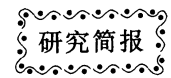


DOI: 10.3724/SP.J.1006.2009.00958



玉米简单重复序列不对等交换的热点区域定位

汤继华^{1,2} 马西青¹ 滕文涛¹ 严建兵¹ 戴景瑞¹ 李建生^{1,*}

¹ 中国农业大学国家玉米改良中心, 北京 100193; ² 河南农业大学农学院, 河南郑州 450002

摘要: 生物基因组中简单重复序列的多态性是同源染色体不对等交换的结果之一, 因此明确不对等交换的热点区域具有重要的理论意义。利用来源于优良玉米杂交种豫玉 22 的一套重组近交系(RIL)群体, 对其遗传组成进行了 SSR 标记分析, 发现 40 个不对等交换的 SSR 标记, 不对等交换在群体间发生的概率介于 0.34%~14.63% 之间, 每世代发生的频率为 10^{-2} ~ 10^{-1} , 其中 (AG)_n 重复的标记占发生不对等交换总标记的 58.3%。有 31 个不对等交换标记分布于染色体上的 11 个热点区域, 位于第 9 染色体以外的其他染色体上, 其中第 3 和第 5 染色体上各分布 2 个不对等交换的热点区域。

关键词: 玉米; 简单重复序列(SSR); 不对等交换; 热点区域

Mapping Unequal Crossing over Hotspot Region of Simple Sequence Repeat in Maize

TANG Ji-Hua^{1,2}, MA Xi-Qing¹, TENG Wen-Tao¹, YAN Jian-Bing¹, DAI Jing-Rui¹, and LI Jian-Sheng^{1,*}

¹ National Maize Improvement Center of China, China Agricultural University, Beijing 100193, China; ² College of Agronomy, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China

Abstract: The polymorphism of simple sequence repeat (SSR) in biological genome is one result of unequal crossing over for homologous chromosomes; therefore it has theoretical importance in clarifying the hotspot regions of unequal crossing over. A set of recombinant inbred lines (RILs) population that derived from an elite hybrid Yuyu 22 was used in this study, its genetic components of the population was analyzed by means of SSR analysis, and 40 unequal crossing over SSR markers were found. The frequency of the unequal crossing over in the RIL population was 0.34–14.63%, with 10^{-2} – 10^{-1} frequency per generation, and the (AG)_n repeat SSR markers accounted for 58.3%. There were 31 unequal crossing over markers locating on 11 chromosomal hotspot regions, distributing on 10 chromosomes except for chromosome 9, including two unequal crossing over hotspot regions each in chromosomes 3 and 5.

Keywords: Maize; Simple sequence repeat (SSR); Unequal crossing over; Hotspot region

减数分裂过程中的遗传重组是生物多样性的基础^[1]。在高等生物的减数分裂过程中, 联合的同源染色体双链断裂, 非姊妹染色单体发生对等交换, 重新形成两条等长的同源染色体, 不会造成染色体结构的变异。但是 Sturtevant 等^[2-3]在研究果蝇棒眼遗传过程中, 发现了非姊妹染色单体之间的不对等交换现象, 其后在人类^[4-5]、玉米^[6-7]、家鼠^[8]等生物中都发现了不对等交换, 证明不对等交换在生物减数分裂过程中的普遍性。不对等交换的结果往往引起基因组的扩增与删除, 形成顺序排列的多基因家族^[9-10], 造成基因组的重复, 如在拟南芥基因组中有高达 18% 基因属于顺序排列的多基因家族^[11]。

在真核生物的基因组中存在着大量的重复序列, 而简单重复序列是高等生物基因组中的一种高度重复序列^[12-13], 多数存在于结构基因的两侧, 在不同基因型的个体间存在丰富的遗传变异, 这种遗传变异是高等生物减数分裂过程中经过不对等交换或者 DNA 的滑动复制产生, 并在长期进化过程中累积形成的^[14-15]。研究表明不对等交换往往发生在染色体的某些特定区域, 具有染色体特异片段发生的倾向性^[16-17]。

玉米经过长期的自然选择与人工驯化, 形成了丰富的遗传变异, 是经典遗传学研究的一个模式植物。在玉米基因组中存在大量的简单重复序列, 而且不同位点的简

本研究由国家高技术研究发展计划(863 计划)重大专项(2006AA100103)资助。

* 通讯作者(Corresponding author): 李建生, E-mail: lijiansheng@cau.edu.cn; Tel: 010-62732422

第一作者联系方式: E-mail: tangjihua1@163.com; Tel: 0371-63558127

Received(收稿日期): 2008-09-19; Accepted(接受日期): 2008-12-15.

单重复序列在自然群体和人工选择群体中的多态性存在明显的差异, 暗示不同位点的简单重复序列在形成过程中发生交换的频率可能存在一定的差异。本研究利用玉米的一套重组近交系群体, 借助 SSR 标记对重组近交系群体的遗传组成, 分析了玉米基因组中简单重复序列不对等交换发生的热点区域。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以优良玉米杂交组合(综 3×87-1)为基础材料, 随机从其 F₂ 群体挑选 300 单株, 经连续多代随机自交, 构建了一套包含 294 个家系的 F₇ 代重组近交系(RIL)群体。

1.2 SSR 分析与遗传连锁图谱的构建

2002 年春在北京于大喇叭口期采集 RIL 群体的叶片, -80℃ 冰箱中保存, 用于 DNA 提取^[18]。从玉米基因组数据库中挑选均匀覆盖玉米基因组的 846 对 SSR 引物, 对亲本进行多态性筛选, 选择其中 283 对共显性的 SSR 标记对群体的遗传组成进行分析。将来源于综 3 的带型记为 1, 87-1 的带型记为 2, 缺失的带型记为 0, 不同于双亲的带型即不对等交换产生的新带型记为 4。将某个标记发生不对等交换的重组近交系个数占群体总数的百分数定义为该标记发生不对等交换的群体比例, 每世代交换的频率定义为不对等交换的群体比例除以群体自交的代数。利用 Mapmaker version 3.0 构建 RIL 群体的遗传连锁图 (LOD>3.0)^[19]。

2 结果与分析

2.1 群体的遗传组成与连锁图谱构建

利用 263 个在亲本间存在多态性的 SSR 标记对 RIL 群体的遗传组成进行分析, 发现来源于亲本综 3 的纯合位点在 26.85%~94.86% 之间, 平均为 49.97%; 来源于亲本 87-1 的纯合位点在 5.14%~73.15% 之间, 平均为 50.03%, 即双亲染色体同源位点的分离整体上符合 1:1 的理论比例, 且群体的基因型组成呈正态分布, 证明该群体是来自豫玉 22 号的一个随机分离的群体。在 263 个多态性标记中, 群体等位基因符合 1:1 分离的标记位点 197 个, 偏分离的标记位点 66 个(占 25.1%, $P<0.05$), 偏向综 3、87-1 的位点分别有 37 和 29 个, 分布在整个基因组的 10 条染色体上, 其中第 1 和第 2 染色体上大部分标记位点等位基因频率偏向 87-1, 第 3 和第 7 条染色体偏向综 3, 且呈偏分离热点区域, 该结论与利用 F₂ 群体发现的偏分离热点区域多数相同^[20]。

利用在两亲本间存在多态性的 283 个 SSR 标记对 RIL 群体进行分析, 构建了包含 263 个 SSR 标记的遗传连锁图, 覆盖了玉米的 10 条染色体, 总长度为 2 360.8 cM, 平均间距 9.0 cM^[21]。

2.2 不对等交换的标记及其出现的频率

由于染色体在减数分裂过程中往往会通过不对等交

换形成新的多态性, 因此在 SSR 标记分析过程中, 往往出现不同于双亲的多态性, 如 bnlgl805 的扩增带型(图 1)。在本研究所利用的 263 个 SSR 标记中, 有 40 个 SSR 标记出现了因不对等交换产生的新的多态性(表 1), 占所利用标记的 15.2%, 这些标记在群体内发生不对等交换的概率在 0.34%~14.36% 之间。

尽管简单重复序列可以在高等生物减数分裂过程中通过不对等交换产生, 但是不同标记位点在不同世代间发生不对等交换的频率存在明显的差异, 如本研究多数标记发生每世代不对等交换的频率介于 10^{-2} ~ 10^{-1} 之间, 其中 bnlgl805 每世代发生不对等交换的频率最高, 达到 2.872, 是一个发生高频不对等交换的标记, 依次分别是 bnlgl666、umc1155、phi213984、bnlg1811 和 bnlgl640, 每世代间发生不对等交换的频率分别为 9.52×10^{-1} 、 5.84×10^{-1} 、 3.4×10^{-1} 、 2.84×10^{-1} 和 2.72×10^{-1} , 多数标记每世代不对等交换的频率为 10^{-2} 。

2.3 玉米基因中简单重复序列不对等交换的热点区域

对发生不对等交换的标记进行分析, 发现这些标记多数集中在染色体的某些区段, 即表现一定的热点区域(unequal crossing over region, UCOR), 在本研究所发现的 40 个不对等交换的标记中, 有 31 个集中在玉米基因组中的 11 个区域(表 1), 占发生不对等交换标记的 77.5%, 其中在第 3 和第 5 染色体上分别发现了 2 个不对等交换的热点区域, 如第 1 染色体 1.03 和 1.04 区间发现有 4 个不对等交换的标记 bnlgl82、bnlg1866、bnlg2180 和 bnlgl811。在第 5 染色体上的 5.05~5.06 和 5.07 区间上分别发现了 2 个不对等交换的热点区域, 其中在 5.05~5.06 区间分布着 4 个不对等交换的标记 bnlgl2323、umc2164、umc1155 和 umc1019, 5.07 区间分布着 3 个不对等交换的标记 bnlgl306、bnlg2305 和 umc1072。尽管发生不对等交换的多数 SSR 标记存在于染色体上的一定区域, 但是在发生不对等交换的热点区域内仍然分布有没有发生交换的 SSR 标记, 只有 5.07 区的 3 个标记和 8.05 区的 2 个标记之间没有发现有不对等交换的标记。说明不对等交换的热点区域只是存在某一个染色体区间, 而在该区间并不是每一个标记均有较高的不对等交换的频率。此外在发生不对等交换的 40 个 SSR 标记中, (AG)_n 重复的标记占发生不对等交换标记的 58.3%(21/36), (CT)_n 重复的标记占 5.6%(2/36), 其他简单重复序列只发现 1 个标记发生不对等交换。

3 讨论

高等生物减数分裂过程中的非姊妹染色单体交换, 促进了遗传物质的重组, 是物种进化的一种原动力。不对等交换在高等生物的减数分裂过程中普遍存在, 不仅造成了遗传物质的重组, 同时造成了基因组的扩增或删除, 形成串联排列的基因家族, 丰富了基因的类型, 加速了物种进化的进程, 如人类基因中的 rDNA、高等植物中抗病

表 1 检测到的不对等交换 SSR 标记及其交换频率
Table 1 Unequal crossing over SSR markers detected in RIL population and its frequency

染色体位点 Chrom. locus	SSR 引物 SSR marker	重复序列 Motif	群体比例 Rate in population (%)	不对等交换频率 UCO frequency	染色体位点 Chrom. locus	SSR 引物 SSR marker	重复序列 Motif	群体比例 Rate in Population (%)	不对等交换频率 UCO frequency
1.03	bnlg2180	(AG)n	0.34	0.068	5.06	umc1019	(CT)n	0.34	0.068
1.03	bnlg182	—	0.35	0.070	5.07	bnlg1306	(AG)n	0.68	0.136
1.03	bnlg1866	(AG)n	0.70	0.140	5.07	bnlg2305	(AG)n	0.34	0.068
1.04	bnlg1811	(AG)n	1.42	0.284	5.07	umc1072	(GGA)n	0.36	0.072
2.05	nc131	(AC)n	0.34	0.068	6.04	umc1014	(GA)n	0.34	0.068
2.05	umc1635	(GAAGG)n	0.34	0.068	6.04	phi452693	(AGCC)n	0.34	0.068
3.04	bnlg1452	(AG)n	1.02	0.204	6.05	bnlg1617	(AG)n	0.34	0.068
3.04	umc1223	(AG)n	0.34	0.068	7.03	bnlg1035	(AG)n	0.34	0.068
3.04	phi036	(AG)n	1.02	0.204	7.03	bnlg1805	(AG)n	14.36	2.872
3.04	umc1773	(GAC)n	0.34	0.068	7.04	bnlg1666	(AG)n	4.76	0.952
3.09	phi047	(ATC)n	0.34	0.068	8.03	bnlg1863	(AG)n	0.34	0.068
3.09	bnlg1257	(AG)n	0.70	0.140	8.05	umc1562	(TC)n	0.34	0.068
4.01	phi072	(AAAC)n	0.34	0.068	8.05	bnlg666	—	0.34	0.068
4.01	phi213984	(ACC)n	1.70	0.340	8.07	bnlg1823	(AG)n	0.68	0.136
4.03	umc2082	(CT)n	0.34	0.068	8.08	umc1069	(GGAGA)n	0.34	0.068
5.03	bnlg1879	(AG)n	0.68	0.136	10.02	umc1337	(TA)n	0.68	0.136
5.04	bnlg2323	(AG)n	0.35	0.070	10.03	umc2067	(CATG)n	0.34	0.068
5.05	bnlg278	—	0.35	0.070	10.03	bnlg640	—	1.36	0.272
5.05	umc2164	(CGGC)n	0.34	0.068	10.04	umc2163	(AG)n	0.34	0.068
5.05	umc1155	(AG)n	2.92	0.584	10.04	bnlg1518	(AG)n	0.34	0.068

UCO: unequal crossing over.

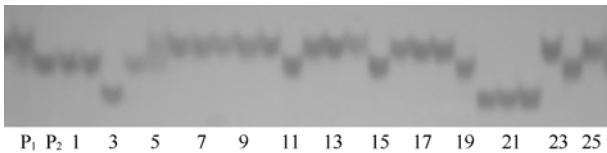


图 1 引物 bnlg1805 在 RIL 群体中的不对等交换
Fig. 1 PCR profile of unequal crossing over SSR marker bnlg1805
P₁: 综 3; P₂: 豫 87-1; 1~25: RIL 群体, 其中泳道 3、20、21 和 22 为不对等交换带型。

P₁: Zong 3; P₂: Yu 87-1; 1~25: RIL populations, among which lanes 3, 20, 21, and 22 show the band of unequal crossing over.

基因家族等。高等生物体内的部分简单重复序列同样是生物在长期进化过程中经过不对等交换形成的, 在不同基因型间存在丰富的遗传变异, 为分子生物学研究提供了可靠的标记^[22]。前人研究认为简单重复序列发生的频率在不同物种间存在较大的差异, 从果蝇的 10^{-6} ^[23]到人类的 10^{-3} ^[24]。在本研究所利用的多数 SSR 标记(84.8%)经过连续 6 代自交并没有检测到不对等交换, 只有在 15.2% 的 SSR 标记中检测到了不对等交换, 且发生的频率在 10^{-2} ~ 10^{-1} 之间。说明简单重复序列发生不对等交换的频率存在较大的差异, 这种交换可能与自然群体中的多态性变异程度有关。

在高等生物基因组中简单重复序列形成的 2 种遗传机制中, Eisen^[25]认为 DNA 滑动复制在简单重复序列形成过程中起着重要作用, 该机制往往形成单个或很少的重复单位; 不对等交换尽管发生频率较低, 但不对等交换则可以形成几个重复单位。本研究所发现的新的多态性表现为几个拷贝的变异, 因此这些新的多态性应该是通过不对等交换产生的, 并且集中在染色体的少数几个热点区域。Kermicle 等^[26]发现基因组中不对等交换的发生往往与转座子的作用有关。由于玉米基因组中存在大量的转座子和反转座子, 本研究中发现的 SSR 标记不对等交换的高频发生是否与转座子的作用有关, 还有待于进一步深入研究。

遗传图谱是生物学遗传研究的基础, 在遗传作图过程中, 由于所利用的作图软件没有考虑不对等交换的类型, 只能将不对等交换的类型作为缺失数据进行处理, 标记之间的交换概率可能被低估, 因此在开发遗传作图软件中, 应考虑不对等交换的类型, 以免人为扩大标记间的遗传距离, 造成遗传图距的膨胀。

References

[1] Civardi L, Xia Y, Edwards K J, Schnable P S, Nikolau B J. The

- relationship between genetic and physical distances in the cloned a1-sh2 interval of the *Zea mays* L. genome. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91: 8268–8272
- [2] Sturtevant A H. The effects of unequal crossing over at the bar locus in *Drosophila*. *Genetics*, 1925, 10: 117–147
- [3] Sturtevant A H, Morgan T H. Reverse mutation of the bar gene correlated with crossing over. *Science*, 1923, 57: 746–747
- [4] Tusié-Luna M T, White P C. Gene conversions and unequal crossovers between CYP21 (steroid 21-hydroxylase gene) and CYP21P involve different mechanisms. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 10796–10800
- [5] Baumer A, Dutly F, Balmer D, Riegel M, Tükel T, Krajewska-Walasek M, Schinzel A A. High level of unequal meiotic crossovers at the origin of the 22q11.2 and 7q11.23 deletions. *Human Mol Genet*, 1998, 7: 887–894
- [6] Webb C A, Richter T E, Collins N C, Nicolas M, Trick H N, Pryor T, Hulbert S H. Genetic and molecular characterization of the maize *rp3* rust resistance locus. *Genetics*, 2002, 162: 381–394
- [7] Collins N, Drake J, Ayliffe M, Sun Q, Ellis J, Hulbert S, Pryor T. Molecular characterization of the maize Rpl-D rust resistance haplotype and its mutants. *Plant Cell*, 1999, 11: 1365–1376
- [8] Silver L M, White M, Artzt K. Evidence for unequal crossing over within the mouse T/t complex. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1980, 77: 6077–6080
- [9] Adams K L, Wendel J F. Polyploidy and genome evolution in plants. *Curr Opin Plant Biol*, 2005, 8: 135–141
- [10] Lockton S, Gaut B S. Plant conserved non-coding sequences and paralogue evolution. *Trends Genet*, 2005, 21: 60–65
- [11] Zhang L, Gaut B S. Does recombination shape the distribution and evolution of tandemly arrayed genes (TAGs) in the *Arabidopsis thaliana* genome? *Genome Res*, 2003, 13: 2533–2540
- [12] Goodfellow P N. Variation in now the theme. *Nature*, 1992, 359: 777–778
- [13] Powell W, Machray G C, Provan J. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends Plant Sci*, 1996, 1: 215–222
- [14] Jeffreys A J, Wilson V, Thein S L. Hypervariable “minisatellite” regions in human DNA. *Nature*, 1985, 314: 67–73
- [15] Crow J F, William F D. Anecdotal, historical and critical commentaries on genetics: Unequal crossing over then and now. *Genetics*, 1988, 120: 1–6
- [16] Walsh J B. Persistence of tandem arrays: Implications for satellite and simple-sequence DNAs. *Genetics*, 1987, 115: 553–567
- [17] Sia E A, Jinks-Robertson S, Petes T. Genetic control of microsatellite stability. *Mutat Res*, 1997, 383: 61–70
- [18] Saghai-Maroo M A, Soliman K M, Jorgensen R A, Allard R W. Ribosomal DNA spacer length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984, 81: 8014–8018
- [19] Lincoln S, Daly M, Lander E. Mapping genetic mapping with MAPMAKER/EXP3.0. Cambridge: Whitehead Institute Technical Report, 1992
- [20] Yan J-B(严建兵), Tang H(汤华), Huang Y-Q(黄益勤), Zheng Y-L(郑用琏), Li J-S(李建生). Genetic analysis of segregation distortion of molecular markers in maize F₂ population. *Acta Genet Sin* (遗传学报), 2003, 30(10): 913–918 (in Chinese with English abstract)
- [21] Tang J H, Ma X Q, Yan J B, Teng W T, Wu W R, Dai J R, Li J S. The QTL and heterotic detection loci for plant height using an immortalized F₂ population in maize. *Chin Sci Bull*, 2007, 51(24): 2864–2869
- [22] Udupa S M, Robertson L D, Weigand F, Baum M, Kahl G. Allelic variation at (TAA)_n microsatellite loci in a world collection of chickpea (*Cicer arietinum* L.) germplasm. *Mol Gen Genet*, 1999, 261: 354–363
- [23] Schug M D, Mackay T F C, Aquadro C F. Low mutation rates of microsatellite loci in *Drosophila lanogaster*. *Nat Genet*, 1997, 15: 99–102
- [24] Xu X, Peng M, Fang Z, Xu X. The direction of microsatellite mutations is dependent upon the allele length. *Nat Genet*, 2000, 24: 396–399
- [25] Eisen J A. Mechanistic basis for microsatellite instability. In: Goldstein D B, Schlötterer C, eds. *Microsatellites: Evolution and applications*. Oxford: Oxford University Press, 1999. pp 34–48
- [26] Kermicle J K, Eggleston W B, Alleman M. Organization of paramutagenicity in R-stipples maize. *Genetics*, 1995, 141: 361–372