Q-F(孟庆芳), Liu D-Q(刘大群). Specificity and stability of E-chromosome specific SCAR marker from *Thinopyrum* spp. for *Lr19*. *Acta Phytopathol Sin* (植物病理学报), 2009, 39(1): 76–81 (in Chinese with English abstract)
- [33] Li X M, Lee B S, Mammadov A C, Koo B C, Mott I W, Wang R C. CAPS markers specific to E^b, E^c, and R genomes in the tribe *Triticeae*. *Genome*, 2007, 50: 400–411
- [34] Chen G-Y(陈国跃), Dong P(董攀), Wei Y-M(魏育明), He K(何坤), Li W(李伟), Zheng Y-L(郑有良). Development of E^c- chromosome-specific RGAP markers for *Lophopyrum elongatum* (Host) in wheat background by using resistance gene analog polymorphism. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2007, 33(11): 1782–1787 (in Chinese with English abstract)
- [35] Ge J-Y(葛江燕), Chen S-Q(陈士强), Gao Y-Y(高营营), Gao Y(高勇), Zhu X(朱雪), Huang Z-F(黄泽峰), Chen J-M(陈建民). Development of genome-specific molecular markers for *Lophopyrum elongatum* based on suppression subtractive hybridization. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2012, 38(10): 1818–1826 (in Chinese with English abstract)
- [36] Wang J-X(王景雪), Sun Y(孙毅), Gao W-J(高武军). A simple of practical method for extracting plant total DNA. *J Shanxi Univ* (Nat Sci Edn) (山西大学学报·自然科学版), 2000, 23(3): 271–272 (in Chinese with English abstract)
- [37] Kent W J. BLAT: the BLAST-Like alignment tool. *Genome Res*, 2002, 12: 656–664
- [38] Ma J-X(马渐新), Zhou R-H(周荣华), Dong Y-C(董玉琛), Jia J-Z(贾继增). Chromosomal location of the genes resistant to wheat stripe rust from *Lophopyrum elongatum*. *Chin Sci Bull* (科学通报), 1999, 44(1): 65–69 (in Chinese)
- [39] Sears E R. Use of radiation to transfer alien segments to wheat. *Crop Sci*, 1993, 33: 897–901