

## 小麦体细胞无性系 SSR 位点的遗传变异特性分析

杨随庄<sup>1,3</sup>, 王红梅<sup>1</sup>, 杨晓明<sup>2</sup>, 王化俊<sup>3</sup>, 尚勋武<sup>3,\*</sup>

甘肃省农业科学院<sup>1</sup> 生物技术研究, <sup>2</sup>作物研究所, 兰州 730070; <sup>3</sup>甘肃农业大学农学院, 兰州 730070

**摘要:** 研究结果表明:(1)小麦体细胞无性系 SSR 位点变异类型有:扩增片段迁移率的变大或变小、扩增片段缺失以及新的扩增片段;(2)变异特点为:变异频率与基因型有关,不同染色体组上的 SSR 位点变异频率不同,而不同无性系后代的 SSR 位点变异频率也不同;(3)同一 SSR 位点的变异类型在同一基因型的无性系后代中变异表现一致,在不同基因型无性系后代中的变异表现不同,有的 SSR 位点在无性系后代中表现出一致的变异,而有的则不一致。

**关键词:** 小麦;体细胞无性系;SSR 位点;遗传变异

## Analysis of Genetic Variation Character on SSR Loci of Somaclones in Wheat (*Triticum aestivum* L.)

YANG Sui-Zhuang<sup>1,3</sup>, WANG Hong-Mei<sup>1</sup>, YANG Xiao-Ming<sup>2</sup>, WANG Hua-Jun<sup>3</sup>, SHANG Xun-Wu<sup>3,\*</sup>

<sup>1</sup>Biotechnology Research Institute, <sup>2</sup>Crop Research Institute, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730070, China;

<sup>3</sup>College of Agronomy, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China

**Abstract:** Research results indicated that the types of somaclonal variation on SSR loci in wheat consist of addition, deletion, absence of DNA fragments and newly amplified band; the frequency of somaclonal variation on SSR loci was related to donor genotypes, different frequency of somaclonal variation was found on SSR loci located on different chromosome groups; and also among different somaclonal progenies derived from the same donor genotypes and the different tones; the type of somaclonal variation was same on SSR loci in the somaclonal progenies derived from the same genotype, but different in the somaclonal progenies derived from different genotype; on some SSR loci, the type of somaclonal variation were same in the somaclonal progenies, and on other SSR loci, that were not the same.

**Key words:** wheat (*Triticum aestivum*); somaclone; SSR loci; genetic variation

体细胞无性系变异作为一种创造突变的人工诱变技术,已广泛应用于各种作物种质资源创新和品种改良,育成新的品种已在生产中得到应用(Jain 2001)。人们相继从形态学、细胞学、生理学、生物化学、分子水平等不同层次上揭示了体细胞无性系变异的机制和特点(韦彦余等 2004)。研究体细胞无性系变异的方法有多种,最简单直观的鉴定方法是表现型鉴定,这已有大量的报道(刘景松等 2006; Larkin 等 1984)。同工酶分析检测的生化变异是相对方便的方法,但由于可利用标记数目少以及区分近缘品种有困难,其应用受到限制。基于 PCR 技术上的各种分子标记技术具有多态性高、实验成本低、可重复性好、易操作等优点,特别是简单重复序列(simple sequence repeat, SSR)分子标记技术已广泛用于植物

体细胞无性系变异研究。近年来,人们采用 PCR 及其衍生技术对多种植物的体细胞无性系变异进行了研究,并揭示了体细胞无性系 DNA 的多态性(Rahman 和 Rajora 2001; 张志清等 2006; 王立新等 2005)。本文以小麦幼胚无性系 R5 代为材料,用 55 对小麦 SSR 引物对小麦体细胞无性系 DNA 多态性作了分析,研究体细胞无性系 SSR 位点的遗传变异特点,以期能为体细胞无性系变异应用于改良小麦品种提供参考。

### 材料与方法

普通小麦(*Triticum aestivum* L.)品种‘永良 4

收稿 2007-05-14 修定 2007-07-03

资助 甘肃省自然科学基金(ZS991-A21-041-N)。

\* 通讯作者(E-mail: Shangxw@gsau.edu.cn; Tel: 0931-7631145)。

号、‘陇春21号’和‘花培9355’及其幼胚组织培养无性系第5代(R5), 共计29个供试材料。‘永良4号’的10个无性系编号为1~10, ‘花培9355’的9个无性系编号为11~19, ‘陇春21号’的7个无性系编号为20~26。所有无性系都来源于各自供体亲本的一个幼胚愈伤组织诱导、继代、分化培养的再生植株。

提取DNA, 取叶片放在液氮中研磨成粉末, 采用CTAB法提取小麦总DNA。提取的DNA经0.8%琼脂糖凝胶和紫外分光光度计检测, DNA无降解, 测定的 $OD_{260/280}$ 的比值在1.8~2.0之间, 适合于PCR扩增, 用TE溶液稀释成 $25\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 备用。

选用55对Röder等(1998)开发的Xgwm系列SSR引物, 引物代号为2、6、30、33、37、47、60、66、67、70、72、88、95、99、106、107、111、113、114、120、130、131、155、157、159、161、169、179、194、205、219、232、257、261、272、275、294、325、337、339、357、340、471、495、512、513、533、537、539、577、582、583、595、604、610, 由上海生工生物工程技术有限公司合成。

PCR反应总体积为 $25\ \mu\text{L}$ , 其中含1 U Taq DNA聚合酶(TaKaRa公司)、 $10\times\text{Tris-HCl}$ 缓冲液(pH 8.3)、 $1.5\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{MgCl}_2$ 、 $200\ \text{pmol}\cdot\text{L}^{-1}$  dNTP、65 ng引物和50 ng模板DNA。PCR反应条件为: 扩增前94 预变性3 min; 然后在94

中变性1 min, 50~60 (视引物而定)退火1 min, 72 延伸1 min, 扩增35个循环; 最后在72 延伸10 min, 于4 下保存。

聚丙烯酰胺凝胶浓度为6%, 50 mL凝胶溶液的配方为10 mL 30% 丙烯酰胺(Acr:Bis=19:1)、5 mL  $10\times\text{TBE}$ 、35 mL  $\text{H}_2\text{O}$ 、200  $\mu\text{L}$  10% 过硫酸铵和70  $\mu\text{L}$  TEMED。扩增产物中加入5  $\mu\text{L}$  上样缓冲液(95 mL 甲酰胺中加入2 mL pH 8.0的 $10\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  EDTA、0.09 g 二甲苯氰、0.09 g 溴酚蓝, 定溶至100 mL)后点样, 每个点样孔内扩增产物的上样量为7  $\mu\text{L}$ , 以 $1\times\text{TBE}$ 缓冲液为介质, 800 V 稳压电泳90 min后硝酸银染色, 银染按严学兵(2005)文中的方法进行。

## 实验结果

### 1 小麦体细胞无性系的SSR位点变异类型

以未经组织培养的供体亲本为对照, 从PCR产物的聚丙烯酰胺凝胶电泳结果来看, SSR位点变异有4种类型:(1)扩增片段迁移率变小(图1-a);(2)扩增片段迁移率变大(图1-b);(3)SSR位点缺失(图1-c);(4)新的扩增片段(图1-d)。

### 2 小麦体细胞无性系SSR位点变异的特点

表1、表2显示:

(1)小麦体细胞无性系SSR位点遗传变异频率与基因型有关。用55对小麦SSR引物对3个基因型供体亲本进行PCR扩增, ‘永良4号’有40对SSR引物可扩增出条带, 再用这40对SSR引物对‘永良4号’及其10个无性系后代材料进行扩增, 扩增产物对比分析表明, 在这10个无性系后代的400个SSR位点上有61个SSR位点产生变异, 变异频率为15.25%。‘花培9355’有51对引物可扩增出条带, 分析这51对引物在‘花培9355’的9个无性系后代中的459个SSR位点扩增的结果表明, 85个SSR位点发生变异, 变异频率为18.52%。而‘陇春21号’有39对引物可扩增出条带, 这39对引物在‘陇春21号’的7个无性系后代中的273个SSR位点扩增的结果表明, 有81个SSR位点发生变异, 变异频率为29.67% (表1)。

(2)小麦不同染色体组上SSR位点的变异频率不同。在选用的55对SSR引物中, 有21对分布在b组染色体上, 19对分布在a组染色体上, 15对分布在d组染色体上, 覆盖了小麦42条染色体全基因组。‘永良4号’无性系后代在可扩增条带的40个SSR位点上, 29个位点发生变异, 有9个位于a组染色体上(占变异位点数的31.03%), 有15个位于b组染色体上(占变异位点数的51.72%), 有5个位于d组染色体上(占变异位点数的17.24%)。‘花培9355’无性系后代在可扩增条带的51个SSR位点上, 42个位点发生变异, 有13个位于a组染色体上(占变异位点数的30.95%), 有17个位于b组染色体上(占变异位点数的40.48%), 有12个位于d组染色体上(占变异位点数的28.57%)。‘陇春21号’无性系后代在可扩增条带的39个SSR位点上, 32个位点发生变异,

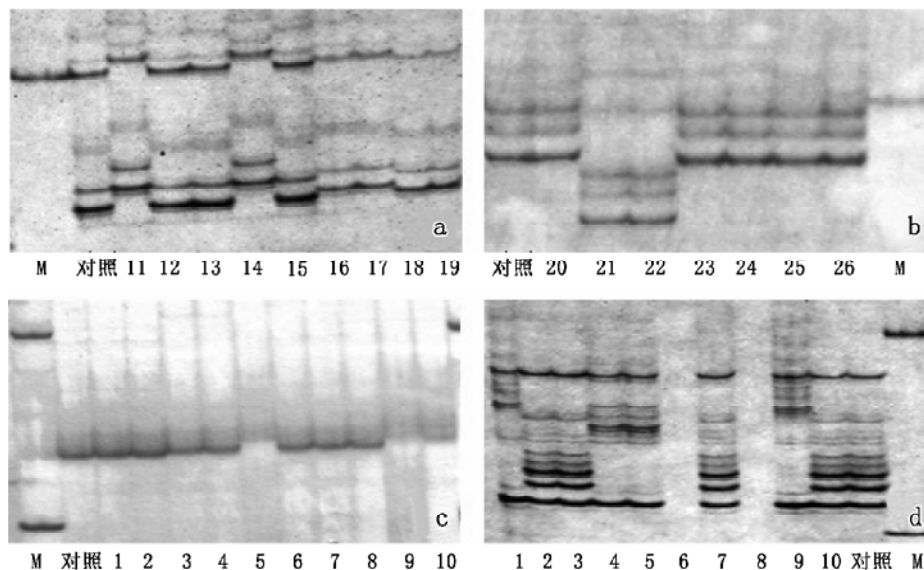


图1 3个小麦品种及其无性系R5代的PCR扩增

Fig.1 Amplifications of three wheat varieties and their somaclones in R5 generation by PCR

a: Xgwm513引物的扩增, M为DNA标准分子量(200 bp), 对照为‘花培9355’, 11~19为其无性系R5代; b: Xgwm495引物的扩增, M为DNA标准分子量(200 bp), 对照为‘陇春21号’, 20~26为其无性系R5代; c和d: Xgwm194和Xgwm131引物的扩增, M为DNA标准分子量(200、100 bp), 对照为‘永良4号’, 1~10为其无性系R5代。

有9个位于a组染色体上(占变异位点数的28.13%), 有14个位于b组染色体上(占变异位点数的43.75%), 有9个位于d组染色体上(占变异位点数的28.13%)。3个基因型无性系后代在发生变异的103个位点上, 位于a组染色体上的有31个(占变异位点数30.10%), 位于b组染色体上的有46个(占变异位点数的44.66%), 位于d组染色体上的有26个(占变异位点数的25.24%) (表2)。由此可以看出, 3个基因型的无性系后代中, 小麦体细胞无性系变异频率以b组染色体上的SSR位点为最高, 而a组和d组染色体上的SSR位点遗传变异相差不大。

(3)同一基因型的不同无性系后代的SSR位点遗传变异频率不同。‘永良4号’无性系后代的40个可扩增条带的SSR位点上, 10个无性系后代的SSR位点发生变异的位点数介于5~10个之间, 变异频率介于12.50%~25.00%; ‘花培9355’的无性系后代的51个可扩增条带的SSR位点上, 9个无性系后代的SSR位点发生变异的位点数介于6~15个之间, 变异频率介于11.76%~29.41%; ‘陇春21号’无性系后代的39个可扩增条带的SSR位点上, 7个无性系后代材料的SSR位点发

生变异的位点数介于5~15个之间, 变异频率介于12.82%~38.46% (表1)。

(4)同一SSR位点在同一基因型的无性系后代中的变异表现一致, 即在所有的无性系后代中表现扩增片段迁移率变大或变小, 但变异扩增片段的迁移率因SSR位点不同而有差异; 在有的SSR位点上, 变异扩增片段的迁移率相同(图1-b), 而在有的SSR位点上, 变异扩增片段的迁移率不相同(图1-a); 在不同基因型无性系后代中的遗传变异表现不同, 有的SSR位点在3个基因型的无性系后代中表现出一一致的变异(扩增片段迁移率变大或变小), 而有的SSR位点在3个基因型的无性系后代中表现出不一致的变异(扩增片段迁移率在有的无性系后代中变大, 而在有的中表现变小)。统计3个基因型无性系后代中能产生扩增条带并表现有差异的18个SSR位点可以看出, 表现一致的变异位点有11个, 不一致的变异位点有7个。

## 讨 论

幼胚培养可以引起小麦农艺性状和生理生化特性的变异(Jain 2001; 韦彦余等2004)。本文用SSR分子标记技术从DNA水平上也表明, 通过幼

表1 不同基因型无性系 SSR 位点的变异  
Table 1 Somaclonal variation on SSR loci of different somaclones from the same genotype

基因型	无性系 R5	SSR 位点数	变异 SSR 位点数	
			变异 SSR 位点数	变异频率 /%
‘永良4号’	1	40	5	12.50
	2	40	10	25.00
	3	40	6	15.00
	4	40	5	12.50
	5	40	7	17.50
	6	40	5	12.50
	7	40	5	12.50
	8	40	5	12.50
	9	40	6	15.00
	10	40	7	17.50
合计		400	61	15.25
‘花培9355’	11	51	11	21.59
	12	51	8	15.69
	13	51	15	29.41
	14	51	9	17.65
	15	51	10	19.61
	16	51	8	15.69
	17	51	11	21.59
	18	51	6	11.76
	19	51	7	13.73
合计		459	85	18.52
‘陇春21号’	20	39	15	38.46
	21	39	13	33.33
	22	39	13	33.33
	23	39	12	30.77
	24	39	14	35.89
	25	39	5	12.82
	26	39	9	23.08
合计		273	81	29.67

胚培养和愈伤组织继代, 可以引起小麦基因组 DNA 片段的变化, 即小片段碱基的缺失或增加、SSR 位点的缺失以及新扩增片段的出现, 这与前

人在小麦、白杨树中的研究结果(王立新等 2005; 张志清等 2006; Rahman 和 Rajora 2001)相似。

小麦体细胞无性系农艺性状变异频率与基因型有关(Larkin 等 1984)。本文用 SSR 分子标记技术得到的结果表明, 小麦体细胞无性系 SSR 位点变异频率和基因型有关, 这与前人在农艺性状研究中的结果相似。本文还观察到, 小麦体细胞无性系的不同染色体组 SSR 位点变异频率不同, b 组染色体上的 SSR 位点变异频率高于其它二个染色体组, 即 b 组染色体上的 SSR 位点为小麦体细胞无性系变异的热点位点。SSR 分析小麦遗传多样性的结果也表明, 小麦 b 组染色体上的遗传多样性高于其它二个染色体组(郭小丽等 2004)。据此可以推测, 位于 b 组染色体上的 SSR 位点可能更易受组织培养条件和培养过程的影响, 因而表现出较高的变异频率。有关这方面的研究尚少报道, 还需在大量的基因型无性系后代中进行验证。

同一基因型的不同无性系后代的农艺性状表现有异(Larkin 等 1984)。本文的结果表明, 同一基因型的不同无性系后代的 SSR 位点变异频率不同, SSR 片段迁移率也有差异。虽然 SSR 位点处于基因组的非编码区, 与农艺性状的变异并无直接关系, 但说明组织培养产生的 DNA 水平变异在不同无性系后代中是不均等的, 这种变异有利于创造类型不同的无性系, 可为选育新品种提供更多的选择机会。

总之, 在一个基因型的无性系后代中, 某一特定的 SSR 位点上的变异表现一致; 而在不同的基因型无性系后代中, 有的 SSR 位点上的变异表现为一致, 而有的 SSR 位点上则表现为不一致, 前者变异频率高于后者。其机制还不清楚。

表2 不同染色体组的 SSR 位点变异频率

Table 2 Frequency of somaclonal variation on SSR loci located on different chromosome groups

基因型	变异 SSR 位点数	a 组染色体		b 组染色体		d 组染色体	
		变异位点数	变异频率 /%	变异位点数	变异频率 /%	变异位点数	变异频率 /%
‘永良4号’ R5	29	9	31.03	15	51.72	5	17.24
‘花培9355’ R5	42	13	30.95	17	40.48	12	28.57
‘陇春21号’ R5	32	9	28.13	14	43.75	9	28.13
合计	103	31	30.10	46	44.66	26	25.24

## 参考文献

- 郭小丽, 刘冬成, 罗铮, 张爱民(2004). 我国部分优质小麦品种遗传差异的SSR标记分析. 麦类作物学报, 24 (1): 1~5
- 刘景松, 宋天君, 孙岩, 黄景华, 张宏纪, 刁艳玲, 郭强, 王广金(2006). 小麦体细胞无性系91B569的变异分析. 黑龙江农业科学, (5): 17~19
- 王立新, 颜暘, 石海波, 叶志杰(2005). 小麦体细胞无性系的DNA突变. 分子植物育种, 3 (6): 857~863
- 韦彦余, 赵民安, 王晓军(2004). 植物体细胞无性系变异在植物性状改良中的应用. 植物生理学通讯, 40 (6): 763~771
- 严学兵(2005). 披碱草属植物遗传多样性研究[博士学位论文]. 北京: 中国农业大学, 64
- 张志清, 郑有良, 魏育明, 颜泽洪, 刘虹, 王际睿, 彭学莲(2006). 小麦组织培养后代的醇溶蛋白和SSR位点的遗传变异. 植物生理学通讯, 42 (3): 489~492
- Jain MS (2001). Tissue culture-derived variation in crop improvement. Euphytica, 118: 153~166
- Larkin PJ, Ryan SA, Brettell RIS, Scowcroft WR (1984). Heritable somaclonal variation in wheat. Theor Appl Genet, 67: 443~ 455
- Rahman MH, Rajora OP (2001). Microsatellite DNA somaclonal variation in micropropagated trembling aspen (*Populus tremuloides*). Plant Cell Rep, 20: 531~536
- Röder MS, Korzun V, Wendehake K, Plaschke J, Tixier MH, Leroy P, Ganal MW (1998). A microsatellite map of wheat. Genetics, 149: 2007~2023