

doi:10.11733/j.issn.1007-0435.2015.01.024

利用基因组 SSR 分子标记对老芒麦品种(种质) 鉴别和品种纯度鉴定

雷云霆¹, 赵闫闫^{1,2}, 喻 风^{1,2}, 李 媛^{1,2}, 窦全文^{1*}

(1. 中国科学院西北高原生物研究所, 青海 西宁 810001; 2. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要:利用从老芒麦(*Elymus sibiricus*)自身基因组中开发出来的 6 对多态性 SSR 引物,对 3 个老芒麦牧草品种和 7 个种质进行分子指纹图谱鉴别研究。结果表明:6 对 SSR 引物在这 10 个材料中共检测到 21 个多态性 SSR 标记片段,每对引物可以检测到 2~5 个数目不等的片段,平均为 3.5 个。6 对引物中 3 对核心引物组合可以将这 10 个材料进行有效鉴别。进一步选用 3 对引物对 2 个老芒麦品种进行纯度鉴定,表明 SSR 标记可以对种群中具有变异位点的个体进行有效鉴别,同时揭示野生栽培品种‘同德’老芒麦比育成品种‘多叶’老芒麦具有较高的遗传变异度。

关键词:老芒麦;基因组 SSR 分子标记;品种(种质)鉴别;纯度鉴定

中图分类号:S324

文献标识码:A

文章编号:1007-0435(2015)01-0151-05

Cultivars (Grmplasms) Discrimination and Seed Purity Assessment of Grass *Elymus sibiricus* Using Genomic SSR Markers

LEI Yun-ting¹, ZHAO Yan-yan^{1,2}, YU Feng^{1,2}, LI Yuan^{1,2}, DOU Quan-wen^{1*}

(1. Northwest Plateau Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining, Qinghai Province 810001, Chian;

2. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: Molecular fingerprinting maps of 3 *Elymus sibiricus* cultivars and 7 germplasms were carried out using 6 simple sequences repeat (SSR) markers developed from the genomic DNA of *E. sibiricus*. A total of 21 polymorphic SSR fragments were detected in all the tested materials, and 2 to 5 alleles were detected by each pair of SSR primer with an average of 3.5. All the 3 cultivars and 7 germplasms could be well distinguished by the fingerprinting maps constructed by 3 pairs of core primers. In addition, seed purity assessment was conducted in cultivars ‘Tongde’ and ‘Duoye’ with 3 pairs of SSR primers. It showed that seed purity and the polymorphism of SSR alleles could be effectively identified. Moreover, it revealed that ‘Tongde’, a domesticated cultivar, had much lower purity and higher polymorphic alleles than ‘Duoye’, a breeding cultivar. The SSR markers used in this study can be a powerful tool for cultivars or germplasms identification, seeds purity assessment in *E. sibiricus*.

Key words: *Elymus sibiricus*; Genomic SSR markers; Cultivar discrimination; Cultivar purity assessment

老芒麦(*Elymus sibiricus*)属禾本科小麦族(Triticeae)披碱草属(*Elymus*),为自花授粉的多年生疏丛草本植物。老芒麦是亚洲北部土生草种,分布区域从欧洲北部瑞典延伸至东亚的朝鲜、日本,以及美国的阿拉斯加和加拿大地区,在我国主要分布于华北、西北、东北以及青藏高原地区^[1]。由于老芒麦具有抗逆性强、生物量高、适口性好等优点,在上述地区常作为

优良牧草在生产中进行利用。目前在生产中主要栽培利用的老芒麦品种都是在搜集当地野生种质资源的基础上,通过筛选、鉴定、选育而出。迄今,通过全国草品种审定委员会审定登记的老芒麦品种有 7 个^[2],其中多数品种主要在青藏高原及毗邻地区种植利用,如‘青牧 1 号’老芒麦(‘多叶’老芒麦)‘同德’老芒麦、‘川草 1 号’老芒麦、‘川草 2 号’老芒麦等。

收稿日期:2014-02-27;修回日期:2014-04-15

基金项目:青海省科技厅科技促进新农村建设项目(2013-N-515);中科院“西部之光”联合学者人才培养计划项目资助

作者简介:雷云霆(1985-),男,四川阆中人,硕士研究生,研究方向为植物遗传育种,E-mail: leiyingting@163.com; *通信作者 Author for correspondence, E-mail: douqw@nwipb.cas.cn

植物品种种子的准确鉴定是进行安全生产的重要保证,植物种质资源的有效鉴别是遗传资源高效利用的重要前提。在形态学水平上,虽然老芒麦不同品种、不同野生种质资源的多样性可以通过穗形、茎秆、叶片等数量化的形态指标进行品种或种质鉴定^[3-4],但这种方法比较繁琐,需要进行多性状的测量和运算,而且利用形态学只能在成株条件下进行,在种子水平上几乎不可能区分老芒麦的不同品种和种质。

基于 DNA 分子标记的指纹图谱构建技术是进行品种或种质鉴别的有效手段,并已被广泛应用于农作物以及牧草作物当中^[5],利用这种技术进行品种和种质的鉴别不依赖于表型,而且取材不受植物发育时期影响、无组织特异性,而基于 SSR (simple sequence repeats) 标记构建品种指纹图谱为育种家最为青睐的方法之一,主要优点为在基因组中随机分布、多态性高、共显性遗传、稳定性好等^[6-7]。迄今,从老芒麦自身开发的 SSR 标记缺乏。由于近缘物种间 SSR 标记的可转移性,研究者常将小麦族其他近缘物种中开发的 SSR 标记用于老芒麦研究中,引物的成功扩增效率介于 15.15%~47.4%^[8-10]。本实验室研究结果显示,从小麦族物种中转移到老芒麦的 SSR 标记多态性非常低,源于小麦 SSR 引物的多态性比率为 7.02%,源于大麦 SSR 引物的多态性比率也仅为 15.07%,而从老芒麦自身基因组开发的 SSR 引物多态率可达 60.1%^[11]。由此可见,从老芒麦自身基因组开发的 SSR 标记,将会是老芒麦种质资源遗传多样性分析和品种资源鉴别的理想工具。本研究尝试利用多态性较高的 SSR 标记进行老芒麦品种和种质的分子鉴别,并进行 2 种高寒区主要老芒麦牧草品种同德老芒麦和多叶老芒麦的纯度鉴定与分析。

1 材料与方法

1.1 试验材料

选用不同地理来源和不同野生居群的老芒麦品种和种质为研究对象,其中‘同德’、‘多叶’和‘川草 2 号’来自青海牧草良种繁殖场;4~6 号材料从野外采集得到;7~10 号材料由美国国家植物种质库 (NPGS) 引进(表 1)。由于老芒麦与同域分布的垂穗披碱草 (*E. nutans*) 很容易在形态学上发生混淆,为了确保材料的物种特异性,以上材料均在单株水平上利用细胞学和分子标记进行过鉴定^[12]。品种纯度鉴定材料来自青海牧草良种繁殖场商业用种。

表 1 老芒麦品种和种质

Table 1 *Elymus sibiricus* cultivars and germplasms

序号 No.	材料号 Material	来源地 Origins	序号 No.	材料号 Material	来源地 Origins
1	同德 Tongde	青海 Qinghai	6	nw043	青海 Qinghai
2	多叶 Duoye	青海 Qinghai	7	PI 547394	内蒙古 Inner Mongolia
3	川草 2 号 Chuancao No. 2	四川 Sichuan	8	PI 619575	新疆 Xinjiang
4	E6	青海 Qinghai	9	PI 531645	青海 Qinghai
5	nw048	青海 Qinghai	10	PI 531644	甘肃 Gansu

1.2 试验方法

1.2.1 材料 DNA 的提取 将所有试验材料发芽并种植于小花盆中,待试验需要时取其叶片提取 DNA。试验材料的基因组 DNA 的提取方法按照李景环等^[13]所用的 CTAB 法提取。

1.2.2 SSR-PCR 扩增、检测 挑选本实验室从老芒麦基因组中开发的 150 对 SSR 引物(引物由上海生工生物工程公司合成),PCR 反应体系和程序参照 Röder 等^[14]的方法,通过优化调整最终优化的 20 μL PCR 扩增体系:模板 DNA 1.5 μL (30 ng \cdot μL^{-1}), $10\times$ PCR Buffer 2.5 μL (含 Mg^{2+}), dNTP 1.0 μL (2.5 mmol \cdot μL^{-1}), Taq DNA 聚合酶 0.2 μL (5 U \cdot μL^{-1}), 上下游引物均为 0.5 μL (10 $\mu\text{mol} \cdot \mu\text{L}^{-1}$); ddH₂O 补足体积。PCR 扩增条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 55/50/45 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 共 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。所有反应在 Applied Biosystems PCR 仪上进行。PCR 扩增产物在 8% 聚丙烯酰胺凝胶上用 $1\times$ TBE 缓冲液进行电泳分离, 经 EB 稀释放液染色后, 用 Bio-Rad 自动成像系统照相, 后将所得的 SSR 谱带和数据进行分析。

2 结果与分析

2.1 多态性引物筛选

利用‘同德’老芒麦和‘多叶’老芒麦基因组 DNA 为模板对 150 对 SSR 引物进行 PCR 扩增筛选, 筛选出了扩增条带稳定、清晰, 且具有显著多态性的 SSR 引物 6 对(表 2)。

表 2 同德老芒麦和多叶老芒麦中具有多态性的引物
Table 2 Polymorphic primers selected from *E. sibiricus* 'Tongde' and *E. sibiricus* 'Duoye'

引物名称 Primer	引物序列 Primer Sequences	退火温度 Ta/℃	引物名称 Primer	引物序列 Primer Sequences	退火温度 Ta/℃
GST1	F:5-GGTGCTGTTTGTGTTTGTCT-3 R:5-GAATGAAAGTTGCCGGGTT-3	45	GST37	F:5-GGTTTCAGACACCTGTTTA-3 R:5-CCAATGTATGTATCTAGCAAG-3	50
GST4	F:5-GTGCCCTATCAAGATTACG-3 R:5-TTCATCGGGACACCTTTT-3	50	GST99	F:5-AGTAGCTAAAAATGAGCAGGCT-3 R:5-CTTGTGCAAACACTAGGGTAA-3	50
GST25	F:5-AAGTGCCAACTAGGAGTT-3 R:5-CATCACCATTTTACAGGG-3	50	GST127	F:5-GGAGGGGATAAAACTAAAGGT-3 R:5-ATCGTGCCAAATCAAGAATAC-3	55

2.2 10 个老芒麦品种(种质)的分子指纹鉴定

如表 3 所示,110 个老芒麦材料的 SSR 指纹图谱各不相同,可以作为鉴定品种或种质的重要依据。6 对 SSR 引物在这 10 个材料中共检测出 21 个多态性 SSR 标记片段,每对引物可以检测到 2~5 个数目不等的片段,平均为 3.5 个(表 4),说明单一引物

能将 11 个材料区分为 2~5 个类型,平均为 3.5 个,不能将所用材料分开。从本研究结果来看,6 对引物中 3 对核心引物组合可以将这 10 个材料进行鉴别,3 对引物组合可以有不同的选择方式,如引物组合 GST4, GST25, GST127 或引物组合 GST4, GST25, GST37(图 1)。

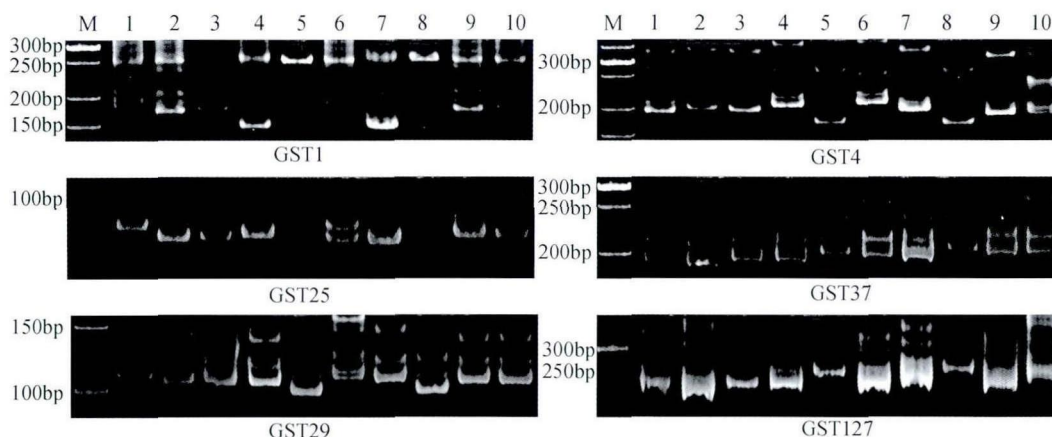


图 1 老芒麦 SSR 电泳图谱

Fig. 1 Electrophoresis patterns of SSR in *E. sibiricus* materials

注:M:Marker;1:同德;2:多叶;3:川草 2 号;4:E6; 5: NW048; 6:NW043;
7:PI 547394; 8:PI 619575; 9:PI 504459; 10:PI 531645

Note:M: Marker; 1: Tongde; 2: Duoye; 3:Chuancao No. 2; 4: E6; 5: NW048; 6: NW043;
7: PI 547394; 8: PI 619575; 9: PI 504459; 10: PI 531645

2.3 利用 SSR 进行老芒麦品种纯度鉴定和分析

对随机选取的 34 粒同德老芒麦种子进行 SSR 分析(图 2),结果表明 GST1 引物在 25 个植株中检测条带表现一致,在 9 个植株(7,9,10,11,13,14,19,23,33)中检测出了区别于其他 25 个植株的多态性条带;利用 GST4 引物在 7 个植株(7,9,10,16,19,23,33),以及 GST37 引物在 12 个植株(7,8,9,10,16,17,18,19,28,32,33)检测出了区别于其他多数植株的多态性条带(图 2)。进一步分析表明,34 个植株中 19 个植株检测的 3 个 SSR 位点带型表现

一致,没有多态性,5 个植株中 3 个位点有多态性,2 个植株中 2 个位点具有多态性,8 个植株中有 1 个位点具有多态性。对随机选取的 36 粒多叶老芒麦种子进行 SSR 分析(图 3),结果表明 GST1 引物在 3 个植株(15,17,36)检测有多态性,GST4 引物在 3 个植株(15,23,28)中检测有多态性,GST37 在 1 个植株(15)中存在多态性,进一步分析表明,36 个植株中 31 个植株检测的 3 个 SSR 位点带型表现一致,没有多态性,1 个植株中 3 个位点有多态性,4 个植株中有 1 个位点具有多态性。

表 3 6 对引物在 10 个老芒麦品种(种质)的 SSR 指纹图谱

Table 3 SSR fingerprint of 6 primers in ten *Elymus sibiricus* cultivars or germplasms

引物 Primer	片段大小/bp Fragment size	老芒麦品种(种质) <i>E. sibiricus</i> cultivars or germplasms									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
GST1	190	+									
	180		+	+	+		+	+		+	+
GST4	220						+				
	210				+			+			
	200		+								+
	195	+		+						+	
GST25	170					+			+		
	90	+									
	85				+					+	+
GST37	80		+	+			+	+			
	200					+	+		+	+	+
	190	+		+	+				+		
GST99	185		+								
	110	+					+	+			
	105		+	+	+					+	+
GST127	100					+			+		
	250								+		+
	248					+					
	245							+			
	240	+		+	+		+			+	
	230		+								

注：“+”表示有目标扩增条带出现

Note:“+”indicate the presence of the targeted amplification

表 4 10 个老芒麦品种(种质)中检测到的 SSR 标记片段

Table 4 Detected SSR fragments in 10 *Elymus sibiricus* cultivars or germplasms

引物 Primer	片段数量 Fragment number	片段大小/bp Fragment size	引物 Primer	片段数量 Fragment number	片段大小/bp Fragment size
GST1	2	180,190	GST37	3	185,190,200
GST4	5	170,195,200,210,220	GST99	3	100,105,110
GST25	3	80,85,90	GST127	5	230,240,245,248,250

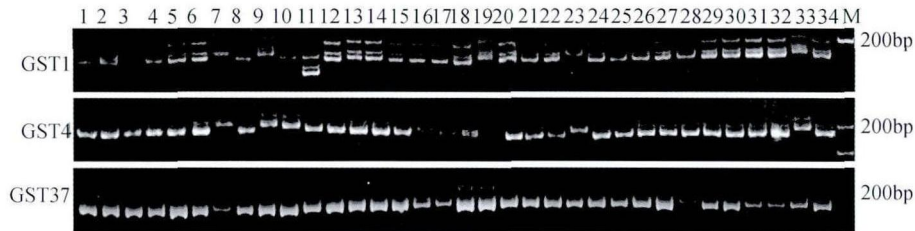


图 2 ‘同德’老芒麦种子纯度鉴定电泳图谱

Fig. 2 Electrophoresis patterns of seed purity assessment in ‘Tongde’



图 3 ‘多叶’老芒麦种子纯度鉴定电泳图谱

Fig. 3 Electrophoresis patterns of seed purity assessment in ‘Duoye’

利用 SSR 位点检测结果进行品种纯度鉴定时，芒麦的纯度为 55.9%，‘多叶’老芒麦的纯度为 86.1%。考虑到‘同德’老芒麦为一野生驯化品种，如果以所有检测位点上表现一致为标准，‘同德’老

如果以 2/3 检测位点表现一致为标准,‘同德’老芒麦的纯度为 79.4%;如果以 1/3 检测位点表现一致为标准,‘同德’老芒麦的纯度则为 85.3%。‘多叶’老芒麦为一育成品种,如果以 2/3 检测位点表现一致为标准,‘多叶’老芒麦的纯度为 97.2%。

‘同德’老芒麦品种群体遗传变异度远高于‘多叶’老芒麦,由于‘同德’老芒麦为野生驯化品种,‘多叶’老芒麦为育成品种,因此可见老芒麦品种培育过程中育种方法的选择可能为显著影响品种变异度的主要原因。

3 讨论

在本研究中采用的 6 对 SSR 引物在 10 个品种或种质中存在丰富的多态性,3 对引物组合就可以将 10 个材料完全分开。在本研究中采用的品种和种质,有些材料地理距离较远,如来自新疆、内蒙等地的材料,而有些材料来自同一地区,如‘同德’老芒麦、‘多叶’老芒麦均为在青海同德巴滩地区野生材料中选育而来的^[15],其他 3 个材料来自青海本地。一般来说种质间遗传关系与地理距离密切相关,分布在同一区域的材料一般遗传关系较近,反映 SSR 分子标记鉴别上,遗传距离越近,鉴别越有难度,但是在本研究中利用的 SSR 引物,无论在距离远或近的材料中均变现出较高的多态性。本研究中,利用 3 对引物就可以对 10 份老芒麦品种(种质)进行有效鉴别,理论上,每多一对引物,其鉴别效率是呈指数级增长的。由此可见,在本研究中的 6 对 SSR 引物,可用于更多老芒麦品种和种质的分子鉴别研究以及老芒麦野生种质的遗传多样性研究。

老芒麦作为牧草作物,一方面其品种来自于本地的野生植物群落,另一方面进行人工育种的历史短、育种手段落后,因此从理论和实践上很难获得像农作物一样的纯系品种。由于老芒麦品种群体内部本身存在有较高的遗传变异,这在利用分子标记进行真伪杂种判断时带来一定的困难,尤其是对野生驯化种更是如此,因此人为标准显著影响该类品种的纯度鉴定结果。区别不同的品种类型,对于育成品种可以采取 2/3 位点以上表现一致为标准,而对于野生驯化种可能要采取 1/3 位点以上表现一致、或更低的标准进行判定。在理论上可以采用 1 对或 2 对 SSR 引物即可以对纯系品种群体进行纯度鉴定,但是对于如老芒麦这样的牧草作物,利用更多的引物对于品种真伪和纯度的鉴定将更为准确。

在利用 SSR 标记进行品种纯度鉴定时,本研究

揭示在‘同德’老芒麦中遗传变异程度远高于‘多叶’老芒麦。由于‘同德’为野生驯化品种,而‘多叶’为经过选择的育成品种^[15],理论上野生驯化育种群体为杂合性育成品种群体,因此除了在品种繁育过程中机械混杂、生物学混杂等的原因,在品种内部群体本身存在的杂合性有可能是影响种子纯度的主要原因之一。在育种群体中存在的变异,在育种中往往具有较高的利用价值,对一些综合性状较好的变异类型的直接选择,可以育成可供生产利用的新品系。由于本研究揭示在‘同德’存在较高的变异,因此对变异个体 SSR 分子鉴别结合综合农艺性状鉴定的基础上,筛选出优良的变异类型,进而有可能快速培育出比原来品种更加优良的新品种。

参考文献

- [1] 刘尚武. 青海植物志[M]. 西宁:青海人民出版社,1999:97-99
- [2] 周国栋,李志勇,李鸿雁,等. 老芒麦种质资源的研究进展[J]. 草业科学,2011,28(11):2026-2031
- [3] 严学兵,周禾,王堃,等. 披碱草属植物形态多样性及其主成分分析[J]. 草地学报,2005,13(2):111-112
- [4] 严学兵,王堃,王成章,等. 不同披碱草属植物的形态分化和分类功能的构建[J]. 草地学报,2009,17(3):274-281
- [5] 罗永聪,马啸,张新全. 利用 SSR 技术构建多花黑麦草品种指纹图谱[J]. 农业生物技术学报,2013,21(7):799-810
- [6] Morgante M, Olivieri A M. PCR amplified microsatellites as markers in plant genetics [J]. The Plant Journal, 1993,3(1): 175-182
- [7] Akkaya M S, Bhagwat A A, Cregan P B. Length polymorphism of simple sequence repeat DNA in soybean [J]. Genetics, 1992,132(4):1131-1139
- [8] 孙建萍,袁庆华. 利用微卫星分子标记研究我国 16 份披碱草遗传多样性[J]. 草业科学,2006,23(8):40-44
- [9] 严学兵,王堃,周禾,等. 不同来源 SSR 标记在我国披碱草属植物的通用性和效率评价[J]. 草业学报,2008,17(6):112-120
- [10] 鄢家俊,白史且,常丹,等. 青藏高原老芒麦种质遗传多样性的 SSR 分析[J]. 中国农学通报,2010,26(9):26-33
- [11] 雷云霆. 老芒麦(*Elymus sibiricus*) SSR 分子标记的开发与初步应用[D]. 西宁:中科院西北高原生物研究所,2012:15-26
- [12] 雷云霆,窦全文. 青藏高原老芒麦和垂穗披碱草 SSR 分子标记鉴别[J]. 草业科学,2012,29(6):937-942
- [13] 李景环,云锦凤,邵丽华,等. 老芒麦总 DNA 提取方法探讨[J]. 内蒙古师范大学学报:自然科学汉文版,2008,37(4):543-545
- [14] Röder M S, Plaschke J, König S U, et al. Abundance, variability and chromosomal location of microsatellites in wheat [J]. Molecular and General Genetics, 1995,246(3):327-333
- [15] 青海省畜牧兽医科学研究所,青海省同德牧场. 多叶老芒麦的选育[J]. 畜牧兽医科技通讯,1978(1):15-19

(责任编辑 吴雅娜)