

张 羽, 李小刚, 王保军, 等. 常规 SNPs-PCR 在水稻遗传多样性研究中的应用[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(9): 28-32.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.09.008

常规 SNPs-PCR 在水稻遗传多样性研究中的应用

张 羽¹, 李小刚², 王保军², 王俊义², 周 凯²

(1. 陕西理工学院生物科学与工程学院, 陕西汉中 723000; 2. 陕西省汉中市农业科学研究所, 陕西汉中 723000)

摘要:探索常规 SNPs-PCR 在生物遗传多样性分析中的应用。利用 5 个功能基因的 SNP 标记和 11 对 SSR 标记, 对 112 份陕西省水稻种质资源进行聚类分析。5 个 SNP 标记聚类分析结果基本符合材料的亲缘关系, 11 对 SSR 标记聚类结果更接近材料的系谱来源。在样本量小时, 可以利用常规 SNPs-PCR 分析生物的遗传多样性, 样本量大时, 测序技术分析更方便和准确。

关键词: SNPs-PCR; 遗传多样性; SNP 标记; SSR 标记; 水稻

中图分类号: S511.032 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)09-0028-04

发生在基因组 DNA 水平上的碱基的转换/颠换、插入/缺失及重排等变化导致了生物个体之间的差异, 由此产生了 RFLP、RAPD、SSR 和 SNP 等分子标记技术, 从 DNA 水平上来分析各种变异。SNP (single nucleotide polymorphism, 简称 SNP) 即单核苷酸多态性, 属于第三代分子标记, 是许多物种基因组中最常见的变异形式, 在基因组中的分布频率很高。近年来, SNPs 在人类、拟南芥、大麦、大豆和玉米等多个物种中的高密度分布已有报道^[1-7]。2002 年, 发表了水稻籼、粳 2 个亚种的基因组序列草图^[8], 2005 年又发表了水稻基因组序列全图, 至此已完成全长 389 Mb 的水稻全基因组序列 95% 以上的测序工作^[9]。研究发现在水稻基因组中大约每几百 bp^[10-14] 甚至几十 bp 就有 1 个 SNP^[15], 表明水稻基因组中存在大量的 SNP, SNP 已经应用在水稻图位克隆、功能基因检测、辅助育种选择等方面^[16-18]。作为第二代分子标记的代表 SSR (simple sequence repeat) 即简单序列重复, 在真核生物基因组中大约每隔 10~50 kb 就存在 1 个 SSR, 在生物的遗传多样性研究中利用最广, 特别是水稻、油菜、玉米等植物在品种鉴定、新品种保护等 DNA 指纹图谱检测中都用 SSR 标记^[19-23]。在生物的遗传多样性分析中, 从理论上讲, 检测位点越多, 和实际越符合, 闫双勇等利用水稻数据库多态性, 搜索了与水稻抽穗期候选基因有关的 820 个 SNPs, 分析了它们的多样性^[24]。王佳媛等以采自四川南部麻咪泽和美姑大风顶 2 个自然保护区的 29 份野生凹叶木兰为材料, 运用在 PCR 和测序基础上的 SNPs 分子标记技术对凹叶木兰的遗传多样性进行了初步分析^[25]。王文斌等利用 2 846 个高质量的 SNPs 标记, 对 31 份玉米自交系材料进行了遗传多样性分析^[26]。Aslam 等对 32 羽来自不同种群的火鸡用 549 万个 SNPs 分析了不同种群火鸡的遗传多样性^[27]。也有将其他分

子标记和功能 SNP 标记结合进行遗传多样性研究, van Inghe-landt 等用 8 244 个 SNPs 标记和 359 个 SSR 标记分别对 1 537 个玉米自交系进行群体结构和多样性分析, 得到了基本一致的聚类结果^[28]。陈蓉等利用 110 对 SRAP 引物和 1 对影响穿心莲内酯生物合成的关键限速酶 CPS 内部存在的 1 个 SNP 位点对 103 份穿心莲样品进行遗传多样性分析^[29]。上述这些结果一般都是基于测序得到的大量 SNP 数据进行分析, 不适合于普通实验室利用, 本研究利用常规 SNPs-PCR 技术, 参考 SSR 标记对相同供试材料进行遗传多样性分析, 探索常规 SNPs-PCR 在生物遗传多样性分析中的应用。

1 材料与方法

1.1 材料

供试的 112 个水稻材料(表 1)由陕西省水稻研究所提供。

1.2 方法

1.2.1 基因组提取及 PCR 水稻基因组 DNA 采用 SDS 法提取, 并采用 1% 的琼脂糖凝胶检测基因组 DNA 的质量。

PCR 反应体系为: 2×Taq Master Mix 15 μL, 10 μmol/L 的正反引物各 1 μL, DNA 模板 1 μL, 反应总体积 30 μL, 用 ddH₂O 补足。反应程序为: 94.0℃ 预变性 5 min; 94.0℃ 变性 50 s, x℃ (视不同引物而定) 退火 50 s, 72.0℃ 延伸 1 min, 35 个循环; 最后 72.0℃ 延伸 10 min, 4℃ 保存; 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离 PCR 产物, 银染法显色拍照。

1.2.2 引物设计 本研究所用的 5 个功能基因的 SNP 标记, 包括 4 个抗稻瘟病基因位点和 1 个蜡质基因位点 (*Pigm*、*Pi9*、*Pita*、*Pib* 和 *Wx*)。SSR 引物为国家水稻数据中心网站分子标记中与育性恢复基因连锁的 11 对 RM* 标记^[30]。引物由北京奥科鼎盛生物科技有限公司合成。

1.2.3 数据处理 SSR 标记扩增统计条带时, 电泳图谱中每条扩增带代表引物的 1 对结合位点, 且被视为有效的分子标记。每对引物检测到的每条多态性带视为 1 个等位变异, 将电泳图谱中的条带 (包括弱带) 赋值为“1”, 无带时赋值为“0”, 缺失时为“9”。用 3 引物法对 SNP 位点进行扩增, 每个位点有 3 种基因型, 分别为野生型纯合体、杂合体和突变型纯合体。SNP 标记扩增统计条带时, 按基因型的等位位点进行

收稿日期: 2015-06-20

基金项目: 陕西省科技厅农业科技攻关项目 (编号: 2013K02-10-01); 陕西省科技厅农业科技创新项目 (编号: NK01-01); 陕西省科技统筹创新工程计划项目 (编号: 2011KTGC02-01)。

作者简介: 张 羽 (1968—), 女, 陕西汉中中人, 硕士, 教授, 主要从事遗传学理论与实践等教学和科研工作。E-mail: zy68169@sina.com。

表 1 供试材料类型(R 代表恢复系材料,B 代表保持系材料,C 代表常规稻)

材料	类型	材料	类型	材料	类型	材料	类型	材料	类型
R7598	R/粳	R2198	R/粳	蜀恢 527	R/粳	527 培	R/粳	佳禾 7 号	B/粳
R5759	R/粳	R5721	R/粳	蜀恢 781	R/粳	527 培-2	R/粳	D 汕 B	B/粳
R1521	R/粳	R1521-2	R/粳	蜀恢 781-1	R/粳	IR-24	R/粳	2480B	B/粳
R6563	R/粳	R2157	R/粳	内恢 182	R/粳	美泰	R/粳	美香占	C/粳
R2152	R/粳	R6563-3	R/粳	辐恢 838	R/粳	辐 74B	B/粳	银丝占	C/粳
R2152-2	R/粳	R207	R/粳	航恢 1 号	R/粳	K17	B/粳	黄丝占	C/粳
R2152-3	R/粳	R207m	R/粳	达恢 2079	R/粳	香改 B	B/粳	水晶稻	C/粳
R2152-4	R/粳	R 晚 5	R/粳	宜恢 1577	R/粳	马协 B	B/粳	香珍 2 号	C/粳
R2152-5	R/粳	R6547	R/粳	成恢 047	R/粳	红 410B	B/粳	湘晚粳 5 号	C/粳
R2021	R/粳	R57	R/粳	明恢 63	R/粳	菲改 B	B/粳	湘晚粳 3 号	C/粳
R2021-2	R/粳	R122	R/粳	明恢 78	R/粳	岗 46B	B/粳	信阳软米	C/粳
R1527	R/粳	R725	R/粳	明恢 86	R/粳	金 23B	B/粳	泰引 1 号	C/粳
R1527-2	R/粳	52 香占	R/粳	南恢 511	R/粳	协青早 B	B/粳	KDLM105	C/粳
R6563-2	R/粳	15 香占	R/粳	南恢 445	R/粳	8010B	B/粳	Tsuguake	C/粳
多泰 7582 变	R/粳	15 香占-2	R/粳	成恢 425	R/粳	优 1B	B/粳	Toride. 1	C/粳
多泰 7582 变-2	R/粳	52 香占-2	R/粳	明 6547	R/粳	D297B	B/粳	Tetep	C/粳
多选 811	R/粳	协美占	R/粳	扬稻 6 号-1	C/粳	D62B	B/粳	日本晴	C/粳
多选 811-2	R/粳	协美占-2	R/粳	扬稻 6 号-2	C/粳	中 9B	B/粳	谷梅 4 号	C/粳
多选 811-3	R/粳	多选 1 号	R/粳	多选 1 号-2	CR/粳	K18B	B/粳	培辐 758	R/粳
多选 811-4	R/粳	15 黄	R/粳	7582 多	R/粳	D 香 B	B/粳	9311	R/粳
多泰多选 811	R/粳	黄 52	R/粳	7582 多-2	R/粳	珍汕 97B	B/粳	协青早 B×9311	F ₁
多泰多选 811-2	R/粳	黄 52-2	R/粳	黄晴	R/粳	泰培 811	R/粳	75-1-127	品系
多泰多选 811-3	R/粳	黄 52-3	R/粳						

统计,相等等位点统计为“1”,不同等位点赋值为“0”,缺失时为“9”。利用 NTSYS-pc2.10e 系统软件中 DICE 法计算遗传相似系数,用 UPGMA 进行聚类分析。

2 结果与分析

2.1 基于 SNP 的聚类分析

SNP 标记分析的遗传相似系数和聚类如图 1 所示,在遗传相似系数 0.45 处将 112 份供试材料聚为 2 大类群。第一类群包括黄 52、52 香占、R2152、红 410B 等 109 个材料,第二类群只有成恢 047、日本晴和扬稻 6 号-1 等 3 个材料。第一大类群在遗传相似系数 0.55 处又将红 410B 和其他材料分开,因为红 410B 为红米材料。SNP 聚类显示首先将不同水稻类型的材料聚在一起,如将亲缘关系相近的材料如粳稻类大致聚在一起,其次将恢复系材料基本聚在一起,将保持系材料大致聚在一起。

2.2 基于 SSR 的聚类分析

SSR 标记分析的遗传相似系数和聚类如图 2,在遗传相似系数 0.11 处将 112 份供试材料聚为 2 大类群。第一类群包括黄 52、52 香占、R2152、D297B 等 111 个材料,第二类群只有扬稻 6 号-1 这 1 个材料,扬稻 6 号-1 为扬稻 4 号×3021 杂交后代经辐照处理选育而成。第一大类群在遗传相似系数 0.33 处又将 111 个材料分为 2 大亚群,第一亚群包括 109 个材料,第二亚群只有 8010B 和 D297B 2 个材料,它们同为选育的保持系中间材料。4 个粳稻材料 Tetep、日本晴、Tsuguake 与 Toride 1,保持系材料,恢复系材料,亲缘关系相近的材料黄 52 与黄 52-2 等都大致聚合在了一起。

3 讨论

112 份供试水稻材料中,有恢复系材料、保持系材料及常规种材料,SNP 聚类时虽然只统计了 5 个功能基因的 SNP 产生的 10 个等位点,但从聚类结果看,与系谱来源较一致,将亲缘关系近的材料大致聚在了一起。11 对 SSR 标记检测到 51 个等位变异,比 SNP 多统计了 41 个数据,因此,SSR 标记聚类比 SNP 聚类详细,更贴近系谱来源。作为第三代分子标记的 SNP,因其在基因组中数量多、分布密度高、在分析过程中不需要根据片段大小分带等特点,可以大规模地高度自动化完成,因此,可以 1 次检测多个 SNP 位点,适合大样本量生物的遗传多样性分析。常规 SNPs-PCR 通常用来进行基因分型研究,虽然在普通实验室用常规 PCR 方法 1 次只能检测单个 SNP 位点,产生 1 条带,但由于 SNP 中有些 SNP 位点与功能基因紧密连锁,所以,样本量少时,可以选用研究过的功能 SNP 标记进行遗传多样性分析。作为第二代分子标记的 SSR 标记由于一次 PCR 能在不同材料及同一材料中产生多个条带,多态性信息含量高,适合生物的遗传多样性分析。SSR 多分布在着丝粒、端粒、内含子及 3' UTR 区等,多数为基因的非功能标记,如果和功能 SNP 标记结合使用效果会更好。

参考文献:

[1] Sachidanandam R, Weissman D, Schmidt S C, et al. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms[J]. Nature, 2001, 409(6822): 928-933.

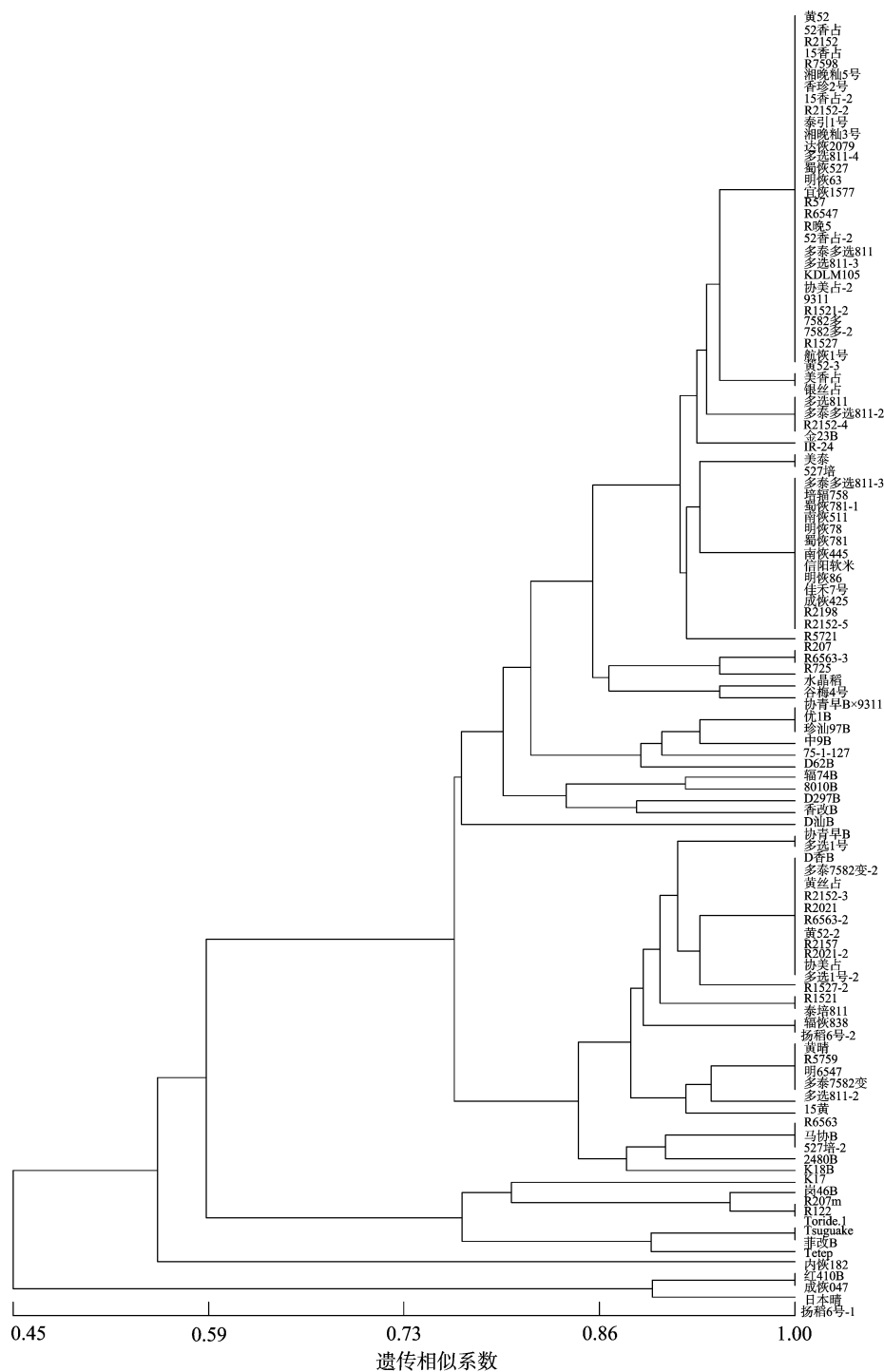


图1 基于 SNP 标记的遗传相似系数数据构建的112份水稻材料的聚类分析

- [2] Lindblad – Toh K, Winchester E, Daly M J, et al. Large – scale discovery and genotyping of single – nucleotide polymorphisms in the mouse[J]. Nature Genetics,2000,24(4) :381 – 386.
- [3] Cho R J, Mindrinos M, Richards D R, et al. Genome – wide mapping with biallelic markers in *Arabidopsis thaliana* [J]. Nature Genetics, 1999,23(2) :203 – 207.
- [4] Kanazin V, Talbert H, See D, et al. Discovery and assay of single – nucleotide polymorphisms in barley (*Hordeum vulgare*) [J]. Plant Molecular Biology,2002,48(5/6) :529 – 537.
- [5] Zhu Y L, Song Q J, Hyten D L, et al. Single – nucleotide polymorphisms in soybean[J]. Genetics,2003,163(3) :1123 – 1134.
- [6] Morales M, Roig E, Monforte A J, et al. Single – nucleotide polymorphisms detected in expressed sequence tags of melon (*Cucumis melo* L.) [J]. Genome,2004,47(2) :352 – 360.
- [7] Batley J, Barker G, O'Sullivan H, et al. Mining for single nucleotide polymorphisms and insertions/deletions in maize expressed sequence tag data [J]. Plant Physiology,2003,132(1) :84 – 91.
- [8] Goff S A, Ricke D, Lan T H, et al. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*) [J]. Science, 2002, 296(5565) :92 – 100.

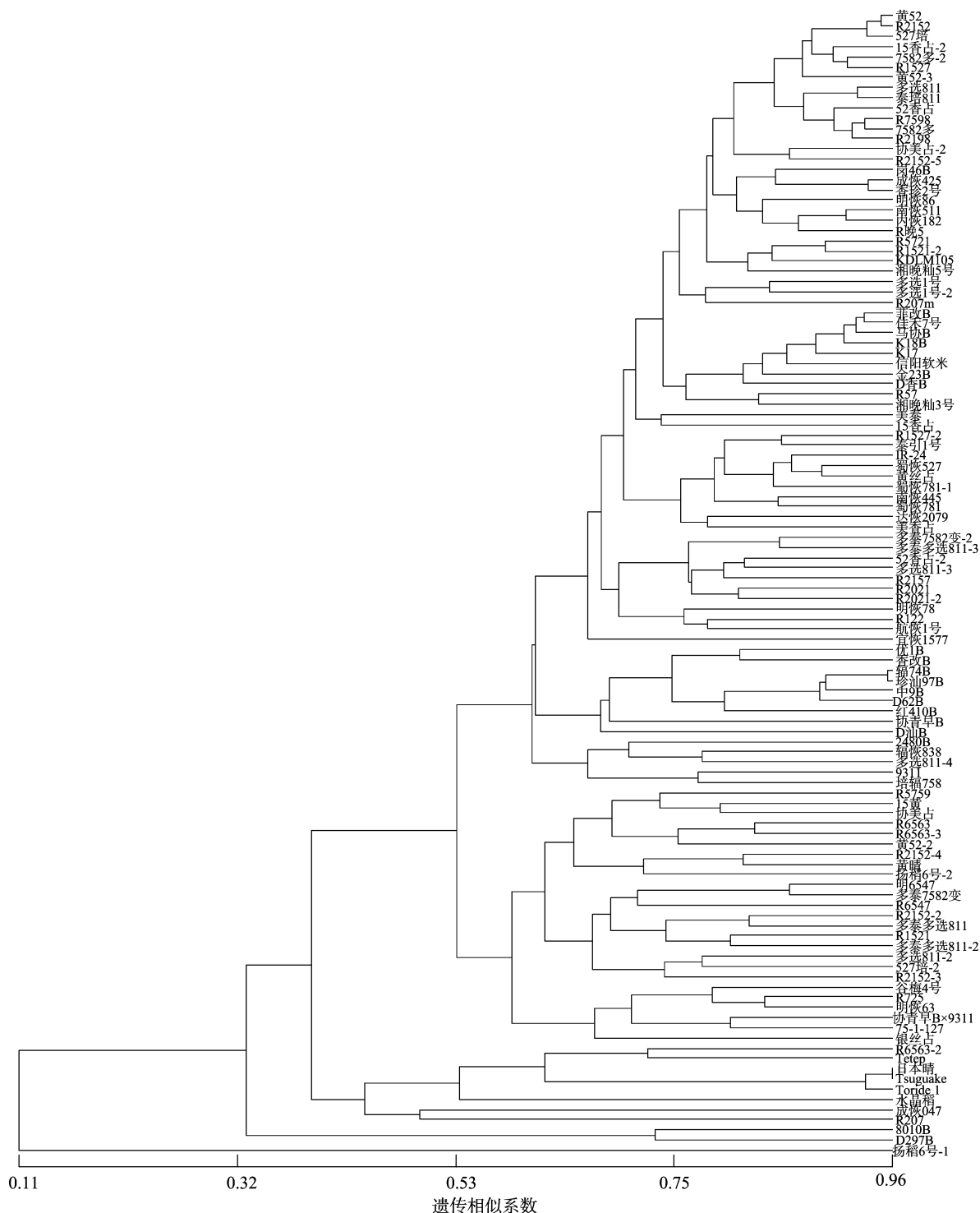


图2 基于 SSR 标记的遗传相似系数数据构建的112份水稻材料的聚类分析

- [9] Project, International Rice Genome Sequencing. The map - based sequence of the rice genome[J]. Nature,2005,436(7052):793 - 800.
- [10] Feltus F A, Wan J, Schulze S R, et al. An SNP resource for rice genetics and breeding based on subspecies indica and japonica genome alignments[J]. Genome Research,2004,14(9):1812 - 1819.
- [11] Yu J, Hu S N, Wang J, et al. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*) [J]. Science,2002,296(5565):79 - 92.
- [12] Feng Q, Zhang Y J, Hao P, et al. Sequence and analysis of rice chromosome 4[J]. Nature,2002,420(6913):316 - 320.

- [13] Li C, Zhang Y, Ying K, et al. Sequence variations of simple sequence repeats on chromosome - 4 in two subspecies of the Asian cultivated rice [J]. Theoretical and Applied Genetics,2004,108(3):392 - 400.
- [14] Shen Y J, Jiang H, Jin J P, et al. Development of genome - wide DNA polymorphism database for map - based cloning of rice genes [J]. Plant Physiology,2004,135(3):1198 - 1205.

李青燕,陈向东,董娜,等. 利用分子标记建立杂交小麦亲本分子指纹图谱[J]. 江苏农业科学,2016,44(9):32-34.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.09.009

利用分子标记建立杂交小麦亲本分子指纹图谱

李青燕,陈向东,董娜,李淦,茹振钢

(河南科技学院小麦中心/河南省高等学校作物分子育种重点开放实验室/现代生物育种河南省协同创新中心,河南新乡 453003)

摘要:表达序列标签-微卫星 DNA(EST-SSR)、序列标志位点(STS)是基于特异引物 PCR 技术的分子标记,具有共显性遗传、位点数量多、多态性高、稳定性好等优点,广泛地应用于指纹图谱构建、品种鉴定等方面。选用小麦低温敏雄性不育系 BNS 和来自不同生态区的 7 个小麦品种(系),从 192 对引物中筛选出条带清晰、多态性丰富、覆盖小麦所有染色体的 21 对引物,在 8 个小麦品种(系)中扩增出 72 个等位位点,每个引物扩增出的位点数 2~7 个,平均 3.43 个;基因多样性指数变幅为 0.218 8~0.843 8,平均值为 0.544 3;每个引物的多态性信息含量(PIC 值)的变化范围在 0.194 8~0.824 7 之间,平均值 0.495 7。由结果可以看出,引物 SWES33、CFE11、CFE188、CFE138 扩增出来的带型多,易于进行品种的鉴定和区分,其中引物 SWES33 和 CFE11 结合起来,可以将这 8 个小麦品种区分开,这为 BNS 型杂交小麦品种的鉴定工作提供了依据。

关键词:小麦;BNS;分子标记;指纹图谱

中图分类号: S512.103.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)09-0032-03

小麦是我国主要的粮食作物之一。随着社会的进步、人们生活水平的提高,对小麦的要求变得更高,不仅要求小麦高产,而且对小麦的品质也要求达到优质。为了满足人们的需

求,育种家开始研究优质、高产的小麦品种,通过杂交等方法使优良的小麦基因集中到一起而培育高产优质的小麦品种。但是,在新品种培育过程中,含有优良基因的小麦亲本的反复利用,使小麦的遗传多样性降低,新品种之间的相似性变高,对小麦新品种的鉴定带来了很大的困难。对小麦品种鉴定和认证的传统方法是采用形态学标记,但是该方法易受外界因素的影响,结果准确性较差,随后发展的细胞学标记、生化标记也易受到各种因素的影响,直到分子标记的出现并成为一种广泛应用的方法。分子标记的方法有微卫星 DNA(simple sequence repeats,SSR)、序列标志位点(sequence tagged site,STS)、表达序列标签(expressed sequence tags,EST)、限制性片

收稿日期:2015-07-27

基金项目:河南省重大科技专项(编号:121100111400);河南省高等学校重点科研项目(编号:15A210007);河南科技学院高层次人才科研启动项目(编号:201010612007)。

作者简介:李青燕(1989—),女,河南林州人,硕士研究生,研究方向为小麦遗传育种。E-mail:kuaile5ys@163.com。

通信作者:茹振钢,教授,主要从事小麦育种研究。E-mail:rzgh@163.com。

[15] Nasu S, Suzuki J, Ohta R, et al. Search for and analysis of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in rice (*Oryza sativa*, *Oryza rufipogon*) and establishment of SNP markers[J]. DNA Research, 2002, 9(5):163-171.

[16] 潘存红,王子斌,马玉银,等. InDel 和 SNP 标记在水稻图位克隆中的应用[J]. 中国水稻科学,2007,21(5):447-453.

[17] 张羽,张晓娟,杨凤娇,等. 水稻稻瘟病抗性基因 *Pi-ta* 的 SNP 检测方法[J]. 中国水稻科学,2013,27(3):325-328.

[18] Chen H, Xie W, He H, et al. A high-density SNP genotyping array for rice biology and molecular breeding[J]. Molecular Plant, 2014, 7(3):541-553.

[19] 齐永文,张冬玲,张洪亮,等. 中国水稻选育品种遗传多样性及其近 50 年变化趋势[J]. 科学通报,2006,51(6):693-699.

[20] 杨坤,唐浩,李祥羽. 利用 DNA 指纹图谱辅助植物新品种保护的可能性[J]. 生物技术通报,2009(1):1-6.

[21] 李海渤,杨军,吕泽文,等. 甘蓝型油菜 SSR 核心引物研究[J]. 中国油料作物学报,2010,32(3):329-336.

[22] 隋光磊,于拴仓,杨金雪,等. 大白菜品种鉴定的 SSR 核心引物筛选及其应用[J]. 园艺学报,2014,41(10):2021-2034.

[23] 尹国英,杨小燕,何其波,等. 鉴定烟草种质资源 SSR 核心引物

筛选和验证[J]. 植物遗传资源学报,2013,14(5):960-965.

[24] 闫双勇,谭振波,刘学军,等. 水稻抽穗期控制候选基因的 SNP/InDel 多态性分析[J]. 分子植物育种,2005,3(3):335-341.

[25] 王佳媛,吴传芳,唐亚. 基于 SNP 分子标记的凹叶木兰遗传多样性初步研究[J]. 广西植物,2012,32(4):542-547.

[26] 王文斌,徐淑兔,高杰,等. 基于 SNP 标记的玉米自交系遗传多样性分析[J]. 玉米科学,2015,23(2):41-45.

[27] Aslam M L, Bastiaansen J W M, Elferink M G, et al. Whole genome SNP discovery and analysis of genetic diversity in Turkey (*Meleagris gallopavo*) [J]. BMC Genomics, 2012, 13(1):391.

[28] van Inghelandt D, Melchinger A E, Lebreton C, et al. Population structure and genetic diversity in a commercial maize breeding program assessed with SSR and SNP markers[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2010, 120(7):1289-1299.

[29] 陈蓉,王晓云,宋毓宁,等. 基于 SRAP 和 SNP 分子标记的国内穿心莲遗传多样性分析[J]. 中国中药杂志,2014,39(23):4559-4565.

[30] 国家水稻数据中心. 稻瘟病主效抗性基因列表 [DB/OL]. [2015-06-20]. http://www.ricedata.cn/gene/gene_pi.htm.