

研究报告

A Letter

适于云南小麦断穗和抗条锈病引物的 SSR-PCR 反应的体系优化

周国雁¹, 李文春², 伍少云¹

1. 云南省农业科学院生物技术与种质资源研究所, 云南省农业生物技术重点实验室, 农业部西南作物基因资源与种质创制重点实验室, 昆明, 650205
2. 云南中医学院, 昆明, 655000

✉ 通讯作者: caiyunwu205cn@yahoo.com.cn ✉ 作者

分子植物育种, 2012 年, 第 10 卷, 第 27 篇 doi: 10.5376/mpb.cn.2012.10.0027

收稿日期: 2012 年 02 月 28 日

接受日期: 2012 年 04 月 26 日

发表日期: 2012 年 06 月 12 日

这是一篇采用 Creative Commons Attribution License 进行授权的开放取阅论文。只要对本原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。

引用格式(中文):

周国雁等, 2012, 适于云南小麦断穗和抗条锈病引物的 SSR-PCR 反应的体系优化, 分子植物育种(online) Vol.10 No.27 pp.1191-1198 (doi:10.5376/mpb.cn.2012.10.0027)

引用格式(英文):

Zhou et al., 2012, Optimization of SSR-PCR Reaction System Adapted to Primers for Brittle Rachis and Stripe Rust Resistance in *Triticum aestivum ssp yunnanense* King, Fenzi Zhiwu Yuzhong (online) (Molecular Plant Breeding) Vol.10 No.27 pp.1191-1198 (doi: 10.5376/mpb.cn.2012.10.0027)

摘要 为开展云南小麦(*Triticum aestivum ssp yunnanense* King)断穗、抗条锈病基因的分子辅助标记鉴定, 选择其新鲜幼嫩的无病斑叶为材料, 研究了 PCR 反应体系中 Mg^{2+} 、dNTP、模板 DNA、引物和 Taq 酶的浓度对其断穗、抗条锈病 SSR 引物扩增结果的影响, 构建起了适宜其断穗、抗条锈病基因分子标记的最佳 PCR 反应体系, 该体系为 Mg^{2+} 1.8 mmol/L、dNTP 0.25 mmol/L、模板 DNA 30 ng、引物 0.1 μ mol/L、Taq DNA 聚合酶 1.5 U、再加 ddH₂O 补至 25 μ L。此反应体系有良好的稳定性, 将为开展云南小麦断穗和抗条锈病基因的 SSR 标记研究提供分子生物学基础。

关键词 云南铁壳麦; 断穗; 抗条锈病; SSR; PCR 反应体系优化

Optimization of SSR-PCR Reaction System Adapted to Primers for Brittle Rachis and Stripe Rust Resistance in *Triticum aestivum ssp yunnanense* King

Zhou Guoyan¹, Li Wenchun², Wu Shaoyun¹

1. Biotechnology and Germplasm Resources Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences; Yunnan Provincial Key Lab of Agricultural Biotechnology; Key Lab of Southwestern Crop Gene Resources and Germplasm Innovation, Ministry of Agriculture, Kunming, 650205

2. Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, Kunming, 655000

✉ Corresponding author, caiyunwu205cn@yahoo.com.cn; ✉ Authors

Abstract In order to appraise the molecular marker of brittle rachis gene and resistance stripe rust gene, fresh, tender and healthy leaves were employed to investigate the effect of concentration of Mg^{2+} , dNTP, template DNA, primer and the level of Taq-DNA polymerase on the brittle rachis and the result of increasing SSR primer of resistance stripe rust of *Triticum aestivum ssp yunnanense* King. The optimized SSR reaction system was established based on the following conditions: Mg^{2+} 1.8 mmol/L, dNTP 0.25 mmol/L, template DNA 30 ng, primer 0.1 μ mol/L, 1.5 U Taq-polymerase and ddH₂O was added to make a final volume of 25 μ L. This system can offer the foundation in molecular biology research of brittle rachis gene and resistance stripe rust gene in *Triticum aestivum ssp yunnanense* King due to its better stability.

Keywords *Triticum aestivum ssp yunnanense* King; Brittle rachis; Resistance of stripe rust; SSR; Optimization of PCR reaction system

研究背景

云南小麦(*Triticum aestivum ssp yunnanense* King, AABBDD, $2n=6x=42$), 也俗称云南铁壳麦, 是中国西部特有的三种小麦种质资源之一。其显著地有别于普通小麦种的特点不仅是包壳紧、不易脱粒, 因而抗穗上发芽和鸟害(曾学琦等, 1989, 云南农业科技, (5): 3-6; 董玉琛等, 1981; 伍少云和奉有壁, 2001), 而且还有成熟时小穗轴节片受外力影响

易下节位断裂的原始特性。这种断裂方式也称楔型(陈庆富, 1999; 王志清和郑有良, 2004; Watanabe et al., 2005)断裂, 是断穗发生在小穗与主穗轴连接点的上方, 断裂的小穗与自己的小穗轴相连。不过, 其断裂程度不及西藏半野生小麦的自然脱落(王志清和郑有良, 2004; 邵启全等, 1980; 陆平, 2000, 西藏农业科技, 22(2): 23-27)。虽然, 自其在 1937 年被金善宝教授发现并在 1959 年被确定为普通小麦种

云南小麦亚种(董玉琛等, 1981)以来, 国内有关研究人员曾先后对其进行了分类(董玉琛等, 1981)、抗旱性鉴定(伍少云和奉有壁, 2001)、抗条锈病鉴定(李明菊, 2004; 李明菊和伍少云, 2005; 2006)、高分子量谷蛋白亚基组成及遗传多样性(王海燕等, 2005; 2007; 杨金华等, 2007)等研究, 以及在研究定位西藏半野生小麦的断穗基因时, 将其与西藏半野生小麦比较, 得出了其控制断穗性状的基因与西藏半野生小麦的等位(陈庆富, 1999; Chen et al., 1998)或不同(陆平, 2000, 西藏农业科技, 22(2): 23-27)的结论。然而, 到目前为止, 其控制断穗行为的基因所在的染色体位置及其遗传机制仍没有统一的观点。另外, 也未见有关其抗病基因的定位研究报道, 以致因其在长期相对封闭的生产环境下种植, 缺乏与外界基因的交流而是否形成有抗病新基因等也都不清楚。

少数几个核苷酸经多次串联重复的 DNA 序列(Tautz, 1989), 即称微卫星的简单重复序列(Simple sequence repeats, SSR)的分子标记, 由于具有可重复、稳定和多变性强, 已成为了构建高度饱和的真核生物的基因图谱的标准和理想分子标记, 是进行种质资源和品种遗传多样性分析、并确定其遗传关系的重要分子技术手段(Beckmann and Soller, 1990; Katzir et al., 1996)。但由于这种微卫星或 SSR 标记技术是基于 PCR 基础上建立起来的, 因此 PCR 的各种反应条件, 如不恰当的模板 DNA、Taq 聚合酶、dNTP 以及 Mg^{2+} 的浓度和不适宜的退火温度等都会导致获得的图谱产生弥散背景、扩增出的条带不清晰或位置改变, 甚至无扩增产物等, 从而最终影响对扩增产物的准确统计与分析(迪芬巴赫 C.W, 和德维克斯勒 G.S., 1998)。所以, 在利用 SSR 标记进行各种研究和分析前, 筛选出适合目标 DNA 扩增的 PCR 反应条件是至关重要的。鉴于目前, 国内外还未见利用 SSR 分子标记开展云南小麦断穗或抗病基因定位或标记研究的报道, 我们旨在开展此项探索研究之前, 首先探讨影响 PCR 反应体系的各种主要成分浓度或用量对云南小麦断穗和抗条锈病 SSR 引物扩增结果的影响, 拟筛选出各种主要成分的最佳用量或浓度量, 建立适合云南小麦断穗和抗条锈病基因分子标记的最佳 SSR-PCR 反应体系。

1 结果与分析

1.1 $MgCl_2$ 浓度的筛选

由于 Mg^{2+} 是聚合酶—Taq DNA 的催化剂, 因

此它的浓度高低将直接影响 dNTPs 与模板 DNA 竞争结合的强弱、SSR 引物同模板 DNA 结合的效率 and 特异扩增物的产生(林万明, 1993)。所以, 合适的 Mg^{2+} 浓度是获得清晰扩增条带的首选必须考虑和优化的因素之一。

采用 1.4 mmol/L、1.8 mmol/L、2.2 mmol/L 和 2.6 mmol/L 四种不同的 $MgCl_2$ 浓度进行了 PCR 扩增实验。从图 1 可以看出, 当 Mg^{2+} 浓度在 1.4 mmol/L 时, 由于 Taq DNA 聚合酶未完全被激活, 只产生了很少的扩增产物, 且出现了弥散现象。随着 Mg^{2+} 浓度的增加催化作用也随之逐渐增强, 扩增出的产物也增多, 产物的浓度也增大, 但当到达一定程度时, 扩增产物反而减少且不清晰。所以, 我们认为在 1.8 mmol/L~2.6 mmol/L 之间的 Mg^{2+} 浓度是适合云南小麦断穗与抗条锈 SSR 反应的浓度, 且以 1.8 mmol/L 的浓度产生的条带多、清晰程度高。

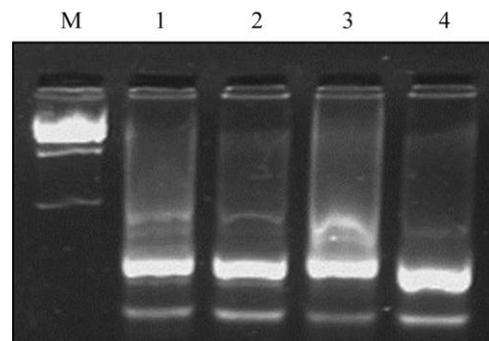


图 1 Mg^{2+} 浓度试验结果

注: M: DL2000 marker, 1~4 泳道的 Mg^{2+} 浓度分别为: 1.4 mmol/L, 1.8 mmol/L, 2.2 mmol/L 和 2.6 mmol/L

Figure 1 Result of Mg^{2+} concentration

Note: M: DL2000 marker, 1~4 Mg^{2+} concentration: 1.4 mmol/L, 1.8 mmol/L, 2.2 mmol/L and 2.6 mmol/L

1.2 dNTP 浓度的筛选

dNTP 的浓度过低, 不仅会影响扩增产物的合成效率, 甚至会因 dNTP 过早消耗而使产物单链化, 影响扩增效果; 过高则容易引起拖尾, 甚至无扩增产物。另外, 无论是过高或是过低, 都会使 Mg^{2+} 产生拮抗作用, 特别是在过低时, 这种拮抗作用更为明显。因此, 在建立 PCR 反应体系时首先应将 dNTP 的浓度确定在 20 μ mol/L~200 μ mol/L 之间(余艳等, 2003)的范围内。

本实验以 0.1 mmol/L、0.15 mmol/L、0.2 mmol/L、0.25 mmol/L、0.3 mmol/L 和 0.35 mmol/L 六种不同的 dNTP 浓度探讨了 PCR 的扩增(扩增效果如图 2)效果。图 2 表明, 在 0.1 mmol/L 的 dNTP 浓度时扩

增出的产物很少, 而在 0.2 mmol/L~0.3 mmol/L 时出现的产物最多, 并以 0.25 mmol/L 时的条带多而清晰, 在 0.35 mmol/L 时则又无扩增产物。因此, 我们认为 0.25 mmol/L 的 dNTP 浓度应是云南铁壳麦 SSR 反应的最适浓度。

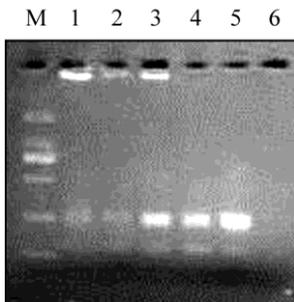


图 2 dNTP 浓度试验结果

注: M: DL2000 marker, 1~6 泳道的 dNTP 浓度分别为: 0.1 mmol/L, 0.15 mmol/L, 0.2 mmol/L, 0.25 mmol/L, 0.3 mmol/L 和 0.35 mmol/L

Figure 2 Result of dNTP concentration

Note: M: DL2000 marker, 1~6 dNTP concentration: 0.1 mmol/L, 0.15 mmol/L, 0.2 mmol/L, 0.25 mmol/L, 0.3 mmol/L and 0.35 mmol/L

1.3 引物浓度的筛选

我们设计了 0.06 $\mu\text{mol/L}$ 、0.1 $\mu\text{mol/L}$ 、0.14 $\mu\text{mol/L}$ 和 0.18 $\mu\text{mol/L}$ 四种不同的引物浓度来检验 PCR 的扩增效果(扩增结果如图 3)。从扩增出的条带多少和清晰度看, 引物浓度在 0.06 $\mu\text{mol/L}$ 以下时产生的扩增物太少, 甚至根本没有扩增物, 在 0.1 $\mu\text{mol/L}$ ~0.18 $\mu\text{mol/L}$ 之间时不但有较多的扩增物, 而且以 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 时的条带效果最好。因此,

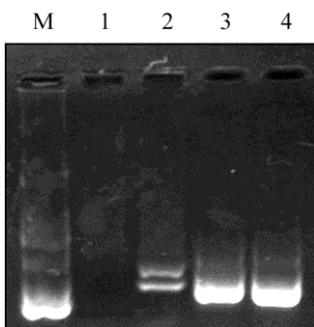


图 3 引物浓度试验结果

注: M: DL2000 marker, 1~4 泳道的引物浓度分别为: 0.06 $\mu\text{mol/L}$, 0.1 $\mu\text{mol/L}$, 0.14 $\mu\text{mol/L}$ 和 0.18 $\mu\text{mol/L}$

Figure 3 Result of Primer concentration

Note: M: DL2000 marker, 1~4 Primer concentration: 0.06 $\mu\text{mol/L}$, 0.1 $\mu\text{mol/L}$, 0.14 $\mu\text{mol/L}$ and 0.18 $\mu\text{mol/L}$

我们选用 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 的引物浓度作为云南铁壳麦 SSR 反应的最适浓度。

1.4 模板 DNA 浓度的筛选

实验中对 10 ng、20 ng、30 ng 和 40 ng 四种不同的模板 DNA 浓度进行了 PCR 扩增检验(扩增结果如图 4)。模板 DNA 浓度太低, 则分子碰撞的几率也越低, 偶然性增大, 扩增物也就不稳定; 模板浓度过高则会造成条带模糊, 出现弥散现象。从图 4 看, 30 ng 时扩增出的条带较其他浓度的都清晰。因此, 我们选用 30 ng 的模板 DNA 作为最适浓度。



图 4 DNA 浓度试验结果

注: M: Ecol- λ T14 marker, 1~5 泳道的引物浓度分别为: 30 ng, 40 ng, 40 ng, 20 ng 和 10 ng

Figure 4 Result of Taq polymerase concentration

Note: M: Ecol- λ T14 marker, 1~5 DNA concentration: 30 ng, 40 ng, 40 ng, 20 ng and 10 ng

1.5 Taq DNA 聚合酶浓度的筛选

在 PCR 反应中, Taq 酶的用量也是影响实验结果的一个重要因素。使用高浓度的 Taq 酶不但造成浪费, 而且很容易发生高错配率、产生非特异性扩增物; 过低则会导致产物的合成效率下降。在随机扩增反应中, 一般应将 Taq 酶的浓度控制在 0.5 U~5 U 之间(余艳等, 2003)。

我们通过对 0.5 U、1.0 U、1.5 U 和 2.0 U 四种不同的 Taq DNA 聚合酶浓度的 PCR 扩增(扩增结果如图 5)表明, Taq 酶浓度在 1.5 U 时扩增出的产物多且较清晰, 而低于 1.5 U 时扩增出的产物减少, 但高于 1.5 U 时又无扩增物出现。因此, 为了既不影响扩增物又避免过多的浪费, 我们选用 1.5 U 的 Taq DNA 聚合酶作为云南铁壳麦 SSR 反应的最适浓度。

1.6 建立优化的 SSR 反应体系

我们通过不同浓度的 Mg^{2+} 、dNTP、引物、模

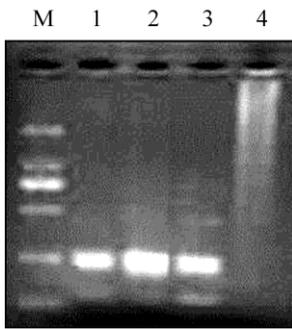


图 5 *Taq* DNA 聚合酶浓度试验结果

注: M: DL2000 marker, 1~4 泳道的引物浓度分别为: 0.5 U, 1.0 U, 1.5 U 和 2.0 U

Figure 5 Result of *Taq* polymerase concentration

Note: M: DL2000 marker, 1~4 *Taq* polymerase: 0.5 U, 1.0 U, 1.5 U and 2.0 U

板 DNA 和 *Taq* DNA 聚合酶对 PCR 扩增效果影响的反复实验、比较分析和筛选优化, 摸索出了一套适于云南小麦断穗与抗条锈病 SSR 标记反应的最佳 PCR 反应体系, 即在总体积 25 μ L 的反应体系中, 以 Mg^{2+} 1.8 mmol/L、dNTP 0.25 mmol/L、引物 0.1 μ mol/L、模板 DNA 30 ng 和 *Taq* DNA 1.5 U 为最佳浓度或用量。其扩增程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 44 个循环按照 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min、复性 1 min、72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min

进行, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。扩增结束后, 采用 2% 的琼脂糖凝胶进行电泳, 以确定利用该体系进行云南小麦抗条锈病和断穗基因的 SSR 反应是否能达到理想的扩增效果。为此, 我们用与抗条锈病基因连锁的 SSR 引物 Xgwm582 和与断穗基因连锁的 Xgwm161, 分别对 37 份云南小麦和山羊草、野生一粒和乌拉尔图小麦等共 47 份不同的实验材料进行了扩增效果检验。扩增结果表明, 在该体系下两对引物都分别在 47 份材料中扩增出了清晰、强弱明显的 DNA 条带(图 6 和图 7), 这说明利用该体系开展云南小麦抗条锈病和断穗基因的 SSR 标记研究是合适的和有效的。

2 讨论

SSR 标记虽然作为遗传多样性、物种起源、品种指纹图谱构建或个体识别和遗传辅助育种等研究的工具或技术手段已是公认的和理想的, 但是在 PCR 反应体系中使用了不适宜的 *Taq* 聚合酶、 Mg^{2+} 、dNTP、模板 DNA 和引物等成分的浓度或用量会使扩增物放大或缩小对它们的敏感性和特异性。就这些成分单独影响而言, Mg^{2+} 浓度与 *Taq* 聚合酶活性有关, 它在过低时会显著降低后者的活力, 反之则又会使非特异产物增多, 以致无法鉴别

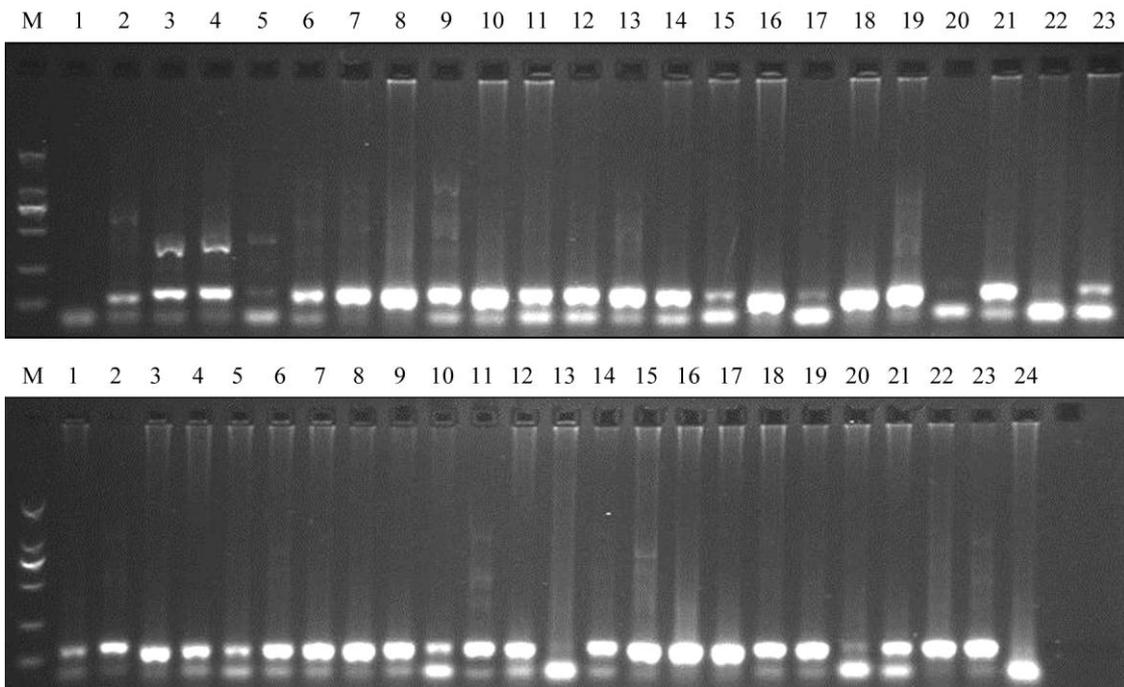


图 6 抗病引物 Xgwm582 在 47 份小麦材料中的 PCR 扩增

注: 上排 1~23 和下排 1~24 泳道模板 DNA 为 47 个不同小麦材料的基因组 DNA; M: DL2000 marker

Figure 6 PCR amplification by resistance stripe rusl primer Xgwm582 among 47 wheat accessions

Note: Upper 1~23 and lower 1~24 is 47 wheat accessions DNA; M: DL2000 marker

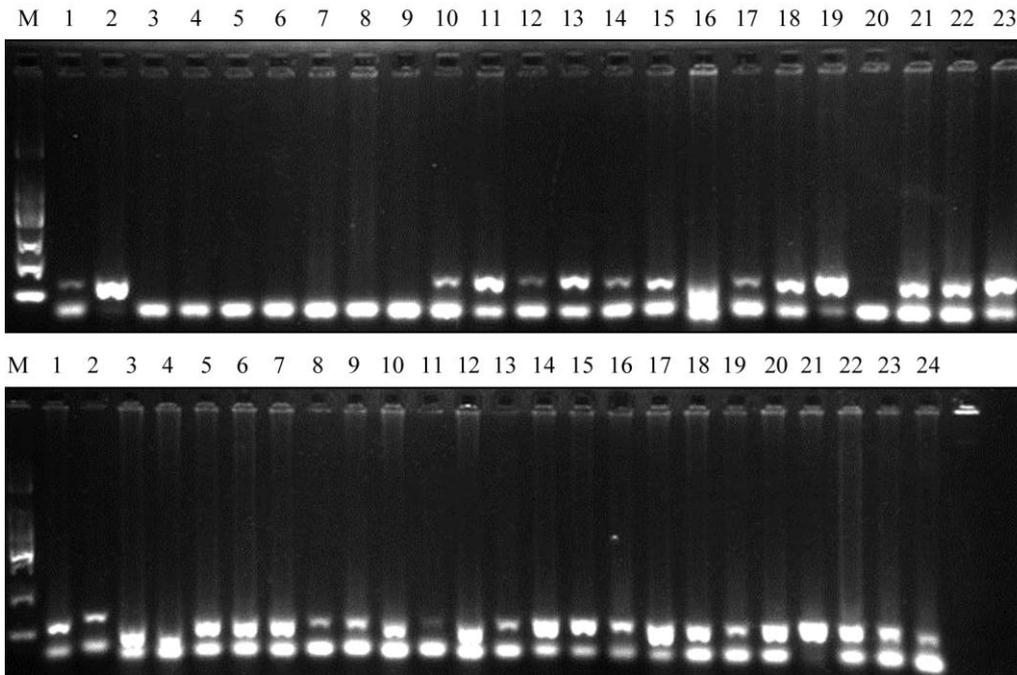


图 7 断穗引物 Xgwm161 在 47 份小麦材料中的 PCR 扩增
注: 上排 1~23 和下排 1~24 泳道模板 DNA 为 47 个不同小麦材料的基因组 DNA; M: DL2000 marker
Figure 7 PCR amplification by brittle rachis primer Xgwm161 among 47 wheat accessions
Note: Upper 1~23 and lower 1~24 is 47 wheat accessions DNA; M: DL2000 marker

真正的目的产物; dNTP 不仅是反应体系中的重要物质, 而且它在浓度过低时会使 PCR 扩增效率降低, 反过来, 它又将同 Taq 聚合酶抢夺 Mg^{2+} , 使 Mg^{2+} 浓度降低, 从而弱化 Taq 酶活性, 并使扩增量显著减少; 在反应体系中保证有足够、特异性显著且浓度适当的引物量也是利用这项工具或手段必须要考虑的因素之一, 过高的引物浓度不但会增加非特异性扩增物的数量, 而且还会使它自己形成二聚体; 而过高的模板 DNA 和 Taq 聚合酶的浓度也会导致 PCR 反应中非特异性扩增物的增加, 相反, 则使目的产物减少(Sato et al., 2005)。除此外, 这些成分之间的相互作用, 如 dNTP 同 Taq 聚合酶、以及与模板 DNA 抢夺 Mg^{2+} 等, 也都对最终获得的扩增物数量和质量有较大影响。因此, 在利用 SSR 标记这项手段开展相关的研究之前, 针对要具体研究的目标首先构建起适合对象的反应体系是利用这项工具的基本条件。

我们通过对上述这些影响 PCR 扩增效果的成分的浓度或用量进行反复试验与优化, 建立起了一套适用于云南小麦 SSR 分子标记研究的最佳反应体系。该体系不仅扩增出了清晰、强弱明显的谱带, 而且可重复性也非常好。这将为从 DNA 分子水平

上研究云南小麦的起源演化、系统分类、品种鉴别或抗病性基因发掘等提供分子生物学基础。

3 材料和方法

3.1 植物材料与试剂

本实验所用的 37 份云南小麦及对照小麦品种中国春来源于云南省作物种质中期保存库, 陕西节节麦、中东山羊草、野生一粒小麦、乌拉尔图小麦、栽培一粒小麦、野生二粒小麦、东方小麦、波兰小麦和波斯小麦等 9 份材料来源于中国农业科学院作物科学研究所。这些材料的新鲜、无病斑幼嫩叶全部采自本所试验地。本实验所用的 SSR 引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成, 10 X buffer (含镁离子浓度 18 mmol/L), dNTP 和 TaqDNA 聚合酶则购自 TaKaRa。

3.2 DNA 的提取方法

我们采用改良的 CTAB 提取法(夏铭等, 1999; 柴建芳等, 2006)提取了所有参试材料的全基因组 DNA。具体的提取过程为: 称取 1 g 左右的参试材料的新鲜叶片, 用液氮将其研磨成粉末状, 装入 1.5 mL 的 Eppendorf 管中, 再加入 CTAB 提取液(含 2% 的 CTAB, 100 mmol/L 的 TrisHCl (Ph 8.0), 20 mmol/L

的 EDTA (pH 8.0), 1.4 mol/L 的 NaCl 和 2% 的 β-巯基乙醇)充分混匀, 放进 65°C 的水浴中保温 1 h。随后, 用 12 000 rpm 的离心机分离 10 min, 将上清液吸至另一离心管中, 加入 1/2 体积的氯仿/异戊醇 (24:1), 经缓慢颠倒混匀, 用 12 000 rpm 的离心机再离心 5 min, 重新将上清液转至另一离心管, 并以满足抽提两管的量为准。然后, 在抽提形成的每一管中加入 1/10 体积的 7.5 mol/L 醋酸铵和等体积的冰乙醇(100%), 混匀, 放在-20°C 的冰箱中处理 30 min 或室温下过夜。取出, 用 12 000 rpm 的离心机再离心 15 min, 获得沉淀的 DNA, 用 70% 乙醇将该 DNA 清洗 2 次, 风干沉淀。再加入 TE 缓冲液 (含 10 ng/μL RNaseA)将其溶解后, 放入 37°C 的水浴中热处理 30 min, 取出, 以岛津 UV-120-02 型

紫外分光光度计测定其在 260 nm 和 280 nm 的吸光度值, 以确定其浓度和纯度, 并最终将其稀释为 10 ng/μg 的样品, 在低温下留存备用。

3.3 PCR 分析方法

按表 1 设计的各成分浓度方案, 在反应体系为 25 μL 的条件下, 采用 T-Gradient (Biometra, 德国)PCR 仪对 DNA 进行扩增。其扩增条件是 94°C 预变性 3 min, 44 个循环按照 94°C 变性 1 min、50°C 复性 1 min、72°C 延伸 2 min 进行, 最后 72°C 再延伸 10 min, 放在 4°C 下的低温条件保存。扩增结束后, 采用 8 μL 的电泳样量、核酸染色、2% 的琼脂糖凝胶成电泳, 随后在紫外透射仪下检测扩增出的产物结果, 照相保存并做记录。

表 1 用于优化 SSR 反应体系的影响因子

Table 1 The influencing factors used in optimizing SSR amplification system

影响因子 Factors	浓度 Concentration				
	A	B	C	D	E
Mg ²⁺ (mmol/L) ^a	1.4, 1.8, 2.2, 2.6	1.8	1.8	1.8	1.8
dNTP (mmol/L) ^a	0.2	0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3, 0.35	0.25	0.25	0.25
引物 (μmol/L)	0.1	0.1	0.06, 0.1, 0.14, 0.18	0.14	0.14
Primer (μmol/L) ^{a, b}					
DNA (ng/μL) ^{a, c}	20	20	20	10, 20, 30, 40	30
Taq 酶(U)	1	1	1	1	0.5, 1, 1.5, 2
Taq DNA polymerase dosage (U) ^a					

注: a: 母液浓度: 引物为 10 μmol/L, 10×buffer (含镁离子浓度 18 mmol/L), dNTP 浓度为 2.5 mmol/L, 模板 DNA 为 10 ng/μL; b: 引物序列: 断穗引物 Xgwm161 (前引物序列(5' to 3'), GATCGAGTGTGGCAGATGG; 后引物序列(5' to 3'), TGTGAATTACTTGGACGTGG; 退火温度 60°C); 抗病引物 Xgwm582 (前引物序列(5' to 3'), AAGCACTACGAAAATATGAC; 后引物序列(5' to 3'), TCTTAAGGGGTGTTATCATA; 退火温度 50°C); c: 模板 DNA: 来自龙陵顶芒大河头小麦(保存编号: 云 0005, XM0912); A: 这个反应体系下 Mg²⁺浓度的设了四个浓度梯度的实验; B: 这个反应体系下 dNTP 浓度的设了六个浓度梯度的实验; C: 表示这个反应体系下引物浓度的设了四个浓度梯度的实验; D: 表示这个反应体系下 DNA 浓度的设了四个浓度梯度的实验; E: 表示这个反应体系下 Taq 酶浓度的设了四个浓度梯度的实验

Note: a: Liquor concentration: primer 10 μmol/L, 10×buffer (Mg²⁺ concentration 18 mmol/L), dNTP concentration 2.5 mmol/L and template DNA concentration 10 ng/μL; b: Primer sequence: Left (5' to 3') of Xgwm161 brittle rachis primer is GATCGAGTGTGGCAGATGG and Right (5' to 3') is TGTGAATTACTTGGACGTGG (Tm is 60°C); left of Xgwm582 of resistance stripe rust primer is AAGCACTACGAAAATATGAC and Right is TCTTAAGGGGTGTTATCATA (Tm is 50°C); c: Template DNA: Long Lin Ding Mang Da He Tou Wheat (Preservation No: Yun0005, XM0912); A: The experiment of four Mg²⁺ concentration gradients in the SSR amplification system; B: The experiment of six dNTP concentration gradients in the SSR amplification system; C: The experiment of four Primer concentration gradients in the SSR amplification system; D: The experiment of four DNA concentration gradients in the SSR amplification system; E: The experiment of four Taq DNA polymerase dosage concentration gradients in the SSR amplification system

作者贡献

周国雁是本研究的实验设计与数据分析者、论文初稿的撰稿者, 李文春参与了本研究的实验设计, 是实验研究的具体执行人; 伍少云是项目研究的构思者及负责人, 指导实验方案的设计、数据分析与论文描写, 负责本文的修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

感谢云南省科技厅“云南省优质高产多抗麦类新品种选育(2010BB005)”项目、云南省农作物资源生物技术创新团队和云南省财政厅—云南省农业科学院专项对本项研究提供了资金资助, 也感谢中国农业科学院作物科学研究所李秀全老师为本项研究提供了部分种质资源材料。

参考文献

- Beckmann J.S., and Soller M., 1990, Toward a unified approach to genetic mapping of eukarotes based on sequence tagged microsatellite sites, *Biotechnology*, 8(10): 930-932 <http://dx.doi.org/10.1038/nbt1090-930> PMID:1366775
- Chai J.F., Liu X., and Jia J.Z., 2006, A rapid isolation method of wheat DNA suitable for PCR analysis, *Zhiwu Yichuan Ziyuan Xuebao (Journal of Plant Genetic Resources)*, 7(2): 246-248 (柴建芳, 刘旭, 贾继增, 2006, 一种适于 PCR 扩增的小麦基因组 DNA 快速提取法, *植物遗传资源学报*, 7(2): 246-248)
- Chen Q.F., 1999, Discussion on origin of Chinese endemic wheat, *Guizhou Nongye Kexue (Guizhou Agricultural Sciences)*, 27(1): 20-25 (陈庆富, 1999, 中国特有小麦起源探讨, *贵州农业科学*, 27(1): 20-25)
- Chen Q.F., Yen C., and Yang J.L., 1998, Chromosome location of the gene for brittle rachis in the Tibetan weederace of common wheat, *Genetic Resources and Crop Evolution*, 45: 407-410 <http://dx.doi.org/10.1023/A:1008603608879> <http://dx.doi.org/10.1023/A:1008635208146>
- Dieffenbach C.W., and Dveksler G.S., eds., Huang P.T., Yu W.Y., and Chen T.M., trans., 1998, *PCR Primer: a laboratory manual*, Science Press, Beijing, China, pp.294 (迪芬巴赫 C.W., 德维克斯勒 G.S., 主编, 黄培堂, 俞炜源, 陈添弥, 主译, 1998, *PCR 技术实验指南*, 科学出版社, 中国, 北京, pp.294)
- Dong Y.C., Zhen D.S., Qiao D.Y., Zeng X.Q., En Z.C., and Chen X.R., 1981, Expedition and investigation of *Triticum aestivum ssp. yunnanense* King, *Zuowu Xuebao (Acta Agronomica Sinica)*, 7(3): 145-151 (董玉琛, 郑殿升, 乔丹杨, 曾学琦, 恩在诚, 陈勋儒, 1981, “云南小麦” (*Triticum aestivum ssp. yunnanense* King) 的考察与研究, *作物学报*, 7(3): 145-151)
- Katzir N., Danin-Poleg Y., Tzuri G., Karchi Z., Lavi U., and Cregan P.B., 1996, Length polymorphism and homologies of microsatellites in several Cucurbitaceae species, *Theor. Appl. Genet.*, 93(8): 1282-1290 <http://dx.doi.org/10.1007/BF00223461>
- Li M.J., 2004, Current research situation on epidemic system of wheat stripe rust in Yunnan Province, *Zhiwu Baohu (Plant Protection)*, 30(3): 30-33 (李明菊, 2004, 云南省小麦条锈病流行体系的研究现状, *植物保护*, 30(3): 30-33)
- Li M.J., and Wu S.Y., 2005, Preliminary study of resistance to stripe rust of germplasm resources including local common wheats of high protein and endemic wheat in Yunnan, *Mailei Zuowu Xuebao (Journal of Triticeae Crops)*, 25(3): 23-26 (李明菊, 伍少云, 2005, 云南省高蛋白地方小麦及“铁壳麦”种质资源抗条锈性的初步研究, *麦类作物学报*, 25(3): 23-26)
- Li M.J., and Wu S.Y., 2006, Assessment to adult-plant resistance to stripe rust of parent materials for quality improvement of wheat germplasms in Yunnan, *Mailei Zuowu Xuebao (Journal of Triticeae Crops)*, 26(1): 113-116 (李明菊, 伍少云, 2006, 云南小麦品质改良亲缘材料成株期抗条锈性评价, *麦类作物学报*, 26(1): 113-116)
- Lin W.M., eds., 1993, *PCR technology operation and application guide*, Surgeon Publishing House, Beijing, China, pp.7-14 (林万明, 编著, 1993, *PCR 技术操作和应用指南*, 人民军医出版社, 中国, 北京, pp.7-14)
- Sato S., Isobe S., Asamizu E., Ohmido N., Kataoka R., Nakamura Y., Kaneko T., Sakurai N., Okumura K., Klimenko I., Sasamoto S., Wada T., Watanabe A., Kohara M., Fujishiro T., and Tabata S., 2005, Comprehensive structural analysis of the genome of red clover (*Trifolium pratense* L.), *DNA Research*, 12: 301-364 <http://dx.doi.org/10.1093/dnares/dsi018> PMID:16769692
- Shao Q.Q., Li C.S., and Basang C.R., 1980, Semi-wild wheat from Xizang (Tibet), *Yichuan Xuebao (Acta Genetica Sinica)*, 7(2): 149-156 (邵启全, 李长森, 巴桑次仁, 1980, 西藏半野生小麦, *遗传学报*, 7(2): 149-156)
- Tautz D., 1989, Hypervariability of simple sequence as a general source for polymorphic DNA markers, *Nucleic Acids Res.*, 17(16): 6463-6471 <http://dx.doi.org/10.1093/nar/17.16.6463> PMID:2780284 PMCid:318341
- Wang H.Y., Wang X.E., Chen P.D., and Liu D.J., 2005, Allelic variation and genetic diversity at HMW glutenin subunits loci in Yunnan, Tibetan and Xinjiang wheat, *Zhongguo Nongye Kexue (Scientia Agricultura Sinica)*, 38(2): 228-233 (王海燕, 王秀娥, 陈佩度, 刘大钧, 2005, 云南、西藏与新疆小麦高分子量谷蛋白亚基组成及遗传多样性分析, *中国农业科学*, 38(2): 228-233)
- Wang H.Y., Wang X.E., Chen P.D., and Liu D.J., 2007, Assessment of genetic diversity of Yunnan, Tibetan, and Xinjiang wheat using SSR markers, *Yichuan Xuebao (Journal of Genetics and Genomics)*, 34(7): 623-633 (王海燕, 王秀娥, 陈佩度, 刘大钧, 2007, 利用 SSR 标记分析云南、西藏和新疆小麦的遗传多样性, *遗传学报*, 34(7): 623-633)
- Wang Z.Q., and Zheng Y.L., 2004, Advances on the study of Tibetanum semi-wild wheat, *Mailei Zuowu Xuebao (Journal of Triticeae Crops)*, 24(4): 133-135 (王志清, 郑有良, 2004, 西藏半野生小麦研究进展, *麦类作物学报*, 24(4): 133-135)
- Watanabe N., Takesada N., Fujii Y., and Martinek P., 2005, Comparative Mapping of Genes for Brittle Rachis in *Triticum* and *Aegilops*, *Czech J. Genet. Plant Breed.*, 41(2):

39-44

- Wu S.Y., and Feng Y.B., 2001, Preliminary study on drought resistance of *Triticum aestivum* ssp *yunnanense* King, *Zhiwu Yichuan Ziyuan Kexue (Journal of Plant Genetic Resources)*, 2(2): 27-30 (伍少云, 奉有璧, 2001, 云南小麦(*Triticum aestivum* ssp *yunnanense* King)的抗旱性鉴定研究初报, *植物遗传资源科学*, 2(2): 27-30)
- Xia M., Luan F.S., and Li J.P., 1999, Study on influencing factors of RAPD and optimization of RAPD experiment conditions, *Zhiwu Yanjiu (Bulletin of Botanical Research)*, 19(2): 195-200 (夏铭, 栾非时, 李景鹏, 1999, RAPD 影响因素的研究及实验条件的优化进展, *植物研究*, 19(2): 195-200)
- Yang J.H., Yu Y.X., Liu L., Cheng G., Hu Y.X., 2007, HMW-GS compositions and genetic diversities in *Triticum aestivum* ssp *yunnanense* King, *Zhiwu Yichuan Ziyuan Xuebao (Journal of Plant Genetic Resources)*, 8(3): 275-279 (杨金华, 于亚雄, 刘丽, 程耿, 胡银星, 2007, 云南铁壳麦高分子量麦谷蛋白亚基组成及其遗传多样性分析, *植物遗传资源学报*, 8(3): 275-279)
- Yu Y., Chen H.S., and Ge X.J., 2003, Optimization of experiment conditions and primer screening with ISSR markers, *Redai Yaredai Zhiwu Xuebao (Journal of Tropical and Subtropical Botany)*, 11(1): 15-19 (余艳, 陈海山, 葛学军, 2003, 简单重复序列区间(ISSR)引物反应条件优化与筛选, *热带亚热带植物学报*, 11(1): 15-19)