

20份美国冬小麦品种的遗传多样性分析

倪胜利, 李兴茂, 王立明

(甘肃省农业科学院旱地农业研究所, 甘肃 兰州 730070)

摘要: 为了解从美国引进的20个冬小麦品种的遗传差异及其遗传丰富度, 提高其作为小麦种质资源的有效利用率, 选择了具有多态性的24对SSR标记进行检测。结果表明: 48条引物在20个冬小麦品种中检测到153条差异带, 每对引物多态性位点2~13个, 平均6.37个, 可以清楚地供试品种分开; 20个材料的遗传相似系数为0.62~0.84, 平均遗传相似系数为0.72, 供试品种的遗传基础有一定的差异性, 其中相似系数最高的是1R2与1R24, 为0.84。聚类分析在相似系数0.68处将20个品种聚为四类。

关键词: 冬小麦; 遗传多样性; SSR; 聚类分析

中图分类号: S512.1⁺1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7601(2012)04-0248-05

通过对引进小麦品种遗传多样性的研究, 对小麦种质资源的收集、保存、评价和开发利用及小麦遗传资源核心种质的建立均具有十分重要的意义。作物遗传多样性(Genetic diversity)主要是指种内不同群体之间或一个群体内不同个体遗传变异的总和, 是生物多样性的重要组成部分。只有充分了解作物的遗传多样性, 才能有目的进行种质创新和品种改良^[1-2]。SSR序列(Simple Sequence Repeats, SSR)的分布遍及人类和动植物的所有染色体及染色体各个片段, 因其随机分布于整个基因组中, 所以具有位点多、多态性丰富、操作简单、稳定性好等优点^[1-2], 目前被广泛应用于小麦遗传多样性分析。Lee等^[3]认为在亲缘关系较近的小麦群体内, SSR标记能比RFLP和RAPD标记提供更丰富的信息。Plaschke等^[4]利用位于15条染色体上的23个SSR标记, 分析了40份亲缘关系较近的欧洲小麦品种间的遗传多样性, 发现每一个SSR标记可检测到3~16个位点, 平均为6.2个; 除2个小麦品种之外, 其余材料间均能相互区分。李小军等^[5]选用分布于小麦7个同源群的17对SSR引物, 在47个小麦地方品种群体中共检测到99个等位变异。陶先萍等^[6]选用分属7个部分同源群的14对SSR引物, 对72份中国地方小麦品种的遗传多样性进行分析, 共检测到93个等位位点。每一个SSR标记可检测到等位位点1~10个, 平均4.42个。为了确定20份美国引进小麦材料的遗传背景, 熟悉它们的遗传丰富度, 使将来作为引进种质资源利用起来有据可依, 同时也可以提高外引种质资源的有效利用率。为此, 笔者利用

在小麦基因组中多态性极高的SSR标记, 对从美国德州引进的20个冬小麦品种进行遗传多样性分析, 为合理开发利用国外引进种质进行种质创新和品种改良提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

选用从美国德克萨斯州引进的冬小麦品种共20份作为供试材料, 具体名称见表1。

1.2 小麦基因组DNA提取

取小麦苗期叶片, 在液氮中研磨后用CTAB法^[7]提取基因组DNA, 经1%琼脂糖凝胶电泳检测DNA含量。取适量DNA稀释为10 ng/ μ L浓度备用。

1.3 SSR分析

选用位于小麦微卫星图谱^[7-8]中26条染色体臂上的48个SSR标记, 其引物序列见表2。所用引物由上海生物工程公司合成, 扩增反应在PTC-200型梯度热循环仪上进行。PCR总反应体积20 μ L, 其中包括: 10 $\times$ PCR Buffer 2.00 μ L, dNTP 1.60 μ L, TaqE (5 U/ μ L)/(2 U/ μ L) 0.16 μ L/0.40 μ L, Primer 2.50 μ L, DNA模板 4.00 μ L及ddH₂O 9.74 μ L。PCR应用程序为94 $^{\circ}$ C 4 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 35个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。退火温度根据引物不同而有所差异, 其具体温度见表2。扩增产物加4 μ L loading buffer于95 $^{\circ}$ C变性8 min后冰浴冷却待用。采用6%变性聚丙烯酰胺凝胶, 预电泳30 min后上样4 μ L, 电泳缓冲液上槽为0.5 $\times$ TBE, 下槽为1 $\times$

收稿日期: 2011-10-13

基金项目: 甘肃省自然科学基金暨中青年科技基金(3ZS061-A25-067); 甘肃省农科院农业科技创新专项(2010GAAS21)

作者简介: 倪胜利(1979—), 男, 甘肃华池人, 硕士, 助理, 主要从事作物遗传育种及生物技术应用研究。E-mail: NSL1979@163.com。

TBE,恒功率 66 W,电泳 1.5 h 左右,硝酸银染色。胶晾干后观察记录,数码相机照相。

表 1 供试小麦品种的名称及来源

Table 1 Names and origins of the wheat genotypes used in this study

序号 No.	材料 Material	来源 Origins	序号 No.	材料 Material	来源 Origin
1	1R8	美国德克萨斯 Texas, USA	11	1R35	美国德克萨斯 Texas, USA
2	1R14	美国德克萨斯 Texas, USA	12	1R34	美国德克萨斯 Texas, USA
3	1R20	美国德克萨斯 Texas, USA	13	1R27	美国德克萨斯 Texas, USA
4	1R19	美国德克萨斯 Texas, USA	14	1R25	美国德克萨斯 Texas, USA
5	1R4	美国德克萨斯 Texas, USA	15	1R24	美国德克萨斯 Texas, USA
6	1R6	美国德克萨斯 Texas, USA	16	1R26	美国德克萨斯 Texas, USA
7	1R5	美国德克萨斯 Texas, USA	17	1R2	美国德克萨斯 Texas, USA
8	1R1	美国德克萨斯 Texas, USA	18	1R17	美国德克萨斯 Texas, USA
9	1R40	美国德克萨斯 Texas, USA	19	1R13	美国德克萨斯 Texas, USA
10	1R39	美国德克萨斯 Texas, USA	20	1R11	美国德克萨斯 Texas, USA

1.4 数据统计方法

产物的银染结果有带记为“1”,无带记为“0”,按 Nei 和 Li 的方法计算材料间遗传相似系数(GS)^[8]: $GS = 2N_{ij} / (N_i + N_j)$,式中: N_{ij} 为材料*i*和*j*共有的扩增片段数目, N_i 为材料*i*中出现的扩增片段数目, N_j 为材料*j*中出现的扩增片段数目;计算材料间的遗传距离(GD): $GD = 1 - GS$ 。根据 GS 值按不加权重成对群算术平均法(UPGMA)进行遗传相似性聚类。全部数据处理用 Excel 和 NTSYS PC2.10 软件完成。

2 结果与分析

2.1 不同 SSR 引物的扩增产物电泳结果

用分别位于 26 条染色体长/短臂上的 24 对 SSR 引物对 20 个美国冬小麦品种基因组 DNA 进行 PCR 扩增,结果列于表 3。24 对引物共检测出 153 个等位位点,引物等位点数在 2~13 个之间,平均每个引物等位数为 6.37 个。引物 WMS508 和 WMS312 的等位位点数最多。图 1、图 2 分别是引物 WMS301 与 WMS508 对 20 个品种(系)扩增的产物,其片段大小约为 100 bp 至 1 800 bp,分别有 10 个与 11 个等位变异。其中以引物 WMS46 扩增的等位变异数最少。

2.2 SSR 多态性分析

根据遗传相似系数对 20 个小麦品种进行聚类分析,24 对 SSR 引物可以将 20 个品种相互分开。计算各品种间的遗传距离,其变异范围为 0.16~0.38,平均值为 0.26;各小麦品种的遗传相似系数变异范围为 0.62~0.84,平均为 0.78。其中 1R35 与

1R24 的遗传相似系数最小(0.62);1R2 与 1R24 的遗传距离最小(0.16),说明供试品种之间的遗传基础有一定的差异性。

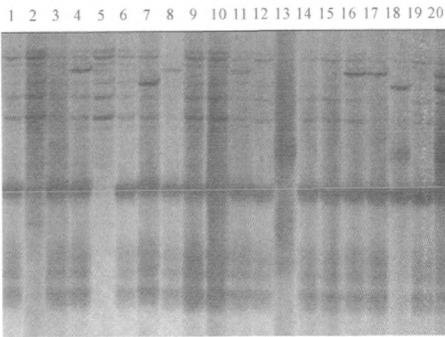


图 1 引物 WMS301 对 20 个冬小麦品种的扩增结果
Fig.1 PCR amplification of 20 wheat cultivars by SSR markers

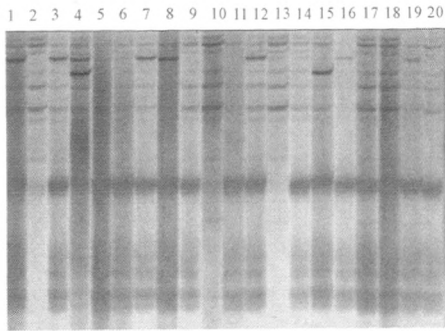


图 2 引物 WMS508 对 20 个冬小麦品种的扩增结果
Fig.2 PCR amplification of 20 wheat cultivars by SSR markers

表 2 SSR 分子标记引物
Table 2 SSR primers used in this study

引物名称 Primer name	序列 Sequences(5'→3')	退火温度(℃) Annealing temperature	GC 含量(%) Content of GC
WMS508	Upper: GTTATAGTAGCATATAATGGCC Lower: GTGCTGCCATGATATTT	53.5	61.90 61.90
WMS135	Upper: TGTCAACATCGTTTTGAAAAGG Lower: ACACTCTCAACCTGGCAATG	52.5	66.67 54.55
WMS312	Upper: ATCGCATGATGCACGTAGAG Lower: ACATGCATGCCTACCTAATGG	57.8	48.00 54.55
WMS155	Upper: AATCATTTCCTCCCTCCC Lower: AATCATTGGAAATCCATATGCC	54.4	50.00 66.67
WMS601	Upper: ATCGAGGACGACATGAAGGT Lower: TTAAGTTGCTGCCAATCTTTC	55.4	52.17 50.00
WMS186	Upper: CGACAGCCTGCTCAAAAAG Lower: CGCCTCTAGCGAGAGCTATG	51.6	50.00 55.00
WMS154	Upper: TCACAGAGAGAGCGGAGGG Lower: ATGTGTACATGTTCCCTGCA	56.3	50.00 56.52
WMS570	Upper: TCGCCTTTTACAGTCGGC Lower: ATCGGTAGCTGAGACCCAAA	51.0	52.38 52.17
WMS276	Upper: ATTTGCCCTGAAGAAAATATT Lower: AATTTCACCTGCATACACAAG	51.0	61.90 63.64
WMS153	Upper: GATCTCGTCACCGGAATTC Lower: TCGTAGAGAAGGACGGAGAG	51.0	50.00 52.00
WMC175	Upper: GCTCACTCAAAACCGCTACTTCT Lower: CACTACTCCAATCTATCGCCGT	52.7	48.00 54.17
WMS108	Upper: CGACAATCGCGTCTTACCAT Lower: TGCACACTTAAATTACATCCGC	55.4	65.00 50.00
WMS251	Upper: CAACTGGTTGCTACACAAGCA Lower: GGGATGTCTGTTCATCTTTAG	52.6	48.00 61.90
WMS626	Upper: GATCTAAAATGTTATTTTCTCTC Lower: TGACTATCAGCTAAACGTGT	50.2	42.31 44.00
WMS46	Upper: GCACGTGAATCGATTGGAC Lower: TGACCCAATACTGCTGCTCA	51.6	48.00 52.17
WMS337	Upper: CCTCTTCTCCCTCACTTAGC Lower: TGCTAACTGGCCTTTGCC	53.5	50.00 54.55
WMS642	Upper: ACGGCGAGAAGTGCTC Lower: CATGAAAGGCAAGTTCGTCA	50.7	56.00 54.55
WMS301	Upper: GAGGACTAAGACACATGCCC Lower: GTGGCTGGAGATTCAAGTTTC	50.7	47.83 55.00
WMS484	Upper: ACATCGCTCTTCACAAACCC Lower: AGTTCGGTCATGGCTAGG	50.7	47.83 55.00
WMS183	Upper: GTCTTCCCATCTCGCAAGAG Lower: CTCGACTCCCATCTGGATG	50.7	47.83 55.00
WMS383	Upper: ACGCCAGTTGATCCGTAAC Lower: GACATCAATAACCGTGGATCG	50.7	47.83 55.00
WMS325	Upper: TTTCTTCTGCTTCTCTTCCC Lower: TTTTACGGGTCAACGACG	50.7	47.83 55.00
WMS295	Upper: GTGAAGCAGACCCACAACAC Lower: GACGGCTCGGACGTACAG	50.7	47.83 55.00
WMS344	Upper: CAAGGAAATAGCCGGTAACT Lower: ATTTGAGTCTGAAGTTTGCA	50.7	47.83 55.00

表 3 SSR 引物及所在染色体位置和等位点个数

Table 3 SSR primers and their positions on chromosome and allelic loci

引物 Primer	染色体位置 Position on chromosome	等位变异 No. of alleles	引物 Primer	染色体位置 Position on chromosome	等位变异 No. of alleles
WMS135	1AL	7	WMS251	4BL	6
WMS312	2AS	13	WMS626	6BL	8
WMS155	3AL	6	WMS46	7BS	2
WMS601	4AS	6	WMS337	1DS	7
WMS186	5AL	4	WMS642	1DL	5
WMS154	5AS	6	WMS301	2DS	10
WMS508	6BS	11	WMS484	2DL	8
WMS570	6AL	5	WMS183	3DS	6
WMS276	7AL	4	WMS383	3DL	3
WMS153	1BL	6	WMS325	6DS	5
WMC175	2BL	9	WMS295	7DS	7
WMS108	3BL	6	WMS344	7BL	3

2.3 聚类分析

20 个美国冬小麦品种聚类分析结果详见图 3。在距离 0.68 处可将 20 个品种分为四类。第一类包括了 4 个品种,其中 1R8 与 1R14 遗传关系比较近。第二类包括了 10 个品种,可分为两个亚类,第一个亚类(Ⅱ-1)包括了 1R4、1R40、1R13、1R39、1R17、1R11、1R24 和 1R2 等共 8 个品种,其中 1R2 与 1R24 的遗传关系最近,遗传相似系数为 0.84,相似度比较大,与其它的品种遗传差异比较大。第二亚类(Ⅱ

-2)包括 2 个品种,即 1R6 与 1R5,两者之间的遗传相似系数为 0.745;第三类包括了 1 个品种,即 1R1,与其它参试品种的遗传距离较大,相似度低;第四类包括了 5 个品种,即 1R35、1R26、1R34、1R27 与 1R25,其中 1R34 与 1R27 两品种之间的相似系数最大,遗传关系最近。以上结果表明,SSR 标记不仅能有效地进行品种鉴定,而且还能在一定程度上揭示小麦品种间的亲缘关系远近。

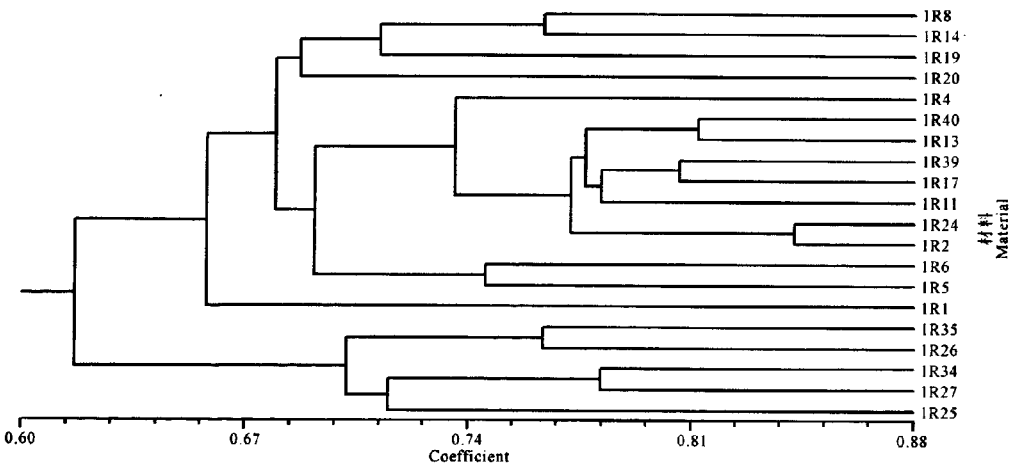


图 3 20 份冬小麦品种的 SSR 标记遗传多样性聚类图

Fig.3 Cluster of 20 accessions by SSR marker

3 讨 论

小麦是我国主要的粮食作物之一,SSR 引物是

研究遗传多样性、种属间亲缘关系、品种及基因型鉴定和标记辅助育种的有力工具^[9-15]。Plaschke 等^[13]利用 23 个标记分析了 40 个亲缘关系较近的

小麦品种的遗传多样性,结果表明,可用较少的 SSR 标记来检测小麦种质资源的遗传差异。倪中福等^[16]用微卫星分子标记技术对我国不同生态区的 6 个春小麦品种(系)及北方冬麦区的 17 个小麦品种(系)D 染色体组的遗传多样性进行了分析,根据 65 个 SSR 标记计算了不同材料间的遗传距离平均为 0.43,本试验用了 24 对引物能将引进美国的 20 个品种完全分开,较好地检测了供试材料的亲缘关系,进一步证明 SSR 分子标记在小麦育种中的应用价值。也显示出这批供试引进资源的遗传差异较小,遗传基础狭窄。这为了解引进的美国旱地冬小麦品种之间的遗传丰富度奠定了基础,为下一步有针对性地开发利用引进小麦种质资源进行杂交育种亲本的选配提供了重要的参考依据。从供试材料的聚类分析中可以得出:在所有供试材料中,1R1 与其他材料的差异性最大。建议在选配亲本,配制杂交组合时,多选用抗旱性强、抗寒性强及落黄好的国外材料与国内材料进行杂交组合,可以创造出更多杂交后代变异类型,以便提高抗旱育种工作效率。

本研究所用供试的美国小麦品种笔者曾在甘肃陇东旱源区种植观察过,这些供试材料均可以顺利越冬,抗春冻性与当地选育出的推广品种相当,且发现供试材料的分蘖力都特别强,各供试品种的成熟期及分蘖成穗率存在着差异,虽然其遗传背景及亲缘关系比较接近,但利用其作为种质资源时,必须根据其特殊的农艺性状(如分蘖力强、抗寒性强等性状)及品质特征进一步鉴定,所以这批供试材料作为种质资源利用还是具有很大的前途。也充分表明引进资源时,还需考虑从不同生态区进行种质资源引进。同时,我们的研究结果表明,只要选择合适的 SSR 引物就可将不同小麦品种区分开来。

参考文献:

- [1] 束爱萍,金钟煥,张三元.世界不同地理来源穗粒品种的遗传相似性研究[J].中国农业科学,2008,41(7):1879-1886.
- [2] Roder M S, Plaschke J, König S U, et al. Abundance variability and chromosomal location of microsatellites in wheat[J]. Molecular & General Genetics, 1995,246:327-333.
- [3] Lee M. DNA markers and plant breeding programs[J]. Adv Agron, 1995,55:265-344.
- [4] Plaschke J, Ganai M W, Roder M S. Detection of genetic diversity in closely related bread wheat using microsatellite markers[J]. Theoretical Applied and Genetics,1995,91:1001-1007.
- [5] 李小军.中国小麦地方品种的遗传多样性研究[D].杨凌:西北农林科技大学,2005:17.
- [6] 陶先群.利用醇溶蛋白与 SSR 分析中国小麦地方品种遗传多样性[D].北京:中国农业科学院,2006:33.
- [7] 蔡剑辉,谢丽琼,赵惠新.外源 DNA 导入彩棉后 RAPD 分析体系的优化[J].核农学报,2006,20(3):211-214.
- [8] Nei M, Li W. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1979,76(10):5269-5273.
- [9] 景蕊莲,吕小平.小麦抗旱种质资源的遗传多样性[J].西北植物学报,2003,23(3):410-416.
- [10] 杨德广,翁跃进,管玉琛,等.部分耐盐小麦品种(系)SSR 位点遗传多样性研究[J].植物遗传资源学报,2005,6(1):9-14.
- [11] 郝晨阳,王兰芬,张学勇.我国育成小麦品种的遗传多样性演变[J].中国科学 C 辑(生命科学),2005,35(5):408-415.
- [12] 王海燕,王秀娥,陈佩度.利用 SSR 标记分析云南、西藏和新疆小麦的遗传多样性[J].遗传学报,2007,34(5):623-633.
- [13] Plaschke J, Borner A, Wendehakek, et al. The use of wheat aneuploids for the chromosomal assignment of microsatellite loci[J]. Euphytica, 1996,89:33-40.
- [14] 张志清,郑有良,魏育明.四川主栽小麦品种遗传多样性的 SSR 标记研究[J].麦类作物学报,2002,22(2):5-9.
- [15] 周桂莲.小麦抗旱性鉴定的生理生化指标及其分析评价[J].干旱地区农业研究,1996,14(2):65-71.
- [16] 倪中福,张义荣,梁荣奇,等.普通小麦 D 染色体组微卫星分子标记遗传差异研究[J].作物学报,2003,29(1):145-151.

SSR analysis of genetic diversity of twenty winter wheat cultivars introduced from USA

NI Sheng-li, LI Xing-mao, WANG Li-ming

(Institute of Dryland Farming, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou, Gansu 730070, China)

Abstract: In order to gain knowledge of genetic diversity of winter wheat, 20 cultivars introduced from USA were analyzed for polymorphism by some SSR markers developed in our laboratory. A set of 48 SSR markers were screened and a total of 153 allelic variants were detected in the 20 wheat cultivars, with the range of 2 to 13 alleles per marker and average of 6.37. The genetic similarity coefficient (GS) among the cultivars was 0.72 at average, and varied from 0.62 to 0.84. Based on 0.68 of GS, the cultivars used in this study were clustered into four groups.

Keywords: winter wheat; genetic diversity; SSR; cluster