

# 青藏高原栽培青稞 SSR 标记遗传多样性研究<sup>\*</sup>

潘志芬<sup>1,2</sup>, 邹弈星<sup>1,2</sup>, 邓光兵<sup>1</sup>, 翟旭光<sup>1,2</sup>, 吴芳<sup>1,2</sup>, 余懋群<sup>1</sup>

(1. 中国科学院成都生物所, 四川 成都 610041;  
2. 中国科学院研究生院, 北京 100039)

**摘 要:** 利用 SSR 标记评估了 64 份青藏高原栽培青稞的遗传多样性。选择的 30 个 SSR 标记中, 22 个标记扩增良好且具有多态性, 每位点检测出的等位基因数为 2~15 个, 共检测出等位基因 132 个, 平均 6.0 个; 各多态位点检测出基因型为 2~11 种, 多态信息指数为 0.16~0.91, 平均为 0.65。这些表明青藏高原栽培青稞具有丰富的遗传多样性。同时发现, 青藏高原栽培青稞在麦芽性状、淀粉性状、病虫及裸粒等重要农艺性状存在丰富的变异, 是遗传育种的宝贵资源库。不同来源的群体材料的遗传多样性不同, 具有区域特异稀有基因。聚类分析将材料分为四组, 材料聚类与材料来源地和生长习性无相关性。聚类图显示了不同材料间的遗传距离或遗传相似程度, 可为材料选择提供参考。

**关键词:** 青藏高原; 栽培青稞; SSR 标记; 遗传多样性

**中图分类号:** Q75    **文献标识码:** A    **文章编号:** 0529-6579 (2007) 02-0082-05

青稞是我国藏族人民对裸大麦的称谓, 它对藏民的生活有重要影响。青稞不仅是藏民的主要食粮、燃料和牲畜饲料, 也是生产啤酒和保健品的原料, 为藏区人民的健康和经济发展做出了不可低估的贡献<sup>[1-2]</sup>。近年来, 由于人们发现青稞比皮大麦具有更丰富的膳食纤维、更高含量的保健组分和饲料利用价值, 因此青稞育种和利用受到了越来越多的关注<sup>[3-7]</sup>。我国的青藏高原是世界上青稞资源最丰富、种植面积最广的地区<sup>[8-10]</sup>, 但对其遗传多样性评价和利用都很薄弱, 因此, 加强现有青稞资源的研究将有利于青稞资源的保护和大力促进优质高抗青稞品种的选育和利用。

SSR 标记具有基因组分布广泛、数量丰富、多态性高、容易检测、共显性、结果稳定可靠等许多优点, 被认为是用于遗传多样性、品种鉴定、物种的系统发育、亲缘关系及起源等研究非常有效的分子标记<sup>[3-5]</sup>。目前, SSR 标记已用于大豆<sup>[6]</sup>、水稻<sup>[7]</sup>、玉米<sup>[8]</sup>等多种植物的遗传研究或辅助育种。

Saghai-Maroof 等<sup>[5]</sup>首先进行了大麦 SSR 标记的研究, 随后许多研究者进行了大麦 SSR 标记的发展和相关研究。现已发展的大麦 SSR 标记约 700 个, 已作图的微卫星标记约 300 个, 已发现近 100 个 SSR 标记与重要农艺性状联系紧密<sup>[5,9]</sup>。利用

SSR 标记进行大麦遗传多样性和种质筛选与鉴定的工作在世界许多地方都已开展, 包括德国<sup>[10]</sup>、澳大利亚<sup>[9]</sup>、中国<sup>[11]</sup>、中东地区<sup>[12]</sup>。关于中国大麦 SSR 标记遗传多样性研究的文献很有限, 还未见关于栽培大麦 SSR 标记遗传多样性的研究报道。本研究试图通过分析我国青藏高原部分栽培青稞 SSR 标记遗传多样性, 以期对具有某些优异特性的青稞品种或资源筛选、青稞资源的保护和建立辅助我国大麦品种改良的高效 SSR 分子标记奠定基础, 为重要或稀有基因资源的挖掘提供参考。

## 1 材料和方法

### 1.1 材 料

64 份栽培六棱青稞, 包括 45 份西藏青稞及 19 份四川青稞。按生长习性, 64 份材料中含 51 份春性青稞和 13 份冬性青稞, 冬性青稞全来自西藏。西藏青稞由西藏农牧科学院农科所强小林研究员提供, 四川青稞材料分别由阿坝州和甘孜州青稞研究所提供。材料收集地的海拔高度为 1 600~4 200 m (表 1)。中国春为对照。

### 1.2 方 法

1.2.1 DNA 提取 DNA 提取采用 SDS 微量提取法<sup>[13]</sup>。

<sup>\*</sup> 收稿日期: 2006-07-14  
基金项目: 国家 863 计划资助项目 (2003AA207100); 中国科学院西部之光人才培养资助项目; 科技部基础性工作专项 (2006FY110700)  
作者简介: 潘志芬 (1971 年生), 女, 博士, 助理研究员; 通讯联系人: 余懋群; E-mail: Yumq@cb.ac.cn  
(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 1 64 份青藏高原栽培青稞

Tab. 1 List of 64 cultivated hulless cultivars from Qinghai Tibet Plateau used in this study

| 收集地 | 编 号                             | 海 拔 <i>m</i> |
|-----|---------------------------------|--------------|
| 西藏  | Z01 Z03 Z04 Z05 Z06 Z07 Z08 Z09 | 2500~4000    |
|     | Z10 Z11 Z12 Z13 Z14 Z16 Z17 Z19 |              |
|     | Z20 Z21 Z22 Z23 Z24 Z25 Z26 Z27 |              |
|     | Z28 Z29 Z30 Z32 Z34 Z35 Z36 Z37 |              |
|     | Z38 Z39 Z40 Z42 Z43 Z44 Z45 Z46 |              |
|     | Z54 Z55 Z78 Z79 Z87             |              |
| 四川  | Z47 Z48 Z50 Z51 Z53 Z56 Z58 Z66 | 1600~4000    |
|     | Z67 Z71 Z73 Z74 Z75 Z76 Z77 Z81 |              |
|     | Z82 Z83 Z84                     |              |

1.2.2 SSR 分析

(1) SSR 引物选择

表 2 大麦 SSR 标记染色体位置、相连性状、引物序列和 PCR 条件

Tab. 2 Chromosome locations, linked traits, Primer sequences and PCR Procedures of barley SSRs

| SSR        | 染色体位置 | 相连性状          | PCR 程序           | SSR       | 染色体位置 | 相连性状                 | PCR 程序           |
|------------|-------|---------------|------------------|-----------|-------|----------------------|------------------|
| Elm ac0501 | 1H    | 麦芽浸提, 糖化力     | T - 50           | GMS027    | 5H    | 禾谷类包囊线虫 (Ha4)        | T - 50           |
| Bm ag0125  | 2H    | 禾谷类包囊线虫 (Ha2) | T - 55<br>T - 50 | GMS001    | 5H    | 麦芽浸提与 糖化力            | T - 50           |
| Bm ag0692  | 2H    | 麦芽浸提          | T - 50           | Bm ac0096 | 5H    | 叶锈病                  | T - 50           |
| HVM 54     | 2H    | 麦芽浸提          | T - 55           | HVDHN 9   | 5H    | mRNA for dehydrin -9 | T - 50           |
| GMS003     | 2H    | 硼耐受性          | T - 50           | HVM 11    | 6H    |                      | T - 55           |
| Bm ac0093  | 2H    | 硼耐受性          | T - 50           |           |       |                      | T - 55           |
| Bm ag0603  | 3H    | 硼耐受性          | T - 50           | Bm ag0359 | 7H    | 裸粒性状                 | T - 50           |
| HVM 33     | 3H    | 矮化性状          | T - 55           | Bm ac0167 | 7H    | 裸粒性状                 | T - 50           |
| Bm ag0006  | 3H    | 矮黄病毒病 Yd2     | T - 55           | GMS056    | 7H    |                      | T - 50           |
| Bm ac0310  | 4H    | 铝耐受性          | T - 50           | GMS046    | 7H    |                      | T - 50           |
| Elm ac0701 | 4H    | 硼耐受性          | T - 50           | Bm ag0206 | 7H    | 抗叶枯病、与 Waxy 蛋白相关     | T - 50           |
| HVRCABGA   | 4H    |               |                  | HvAMY2    | 7H    | 糖化力                  | T - 50<br>T - 55 |
| HVRCABGB   | 4H    |               | T - 55           | HvWaxy4   | 7H    | 淀粉合成酶                | T - 50           |
| HVM 40     | 4H    | 锰高效利用性        | T - 55           | HVM 04    | 7H    | 与 Waxy 白相关           | T - 55<br>T - 50 |
| HVM 67     | 4H    | 糖化力           | T - 55           | HVCM A    | 7H    | 裸粒性状                 | T - 55<br>T - 50 |
| HVM 03     | 4H    | RcaA          | T - 55           |           |       |                      |                  |

(b) PCR 扩增程序

参 照 Karakousis 等<sup>[9]</sup>, 采用 降 落 PCR (Touchdown PCR) 方法在 9700 PCR 仪上进行扩增。PCR 扩增程序 T - 55 (退火温度为 55 ~ 60℃ 的引物扩增)。

根据多态性高、与重要性状相连及每条染色体均有覆盖的原则选择了已作图定位的 SSR 标记 30 个。1H、2H、3H、4H、5H、6H、7H 染色体上分别选择了 2、5、3、7、4、1、7 个, 其中有 5 个标记未与性状建立联系, 其余 25 个分别与大麦品质性状、抗病性状、抗逆性状及生理性状相关, 标记位点与这些性状控制位点的距离小于 10 cM (表 2)<sup>[5,9,14]</sup>。引物序列由上海生物工程公司合成。

(2) PCR 扩增

PCR 反应所需试剂购自华美生物公司。

(a) PCR 反应体系

PCR 反应总体积为 25 μL, 包括: 2.5 mmol/L dNTPs 2.0 μL, 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 溶液 1.5 μL, 10 × buffer (MgCl<sub>2</sub> - Free) 2.5 μL, 5 pmol/μL 引物各 2.0 μL, 5 U μL Taq DNA 聚合酶 0.2 μL, 10 ng μL 基因组 DNA 2.0 μL 及纯水 12.8 μL。

94℃ 预变性 5 min——以 94℃ 变性 30 s, 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s 为一个循环, 退火温度从 64℃ 开始以 1℃ 的梯度降至 55℃, 退火温度为 55℃ 时循环 25 次, 其余退火温度处均循环 2 次——

最后 72 ℃终延伸 10 min, 4 ℃保存产物。

PCR扩增程序 T-50 (退火温度为 50~55 ℃的引物扩增): 退火温度从 59 ℃以 1 ℃的梯度降至 50 ℃, 其余参数与扩增程序 T-55 相同。

每对引物的具体扩增程序见表 2

(3) PCR产物检测

w=6% 的聚丙烯酰胺凝胶 (29A cryl 1Bis) 恒压 200 V 电泳 3 h, 胶片采用快速银染法染色, 电泳, 并用 Bio-Rad GDS2000凝胶成像系统进行条带分析。

快速银染法的操作步骤为: 胶片置于 w=0.1%的 AgNO<sub>3</sub> 溶液中浸泡 10 min 取出用蒸馏水快速洗两次, 然后放入盛有显影液 (2.0 g/100 mL NaOH+40 mg/100 mL Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>+100 μL 甲醛溶液) 的容器中染色, 直到出现清晰条带。

1.2.3 数据分析 利用软件 POPGENE1.01 计算遗传多样性指数, 聚类分析采用软件 NTSYSpc2.01 进行。

2 结果与分析

2.1 SSR多态性

选择的 30 对引物, 25 对引物在供试材料中都得到了良好的扩增 (见图 1), Elmac0501、HVR-CABGA、HVR-CABGB3 对引物的扩增产物在供试材料中没有差异, 其余引物都表现出多态性。22 对多态性引物位点中, 每个位点扩增的等位基因数 2~15 共扩增出等位基因 132 个, 平均 6.0 个, 其中等位基因数为 4 的位点较多, 有 8 个, 占多态位点的 37%。材料群体在各多态位点的基因型为 2~11 种, 位点 HVM33 扩增出的基因型最多。各多态位点的多态信息指数为 0.16~0.91, 位点 HVC-MA 最低,

GMS027 最高, 平均为 0.65。在 Elmac0501、HVR-CABGA、HVR-CABGB 三对无多态性引物位点中, 共扩增出四个等位基因, 3 种基因型。总之, 研究材料具有丰富的 SSR 多态性。

2.2 不同群体中 SSR遗传差异比较

地区间存在差异, 西藏材料中共发现等位基因 124 个, 平均 5.6 个; 多态信息指数为 0.19~0.91, 多态信息指数均值为 0.65。位点 GMS027 的最大, HVCMA 位点最小。四川材料中发现基因 121 个, 平均 5.1 个; 多态信息指数为 0.09~0.88 平均为 0.63, 同样也是 GMS027 的最大, HVCMA 位点最小。

各多态位点的等位基因在西藏和四川材料中的分布存在差异。位点 Bmac0310、Bmag0692、HVM11、Bmac0167、Bmac0096、HVM3、HVM40、HVM67、GMS027 扩增出仅分布在西藏群体中的稀缺基因, 其频率为 0.01~0.23。位点 Elmac0701 和 Bmag006 共有 5 个仅分布在四川群体材料中的稀缺基因; 位点 GMS001 和 Bmag0125 在西藏和四川群体中均扩出了特异的稀缺基因。总之, 在两群体中共发现 30 个与材料来源地相联系的具有区域分布的稀缺基因, 西藏材料中有 22 个, 四川材料中有 8 个, 它们在材料鉴定和开发诊断性 SSR 分子标记中具有重要意义。另外, 大多数位点各等位基因的频率分布在两群体中的趋势表现较一致, 但位点 GMS46、HVM33 和 HVM54 的等位基因的分布频率在两群体中有差异, 有的在西藏群体中为常见基因, 而在四川群体中为稀缺类型; 有的恰恰相反, 在四川群体中为常见基因, 而在西藏群体中为稀缺基因。

2.3 聚类分析

从图 2 可看出, 根据 SSR 标记多态性可将 64 份青稞材料分为四组, 即 I、II、III 和 IV。西藏和四川两群体中 50% 以上材料都集中分配在 I 组, I 组共包含了 37 份材料, 其中 23 份来自西藏, 14 份来自四川。II 组共包含了 12 份材料, 10 份西藏材料, 2 份四川材料。III 组共包含了 11 份材料, 9 份西藏材料, 2 份四川材料。IV 组仅包含了 4 份材料, 3 份西藏材料, 1 份四川材料。64 份材料中, 只有 Z56 和 Z84 遗传距离较近。这些结果表明, 基于 SSR 多态性的聚类与材料来源地区没有明显的相关性。本试验选择的 22 对多态引物能较好地将供试材料区分。不同生长习性的材料在聚类时没有明显的区别界限, 显示生长习性与所研究的 SSR 位点相关性状可能为独立性状。

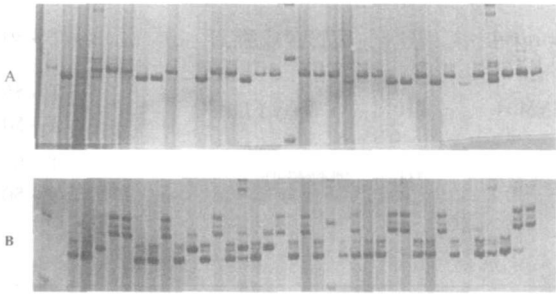


图 1 SSR 标记 PCR 产物聚丙烯酰胺凝胶电泳  
A: Hwaxy4 B: Bmac0310

Fig. 1 Polyacrylamide gelelectrophoresis of PCR products of SSR markers

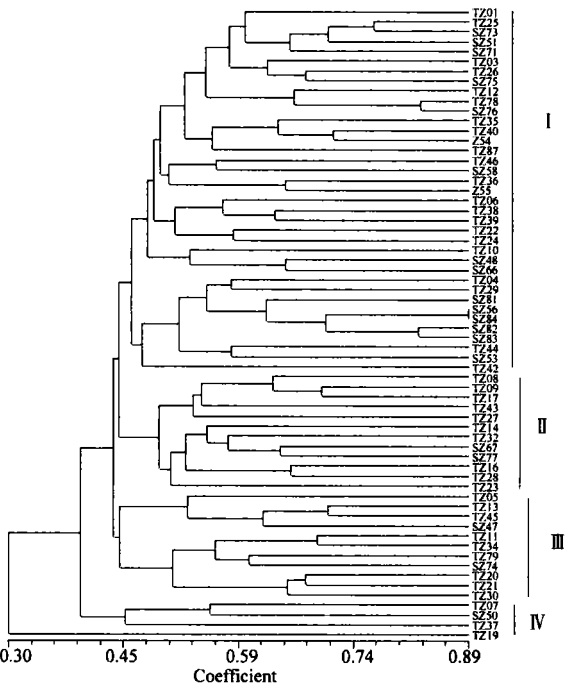


图 2 SSR 聚类图

Fig. 2 Dendrogram based on SSR polymorphism

T: Tibet S: Sichuan

2.4 重要农艺性状遗传差异分析

2.4.1 麦芽浸提性状 HvAM Y2、Bm ag0692、GM S001、HVM 54、Ebm ac0501 等 5 个标记与麦芽浸提相关。其中 HvAMY2 位点扩增不好，Ebm ac0501 在材料中存在两个等位基因，但无多态性；Bm ag06927 位点在供试材料中共发现 8 个等位基因，其中一个等位基因仅在西藏材料中发现，共发现 7 种基因型；在 GM S001 位点共扩增出 9 个等位基因（在两群体中都存在特异的稀缺基因），5 种不同的基因型；HVM 54 位点在供试材料中共发现 6 个等位基因，其中一个等位基因仅在西藏材料中发现，共发现 3 种基因型。

2.4.2 淀粉性状 位点 Bm ag0206、HVM 04 和 H waxy4 与淀粉性状相关，其中 HVM 04 扩增不好。Bm ag0206 和 H waxy4 都表现出了多态性，分别有 10 和 2 个等位基因，7 和 3 种不同的基因型。

2.4.3 病害性状 Bm ag0206 位点与叶枯病相关，在本研究材料中存在丰富的多样性，扩增出 10 个不同的等位基因和 7 种不同的基因型。Bm ac0096 与叶锈病性状相连，在材料中发现了 10 种不同的等位基因和 5 种不同的基因型。GM S027 与禾谷类包囊线虫有关，本研究材料在此位点表现出丰富的多样性，共有 15 种不同的等位基因和 10 种不同的基因型。Bm ag006 与矮黄病毒病相关，在此位点检测出 6 种等位基因和 4 种不同的基因型。

2.4.4 裸粒性状 位点 Bm ac0167、HVCMA 和 Bm ag0359 与裸粒性状相连，其中 Bm ag0359 扩增不好。在位点 Bm ac0167 发现了四个等位基因和两种基因型；HVCMA 位点处有 4 个不同的等位基因、4 种基因型。这些等位基因和不同基因型的出现，可能对我们裸大麦基因的挖掘和裸大麦育种提供丰富的基因和材料，或许对一些特色功能的大麦选育新策略提供思路。

3 讨论

有些 SSR 标记没有得到扩增产物，有的只在部分材料中能很好地扩增，这可能因为材料本身基因组的差异，目前的 PCR 反应体系和扩增循环指数不适合，需要寻找新的适宜的 PCR 反应条件才能解决这个问题。

64 份青稞材料在 22 个 SSR 标记位点处表现出多态性，各位点扩增的等位基因数 2~15 共鉴定出 132 个等位基因，每位点平均 6.0 个；遗传多样性指数为 0.16~0.91，均值为 0.65。这些结果表明青藏高原栽培青稞具有丰富的遗传多样性，与青藏高原是我国栽培大麦多样性分布中心的观点一致。

从麦芽性状、淀粉性状、病虫害及裸粒等重要农艺性状来看，所选标记位点都存在丰富的变异，表明青藏高原栽培青稞的重要农艺性状遗传基础宽广，可能蕴藏着多种不同的等位基因，是研究重要性状遗传特性、基因资源挖掘和遗传育种的宝贵资源库。

不同来源的群体材料的遗传多样性不同，西藏材料的遗传多样性比四川材料丰富，而且两种群体中都有区域特异稀有基因。因此，加强不同地区间资源的交换和配合使用，有利于增加群体材料的遗传多样性和新品种的培育。稀缺基因对于开发诊断性的分子标记和可利用价值育种材料筛选均具有非常重要意义。

聚类图显示了不同材料间的遗传距离或遗传相似程度，可为我们在遗传研究或育种亲本选择时提供参考，育种亲本选择时选择遗传距离更远的材料，得到的后代材料差异越丰富。

SSR 标记在染色体中分布很不均匀，大多数 SSR 标记在着丝粒附近区域成簇存在，有的染色体（如 1HL 和 6HS）上缺少 SSR 标记，相邻标记还有很大的空隙。在已建立性状联系的标记中，与育种密切关注的性状紧密连锁的 SSR 标记特别少。随着更多新的 SSR 标记的发展和大麦高密度 SSR 标记图谱的构建，SSR 标记将在大麦遗传学研究和育

种中发挥更大的作用。

## 参考文献:

- [1] 尼玛扎西. 青稞与高原地区的食物保障: 优势与作用 [J]. 西藏农业科技, 1998 20 20-25
- [2] 栾运芳, 何燕. 西藏青稞品质改良的趋势和对策 [J]. 大麦科学, 2004 12 1-4
- [3] WEBER J L. The informativeness of human (dG-dA)n (dG-dT)n polymorphism [J]. Genomics, 1990 7: 524-530
- [4] WANG Z, WEBER J L, ZHONG G, et al. Survey of plant short tandem DNA repeats [J]. Theor Appl Genet, 1994, 88: 1-6
- [5] SAGAHIMAROOF M A S, BAYASHEV R M, YANG G P, et al. Extraordinarily polymorphic microsatellite DNA in barley species diversity, chromosomal locations and population dynamics [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1994 91: 5466-5470
- [6] POWELL W, MORGANTE M, ANDRE C, et al. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR markers for germplasm analysis [J]. Molecular Breeding, 1996 2: 225-238
- [7] AKAGI H, YOKOZEKI Y, NAKAGI A. Microsatellite DNA markers for rice chromosomes [J]. Theor Appl Genet, 1996 93: 1071-1077
- [8] PEJIC I, AMONE M, MARSAN P, MORGANTE M, et al. Comparative analysis of genetic similarity among maize inbred lines detected by RFLPs, RAPDs, SSRs and AFLPs [J]. Theor Appl Genet, 1998 97: 1248-1255
- [9] KARAKOUSIS A, BARR A R, CHAIMERSK J, et al. Potential of SSR markers for plant breeding and variety identification in Australian barley germplasm [J]. Australian Journal of Agricultural Research, 2003 54: 1197-1210
- [10] STRUSS D, PLIESKE J. The use of microsatellite markers for detection of genetic diversity in barley populations [J]. Theor Appl Genet, 1998 97: 308-315
- [11] 冯宗云, 张义正, 张立立, 等. 应用微卫星标记研究西藏野生二棱大麦的遗传多样性及地理分化 [J]. 高技术通讯, 2003 10: 46-53
- [12] VANDIC V, HACKETT C A, NEVO E, et al. Analysis of simple sequence repeats (SSRs) in wild barley from the Fertile Crescent: associations with ecology, geography and flowering time [J]. Plant Molecular Biology, 2002 48: 511-527
- [13] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程 [M]. 北京: 科学出版社, 1998
- [14] PILLEN K, BLINDER A, KREUZKAM B, et al. Mapping new EMBe derived barley microsatellites and their use in differentiating German barley cultivars [J]. Theor Appl Genet, 2000 101: 652-660

## Genetic Diversity of SSR Markers in Cultivated Hulless Barley from Qinghai Tibet Plateau in China

PAN Zhi-fen<sup>1,2</sup>, ZHOU Yi-xing<sup>1,2</sup>, DENG Guang-bing<sup>1</sup>, ZHAI Xu-guang<sup>1,2</sup>, WU Fang<sup>1,2</sup>, YU Mao-qun<sup>1</sup>

(1. Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610041, China

2. Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

**Abstract** The genetic diversity of 64 cultivated naked barley from Qinghai Tibet Plateau was studied with 30 SSRs of known map location. Among the selected SSR markers, PCR products of 5 SSR markers were not obtained and 3 SSR marker loci were monomeric. A total of 132 alleles were identified at 22 polymorphic SSR loci. The number of alleles per locus ranged from 2 to 15, with an average of 6.0. The polymorphism information content values for the SSRs ranged from 0.16 to 0.91, with an average of 0.65. The results indicate the genetic diversity of cultivated naked barley from Qinghai Tibet Plateau is very high. At the same time, it is found the genetic diversity of SSR loci linked with important agroclimatic traits including pest, disease, naked character, starch traits and malt quality in cultivated naked barley from Qinghai Tibet Plateau is very rich, which is an important resource bank for cereal breeding. The genetic diversity in Tibet and Sichuan accessions is different and has specific genes linked with the sites of origin. Jaccard's coefficient of similarity was calculated and the lines were grouped by cluster analysis using UPGMA. A dendrogram was obtained from the analysis of the groups and five main clusters were identified. No relationship between the distribution in the dendrogram and growth habits and origins of the cultivars could be detected. Diagram obtained through cluster analysis exhibited a structuration of diversity and genetic relationship among cultivated hulless accessions. In breeding program, parents with genetically distant relationship for hybridization will increase genetic diversity of progenies.

**Key words** Qinghai Tibet Plateau; cultivated naked barley; SSR; genetic diversity