

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2008.01056

非洲黑麦染色体特异性标记的建立与应用

曾雪, 杨足君, 李光蓉, 雷孟平, 刘成, 贾举庆, 任正隆

电子科技大学生命科学与技术学院, 成都 610054

摘要: 以非洲黑麦、小麦-非洲黑麦双二倍体、安岳排灯麦等为材料筛选 100 条 ISSR 引物。其中, 引物 UBC815 可在非洲黑麦中扩增出 1 条长 561 bp 的特异性片段(命名为 pSaUBC815₅₆₁), 而小麦对照均未扩出该片段。引物 UBC815 同样能在黑麦属的瓦维洛夫黑麦(*Secale vavilovii* Grossh.)、森林黑麦(*Secale sylvestre* Host.)等 5 个种扩增出 pSaUBC815₅₆₁。根据 pSaUBC815₅₆₁ 设计特异 PCR 引物 U815-F、U815-R, 对小麦族多物种进行扩增, 表明 pSaUBC815₅₆₁ 为黑麦属特有。进而利用一套中国春-Imperial 黑麦二体附加系及小麦-黑麦异源材料进行扩增, 结果显示, pSaUBC815₅₆₁ 分布在黑麦整套染色体上, 并且所有后代材料都能扩增出 pSaUBC815₅₆₁, 表明 pSaUBC815₅₆₁ 可作为特异性标记用来检测小麦背景中的黑麦染色质。

关键词: 非洲黑麦; ISSR 分子标记; 特异 PCR

Development and application of a genome specific marker for *Secale africanum*

ZENG Xue, YANG Zu-Jun, LI Guang-Rong, LEI Meng-Ping, LIU Cheng, JIA Ju-Qing, REN Zheng-Long

School of Life Science and Technology, University of Electronic Science and Technology of China, Chengdu 610054, China

Abstract: Genome *in situ* hybridization (GISH) analysis of wheat-*Secale africanum* amphiploid revealed that the *S. africanum* genome displayed significant divergence to the *Secale cereale* genome. It is thus valuable to deploy genes from *S. africanum*. We performed the PCR analysis on *S. africanum*, wheat-*S. africanum* amphiploid, *T. aestivum* cv. Anyuepaideng and other genetic stocks by 100 ISSR primers. A specific segment of 561 bp, named pSaUBC815₅₆₁, was obtained from *S. africanum* using primer UBC815. This segment was not amplified from the control wheat lines. Primer UBC815 also amplified fragments from wild species of genus *Secale*, including *S. vavilovii*, *S. sylvestre*, and other cultivated ryes. Based on the sequence of pSaUBC815₅₆₁, a pair of special primers U815-F and U815-R was designed and was used to amplify the DNA of wheat related species in Triticeae aimed at validating the specificity of pSaUBC815₅₆₁. PCR analysis indicated that this specific DNA fragment was amplified not only from a set of Chinese Spring wheat-Imperial rye chromosome addition lines but also from certain wheat-rye introgression lines. Therefore, pSaUBC815₅₆₁ can be used as a specific marker for detection of chromosomes of *Secale* genome in wheat.

Keywords: *Secale africanum*; ISSR (Inter-simple sequence repeat) marker; specific PCR

收稿日期: 2007-12-28; 修回日期: 2008-04-01

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 30671288 和 30671136), 教育部新世纪优秀人才资助项目(编号: NCET-06-0810)资助[Supported by National Natural Science Foundation of China (No. 30671288 and 30671136) and Program for New Century Excellent Talents in University (No. NCET-06-0810)]

作者简介: 曾雪(1982-), 女, 重庆人, 在读硕士, 专业方向: 植物分子遗传学。E-mail: zengxue@uestc.edu.cn

通讯作者: 杨足君(1971-), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 植物分子细胞遗传学。E-mail: yangzujun@uestc.edu.cn

黑麦属(*Secale* L.)植物是禾本科(Poaceae)小麦族(Triticeae Dumort.)的近缘物种。黑麦的染色体组为R, 除人工诱变材料外, 皆为二倍体, 体细胞染色体数多为 $2n=2x=14$, 主要分布在原苏联南部、东欧、南北美洲等地。黑麦属位居小麦的三级基因库(Tertiary gene pool)^[1], 其间蕴藏着丰富的遗传变异, 是改良普通小麦产量、品质、抗病性和抗逆性性状的重要外源基因供体^[2,3]。尽管在黑麦属基因资源的利用上已取得了一定的进展, 但也存在一些问题, 如1BL/1RS易位系小麦对锈病抗性的衰减以至消失等。目前人们利用的黑麦属基因资源主要是栽培黑麦(*Secale cereale*), 而对黑麦属的野生物种如非洲黑麦(*S. africanum* Stapf.)、山地黑麦(*S. montanum* Guss.)等则利用较少。非洲黑麦是黑麦属的重要多年生珍稀物种, 表现矮秆和对多种病害具有优异的抗性, 因而十分有必要对这一珍贵资源的优异基因开展研究与开发工作。蒋华仁等^[4]率先人工合成了小麦地方品种与非洲黑麦的双二倍体。杨足君等^[5]在此基础上利用双二倍体与普通小麦杂交, 开展了非洲黑麦优异基因向小麦基因组渗入的工作, 目前已获得大量小麦-非洲黑麦渐渗系^[6,7]。在非洲黑麦优异基因导入小麦的工作中, 非洲黑麦染色质的检测是小麦染色体工程育种研究的重要内容。本研究拟建立非洲黑麦基因组特异分子标记, 并利用建立的标记对这些渐渗系材料进行筛选和鉴定。

分子标记辅助选择育种已经成为国际小麦育种的一种发展趋势。基于PCR的分子标记有较高的多态性、开发使用成本低廉、检测手段简单易行等优点而被育种工作者们广泛使用。其中ISSR(Inter simple sequence repeat)是一种基于植物基因组中广泛存在的双核苷酸重复序列的新型分子标记技术^[8], 与其他分子标记技术相比有更高的稳定性。ISSR标记技术已应用于品种鉴定、遗传多样性分析、基因定位、植物基因组作图研究等各个方面。但应用ISSR标记技术建立黑麦属特异分子标记的研究还未见报道。本研究利用ISSR技术, 从非洲黑麦中获得了特异性的DNA片段, 然后根据其序列设计特异引物, 将ISSR标记转化成特异PCR标记。该标记可以用于小麦-非洲黑麦渐渗系的检测, 并且也可以用来检测小麦背景中的栽培黑麦染色质, 为小麦育种中外源染色质的检测提供了一个新的途径。

1 材料和方法

1.1 材料

非洲黑麦(*S. africanum*)和森林黑麦(*S. sylvestre*)

引自美国Missouri植物园。安东尼奥黑麦(*S. strictum* subsp. *anatolicum*)、瓦维洛夫黑麦(*S. vavilovii*)由四川农业大学唐宗祥博士提供。节节麦-森林黑麦双二倍体(DDR^sR^s)、安岳排灯麦-非洲黑麦双二倍体、波斯小麦-非洲黑麦双二倍体、简阳矮兰麦-非洲黑麦双二倍体由四川农业大学蒋华仁研究员人工合成^[4]。具有分枝性状的小黑麦Fenzhi-1由四川农业大学张显志研究员创制^[9]。秦岭黑麦(*S. cereale* cv. Qingling rye)、荆州黑麦(*S. cereale* cv. Jinzhou rye)、波斯小麦(*T. carthlicum*)、安岳排灯麦(*T. eastivum* cv. Anyuepaideng)、简阳矮兰麦(*T. turgidum* cv. Jianyangailanmai)、普通小麦中国春(CS), 绵阳11(MY11)由四川农业大学植物遗传育种重点实验室保存并提供。多年生簇毛麦(*Dasypyrum breviaristatum*)、中间偃麦草(*Thinopyrum intermedium*)、二倍体长穗偃麦草(*Thinopyrum elongatum*)、拟鹅观草(*Pseudoroegneria spicata*)由美国NPGS提供。中国春-Imperial黑麦附加系CSDA1R-7R由英国John Innes Center的Reader博士提供; 硬粒小麦-非洲黑麦双二倍体与小麦的杂种后代材料L1-L20由本实验室培育^[5,10]。

1.2 方法

1.2.1 DNA的提取

参试材料种子发芽后按单株取叶片, 参照Yang等^[11]的方法提取DNA。

1.2.2 PCR扩增与电泳分析

扩增反应体系的体积为25 μ L, 其中包括10 \times PCR buffer 2.5 μ L, 25 mmol/L MgCl₂ 1.5 μ L, 10 μ mol/L引物各1 μ L, 2 mmol/L dNTP 1 μ L, ddH₂O 15.7 μ L, 5 U/ μ L Taq酶0.3 μ L和模板DNA 2 μ L; 最后加入一小滴矿物油。扩增反应在MyCycle™ Thermal Cycler(BIO-RAD)中进行, 先94℃预变性3 min; 然后94℃变性1 min, 52℃复性1 min, 72℃延伸2 min, 40个循环; 最后72℃延伸7 min。扩增产物12 μ L加入3 μ L溴酚蓝, 在含EB的1%琼脂糖胶、1 \times TAE缓冲液中电泳, 最后在GDS-Gel Dol 2000紫外凝胶成像系统下扫描照相。

1.2.3 PCR扩增产物的回收克隆测序以及序列比对

PCR扩增产物经1%的琼脂糖凝胶电泳后用DNA回收试剂盒(上海申能博彩公司)进行回收。将回收产物连接到载体pMD18-T(TaKaRa)后, 将连接产物转化*E. coli* DH5a感受态细胞, 后涂布于含IPTG、X-gal、Amp的LB固体培养基上培养过夜后

进行蓝白斑筛选。随机挑选 6 个左右的白色单菌落接种到含 Amp 的 LB 液体培养基里震荡培养。然后提取质粒直接电泳,并用质粒作模板用引物 UBC815 及通用引物 M13F、M13R 进行 PCR 扩增来鉴定筛选正确的克隆。把正确的克隆送交北京三博公司进行测序。最后将克隆测序得到的核苷酸序列在 NCBI GenBank(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)中进行同源搜索。

1.2.4 特异 PCR 分析

扩增反应体积为 20 μ L, 反应液中含 50 ng 基因组 DNA, 1 U *Taq* 聚合酶(10 nmol/L Tris-HCl, pH 8.3); 50 mmol/L KCl; 1.5 mmol/L $MgCl_2$ 每个引物 0.2 μ mol/L, PCR 反应于 PTC-200 扩增仪上进行, 扩增条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 61 $^{\circ}$ C 复性 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。扩增产物 12 μ L 加入 3 μ L 溴酚蓝, 在含有 EB 的 1% 琼脂糖凝胶上以 1 \times TAE 缓冲液为介质电泳。

1.2.5 原位杂交

采用任正隆等^[12]的方法制作安岳排灯麦-非洲黑麦双二倍体的染色体标本制片。采用缺口平移法以地高辛(Digoxigenin-11-dUTP)对含基因组总 DNA 或目标片段的质粒 DNA 进行探针标记。杂交前, 在制片标本上滴加 70% 甲酰胺 2 \times SSC 溶液 150 μ L, 盖上 22 mm \times 40 mm 盖玻片; 80 $^{\circ}$ C 条件下处理 1.5 min, 将载玻片依次迅速插入预冷的 70%、95% 和 100% 梯度酒精中, -20 $^{\circ}$ C 下分别处理 5 min, 空气中自然干燥。杂交液(50% 甲酰胺、2 \times SSC、4~5 μ g/mL 探针

和 500 μ g/mL 鲑精 DNA、10% 葡聚糖)经 80 $^{\circ}$ C 水浴, 变性 5 min, 迅速在冰上冷淬至少 5 min, 每张染色体标本滴加 15 μ L 杂交液, 37 $^{\circ}$ C 孵化至少 6 h 或过夜。杂交后, 在 40 $^{\circ}$ C 的 2 \times SSC 中洗 10 min, 50% 甲酰胺-2 \times SSC、2 \times SSC、1 \times PBS 中各洗 1 次, 每次 10 min。

将制片标本放在纸巾上吸干, 滴加 100 μ L 按 1:200 的比例稀释的 anti-digoxigenin Fab fragments, 盖上 22 mm \times 40 mm 盖玻片, 37 $^{\circ}$ C 孵化 30 min。将载玻片插入盛有 1 \times PBS 的烧杯中, 使盖玻片脱落, 1 \times PBS 室温下清洗 3 次(每次 5 min)。将载玻片放在纸巾上吸干, 加一薄层含有 1 μ g/mL Propidium iodide (PI) 的抗褪色剂(Vectrashield), 盖上盖玻片。OLYMPUS BX51 荧光显微镜检查, DP70CCD 自动摄影。

2 结果与分析

2.1 原位杂交分析

分别以荆州黑麦基因组总 DNA 和非洲黑麦基因组总 DNA 为探针, 中国春基因组总 DNA 为封阻, 对安岳排灯麦-非洲黑麦双二倍体的有丝分裂中期细胞进行原位杂交, 结果显示以栽培黑麦为探针的小麦-非洲黑麦双二倍体中非洲黑麦的 14 条染色体也具有杂交信号(图 1A), 但其中 2 对染色体端部没有杂交信号(图中白色箭头所示); 而以非洲黑麦为探针的小麦-非洲黑麦双二倍体中非洲黑麦的 14 条染色体均布满杂交信号(图 1B)。另外, 我们还利用本研究的其他四倍体小麦-非洲黑麦双二倍体进行

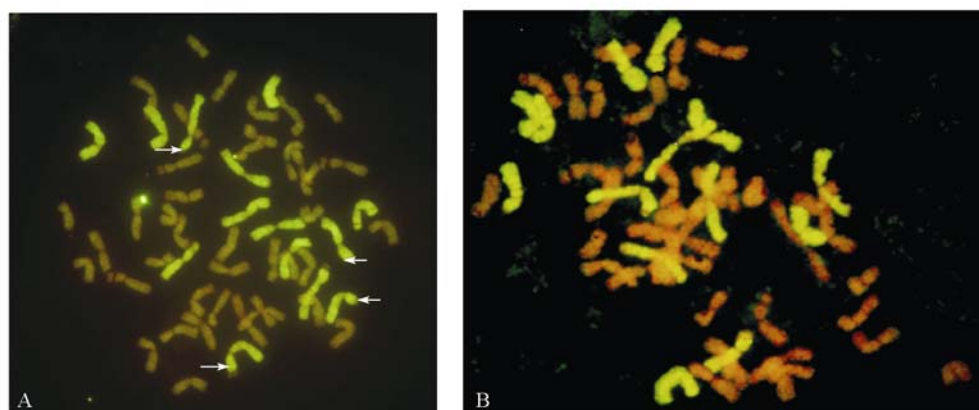


图 1 以荆州黑麦基因组总 DNA 为探针(A)和以非洲黑麦基因组总 DNA 为探针(B)的安岳排灯麦-非洲黑麦双二倍体中期细胞染色体原位杂交图

Fig. 1 Fluorescence in situ hybridization (FISH) analysis mitotic metaphase chromosomes from *T. aestivum* cv. Anyuepaideng-S. *africanum* amphiploid (2n=56) using genomic DNA of *S. cereale* cv. Jinzhou rye (A) and *S. africanum* (B) as probe

了 GISH 分析, 也获得了类似结果。以上结果证实了栽培黑麦与非洲黑麦在基因组上存在较大差异。由于非洲黑麦基因对多种病害具有优异的抗性, 故应加强对非洲黑麦等野生黑麦的研究和利用, 进一步发掘易于应用的非洲黑麦分子标记, 为跟踪非洲黑麦遗传物质向小麦中渗入提供方便^[13]。

2.2 引物的筛选鉴定

以非洲黑麦、安岳排灯麦-非洲黑麦双二倍体、简阳矮兰麦-非洲黑麦双二倍体、波斯小麦-非洲黑麦双二倍体、波斯小麦、安岳排灯麦、简阳矮兰麦为材料, 筛选 100 条 ISSR 引物。发现引物 UBC815 可以在非洲黑麦及小麦-非洲黑麦双二倍体中扩出一条分子量约为 600 bp 的特异 DNA 带, 而供试小麦材料均未扩出该片段, 初步推断该片段为非洲黑麦所特有。进一步对荆州黑麦、秦岭黑麦、森林黑麦、安东尼奥黑麦、瓦维洛夫黑麦等材料进行扩增, 验证该片段的特异性, 结果显示所有供试黑麦均扩增出了目标片段(图 2)。即表明该片段在野生黑麦和栽培黑麦基因组中均有分布。

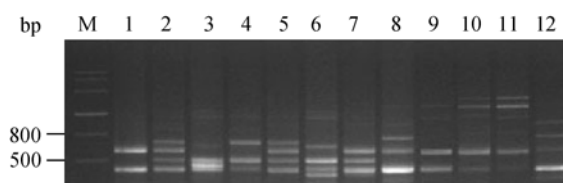


图 2 引物 UBC815 在各个黑麦种和黑麦-小麦双二倍体基因组 DNA 中的扩增结果

M: DL4500 marker; 1: 非洲黑麦; 2: 波斯小麦-非洲黑麦双二倍体; 3: 波斯小麦; 4: 安岳排灯麦; 5: 安岳排灯麦-非洲黑麦双二倍体; 6: 简阳矮兰麦; 7: 简阳矮兰麦-非洲黑麦双二倍体; 8: 荆州黑麦; 9: 秦岭黑麦; 10: 森林黑麦; 11: 安东尼奥黑麦; 12: 瓦维洛夫黑麦。

Fig. 2 Amplification result of primer UBC815 in genomic DNA of rye and rye-wheat amphiploid

M: DL=4500 marker; 1: *S. africanum*; 2: *T. carthlicum*-*S. africanum* amphiploid; 3: *T. carthlicum*; 4: *T. eastivum* cv. Anyuepaideng; 5: *T. eastivum* cv. Anyuepaideng-*S. africanum* amphiploid; 6: *T. turgidum* cv. Jianyangailanmai; 7: *T. turgidum* cv. Jianyangailanmai-*S. africanum* amphiploid; 8: *S. cereale* cv. Jinzhou rye; 9: *Secale creale* cv. Qingling rye; 10: *S. sylvestre*; 11: *S. strictum* subsp. *anatolicum*; 12: *S. vavilovii*.

2.3 非洲黑麦特异 DNA 片段的克隆、测序及序列比对

对非洲黑麦的特异性片段进行回收, 然后进行克隆、测序, 得到一条 561 bp 的序列(图 3), 命名为 pSaUBC815₅₆₁, GenBank 登录号为 EU295490, 其中

5'-CTCTCTCTCTCTCTCTG-3'和 5'-CAGAGAGAGAGAGAGAG-3'分别是 UBC815 的正向和互补反向序列(图示边框部分)。通过比对发现 pSaUBC815₅₆₁与园锥小麦(*Triticum turgidum*)的 BAC 克隆 326E2、354M17(EF540321)和一粒小麦(*Triticum monococcum*)的 BAC(AY485644)均有 93%的同源性, 进一步的比对并结合多个软件综合分析, 表明这段序列仅存在于所报道的已知序列中的微卫星重复序列的近端, 是一段序列特征未知的新序列, 可能是一个新型的重复序列。

2.4 特异 PCR 验证 pSaUBC815₅₆₁ 的特异性

将 pSaUBC815₅₆₁ 输入 Bioedit 软件, 设计了 1 对 PCR 引物 U815-F 和 U815-R, 两引物之间长度为 530 bp。设计的引物序列为:

U815-F: 5'-CCTAGGAGTACGTGAAGAGCTTG-3'

U815-R: 5'-CTCTCTCTCTCTCTCTGCTATCT-3'

利用引物 U815-F 和 U815-R 对野生黑麦、栽培黑麦、普通小麦-非洲黑麦双二倍体、中国春、中间偃麦草、拟鹅观草等材料进行扩增。结果表明, 所有含黑麦染色质的材料均扩出分子量为 530 bp 的 DNA 带(图 4), 而不含黑麦染色质的材料均未扩出, 这说明该片段为黑麦所特有。进而利用引物 U815-F 和 U815-R 对一套中国春-Imperial 黑麦附加系 CSDA1R-CSDA7R 及硬粒小麦-非洲黑麦双二倍体后代材料进行扩增, 发现均能扩增出目标片段(图 5)。中国春-Imperial 黑麦附加系均能扩出目标片段, 说明该标记分布在黑麦整套染色体 1R-7R 上, 其后代材料能扩出目标片段进一步说明可以利用 pSaUBC815₅₆₁ 来鉴定双二倍体后代材料中的黑麦染色质。

3 讨论

非洲黑麦(*S. africanum*)是黑麦属的一个重要多年生物种, 主要分布于南非, 但由于其它小麦和牧草的侵入下, 非洲黑麦已经成为濒临灭绝的物种。非洲黑麦表现矮秆和对多种病害具有优异的抗性, 因而开展对这一珍贵资源的优异基因的研究与开发工作十分必要。国外对非洲黑麦的研究主要局限在其与黑麦属物种的遗传关系上, Bennett 等^[14]利用染色体 C 带分析发现非洲黑麦与森林黑麦一样是众多黑麦属物种中异染色质含量最低的物种。最近 Ma 等^[15]和 Shang 等^[16]利用分子标记对黑麦属物种的聚

引物 M04 可以在所有黑麦中扩出一条长 1 143 bp 的特异片段, 利用该片段序列设计特异引物验证该片段是黑麦 6R 染色体所特有。上述研究都是建立的单染色体片段分子标记, 这类分子标记可以用于远缘杂交过程中较高世代材料的鉴定。第二类是染色体组的特异性分子标记, 它们分布在多条黑麦染色体上。如 Ko 等^[23]利用 RAPD 方法获得了黑麦基因组的 2 个高拷贝重复序列, 建立了黑麦基因组分子标记, 并通过原位杂交定位了这两个 DNA 片段。Katto 等^[24]根据已经报道的黑麦属重复序列设计特异引物, 对不同来源的黑麦和小麦进行扩增, 获得了一个可以作为检测黑麦染色质的长为 1.4 kb 的特异 DNA 片段; 周建平等^[25]利用 RAPD 引物对小麦、黑麦、小麦-黑麦易位系和附加系进行扩增, 获得了一个特异的能够鉴定黑麦染色质的重复序列 PSC20H.1。这类基于黑麦重复序列的分子标记是鉴定小麦背景中黑麦染色体或染色体片段的理想工具, 特别适合于进行杂交的低世代标记辅助选择, 但相关标记很少被用在野生黑麦的检测中。最近刘成等^[26]通过 RAPD 方法建立的非洲黑麦染色体分子标记, 可以用于黑麦属物种的鉴定。但由于黑麦属物种分布的广泛性和复杂的遗传多样性给小麦育种工作中外源染色质的检测带来不便, 因此, 在实际辅助育种工作中, 仍需发掘多种类型的分子标记, 来提高分子标记育种的效率^[20, 24]。

本研究采用 ISSR 分子标记方法, 直接筛选到非洲黑麦特异性 DNA 片段(pSaUBC815₅₆₁), 将该片段转换为特异性 PCR 标记后不仅可以用于小麦-非洲黑麦渐渗系的检测, 还可以用来检测小麦背景中的栽培黑麦染色质。通过染色体定位发现序列 pSaUBC815₅₆₁ 分布在黑麦的全部染色体上, 比对分析认为该序列可能是一个新型的重复序列, 说明黑麦属物种中重复序列仍然存在很多未知的新型的序列, 这些未知序列为建立新的特异性分子标记奠定了基础。

参考文献(References):

- [1] DONG Yu-Chen. Genepools of common wheat. *J Triticeae Crops*, 2000, 20(3): 78–81.
董玉琛. 小麦的基因源. 麦类作物学报, 2000, 20(3): 78–81.
- [2] Khush GS. Cytogenetic and evolutionary studies in *Secale* III. cytogenetics of weedy ryes and origin of cultivated rye. *Econ Bot*, 1962, 17: 60–71.
- [3] SHU Huan-Lin, YANG Zu-Jun, LI Guang-Rong. Genetic analysis of wheat lines with rye chromatin. *Journal of Sichuan Agricultural University*, 2000, 18(3): 223–227.
舒焕麟, 杨足君, 李光蓉. 几个具黑麦遗传物质的小麦材料的遗传分析. 四川农业大学学报, 2000, 18(3): 223–227.
- [4] JIANG Hua-Ren, DAI Da-Qing, SUN Dong-Fa. Creation of special germplasm resources in *Triticum*. *Journal of Sichuan Agricultural University*, 1992, 10(2): 255–259.
蒋华仁, 戴大庆, 孙东发. 小麦特异种质资源的创新研究. 四川农业大学学报, 1992, 10(2): 255–259.
- [5] Yang ZJ, Li GR, Ren ZL. Identification of a *Triticum durum-Secale africanum* amphiploid and its crossability with common wheat. *J Genet Breed*, 2001, 55: 45–50.
- [6] WAN Xue-Qiu, YANG Zu-Jun, FENG Juan, LIU Yue, REN Zheng-Long. Establishment of a specific PCR marker of genome of rye. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2005, 18(Suppl.): 50–53.
万雪秋, 杨足君, 冯娟, 刘悦, 任正隆. 黑麦染色体组特异 PCR 标记的建立. 西南农业学报, 2005, 18(增): 50–53.
- [7] WAN Xue-Qiu. Establishment of a specific PCR marker of genome of rye and acquisition of a new wheat-*S. africanum* 1RS/1BL transposition lines[Dissertation]. University of Electronic Science and Technology of China, 2006.
万雪秋. 黑麦染色体组特异 PCR 标记的建立及其小麦-非洲黑麦 1RS/1BL 染色体新易位系的获得[学位论文]. 电子科技大学硕士学位论文, 2006.
- [8] Zietkiewicz E, RafalSkj A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 1994, 20(2): 176–183. [\[DOI\]](#)
- [9] ZHANG Xian-Zhi, ZENG Ji-Fang. Study on the effects of He-Ne laser irradiation on the wheat distant hybridization. *Acta Laser Biol Sin*, 1999, 8(2): 134–139.
张显志, 曾级芳. He-Ne 激光对小麦属间杂交影响的研究. 激光生物学报, 1999, 8(2): 134–139.
- [10] YANG Zu-Jun, LI Guang-Rong, JIANG Hua-Ren, REN Zheng-Long. Intergenomic interaction of nucleolus, gliadin and disease resistance in a *Triticum aestivum-Secale africanum* amphiploid. *Journal of Sichuan Agricultural University*, 2001, 19(4): 340–343.
杨足君, 李光蓉, 蒋华仁, 任正隆. 普通小麦与非洲黑麦双二倍体中随体、醇溶蛋白和抗病性表达的染色体组相互作用研究. 四川农业大学学报, 2001, 19(4): 340–343.
- [11] Yang ZJ, Li GR, Feng J, Jiang HR, Ren ZL. Molecular cytogenetic characterization and disease resistance obser-

- vation of wheat-*Dasypyrum breviaristatum* partial anphiploid and its derivatives. *Hereditas*, 2005, 142: 80–85. [\[DOI\]](#)
- [12] REN Zheng-Long, ZHANG Huai-Qiong. An improved C-band technique for plant chromosomes. *Journal of Sichuan Agricultural University*, 1995, 13(1): 1–5.
任正隆, 张怀琼. 一个改良的染色体 C 带技术. 四川农业大学学报, 1995, 13(1): 1–5.
- [13] TANG Zong-Xiang, REN Zheng-Long, FU Shu-Lan, YANG Zu-Jun, ZHANG Huai-Qiong. Variation of rye-specific repetitive DNA pSc119.1 among sister T1RS·1BL translocations. *Hereditas(Beijing)*, 2007, 29(2): 235–242.
唐宗祥, 任正隆, 符书兰, 杨足君, 张怀琼. 黑麦特异重复序列 pSc119.1 在姊妹 T1RS·1BL 易位系中的变异. 遗传, 2007, 29(2): 235–242.
- [14] Bennett MD, Gustafson JP, Smith JB. Variation in nuclear DNA in the genus *secale*. *Chromosoma*, 1977, 61(2): 149–176. [\[DOI\]](#)
- [15] Ma R, Yli-Mattila T, Pulli S. Phylogenetic relationships among genotypes of worldwide collection of spring and winter ryes (*Secale cereale* L.) determined by RAPD-PCR markers. *Hereditas*, 2004, 140(3): 210–221. [\[DOI\]](#)
- [16] Shang HY, Wei YM, Wang XR, Zheng YL. Genetic diversity and phylogenetic relationships in the rye genus *Secale* L. (rye) based on *Secale cereale* microsatellite markers. *Genet Mol Biol*, 2006, 29, volume(4): 685–691. [\[DOI\]](#)
- [17] Lukaszewski AJ, Gustafson JP. Cytogenetics of triticales. *Plant Breed Rev*, 1987, (5): 41–93.
- [18] JIANG Hua-Ren, DAI Da-Qing, XIAO Shi-He. The crossabilities of common wheat with some weedy and wide ryes. *Journal of Sichuan Agricultural University*, 1986, (10): 195–202.
蒋华仁, 戴大庆, 肖世和. 普通小麦与某些杂草黑麦和野生黑麦的可杂交性研究. 四川农业大学学报, 1986, (10): 195–202.
- [19] Yang ZJ, Li GR, Ren ZL. Identification of amphiploid between *Triticum durum* cv. Ailanmai native to Sichuan, China and *Secale africanum*. *Wheat Inf Serv*, 2000, 91: 20–24.
- [20] Nagy ED, Lelley T. Genetic and physical mapping of sequence-specific amplified polymorphic (SSAP) markers on the 1RS chromosome arm of rye in a wheat background. *Theor Appl Genet*, 2003, 107(7): 1271–1277. [\[DOI\]](#)
- [21] Lee JH, Graybosch RA, Lee DJ. Detection of rye chromosome 2R using the polymerase chain reaction and sequence-specific DNA primers. *Genome*, 1994, 37(1): 19–22. [\[DOI\]](#)
- [22] LIU Cheng, YANG Zu-Jun, FENG Juan, ZHOU Jian-Ping, REN Zheng-Long. Establishment of a specific PCR marker of 6R chromosome of rye. *J Triticeae Crops*, 2007, 27(1): 36–40.
刘成, 杨足君, 冯娟, 周建平, 任正隆. 黑麦 6R 染色体特异性 PCR 标记的建立. 麦类作物学报, 2007, 27(1): 36–40.
- [23] Ko JM, Do GS, Suh DY, Seo BB, Shin DC, Moon HP. Identification and chromosomal organization of tow rye genome-specific RAPD products useful as introgression marks in wheat. *Genome*, 2002, 45(1): 157–164. [\[DOI\]](#)
- [24] Katto MC, Endo TR, Nasuda S. A PCR-based marker for targeting small rye segments in wheat background. *Genes Genet Syst*, 2004, 79(4): 245–250. [\[DOI\]](#)
- [25] ZHOU Jian-Ping, YANG Zu-Jun, FENG Juan, TANG Zong-Xiang, REN Zheng-Long. Isolation and identification of rye special DNA sequences. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2005, 18(5): 598–602.
周建平, 杨足君, 冯娟, 唐宗祥, 任正隆. 黑麦特异 DNA 重复序列的分离与鉴定. 西南农业学报, 2005, 18(5): 598–602.
- [26] Liu C, Yang ZJ, Li GR, Zeng ZX, Zhang Y, Zhou JP, Liu ZH, Ren ZL. Isolation of a new repetitive DNA sequence from *Secale africanum* enables targeting of *Secale* chromatin in wheat background. *Euphytica*, 2008, 159(1): 249–258. [\[DOI\]](#)