

一粒系小麦的微卫星分析

白建荣^{1,2}, 宋彦霞¹, 朱银峰², 刘坤凡², 贾旭²

(1. 山西省农业科学院作物遗传研究所, 山西 太原 030031; 2. 中国科学院遗传与发育生物学研究所, 北京 100101)

摘要: 利用普通小麦 A 基因组含有微卫星位点的引物对在 3 种一粒系小麦的部分同源微卫星位点进行了检测。结果发现, 59% 的小麦 A 基因组微卫星位点的引物对可在 3 种一粒系小麦的多个种质中检测到部分同源微卫星位点, 表明 A 基因组含有的微卫星位点在普通小麦和一粒系小麦间并不完全保守。一粒系小麦的微卫星位点之间在扩增条带数目以及扩增条带长度上均存在广泛差异, 同一微卫星位点在不同一粒系小麦种质中的扩增条带数目以及扩增条带长度上也表现明显差异。

关键词: 一粒系小麦; 微卫星

中图分类号: S512.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2005)04-0012-05

SSR Analysis of Einkorn Wheats

BAI Jian-rong^{1,2}, SONG Yan-xia¹, ZHU Yin-feng², LIU Kun-fan², JIA Xu²

(1. Crop Genetics Institute, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Taiyuan 030031, China;

2. Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract: The presence in einkorn wheats of microsatellite loci homoeologous to those in the A genome of hexaploid wheat were studied. Up to 59% of the PCR primer sets for the microsatellite loci of the A genome of hexaploid wheat detected homoeologous loci in multiple accessions of *T. urartu*, *T. monococcum* and *T. boeoticum*, indicating that A genome encoded microsatellite loci are highly, but not completely, conserved between hexaploid wheat and einkorn wheats. Microsatellite loci in einkorn wheats differed from each other in both allele number and the length of individual alleles. For a given locus, its allele number and allele length could also vary among different accessions of *T. urartu*, *T. monococcum* or *T. boeoticum*.

Key words: Einkorn wheats; Microsatellite

品种间的多态性是基因标签和分子标记辅助育种的前提。虽然分子标记技术的不断进步促进了这项工作的发展, 但普通小麦基因组的高倍性、大量重复序列的存在和品种间有限的多态性使得高密度的分子图谱构建缓慢。所以近几年来人们开始研究普通小麦的二倍体供体种, 例如 D 染色体组的供体——粗山羊草 (*Ae. tauschii*), 结果得到的遗传连锁图比相应的普通小麦 D 染色体组的长^[1]。A 染色体组是小麦属的基本染色体组之一。在具有 A 染色体组的一粒系小麦(二倍体小麦)中, 有 3 个种: 乌拉尔图小麦 (*T. urartu*)、野生一粒小麦 (*T. boeoticum*) 和

栽培一粒小麦 (*T. monococcum*)。许多研究表明, *T. boeoticum* 是 *T. monococcum* 的祖先, 染色体组成为 A^m, 乌拉尔图小麦是普通小麦 A 染色体组的供体, 染色体组成为 A^{u2}。构建具有 A 染色体组的一粒系小麦遗传图谱对普通小麦的遗传和育种研究有着重要意义。

评价一粒系小麦遗传多样性是遗传作图的必要准备。近十几年来, 已有多种方法用于该项研究, 如种子储藏蛋白、同工酶、RFLP 和 RAPD 等技术^[3,4]。尽管 RFLP 有许多优点, 但需大量的 DNA 和时间, 并且需要复杂的操作; RAPD 标记虽然可在重复区

收稿日期: 2004-12-19

基金项目: 国家重点基础研究发展规划项目(G19990116-02)

作者简介: 白建荣(1961-), 女, 山西太原人, 研究员, 博士, 主要从事植物分子生物学研究工作。

作图,但它们的多态性低而且在小麦中不稳定。微卫星 DNA,又叫简单序列重复 (simple sequence repeats, SSRs),是一些长度小于 5 bp 的串联单位,广泛分布在基因组中。微卫星 DNA 在同源位点具有高度变异,因而可以作为一种分子标记。微卫星作为遗传标记已在小麦遗传作图和遗传多样性的研究中显示出它的优点,如多态性高、共显性、易操作等^[5,6]。但需要大量的时间和经费去鉴定含有微卫星 DNA 的克隆和设计微卫星 DNA 引物。

尽管由于进化和选择的作用有一些变异,但普通小麦的 A 染色体组和一粒系小麦的基因组有很大的同源性。如果在二倍体小麦的研究中能利用普通小麦 A 染色体组微卫星 DNA 引物,无疑对成本和

时间的节约以及比较遗传作图是有利的。虽然有人已在了解普通小麦微卫星 DNA 引物在小麦族二倍体种中的扩增情况有所尝试,但已有的结果还不完善^[7]。本研究的目的是要了解普通小麦 A 染色体组微卫星 DNA 引物在二倍体小麦中的扩增情况,为以后用微卫星标记构建具有 A 染色体组的一粒系小麦的遗传图谱和基因定位奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

本实验选用 7 份乌拉尔图小麦、两份野生一粒小麦和两份栽培一粒小麦,以普通小麦中国春 (CS) 作为对照 (表 1)。

表 1 研究所用的一粒系小麦和普通小麦材料

Tab. 1 Accessions of diploid wheats and common wheat used in this study

序号	基因组	种	材料编号	起源	来源
No.	Genome	Species	Accession	Origins	sources
1	A ^u	<i>T. urartu</i> Tum	IZ29-1	叙利亚 Syria	美国 America
2	A ^u	<i>T. urartu</i> Tum	DV868	亚美尼亚 Armenia	美国 America
3	A ^u	<i>T. urartu</i> Tum	DV867	亚美尼亚 Armenia	美国 America
4	A ^u	<i>T. urartu</i> Tum	DV877	亚美尼亚 Armenia	美国 America
5	A ^u	<i>T. urartu</i> Tum	DV865	伊朗 Iran	美国 America
6	A ^u	<i>T. urartu</i> Tum	G1958	土耳其 Turkey	美国 America
7	A ^u	<i>T. urartu</i> Tum	G3159	黎巴嫩 Lebanon	美国 America
8	A ^m	<i>T. boeoticum</i> Bosis	As261		中国 四川 Sichuan China
9	A ^m	<i>T. boeoticum</i> Bosis	As262		中国 四川 Sichuan China
10	A ^m	<i>T. monococcum</i> L	As264		中国 四川 Sichuan China
11	A ^m	<i>T. monococcum</i> L	As265		中国 四川 Sichuan China
12	ABD	<i>T. aestivum</i>	Chinese Spring	中国 China	北京 Beijing

1.2 DNA 的提取

参照 Guide^[8] 等方法并略有修改。取 1~2 片幼嫩叶片用研钵在液氮中磨碎,转入预冷的 ependorf 管中,加入约 600 μ L 的提取缓冲液 (4% Sarkosyl, 100 mmol/L Tris-HCl, 10 mmol/L EDTA, pH 8.5),颠倒混匀后加入等体积酚/氯仿/异戊醇 (25:24:1) 混匀后离心 (12 000 r/min, 10 min); 吸出上清转入另一管,加等体积酚/氯仿/异戊醇 (25:24:1) 再纯化一次;吸出上清转入另一管,然后加入 60 μ L 3 mol/L 醋酸纳 (pH 5.2) 和 600 μ L 异丙醇,轻轻颠倒数次后离心 (12 000 r/min, 10 min); 倒掉上清液,将 DNA 沉淀用 1 mL 70% 酒精漂洗 2 次后离心 (12 000 r/min, 2 min); 室温干燥后加入 30~50 μ L 含有 40 μ g/mL RNase 的 TE 溶液中,4 $^{\circ}$ C 放置过夜使其完全溶解。

1.3 SSR 的扩增

按照 Röder^[9] 等发表的微卫星引物序列由上海

生工合成引物。扩增体系为 25 μ L,其中模板 80~100 ng, dNTP 0.2 mmol/L,引物 P1/P2 各 1 μ mol/L, 1 \times Taq DNA 聚合酶 buffer, Taq DNA 聚合酶 0.2 U。PCR 扩增在 Perkin Elmer 9600 PCR 仪上进行。反应程序为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 1 个循环; 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 复性 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1.5 min, 共 35 个循环; 最后在 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

1.4 扩增产物的胶凝胶电泳

扩增产物变性后在 6% 的测序胶上分离。在恒定功率 40 W 条件下预电泳约 30 min 后加扩增样品 DNA 4~6 μ L, 电泳约 2 h。

1.5 银染

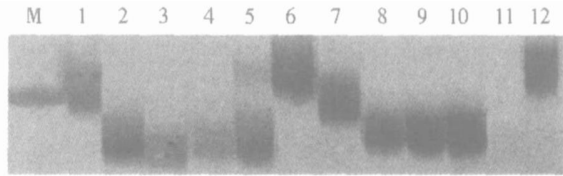
电泳结束后,将凝胶放入 10% 冰乙酸中轻摇 30 min 至指示剂无色;用重蒸水漂洗 3 次,每次 5 min。放入染色液 (0.2% AgNO₃, 0.5% 甲醛) 中,轻摇 30 min;用重蒸水洗约 5 s 后放入显影液 (3% Na₂CO₃, 0.5% 甲醛, 0.02% Na₂S₂O₃) 至 DNA 条带显出;用

10%冰乙酸终止反应,约 5 min 后,用重蒸水洗。室温干燥后统计带型或照相。

1.6 数据统计和分析方法

有带出现赋值为 1, 没带出现的赋值为 0。供试

材料间的 Nei 氏遗传距离按照下列公式计算: $D = 1 - 2N_{xy} / (N_x + N_y)$, 其中 N_x 为样品 x 的条带数, N_y 为样品 y 的条带数, N_{xy} 为两样品共有的条带数。利用 STATIC CLUSTER 软件进行聚类分析。



M: Marker; 1~12 依次是 IZ29-1, DV868, DV867, DV877, DV865, G1958, G3159, AS261, AS262, AS264, AS265, CS

M, DNA markers; Lanes 1~12, products amplified from IZ29-1, DV868, DV867, DV877, DV865, G1958, G3159, AS261, AS262, AS264, AS265, CS

图 1 Xgwm471 位点在二倍体小麦的扩增

Fig 1 Amplification of homoedogous microsatellite locus in three diploid wheats using the primer set for Xgwm471

表 2 32 套普通小麦 A 染色体组的引物在二倍体小麦材料中的扩增情况

Tab 2 The alleles amplified from three diploid wheats with 32 primer sets

Locus (Xgwm)	AT (°C)	Allele								
		0 ^a	1 ^b	2	3	4	5	6	7	8
164- 1AL	56		1 ^c	1	3	3	3			
135- 1AL	62		1	3	3	4				
99- 1AL	62		1	4	2	4				
359- 2AS	56	4	1	2	1	3				
372- 2AS	62		1	1	4	1	4			
356- 2AL	56		2	1	1	1	3	3		
265- 2AL	56		7	4						
95- 2AL	56	1	3	2	5					
339- 2AL	51		1	2	3	5				
294- 2Al	56	4	3	1	1	2				
369- 3AS	62		1	1	2	1	4	2		
5- 3AS	51		1	1	1	1	1	3	2	1
480- 3AL	62		4	5	2					
391- 3AL	56		1	1	2	4	1	2		
4- 4AL	56		10	1						
397- 4Al	56		4	1	3	2	1			
415- 5AS	56		1	2	1	1	3	2	1	
293- 5AS	56		3	4	4					
156- 5AL	56	4	1	1	1	4				
186- 5AL	56		1	1	1	3	1	1	1	2
126- 5Al	56	2	7	2						
179- 5Al	56		8	2	1					
334- 6AS	51	2	2	1	6					
570- 6AL	62		6	1	4					
169- 6AL	62	4	7							
471- 7AS	62	1	1	1	1	3	2	2		
130- 7AS	62	1	1	2	1	1	2	3		
60- 1- 7AS ^d	62	4	4	2	1					
60- 2- 7AS ^d	62		7	4						
332- 7AL	62		6	1	4					
32- 3A	55		11							
601- 4A	60		11							
494- 6A (cent)	60		11							

注:“a”代表在 4 个 *T. monococcum* 和 *T. boeoticum* 种质系中产生缺等位基因;“b”代表从不同的二倍体小麦中扩增出的等位变异数(1~8);“c”代表二倍体小麦在每一个位点的种质数;“d”代表用引物 Xgwm60 在二倍体小麦中检测出两个位点

Note: “a” indicating denotes primer sets for these loci produced null alleles in one, two or all of the four accessions of *T. monococcum* and *T. boeoticum*; “b” indicating the numbers (1 to 8) represent different alleles amplified from three diploid wheats; “c” indicating the number of einkorn wheat accessions possessing particular alleles; “d” indicating the primer set for Xgwm60 detected two loci in einkorn wheats

2 结果与分析

2.1 微卫星位点在 3 个二倍体小麦种的扩增

我们利用普通小麦中 A 基因组含有微卫星位点的 54 对引物对 3 个二倍体小麦中的同源微卫星位点进行了检测。图 1 显示了 *Xgwm471* 的扩增情况。表 2 总结了 54 对引物在 3 个二倍体小麦种的扩增。结果发现,分布在普通小麦 A 基因组 7 条染色体的 32 对(59%)引物可在 3 个二倍体小麦种得到清晰的、可读的、在乌拉尔图小麦中没有缺等位变异的条带。*Xgwm32*, *Xgwm601* 和 *Xgwm494* 三对引物的扩增为单态。位于第 7 染色体的 *Xgwm60* 扩增出 2 个位点,其余的 28 对引物的扩增是单位点。共得到 125 个等位变异,位点的变异从 1(*Xgwm169*)到 8(*Xgwm186*),平均每个位点的等位变异是 4.17。在部分 *T. monococcum* 和 *T. boeoticum* 材料中,用 *Xgwm60*, *Xgwm156*, *Xgwm169*, *Xgwm294* 和 *Xgwm359* 引物扩增时发现是缺等位变异,还有 5 对引物(*Xgwm95*, *Xgwm126*, *Xgwm334*, *Xgwm471* 和 *Xgwm130*)或在 *T. monococcum* 或在 *T. boeoticum* 材料中不扩

增。这些结果表明, A 基因组含有的微卫星位点在普通小麦和一粒系小麦间并不完全保守。一粒系小麦的微卫星位点之间在扩增条带数目以及扩增条带长度上均存在广泛差异,同一微卫星位点在不同一粒系小麦种质间的扩增条带数目以及扩增条带长度上也表现明显差异。

2.2 遗传距离及聚类分析

根据扩增的情况,我们利用 Jaccard 相似系数得出了试验材料的遗传距离(表 3)。从表中我们可以看到,乌拉尔图小麦种质间的 GD 值不超过 0.32,而乌拉尔图小麦与 *T. monococcum* 和 *T. boeoticum* 的 GD 值都超过 0.32。基于 GD 值,我们进行了聚类分析(图 2)。聚类结果明显表明,乌拉尔图小麦与中国春聚为一大类,乌拉尔图小麦本身则聚为 3 小亚类,第 1 亚类是 IZ29-1(来源于叙利亚)和 G1958(来源于土尔其),第 2 亚类包括 DV865(来源于伊朗)、DV867(来源于亚美尼亚)和 DV868(来源于亚美尼亚),第 3 亚类由 DV877(来源于亚美尼亚)和 G3159(来源于黎巴嫩)组成。*T. monococcum* 和 *T. boeoticum* 另外聚成一大类。

表 3 12 份材料之间的遗传距离

Tab. 3 Genetic distances (GDs) among the 12 accessions

	IZ29-1	DV868	DV867	DV877	DV865	G1958	G3159	As261	As262	As264	As265	CS
IZ29-1	0.00											
DV868	0.25	0.00										
DV857	0.24	0.15	0.00									
DV877	0.26	0.29	0.21	0.00								
DV865	0.23	0.10	0.14	0.29	0.00							
G1958	0.23	0.29	0.23	0.23	0.29	0.00						
G3159	0.26	0.32	0.26	0.24	0.26	0.29	0.00					
As261	0.34	0.35	0.37	0.37	0.36	0.38	0.38	0.00				
As262	0.32	0.34	0.32	0.32	0.35	0.36	0.35	0.07	0.00			
As264	0.34	0.38	0.37	0.38	0.38	0.38	0.36	0.16	0.18	0.00		
As265	0.32	0.35	0.34	0.35	0.35	0.35	0.35	0.15	0.18	0.16	0.00	
CS	0.29	0.37	0.33	0.32	0.35	0.34	0.29	0.35	0.32	0.33	0.32	0.00

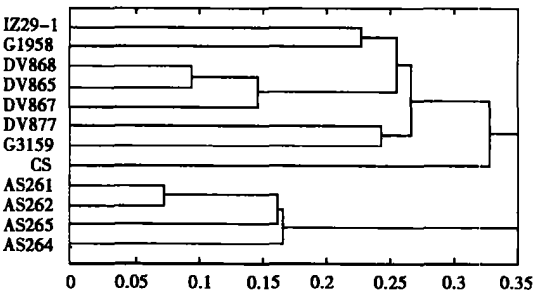


图 2 应用 Statistics Cluster 软件构建的聚类图
Fig 2 A tree diagram of the clustering of 12 accessions using Statistics Cluster software

3 讨 论

微卫星是真核生物的重要组成。根据它们在不同种内和种间的分布,我们知道它们是非常活跃的,因而种内和种间的微卫星位点在许多方面是不同的。例如,水稻微卫星 *OS1E6* 位点,当在不同的品种和野生稻中扩增时,不但重复单位而且侧翼序列都有区别^[10]。在我们的研究中,普通小麦 A 染色体组上的 54 对引物只有 32 对能扩增出清晰、可读的条带,其中 29 对具有多态性。在这些位点中,有 5 对(*Xgwm60*,

Xgwm156, *Xgwm169*, *Xgwm294* 和 *Xgwm359*) 在 *T. monococcum* 和 *T. boeoticum* 中均不扩增。还有一些 (*Xgwm95*, *Xgwm126*, *Xgwm334*, *Xgwm471* 和 *Xgwm130*)或在 *T. monococcum* 或在 *T. boeoticum* 中不扩增。这些缺等位基因的出现,说明引物结合位点的序列发生了突变。而缺等位基因出现的频率可以反映进化关系的远近。很清楚,PCR 标记比杂交技术获得的标记更具有特异性,因为与引物结合的模板序列的点突变能够阻止扩增。而探针与模板即使有部分同源杂交仍然可以进行。在本研究中,基于 29 个微卫星引物产生的多态性,我们进行了聚类分析。聚类结果与目前普遍接受的观点一致,即乌拉尔图小麦与普通小麦聚为一类, *T. monococcum* 和 *T. boeoticum* 聚为一类^[1]。

参考文献:

[1] 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

[2] Dvorak J, Di Terlizzi P, Zhang H B, *et al.* The evolution of polyploid wheat: identification of the A genome donor species [J] . *Genome*, 1993, 36: 21—31.

[3] Waines J G, Paynes P I. Electrophoretic analysis of the high-molecular-weight subunits of *Triticum monococcum*, *T. urartu*,

and the A genome of bread wheat[J] . *Theor Appl Genet*, 1987, 74: 71—76

[4] Castagna R, Gnocchi S, Perenzin M, *et al.* Genetic variability of the wild diploid wheat *Triticum urartu* revealed by RFLP and RAPD markers[J] . *Theor Appl Genet*, 1997, 94: 424—430

[5] Gupta P K, Varshney R K. Molecular markers and their application in wheat breeding[J] . *Plant Breeding*, 1999, 110: 369—390

[6] Plaschke M W, Röder M S. Detection of genetic diversity in closely related bread wheat using microsatellite markers [J] . *Theor Appl Genet*, 1995, 91: 1001—1007.

[7] Sourdille P, Tavaud M, Chamet G, *et al.* Transferability of wheat microsatellites to diploid *Triticeae* species carrying the A, B and D genomes[J] . *Theor Appl Genet*, 2001, 103: 346—352

[8] Guidet F J, Rogowsky P, Taylor C, *et al.* Cloning and characterization of a new rye-specific repeated sequence[J] . *Genome*, 1991, 34: 81—87.

[9] Röder M S, Korzun V, Wendehake K, *et al.* A microsatellite map of wheat[J] . *Genetics*, 1998, 149: 2007—2023.

[10] Davierwala A P, Ramakrishna W, Ranjekar P K, *et al.* Sequence variations at a complex microsatellite locus in rice and its conservation in cereals[J] . *Theor Appl Genet*, 2000, 101: 1291—1298.

[11] Takumi S, Nasuda S, Liu Y G, *et al.* Wheat phylogeny determined by RFLP analysis of nuclear DNA. I. Einkorn wheat[J] . *Japanese Journal of Genetics*, 1993, 68: 73—79.