

应用 SSR 检测导入普通小麦的 野生二粒小麦遗传物质*

王长有¹, 吉万全¹, 王秋英¹, 武玉华², 薛秀庄¹, 蔡东明¹

(1 西北农林科技大学 农学院小麦研究所, 陕西 杨凌 712100;

2 河北省农林科学院 粮油作物研究所, 河北 石家庄 050031)

[摘 要] 以抗白粉病和条锈病的野生二粒小麦 A S846 为父本, 与阿勃非整倍体植株进行杂交, 在杂交后代中选育出抗白粉病的 N 9134a, N 9134b 和 N 9134c 3 个品系。采用 66 个 SSR 引物对 A S846、阿勃和 3 个 N 9134 姊妹系进行分析, 结果发现, 46 个引物对 (69.7%) 在 A S846 和阿勃之间有多态性, 其中 34 个引物对在 A S846 中扩增出特异性产物, 13 个引物对在 N 9134 3 个系中扩增出 A S846 的特异性产物。表明野生二粒小麦 A S846 的遗传物质已经导入到普通小麦中。根据微卫星标记在小麦染色体的位置及 SSR 分析结果推断, N 9134 的 5B 染色体上含有野生二粒小麦 A S846 的遗传物质。

[关键词] SSR; 野生二粒小麦; 遗传物质; 良种选育

[中图分类号] S512.103.52

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2004)04-0001-04

简单重复序列 (Simple sequence repeat, SSR) 亦称微卫星 DNA (Microsatellite DNA), 是一类以少数几个核苷酸 (重复单位少于 6 bp) 串联重复的 DNA 序列。SSR 标记是建立在 PCR 基础上的一种分子标记, 多数表现为共显性遗传, 具有 RFLP 标记重复性和稳定性好的特点, 又具有 RAPD 标记操作简单, DNA 用量少, 周期短等特点。普通小麦的 SSR 位点多、多态性丰富, 随机分布于小麦的整个基因组中, 而且大多数位点具有染色体特异性, 是进行小麦遗传研究的理想工具。因此, 已经在小麦遗传连锁图谱的构建^[1]、遗传多样性分析^[2~3]、目的基因的标记和定位^[4~5]以及染色体片段的鉴定和标记^[6~8]等方面得到广泛应用。

野生二粒小麦 (*Triticum dicoccoides*, 染色体组为 AABB, $2n=28$) 是普通小麦的亲本之一, 具有籽粒大、籽粒蛋白质含量高、抗白粉病和条锈病等优良性状, 是进行普通小麦遗传改良的重要基因资源。本研究报道了野生二粒小麦遗传物质向普通小麦的导入以及利用 SSR 标记的鉴定结果, 旨在为研究野生二粒小麦遗传物质向普通小麦的转移提供分子方面的依据。

1 材料与方法

1.1 材料

野生二粒小麦 A S846 引自四川农业大学资源

室, 普通小麦阿勃二体及 N 9134 的 3 个姊妹系 N 9134a, N 9134b 和 N 9134c 由本研究室提供。

1.2 基因组总 DNA 的提取

将参试材料种植在营养钵内, 当幼苗长至三、四叶期时, 采用微量 CTAB 法进行基因组总 DNA 提取, 具体步骤参考文献[9]的方法进行。

1.3 PCR 扩增和电泳分析

试验共采用位于小麦微卫星图谱^[1]42 条染色体体臂上的 66 个 SSR 引物对, 其中 52 个由澳大利亚悉尼大学育种研究中心 Don Marshall 教授提供, 14 个引物对 (位于 5B 染色体上) 是根据 Roder 发表的引物序列^[1], 由上海申友生物技术有限责任公司合成。扩增反应在 Perkin-Elmer 480 型热循环仪上进行, 反应混合液总体积为 10 μ L, 其中包括 0.25 U Taq DNA 聚合酶 (Promega), 1 $\times$ Buffer, 2 mmol/L MgCl₂, 每个 dNTP 0.2 mmol/L, 每个引物 250 nmol/L, 20~40 ng 基因组总 DNA。反应程序为: 95 2 min; 前 5 个循环, 94 1 min; 47, 50, 55 或 60 (根据引物选择) 1.5 min; 72 1 min; 后 30 个循环, 92 30 s; 47, 50, 55 或 60 (根据引物选择) 50 s; 72 30 s; 循环后 72 延伸 5 min, 保持在 4 结束。电泳在质量分数 8.0% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶上进行, 向扩增产物加入 2 μ L 点样缓冲液 (100 mmol/L EDTA, pH = 8.0; 10 mmol/L Tris-HCl,

* [收稿日期] 2003-04-14

[基金项目] 陕西省“十五”攻关项目 (2001K02-G2); 杨陵生物技术育种中心“农业结构调整重大技术研究专项”

[作者简介] 王长有 (1973-), 男, 陕西泾阳人, 助研, 硕士, 主要从事小麦遗传育种研究。

pH = 7.5; 质量分数 5% 聚蔗糖 400; 质量分数 0.05% 溴酚兰; 质量分数 0.05% 二甲苯青 FF) 后点样, 同时以 GeneRuler™ 100 bp DNA 为标准分子量对照, 电泳缓冲液为 1×TBE, 恒流电泳 2~3 h, 用银染法进行凝胶显色, 制成干胶后扫描成相。

2 结果与分析

2.1 N 9134 3 个姊妹系的选育

野生二粒小麦是普通小麦的祖先之一, 二者均含有相互同源的 A, B 染色体组, 因而容易将野生二粒小麦所具有的优良性状导入到普通小麦中。1991 年, 本研究室在对国内外引进的 39 份野生二粒小麦进行抗性鉴定的基础上, 选取对白粉病和条锈病免疫的野生二粒小麦 A S846 为父本, 以阿勃 5B 缺体系中体细胞染色体数目为 40 的植株为母本进行杂交。共授粉小花数 120 个, 结实 18 粒, 杂交结实率为 15.0%。杂交各世代采用陕西省白粉病混合菌种进行人工接种诱发鉴定, 结合田间农艺性状和籽粒品质的筛选, 选取抗白粉病兼抗条锈病的普通小麦型植株。随着自交代数的增加, 后代逐渐趋于稳定, 在 F₅ 代选育出抗白粉病性状稳定的 3 个株系, 分别命名为 N 9134a, N 9134b 和 N 9134c。3 个系的共同特征为: 幼苗半匍匐, 株高约 75 cm, 株型紧凑, 叶片上

挺, 叶色深绿, 成熟前穗色黄绿, 成熟时颖壳呈棕褐色, 穗纺锤型, 长芒, 白粒。3 个系仅在植株底部叶鞘茸毛有无及多少上存在差别, 其中 N 9134a 的底部叶鞘全被有茸毛, N 9134b 的底部叶鞘仅叶鞘边缘被有茸毛, 而 N 9134c 的底部叶鞘完全没有茸毛。经西北农林科技大学植保学院植物保护研究所白粉病组鉴定, 3 个系在苗期和成株期对陕西省白粉病混合菌种表现高抗至免疫。多年在大田条件下用陕西省白粉病混合菌种诱发鉴定表明, 3 个系的抗白粉病性状稳定, 是良好的抗白粉病亲本材料。从白粉病抗性初步推断野生二粒小麦的遗传物质已经导入到普通小麦阿勃中。

2.2 N 9134 3 个姊妹系的 SSR 分析

为了从分子水平验证 N 9134 3 个姊妹系中含有野生二粒小麦的遗传物质, 首先以野生二粒小麦 A S846 和阿勃为试验材料, 提取基因组 DNA 用于 SSR 引物对的筛选。所采用的 66 个 SSR 引物对中, 13 个引物对在两个材料均没有扩增产物或扩增产物不清晰; 其他 53 个引物对中, 46 个在两个材料间有多态性, 多态性引物对占总数的 69.7%。在 46 个具有多态性的引物对中, 34 个在 A S846 中扩增出特异性产物。

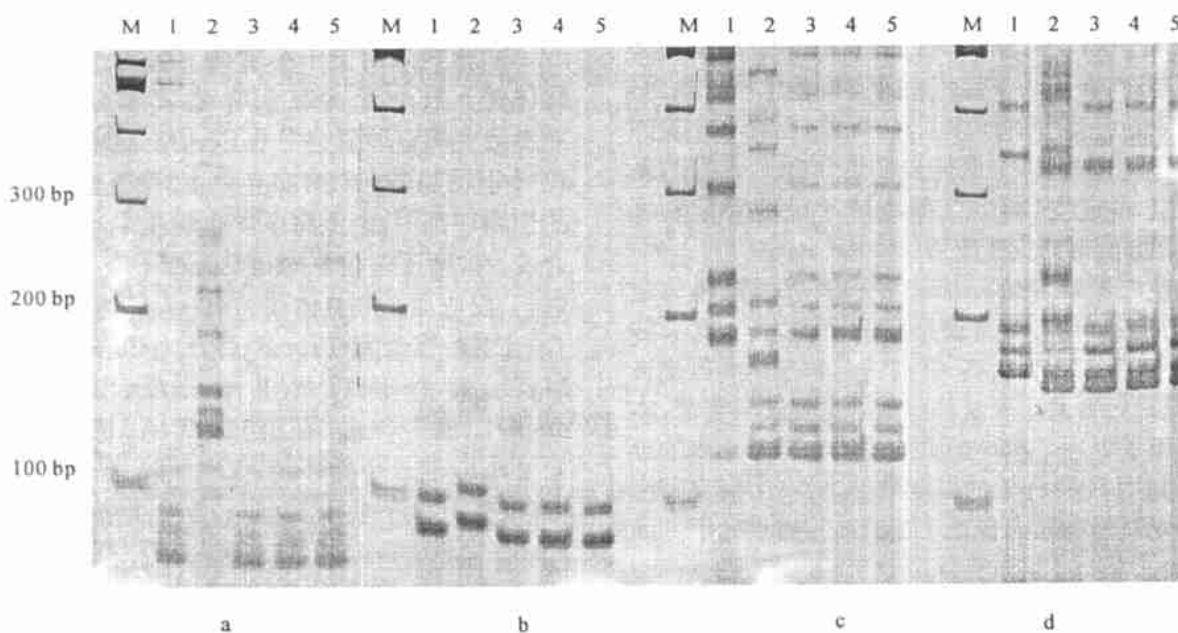


图 1 4 个 SSR 引物对的扩增结果

a WM S604; b WM S67; c WM S213; d WM S265

M. 标准分子量 DNA; 1 野生二粒小麦 A S846; 2 阿勃二体; 3 N 9134a; 4 N 9134b; 5 N 9134c

Fig 1 Amplification results of four SSR primer pairs

a WM S604; b WM S67; c WM S213; d WM S265

M. M marker; 1 *T. dicoccoides* accession A S846; 2 Abbonanza; 3 N 9134a; 4 N 9134b; 5 N 9134c

在对 SSR 引物对初步筛选的基础上,应用能扩增出 A S846 特异性产物的 34 个引物对在 A S846, 阿勃和 N 9134 3 个姊妹系中进行分析。其中 13 个引物对可在 N 9134 3 个姊妹系中扩增产生野生二粒小麦 A S846 的特异性产物,扩增结果包括两种类型,第一种是仅扩增产生 A S846 的特异性产物,而没有扩增出普通小麦阿勃的特异性产物(图 1a, b),这类引物对包括 WM S67, WM S234, WM S371, WM S443, WM S499, WM S544 和 WM S604;第二种是同时扩增出 A S846 和阿勃的特异性产物,但缺少阿勃的一部分特异性产物(图 1c, d),这类引物对包括 WM S213, WM S265, WM S335, WM S 408, WM S540 和 WM S639。SSR 分析表明,野生二粒小麦 A S846 的遗传物质已经转移到了普通小麦的遗传背景中。

3 讨 论

小麦近缘种属遗传物质导入普通小麦后,进行检测的手段包括表型观察、细胞学鉴定、原位杂交、生化和分子标记技术。表型观察能够初步推断外源遗传物质是否导入普通小麦,但要确认外缘遗传物质的导入以及获得更多关于导入遗传物质的信息,还需要借助其他手段。后 4 种方法都能用于鉴定小麦近缘属遗传物质向普通小麦的导入,但要检测小麦属内近缘种(例如野生二粒小麦)遗传物质向普通小麦的导入,细胞学方法和原位杂交技术几乎是不可能实现的;储藏蛋白组分分析和同工酶分析等生化手段虽然可以鉴定,但由于位点较少和多态性较低,获得的信息量有限。SSR 等分子标记技术无疑为解决这一问题开辟了新的途径。此外,通过小麦现有的 SSR 标记和 RFLP 标记遗传连锁图谱,根据标记所在的染色体位置,可以进行外源遗传物质的分子标记及同源群归属等方面的研究。郭光艳等^[6]利用 SSR 对普通小麦-多枝赖草二体异附加系 L ine 24 中的多枝赖草染色体进行了鉴定,获得了 4 个(Xg-

wm 314~ 135 bp, Xgwm 190~ 175 bp, Xgwm 133 ~ 310 bp 和 Xgwm 400~ 190 bp) 可以作为 L ine 24 中多枝赖草染色体的分子标记;根据 4 个微卫星标记位点在小麦染色体的位置,推测 L ine 24 中附加的 1 对多枝赖草染色体是第 3, 第 5, 第 6 和第 7 部分同源群染色体相互易位形成的。Iqbal 等^[7]利用 SSR 鉴定了小麦-单芒山羊草 (*Aegilops uniarista* Vis.) 7N 染色体异附加系。Peil 等^[8]应用 SSR 对附加到普通小麦中的尾状山羊草 (*Aegilops markgrafii*, 又名 *A. caudate* L.) 染色体进行了分析,获得了 22 个可在普通小麦背景中鉴定尾状山羊草染色体的分子标记。本研究通过 66 个 SSR 引物对,在 N 9134 3 个系及其亲本中的分析发现,其中 13 个引物对能在普通小麦阿勃背景中检测到野生二粒小麦的遗传物质,这 13 个 SSR 引物对所对应的微卫星位点 Xgwm 67, Xgwm 234, Xgwm 371, Xgwm 443, Xgwm 499, Xgwm 544, Xgwm 604, Xgwm 213, Xgwm 265, Xgwm 335, Xgwm 408, Xgwm 540 和 Xgwm 639 中,除 Xgwm 265 位于小麦染色体 2A 外,其余 12 个均分布在染色体 5B 的着丝点区域及两个染色体体臂的不同位置。根据微卫星标记在小麦染色体的位置^[1]及 SSR 分析结果推断, N 9134 的 5B 染色体上含有野生二粒小麦 A S846 的遗传物质,但双亲 5B 染色体是否发生代换还有待于进一步研究;此外, 2A 染色体也可能含有野生二粒小麦 A S846 的遗传物质。N 9134 的其他染色体上是否含有野生二粒小麦的遗传物质,还需要应用更多 SSR 引物以及其他分子标记方法进行鉴定。

吉万全等^[10]利用 RAPD 标记,对 N 9134 中的野生二粒小麦的遗传物质进行了鉴定,在采用的 402 个随机引物中,有 42 个(10.4%) 在野生二粒小麦 A S846 和阿勃之间有多态性。本研究所用的 66 个 SSR 引物对中, 46 个(69.7%) 在野生二粒小麦 A S846 和阿勃之间有多态性,这表明 SSR 比 RAPD 在小麦中更具多态性,这与以前的报道^[2, 11]相似。

[参考文献]

- [1] R. der M. S., Korzun V., Wendekhake K., et al. A microsatellite map of wheat[J]. *Genetics*, 1998, 149: 2007- 2023
- [2] 崔国惠, 倪中福, 刘志勇, 等. 小麦杂种优势群研究 III: 普通小麦和斯卑尔脱小麦微卫星分子标记遗传差异的研究[J]. *农业生物技术学报*, 1999, 7(4): 333- 338
- [3] Fahima T., R. der M. S., Grama A., et al. Microsatellite DNA polymorphism divergence in *Triticum dicoccoides* accessions highly resistant to yellow rust[J]. *Theor Appl Genet*, 1998, 96(2): 187- 195
- [4] Chague V., Fahima T., Dahan A., et al. Isolation of microsatellite and RAPD markers flanking the Yr15 gene of wheat using NITs and bulked segregant analysis[J]. *Genome*, 1999, 42: 1051- 1056

- [5] Liu X M, Smith C M, Gill B S. Identification of microsatellite markers linked to Russian wheat aphid resistance genes *Dn 4* and *Dn 6*[J]. Theor Appl Genet, 2002, 104: 1042- 1048
- [6] 郭光艳, 李瑞芬, 张敬原, 等. 利用 SSR 鉴定普通小麦-多枝赖草二体异附加系 Line24 中外源染色体同源群的归属[A]. Xin Z Y, Kiichi F. Advances in chromosome sciences[C]. Beijing: China agricultural Science and Technology Press, 2002. 420- 424
- [7] Iqbal N, Roder M S, Caligari P D S, et al. Characterization of *Aegilops uniaristata* chromosomes by comparative DNA marker analysis and repetitive DNA sequence in situ hybridization[J]. Theor Appl Genet, 2000, 101(8): 1173- 1179
- [8] Peil A, Schumann E, Schubert V, et al. Molecular markers for *Aegilops markgrafii* chromosomes[A]. McIntosh R A, Hart G E, Devos K M, et al. Proceedings of the 9th International Wheat Genetics Symposium [C]. Vol 3 University of Saskatchewan, Canada: University Extension press, 1998. 140- 141.
- [9] 鲁玉柱, 薛秀庄, 王长有, 等. 应用 RAPD 标记检测导入普通小麦的 *Elymus rectisetus* 遗传物质[J]. 西北植物学报, 2002, 22(1): 51- 55
- [10] 吉万全, 王秋英, 薛秀庄, 等. 野生二粒小麦抗白粉病基因的转移及其 RAPD 分析[J]. 西北植物学报, 1999, 19(6): 31- 36
- [11] 吴卫, 郑有良, 魏育明, 等. 利用 SSR 标记分析小麦强优势组合亲本遗传差异[J]. 西南农业大学学报, 2002, 15(3): 1- 6

Detection of *Triticum dicoccoides* chromatin transferred to common wheat by SSR markers

WANG Chang-you¹, JI Wan-quan¹, WANG Qiu-ying¹, WU Yu-hua², XUE Xiu-zhuang¹, CAI Dong-ming¹

(1 Institute of Wheat, College of Agronomy, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Institute of Cereal and Oil Crops, Hebei Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Shijiazhuang, Hebei 050031, China)

Abstract With *Triticum dicoccoides* accession A S846 resistant to powdery mildew and stripe rust as male and common wheat Abbondanza aneuploid plant as female, three lines N 9134a, N 9134b and N 9134c resistant to powdery mildew were obtained. The SSR approach was used to detect *T. dicoccoides* chromatin in N 9134 46 (69.7%) out of 66 wheat microsatellite primer pairs amplified distinguishable as well as polymorphic bands between A S846 and Abbondanza. 34 primer pairs amplified specific products of *T. dicoccoides*. 13 primer pairs could amplified the specific products of *T. dicoccoides* in N 9134a, N 9134b and N 9134c. The results demonstrated that *T. dicoccoides* chromatin had been transferred to common wheat. According to the microsatellite map of wheat, it is inferred that chromosome 5B of N 9134 contained *T. dicoccoides* chromatin.

Key words: SSR (simple sequence repeat); *Triticum dicoccoides*; germ plasm; variety breeding