

普通小麦 Genomic-SSR 和 EST-SSR 分子标记遗传差异

李建明^{1,2}, 李洪杰², 柴守诚¹, 李秀全², 李立会² (1.西北农林科技大学农学院, 陕西杨凌 712100; 2.中国农业科学院作物科学研究所国家农作物基因资源与基因改良重大科学工程, 北京 100081)

摘要 [目的] 探讨国内外的 24 份普通小麦品种间的遗传差异。[方法] 以改进的酚-氯仿法提取国内外 24 份普通小麦品种基因组 DNA, 采用 Genomic-SSR 和 EST-SSR 标记技术分析 24 份小麦品种的遗传多样性, 并对 2 种评价方法进行分析比较。[结果] 采用 37 对 Genomic-SSR 引物对 24 份小麦基因型的 38 个位点进行扩增, 24 个位点共扩增出 152 个多态性片段, 每个位点上平均片段数为 5.85。采用 67 对 EST-SSR 引物对 24 个小麦基因型的 78 个位点进行扩增, 37 个位点共扩增出 120 个多态性片段, 每个位点平均片段数为 3.24。24 份小麦品种的综合遗传距离为 0.1541~0.7820, 平均为 0.4231。[结论] EST-SSR 标记能更准确地反映出不同小麦基因型之间遗传差异和亲缘关系。

关键词 普通小麦; 遗传差异; Genomic-SSR; EST-SSR

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)26-08173-03

Studies on Genetic Diversity of Genomic-SSR and EST-SSR Molecular Marker in Common Wheat

LI Jian-min g et al (College of Agronomy, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100)

Abstract [Objective] The research aimed to discuss the genetic diversity among 24 common wheat varieties at home and abroad. [Method] Improved phenol-chloroform method was used to extract genomic DNA from 24 common wheat varieties at home and abroad. Genomic-SSR and EST-SSR marker technologies were adopted to analyze the genetic diversity of 24 wheat varieties and two evaluation methods were analyzed and compared. [Result] When 37 pairs of Genomic-SSR primers were used to amplify 38 sites in 24 wheat genotypes, 152 polymorphic segments were obtained from 24 sites, with average segments number per site of 5.85. When 67 pairs of EST-SSR primers were used to amplify 78 sites in 24 wheat genotypes, 120 polymorphic segments were obtained from 37 sites, with average segments number per site of 3.24. Comprehensive genetic distance was 0.1541~0.7820, being 0.423 1 on average. [Conclusion] EST-SSR marker could reflect the genetic difference and relationships among different wheat genotypes exactly.

Key words Common wheat; Genetic diversity; Genomic-SSR; EST-SSR

遗传多样性是进行小麦遗传改良的基础。前人已利用形态学性状^[1-2]、蛋白质电泳(包括同工酶和储藏蛋白)^[3]、RFLP、RAPD^[4]等对普通小麦的遗传多样性进行评价分析^[4-7], 其中分析标记由于不受环境条件的影响并遍布整个基因组, 被普遍认为是研究遗传差异的最理想标记^[5-6]。

目前, 已采用不同的分子标记类型研究普通小麦遗传差异, 但大多数分子标记揭示的多态性都比较低, 供试材料亲缘关系较近尤为突出^[7-9]。与最新发展起来的微卫星(SSR)分子标记比较, SSR 标记技术具有染色体组特异性, 且多态性高的优点, 现已成功应用于小麦的遗传差异和遗传演化研究等方面^[10]。

简单重复序列(simple sequence repeats, SSR), 也叫微卫星, 广泛分布于真核生物基因组的编码区和非编码区^[11-12], 由于该类 SSR 标记是基于基因组序列开发的, 称为 Genomic-SSR。其主要缺点是开发成本高、周期长^[13]。随着功能基因组的发展, EST(Expressed Sequence Tagged)发展迅速, 并可在 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> 网站上免费获得。研究发现, 3.2% 的小麦 EST 中也存在 SSR 结构, 这些 EST 是小麦 SSR 标记的一个重要来源^[14]。目前, 许多作物, 如小麦^[15]、甘蔗^[16]、玉米^[17]、大麦^[14]、葡萄^[18]等的 EST-SSR 标记已被用于遗传作图^[14]、遗传多样性、基因发掘^[19-20]等研究。Eujayl 等采用 Genomic-SSR 和 EST-SSR 分子标记对 64 份硬粒小麦的基因型进行了研究, 结果表明 EST-SSR 标记的多态性低于 Genomic-SSR, 采用 10 个引物就能将所有供试材料区分开来, EST-SSR 标记鉴别基因型的水平很高^[15]。杨新泉等采用上述同样方法对

我国北方冬麦区的 18 份普通小麦品种(系)的遗传多样性进行研究也验证了这一点^[21]。为此, 笔者采用 Genomic-SSR 和 EST-SSR 标记探讨了 24 份来自国内外的普通小麦品种间的遗传差异, 在此基础上对 2 种不同评价方法进行系统分析和比较, 以期小麦遗传多样性和亲缘关系评价方法研究提供理论依据。

1 材料与与方法

1.1 材料 我国及国外引进的 24 份普通小麦品种见表 1。其中, 南大 2419、阿勃、早洋麦和西农 6028 为骨干亲本; 繁

表 1 24 份普通小麦基因型的编号、名称、系谱、来源

编号	统一编号	名称	系谱	材料来源
1	ZM9600	丰产 3 号	丹麦 1 号/西农 6028	陕西
2	MY802	丹麦 1 号	-	丹麦
3	ZM9597	西农 6028	西农 60/中农 28	陕西
4	ZM9591	碧蚂 1 号	蚂蚱麦/碧玉麦	陕西
5	ZM17203	陕农 1 号	碧蚂 1 号/西农 6028	陕西
6	ZM2675	辉县红	地方品种	河南
7	ZM17458	阿勃	Autonomia/Fontarionco	意大利
8	ZM9407	泰山 4 号	辉县红/阿勃	山东
9	ZM13340	欧柔白	由欧柔系选	智利
10	ZM15682	济南 13	欧柔白//辉县红/阿勃	山东
11	ZM16624	70-5858	矮绒穗/雅安早	四川
12	ZM10450	繁 6	多个多花多实的亲本聚敛杂交育成	四川
13	ZM16788	绵阳 11	70-5858/繁 6	四川
14	ZM16790	绵阳 15	绵阳 11 系选	四川
15	ZM10701	碧玉麦	White Naples//Fife/ White Naples/Fife/Eden	美国
16	ZM3026	白芒麦	地方品种	河南
17	ZM20640	白火麦	地方品种	河南
18	ZM9523	内乡 5 号	南大 2419(碧玉麦+白芒麦+白火麦)	河南
19	ZM10176	南大 2419	Mentana 系选	意大利
20	ZM10216	徐州 14	早洋麦/南大 2419	江苏
21	MY898	早洋麦	-	美国
22	ZM9594	碧蚂 4 号	蚂蚱麦/碧玉麦	陕西
23	ZM8963	北京 8 号	碧蚂 4 号/早洋麦	北京
24	ZM9391	济南 2 号	碧蚂 4 号/早洋麦	山东

基金项目 国家科技攻关项目(2004BA505B03)。

作者简介 李建明(1981-), 男, 内蒙古五原人, 硕士研究生, 研究方向: 小麦遗传育种。

收稿日期 2007-05-10

6 不仅是生产上的良种,也是后期优良亲本;丹麦 1 号、碧玉麦、欧柔白为国外引进;辉县红、白芒麦和白火麦为我国小麦地方品种;丰产 3 号、绵阳 11,北京 8 号等为通过国家审定的常规品种,且北京 8 号和济南 2 号为姊妹系。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 提取。用 Sharp 等 (1989) 提出,并经 Devos 等 (1992) 改进的酚-氯仿法提取 DNA。

1.2.2 SSR 标记引物。根据 Röder 等发表的微卫星分子标记连锁图^[13],选用 37 对微卫星 Xgwm 引物进行 SSR 分析。试验采用了 Ju-Kyung 等开发的 87 对 EST-SSR 引物^[2]。全部引物由上海生物工程公司合成 (表 2、3)。

表 2 Genomic-SSR 多态性引物名称、染色体位置、退火温度及检测到的等位基因数

引物	染色体位置	退火温度/℃	等位基因数
Xgwm636	2A	50	9
Xgwm2	3A	50	4
Xgwm369	3A	60	4
Xgwm610	4A	60	10
Xgwm415	5A	55	2
Xgwm334	6A	50	8
Xgwm18	1B	50	5
Xgwm264	1B	60	6
Xgwm582	1B	50	2
Xgwm501	2B	60	9
Xgwm429	2B	50	6
Xgwm264	3B	60	6
Xgwm247	3B	55	7
Xgwm499	5B	60	5
Xgwm219	6B	60	5
Xgwm508	6B	50	8
Xgwm333	7B	55	15
Xgwm458	1D	60	4
Xgwm102	2D	60	7
Xgwm161	3D	60	7
Xgwm664	3D	55	2
Xgwm2	3D	50	5
Xgwm174	5D	55	8
Xgwm325	6D	60	5

1.2.3 PCR 扩增。PCR 反应体积为 20 μl, 包括 1×Buffer, dNTPs 200 μmol/L, MgCl₂ 1.7 μmol/L, 正反向引物各 0.25 μmol/L, Taq 聚合酶 1.25 U, 模板 DNA 70 ng。反应在 PTC-200 扩增仪上进行:94℃ 5 min 预变性,35 个循环 (94℃ 1 min, 每秒降低 0.5℃, 适宜退火温度 1 min, 每秒升高 0.5℃, 72℃ 延伸 1 min), 72℃ 延伸 5 min。PCR 产物经 6% 脲变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 硝酸银染色法检测。

1.3 统计方法 扩增结果有带记为 1, 无带记为 0。材料间遗传距离 d_{ij} 采用 Nei 的方法计算^[2]。利用 NTSYS-pc2.0 软

表 3 EST-SSR 多态性引物名称、染色体位置、退火温度及检测到的等位基因数

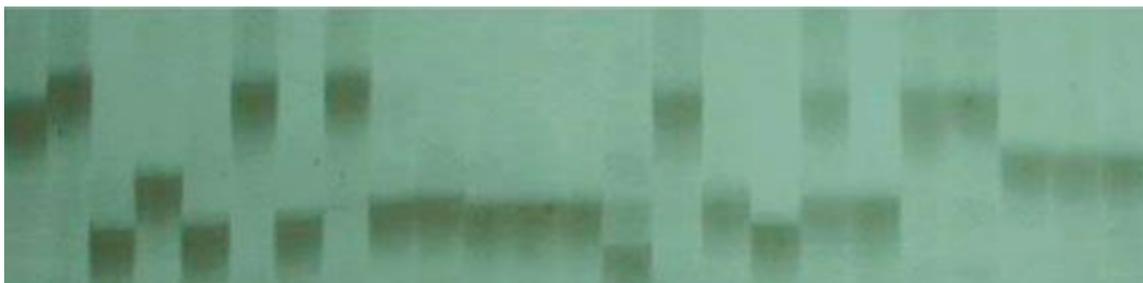
引物	染色体位置	退火温度/℃	等位基因数
SWES86	1A	52	5
CFE282	3A	57	5
CFE134	3A	57	5
CWEM40	5A	55	10
KS73	6A	55	4
KS23	6A	60	2
CFE125	6A	57	3
SWES22	7A	55	6
KS117	1B	60	4
SWES78	1B	55	4
CFE136	1B	57	6
CFE254	1B	60	4
SWES61	2B	50	7
CFE140	2B	60	3
CFE282	3B	57	5
KS62	4B	55	4
KS154	4B	55	5
CFE274	4B	57	2
CFE188	4BL	57	4
KS154	4B	55	3
CWEM40	5B	55	10
CFE125	6B	57	3
SWES22	7B	50	6
CFE223	7B	60	4
SWES78	1D	55	4
SWES86	1D	52	5
CFE136	1D	57	6
KS73	2D	55	4
SWES61	2D	50	7
CFE37	2D	57	5
CFE282	3D	57	5
CFE301	5D	57	4
CWEM40	5D	55	10
CFE87	6D	57	5

件以不加权成对算术平均法 (UPGMA) 进行聚类分析。

2 结果与分析

2.1 Genomic-SSR 和 EST-SSR 多态性 对 37 对扩增效果好的微卫星引物进行 SSR 分析, 引物所在染色体位点见表 2、3。其中, Xgwm2 检测的位点有 2 个, 分别在 3A 和 3D 染色体上。38 个位点基本均匀分布在 A、B 和 D 3 个不同染色体组上。由表 4 可知, 在 39 个 Genomic-SSR 位点上, 26 个能扩增出具有多态性的等位基因, 占总数的 66.6%; 26 个位点上共检测到 152 个多态性片段, 每个位点上为 2~15 个, 平均为 5.85 个。在 78 个 EST-SSR 位点中 37 个能扩增出具有多态性的等位基因, 占总数的 47.4%; 所有 37 个位点上共扩增出 120 个多态性片段, 每个位点上为 2~10 个, 平均为 3.24 个。图 1 为引物 Xgwm484 在全部材料中的扩增结果。

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24



注: 点样孔 1~24 为表 1 中相应的基因型。

图 1 引物 cfe136 在 24 份材料中的扩增结果

2.2 遗传距离 分别利用 Genomic-SSR 和 EST-SSR 标记计算了不同材料间的遗传距离。结果 24 个普通小麦基因型

之间的 Genomic-SSR 遗传距离值在 0.265 7~1.963 5, 平均为 0.504 1; 根据 EST-SSR 标记计算的遗传距离值在 0.081 2~

表 4 24 个普通小麦基因型的 Genomic-SSR 和 EST-SSR 多态性

	SSR 引物数	检测的位点数	单态性位点数	未扩增位点数	多态性位点数	多态率//%	扩增出的等位基因总数	平均每个位点上扩增出的等位基因数
Genomic-SSR	37	39	11	2	26	66.6	163	4.18
EST-SSR	67	78	36	5	37	47.4	156	2.00
总计	104	117	47	7	63	53.8	319	2.73

0.532 1, 平均为 0.246 2, 明显低于 Genomic-SSR 遗传距离的平均值 0.504 1; Genomic-SSR 和 EST-SSR 综合遗传距离在 0.154 1~0.782 0, 平均为 0.423 1。

2.3 聚类分析

2.3.1 Genomic-SSR 聚类图。由图 2 可知, 该试验所用 Genomic-SSR 标记除全国年推广面积最大的品种碧蚂 1 号及其衍生品种陕农 1 号之外, 将其余材料基因型区分开来。这其中包括一些亲缘关系很近的材料, 如姊妹系济南 2 号和北京 8 号。以遗传相似度 1.29 为界, 可以将 24 份材料分为 3 个类群, 骨干亲本阿勃、南大 2419、繁 6 及其各自的衍生品种聚为一类 (类群 I), 骨干亲本早洋麦及其衍生品种济南 2 号、北京 8 号和一些地方品种 (如辉县红、白芒麦、碧玉麦等) 聚为一类 (类群 II), 河南小麦地方品种白火麦单独聚为一类 (类群 III)。

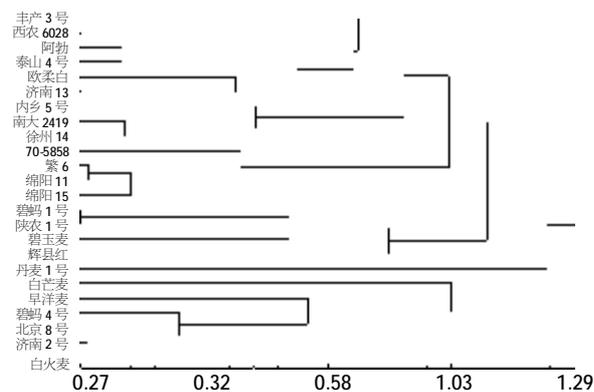


图 2 24 份普通小麦 Genomic-SSR 遗传距离聚类

2.3.2 EST-SSR 聚类图。由图 3 可知, 所用 EST-SSR 标记除繁 6、绵阳 15 之外, 将其余 22 份材料全部区分开来, 分为 3 大类群, 来自陕西的西农 6028、碧蚂 4 号等和国外引进的碧玉麦聚为一类 (类群 I), 来自山东的济南 13、泰山 4 号和四川的繁 6 等聚为一类 (类群 II), 国外品种丹麦单独为一类 (类群 III)。

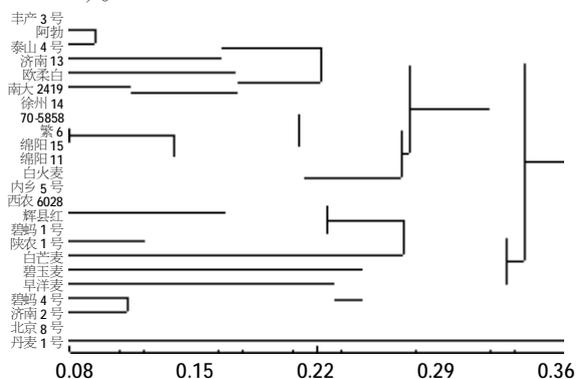


图 3 24 份普通小麦 EST-SSR 遗传距离聚类

2.3.3 Genomic-SSR 和 EST-SSR 聚类比较及其综合聚类分析。对图 2、3 进行比较发现, 2 个聚类图在一些材料的次序上有变化, 但所有来自同一个骨干亲本的育成后代品种聚在一起, 如繁 6 及其后代绵阳 11 和绵阳 15、阿勃及其后代

品种泰山 4 号和济南 13 等; 另外可以看出, 图 2、3 总体聚类结果也为一致。由此说明, Genomic-SSR 和 EST-SSR 都能很好地确定不同供试基因型之间的遗传差异和亲缘关系。

根据 Genomic-SSR 和 EST-SSR 2 种标记揭示的多态性计算材料间的综合遗传距离, 再用 UPGMA 方法进行聚类, 其聚类结果 (图 4) 与 EST-SSR 标记 (图 3) 更为相似, 表明 EST-SSR 标记更能准确揭示不同小麦基因型间的遗传关系。

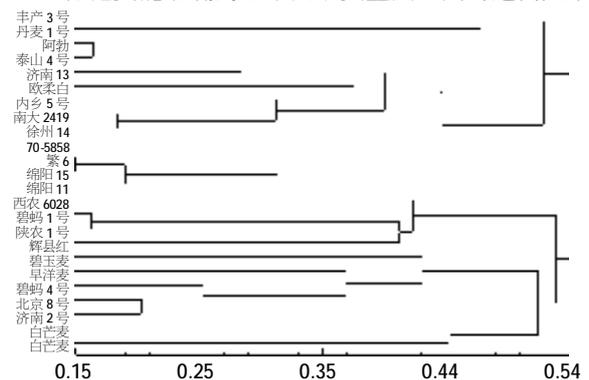


图 4 24 份普通小麦 Genomic-SSR 与 EST-SSR 综合遗传距离聚类

3 结论与讨论

该试验表明, 基于表达序列的 EST-SSR 标记可以用于遗传多样性分析, 但与基因组 SSR 相比, EST-SSR 多态性较低。Eujayl 等用包括 22 对 EST-SSR, 11 对 GWM 和 9 对 WMC 多态引物研究了 64 份硬粒小麦地方品种、选育品种 (品系) 的遗传多样性。结果表明 EST-SSR 扩增效果最好, 但其多态性最低 (25%), 平均每个位点有 4.1 个等位变异, 其他 2 种 SSR 的多态性为 53%, 平均每个位点检测到 5.5 和 4.3 个等位变异^[9]。EST 是基因表达序列, 而 EST 序列中的 SSR 序列必然与有关基因紧密连锁, 将 EST-SSR 作图, 就可定位功能已知的基因。选用相关功能的 EST-SSR 进行相应基因的分子标记目的性更强已知基因转录物中的 SSR 可能在基因表达及基因功能方面起作用, 如水稻的蜡质基因 (waxygene) 5'UTR 的 (CT)_n 长度变化与直链淀粉的含量有关^[24]。在长期的进化与选择的过程中必然有一些基因得到选择, 而使群体的遗传多样性丧失, 据此可选用一些在野生种中表现多态而在普通栽培种中无多态性的 EST-SSR 用于筛选重要农艺性状的基因。相关基因功能的遗传多样性对于种质资源的收集、保存、评价有重要意义。

在当今小麦育种工作中, 由于大量使用相同的骨干亲本, 导致育成的普通小麦品种群体内的遗传基础相对狭窄, 从分子水平的研究也证明这一点。该试验研究表明, 一个骨干亲本与由其衍生出来的品种之间的遗传差异一般比较小。因此, 采用不同来源的遗传变异, 拓宽小麦育种亲本的遗传基础是十分必要的。武军等指出, 通过远缘杂交和幼胚拯救方法创造出的大穗多花小麦-冰草异附加系、异代换系具有株型结构合理、大穗多粒、抗条锈病、抗白粉病等特性, 在小麦高产育种上具有很高的利用价值^[25]。但该试验中, 一

(上接第 8175 页)

些小麦地方品种聚类比较复杂、遗传差异比较大,如河南的辉县红、白火麦,可能绵阳 15 继承繁 6 的血缘比较多,该试验没有很好的区分,还有待进一步研究。

参考文献

[1] 曾浙荣,李英蝉,孙芳华,等.37 个小麦品种面包烘烤品质的评价和聚类分析[J].作物学报,1994,20(6):641-652.

[2] 刘三才,郑殿升,曹永生,等.中国小麦选育品种与地方品种的遗传多样性[J].中国农业科学,2000,33(4):20-24.

[3] 魏育明,郑有良,周永红,等.中国特有小麦 GII-1、Gli-2 和 Gli-1 位点的遗传多样性[J].植物学报,2001,43(8):834-839.

[4] 朱列层,唐国顺,HAZEN S P,等.用 RFLP 方法研究陕西省主要小麦品种遗传多样性及其演变[J].西北植物学报,1999,19(2):208-213.

[5] SUN Q X,NI Z F,LIU Z H Y,et al.Genetic relationships and diversity among Tibetan wheat common wheat and European spelt wheat revealed by RAPD markers[J].Euphytica,1998,99:205-211.

[6] 贾继增,张正斌.小麦 21 条染色体 RFLP 作图位点遗传多样性分析[J].中国科学(C 辑),2001,31(1):13-21.

[7] TINKER N A,FORTIN M G,MATHER D E. Random amplified polymorphic DNA and pedigree relationships in spring barley[J]. Theor Appl Genet,1993,85:976-984.

[8] MELCHINGER A E, GRANER A, SINGH M,et al.Relationships among European barley germplasm: I Genetic diversity among winter and spring cultivars revealed by RFLPs [J].Crop Science, 1994,34:1191-1199.

[9] 杜金昆,姚颖垠,倪中福,等.普通小麦、斯卑尔脱小麦、密穗小麦和轮回选择后代材料 ISSR 分子标记遗传差异研究 [J]. 遗传学报, 2002,29(5):445-452.

[10] LELLEY T,STACHEL M,GRAUSGRUBER H,et al.Analysis of relationship between *Aegilops tauschii* and the D genome of wheat utilizing microsatellites[J].Genome,2000,43:661-668.

[11] GUPTA P K,BALYAN H S,SHARMA P C,et al. Microsatellite in plants;a new class of molecular markers [J].Current Science, 1996,70:45-54.

[12] TAUTZ D, RENZ M. Simple sequence repeats are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes[J].Nucleic Acids Research, 1984,12:4127-4138.

[13] RODER M S,KORZUN V,WENDEHAKE K,et al.A microsatellite map of wheat [J].Genetics,1998,149:2007-2023.

[14] KOTA R,VARSHNEY R K,THIEL T,et al Generation and comparison of EST-derived SSRs and SNPs in barley (*Hordeum Vulgare L.*) [J].Hereditas,2001,135:145-151.

[15] EUJAYL L,SORRELLS M E,BAUM M,et al.Assessment of genotypic variation among cultivated durum wheat based on EST-SSR and genomic SSRs[J]. Euphytica,2001,119:39-43.

[16] CORDEIRO G M,CASU R,MCLINTYRE C L,et al Microsatellite markers from sugarcane (*Saccharum spp.*) ESTs cross transferable to *erianthus* and sorghum[J].Plant Science,2001,160:1115-1123.

[17] WANG X,BOWEN B A.Progress report on corn genome projects at pioneer hi-bred [M].Plant and Animal genome VI Conference, San Diego,California,USA,1998.

[18] SCOTT K D, EGGLER P, SEATON G. Analysis of SSRs derived from grape ESTs [J].Theor.Appl.Genet,2000,100:723-726.

[19] REMINGTON D L,THORNSBERRY J M,MATSUOKA Y. Structure of linkage disequilibrium and phenotypic associations in the maize genome [J].Proceeding of National Academy of Science, 2001,98:11479-11484.

[20] VIGOUROUX Y,MCMULLEN M,HITTINGER C T. Identifying genes of agronomic importance in maize by screening microsatellites for evidence of selection during domestication [J].Proceeding of National Academy of Science,2002,99:9650-9655.

[21] 杨新泉,刘鹏,韩宗福,等.普通小麦 Genomic-SSR 和 EST-SSR 分子标记遗传差异及其与系谱遗传距离的比较研究[J].遗传学报,2005, 32(4):406-416.

[22] KYUNG J,TREVOR Y,DAKE M,et al.Development and mapping of EST-derived simple sequence repeat markers for hexaploid wheat[J].Genome,2004,47:805-818.

[23] NEI M.Genetic distance between populations [J].Amer Naturalist, 1972,106:283-292.

[24] AYERS N M,MCCLUNG A M,LARKIN P D,et al. Microsatellite and a single nucleotide polymorphism differentiate apparent amylose classes in an extended pedigree of US rice germplasm[J]. Theor.Appl.Genet.,1997,94:773-781.

[25] JUN WU,XINMIN YANG,HUI WANG,et al.The introgression of chromosome 6P specifying for increased numbers of florets and kernels from *Agropyron cristatum* into wheat[J].Theor Appl Genet, 2006,114:13-20.