

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

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。

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

[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.

段长度多态性 (restriction fragment length polymorphism, RFLP)、特定序列扩增 (sequence characterized amplified regions, SCAR) 等。EST-SSR 是从 EST 序列中开发的一种新型 SSR 标记。EST-SSR 和 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。目前,很多作物如大麦^[1-2]、小麦^[3]、葡萄^[4] 等的 SSR 标记已被用于遗传作图、遗传多样性、比较作图、品种指纹图谱等研究中。另外,还有一些学者利用分子标记构建农作物的分子身份证,用于农作物品种纯度鉴定,例如聂新辉等利用 40 对引物完全区分开新陆早 51 份常规品种,并可用于构建供试品种的指纹图谱^[5];陆徐忠等采用 SSR 标记与商品信息相结合的方法构建水稻品种身份证,有利于了解品种信息,方便品种的管理等^[6];颜静宛等构建了 137 个水稻品种材料 24 个标记的分子身份证数据库^[7];李伟忠等利用 64 对 SSR 引物对 257 份玉米自交系建立了分子身份证^[8];巫桂芬等利用相关序列扩增多态性 (sequence related amplified polymorphism, SRAP)、简单重复序列区间扩增 (inter simple sequence repeat, ISSR)、SSR 标记绘制了 154 份黄麻品种基因组 DNA 分子指纹图谱^[9]。但是构建小麦分子身份证的研究很少,因此,本研究采用 EST-SSR 和 STS 分子标记,对部分 BNS 型杂交小麦亲本进行遗传多样性分析,构建小麦分子身份证,有利于小麦品种的收集和保存,同时也为育种家亲本选配提供有力依据,加速育种进程。

1 材料与方法

1.1 试验材料

选用来自不同地区的 8 份小麦材料,其种子均由河南科技学院小麦中心提供。包括黄淮地区的 BNS、周麦 18,西南地区的川麦 107,西北地区的新春 6 号,长江流域的浙丰 2 号,东北地区的小冰麦 33,国外的 CL0433 (智利)、FRA01 (法国)。

1.2 DNA 的提取

在小麦 4~5 叶期时取幼苗叶片,通过 CTAB 法提取其 DNA^[10]。

1.3 SSR 检测

本试验所用引物 SWES^[11]、CFE^[12] 和 Xmag (<http://avena.pw.usda.gov>) 均由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。对供试品种进行 PCR 扩增,PCR 扩增产物经 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (每次的点样顺序都是固定的,即品种顺序固定),电泳结束后显影。显影的方法: (1) 银染: 将其放入 600 mL 蒸馏水 + 0.6 g 硝酸银溶液中浸泡 15 min; (2) 水洗: 迅速放入蒸馏水中冲洗; (3) 显影: 放入 500 mL 蒸馏水 + 8 g NaOH + 0.3 g Na₂CO₃ + 4 mL 甲醛溶液中,直至出现带型即可。拍照并记录位点数。

1.4 数据处理

带型的记录参考颜静宛等的方法^[7],根据带型 (基因型): 记录每 1 个引物在 8 个品种 (系) 中扩增的带型,相同带型 (相同的基因型) 代号相同,不同带型 (不同的基因型),依次记作 1, 2, 3, …, *n*。

利用 PowerMarker V3.25 软件计算不同引物的基因多样性指数及多态信息含量 (PIC 值)。

1.5 小麦分子身份证的初步构建

根据带型记录电泳结果,8 个小麦品种以 BNS 作为对照品种,由对照品种扩增出的带型标记为 1,其他品种扩增出的带型,与对照品种相同的同样标记为 1,不同的标记为 2,与带型 2 不同的标记为 3,依此类推。得到 8 个小麦品种由 21 对引物扩增出的基因带型码后,按照染色体 1A、1B、1D、2A、2B、2D 等顺序依次排列,建立小麦的分子身份证。

2 结果与分析

2.1 EST-SSR 和 STS 分子标记的多态性分析

从 192 对引物中筛选出条带清晰、多态性丰富的 21 对引物。这些引物在 8 个小麦品种 (系) 中扩增出 72 个等位点,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 (表 1)。在这 21 对引物中,有 6 对引物检测到 2 个等位变异位点,有 6 对引物检测到 3 个等位变异位点,有 5 对引物检测到 4 个等位变异位点,有 3 对引物检测到 5 个等位变异位点,有 1 对引物检测到 7 个等位变异位点。

表 1 21 对引物扩增片段信息

引物名	染色体	基因多样性指数	等位基因数 (个)	PIC 值
SWES131	1A	0.531 3	3	0.468 3
CFE150	1B	0.406 3	3	0.370 6
CFE136	1D	0.687 5	4	0.629 9
Xmag3253	2A	0.429 7	2	0.337 4
SWES114	2B	0.570 3	3	0.495 6
Xmag3616	2D	0.773 4	5	0.737 3
CFE134	3A	0.718 8	4	0.667 5
CFE185	3B	0.218 8	2	0.194 8
SWES33	3D	0.750 0	5	0.711 9
CFE11	4A	0.843 8	7	0.824 7
CFE188	4B	0.687 5	4	0.629 9
CFE218	4D	0.218 8	2	0.194 8
CFE186	5A	0.656 3	3	0.581 5
SWES207	5B	0.375 0	2	0.304 7
SWES197	5D	0.687 5	4	0.629 9
CFE179	6A	0.218 8	2	0.194 8
SWES1	6B	0.625 0	3	0.554 7
SWES158	6D	0.218 8	2	0.194 8
Xmag3284	7A	0.406 3	3	0.370 6
Xmag1932	7B	0.656 3	4	0.605 0
CFE138	7D	0.750 0	5	0.711 9

2.2 基于 EST-SSR 和 STS 分子标记构建小麦品种的分子身份证

以 BNS 作为对照种,21 对引物对 BNS 扩增出来的带型都标记为 1,获得这些引物对其他品种扩增的带型码。以引物 SWES131 (图 1) 为例,第 1 条泳道 BNS 扩增出的带型标记为 1;第 2 条泳道周麦 18 扩增出的带型与 BNS 的带型不同,标记为 2;第 3、4、5、8 条泳道分别是川麦 107、新春 6 号、浙丰 2 号、小冰麦 33 扩增出的带型,与周麦 18 扩增的带型相同,同样标记为 2;第 6、7 条泳道分别是 CL0433、财富麦 (FRA01)

扩增的带型,与前 2 种带型都不同,标记为 3。依此类推,得到引物 SWES131 在 8 个小麦品种(系)中扩增的带型码是 12222332,然后获得 21 对引物在 8 个小麦品种(系)中扩增的带型码标记。同一品种在不同引物中扩增的带型码标记按照引物所在染色体 1A、1B、1D、2A、2B、2D 等顺序依次排列,获得 1 组由 21 个数字组成的分子身份证号,如川麦 107 的分子身份证号是:212222113331112121233,该分子身份证号的第 1 位数字 2 表示川麦 107 在引物 SWES131 上扩增的带型标记为 2,第 2 位数字 1 表示在引物 CFE150 上扩增的带型标记为 1(即与对照种的带型码相同),第 3 位数字 2 表示在引物 CFE136 上扩增的带型标记为 2,后面的依此类推,获得 8 个小麦品种(系)的分子身份证号(表 2)。

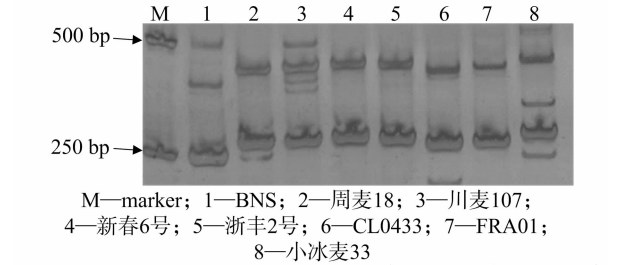


图1 EST-SSR 引物 SWES131 扩增8个品种(系)的微卫星位点

表 2 8 个小麦品种(系)的分子身份证

品种(系)	分子身份证号
BNS	11111111111111111111
周麦 18	221222212221211122122
川麦 107	212222113331112121233
新春 6 号	213223324431221131114
浙丰 2 号	212223115532313111322
CL0433	311221413621313231112
FRA01	314114413741213111145
小冰麦 33	232235214621324111115

3 讨论

分子 ID(即分子身份证)是把品种的特征数字化,即每个品种都有属于自己的 1 套字符串形式的代码,从而可以简单明了地区分品种。构建小麦分子身份证,就需要选择具有条带清晰、多态性丰富、稳定性好等特点的引物,并选择合适的分子标记方法。随着分子标记的不断发展,农作物在分子水平上的研究越来越深入^[13-14],但是由于小麦是异源六倍体,分子水平上的研究相对落后于水稻、玉米等农作物,其完整的遗传图谱尚未完成。虽然小麦的分子标记很多,但是它们在染色体上的分布不均匀,要想构建完整的遗传图谱需要不断地开发新的分子标记,采用不同的分子标记相结合的方法构建。本研究利用覆盖小麦整个基因组的 19 对 EST-SSRs 引物和 2 对 STS 引物,以小麦低温敏雄性不育系 BNS 为对照种,构建杂交小麦亲本分子身份证。从结果中可以看出,引物 SWES33、CFE11、CFE188、CFE138 扩增出来的带型多,易于品种的鉴定和区分,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,有利于区分不同的品种,辨别假冒

种子,防止假冒种子流入市场,维护消费者权益。

本研究中,记录带型数据主要是依靠人工对比获得,可能结果中存在一定的误差。随着科技的迅速发展,扩增产物可以借助基因分析仪进行直接读取^[15-16],构建更为精确的结果,但是该方法成本昂贵。另外,本研究只是针对 8 个代表性的杂交小麦亲本品种进行初步的探讨,以后还须对更多的杂交小麦亲本构建分子身份证,并结合田间农艺性状、商品信息等,使小麦品种有完善的数据库,为品种区分提供更为便利的方法,也将为杂交新品种的选育提供理论基础,推进杂交小麦育种的进程。

参考文献:

[1] Kota R, Varshney R K, Thiel T, et al. Generation and comparison of EST-derived SSRs and SNPs in barley (*Hordeum vulgare* L.) [J]. Hereditas, 2001, 135(135): 145-151.

[2] Thiel T, Michalek W, Varshney K, et al. Exploiting EST databases for the development and characterization of gene-derived SSR-markers in barley (*Hordeum vulgare* L.) [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2003, 106(3): 411-422.

[3] Eujay I, Sorrells M, Baum M, et al. Assessment of genotypic variation among cultivated durum wheat based on EST-SSRs and genomic SSRs [J]. Euphytica, 2001, 119(1): 39-43.

[4] Scott K D, Eggler P, Seaton G. Analysis of SSRs derived from grape ESTs [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2000, 100(5): 723-726.

[5] 聂新辉, 尤春源, 李晓方, 等. 新陆早棉花品种 DNA 指纹图谱的构建及遗传多样性分析 [J]. 作物学报, 2014, 40(12): 2104-2117.

[6] 陆徐忠, 倪金龙, 李莉, 等. 利用 SSR 分子指纹和商品信息构建水稻品种身份证 [J]. 作物学报, 2014, 40(5): 823-829.

[7] 颜静婉, 田大刚, 许彦, 等. 杂交稻主要亲本的 SSR 分子身份证数据库的构建 [J]. 福建农业学报, 2011, 26(2): 148-152.

[8] 李伟忠, 许崇香, 安英辉, 等. 257 份玉米自交系分子 ID 的构建 [J]. 玉米科学, 2013, 21(2): 24-30.

[9] 巫桂芬, 徐鲜均, 徐建堂, 等. 利用 SRAP、ISSR、SSR 标记绘制黄麻基因源分子指纹图谱 [J]. 作物学报, 2015, 41(3): 367-377.

[10] Botstein D, White R L, Skolnick M, et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms [J]. American Journal of Human, 1980, 32(3): 314-331.

[11] Chen H M, Li L Z, Wei X Y, et al. Development chromosome location and genetic mapping of EST-SSR markers in wheat [J]. Chinese Science Bulletin, 2005, 50(20): 2328-2336.

[12] Zhang L Y, Bernard M, Leroy P, et al. Hightransferability of bread wheat EST-derived SSRs to other cereals [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2005, 111(4): 677-687.

[13] 李芳, 徐良, 魏美甜, 等. 萝卜 IRAP 技术体系建立与品种指纹图谱构建 [J]. 江苏农业学报, 2015, 31(1): 143-148.

[14] 顾炳朝, 岳绪国, 杨军, 等. 油菜品种镇油 6 号的指纹图谱分析 [J]. 江苏农业科学, 2015, 43(1): 87-89.

[15] 王风格, 赵久然, 戴景瑞, 等. 玉米品种 DNA 指纹数据库构建的标准化规范 [J]. 分子植物育种, 2007, 5(1): 128-132.

[16] 王风格, 赵久然, 孙世贤, 等. 我国玉米 DNA 指纹数据库管理系统的建立 [J]. 玉米科学, 2010, 18(2): 41-44, 49.