

18 个早熟禾品种 SSR 指纹图谱的构建

赵闫闫, 喻 凤, 李 媛, 窦全文

(中国科学院西北高原生物研究所, 青海 西宁 810000)

摘要:利用从草地早熟禾(*Poa pratensis*)基因组中开发出来的 3 对多态性 SSR 引物,对 18 个早熟禾品种进行分子指纹图谱鉴别研究。结果表明:3 对引物在 18 个品种中共检测出 16 个多态性片段,每对引物可以检测到 4 至 6 个数目不等的片段,平均为 5.33 个,片段大小介于 152 至 227 bp。利用单一引物可将 18 个品种区分为 5~11 种类型,平均为 8.33 个类型。利用这 3 对 SSR 多态性引物指纹图谱可以将 18 个品种完全区分开。研究构建的指纹图谱可作为对文中 18 个早熟禾品种进行区分的重要参考依据,同时筛选出的对核心引物也可以用来构建其他早熟禾品种的指纹图谱。

关键词:早熟禾;SSR 标记;指纹图谱;品种鉴别

中图分类号:Q 789 **文献标识码:**A **文章编号:**1009-5500(2016)01-0031-05

DOI:10.13817/j.cnki.cyyep.2016.01.006

早熟禾属(*Poa*)为禾本科早熟禾亚科,全世界约有 500 多种,我国早熟禾资源丰富,约有 100 多种,广泛分布于西北、华北、东北等地区。早熟禾属内多数植物再生能力强、繁殖力强、耐寒、耐旱,而且营养丰富、绿色周期长,不少种是天然和人工种植利用的优质牧草,也是草坪绿化常用植物^[1,2]。我国的早熟禾育种起步较晚,一些早熟禾品种都是在我国本土遗传资源基础上选育出的,其具有良好的环境适应特性,在牧草生产以及生态环境恢复中起着不可替代的作用,如在青藏高原地区人工种植利用青海草地早熟禾(*P. pratensis*)、青海扁茎早熟禾(*P. pratensis* var. *anceps*)、以及青海冷地早熟禾(*P. crymophila*)等^[3-6]。

在对早熟禾实际应用中,需要针对不同生态环境和不同利用目的选择性地利用不同的品种,但早熟禾的表型性状区别不明显,通过形态很难鉴别这些品种^[7]。20 世纪 90 年代 DNA 指纹图谱技术就是有效的分子手段,克服了易受环境影响、周期长、工作量大等传统鉴定手段的缺点,可以对品种真实性和纯度进

行快速、准确的鉴定^[8]。在早熟禾早期的指纹图谱的研究中,研究者利用 RAPD、AFLP、ISSR 等分子标记技术对早熟禾进行品种分类和多样性鉴定^[1,2,9-12],但是有研究结果表明,利用某些分子标记的品种鉴定结果与形态鉴定结果不一致^[9]。Honig 等^[13]于 2010 年首次从草地早熟禾基因组 DNA 中分离得到了 88 个多态性 SSR 分子标记,进一步利用其中 22 个标记对 247 个品种和材料进行分类研究,结果表明 SSR 分子标记分类结果与形态学分类、以及系谱分析等具有很好的 consistency^[14]。

笔者在试验室开发出的 15 对多态性 SSR 分子标记基础上^[15],筛选可用于品种指纹图谱构建的多态性核心引物,并进一步利用这些核心引物对 15 个国外引进的草地早熟禾品种和 3 个青海本土早熟禾品种构建指纹图谱。

1 材料和方法

1.1 供试材料

3 个青海本土早熟禾品种种子由青海省牧草良种繁殖场提供,其他 15 个进口草地早熟禾品种购自相关牧草或草坪草种子供应公司(表 1)。

1.2 草地早熟禾叶片 DNA 提取

将所有试验材料发芽,单粒种植于小钵中,待试验需要时取其叶片提取 DNA。采用文献^[16]改良 CTAB 法提取基因组 DNA。每个品种随机选取 10 株

收稿日期:2015-05-28; 修回日期:2015-12-03

基金项目:青海省科技厅科技促进新农村建设计划项目(2013-N-515)资助

作者简介:赵闫闫(1990-),女,安徽蚌埠人,在读硕士生。

E-mail:yanyanziji@126.com

窦全文为通讯作者。

苗的叶片混合提取 DNA。

1.3 SSR-PCR 扩增及检测

SSR-PCR 反应体系:总体系 25 μ L, DNA 1 μ L (50 ng/ μ L), 10 \times PCR Buffer 2.5 μ L (含 Mg²⁺), dNTP 2.0 μ L (2.5 mmol/ μ L), Taq DNA 聚合酶 0.3 μ L (5 U/ μ L), 上下游引物均为 0.5 μ L (10 μ mol/ μ L), ddH₂O 18.2 μ L。扩增程序 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55~50 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 共 30 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ 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。

表 1 18 个早熟禾品种

Table 1 Tested 18 *Poa* cultivars

序号	品种	英文名称
1	青海草地早熟禾	<i>P. pratensis</i> cv. Qinghai
2	骑士	Knight
3	帝国	Kingdom
4	爱美	Amilyblue
5	布鲁克	Brooklawn
6	水晶	Crystal
7	肯塔基	Kentucky
8	午夜	Midnight
9	黑珍珠	Rhythm
10	勇士	Warrior
11	世外桃源	Arcadia
12	奖品	Award
13	武士	Geronimo
14	百斯特	Barrister
15	优异	Merit
16	公园	Park
17	青海扁茎早熟禾	<i>P. pratensis</i> var. <i>anceps</i> cv. Qinghai
18	青海冷地早熟禾	<i>P. cymophila</i> cv. Qinghai

注: 1, 17, 18 序号的品种原于青海, 2~16 序号的品种来源于美国

2 结果与分析

2.1 多态性引物筛选

在草地早熟禾中开发出的 15 对多态性 SSR 标记引物中, 有 13 对引物在扁茎早熟禾中有扩增产物, 同时在这 13 对中有 7 对 SSR 引物在青海冷地早熟禾中有扩增产物^[15]。利用这 15 对 SSR 引物进一步对 18 个早熟禾品种进行多态性分析, 筛选出多态性丰富、扩增条带稳定、清晰的引物 3 对(表 2)。

表 2 多态性 SSR 引物

Table 2 Polymorphic SSR primers

引物名称	引物序列	片段大小/bp	Ta/ $^{\circ}$ C
Poap5	F: GCTTCTTAGAATGGAGGTC R: ATCAGAGGGAGATTTTGC	220-227	55
Poap9	F: AGAGGAAAACTCTTCTCTCTG R: GAAAGCAACAAGCACCT	152-170	55
Poap10	F: TCGCTTGAGTTGCTGTAC R: AAGGTTTCCAATAGGCT	190-222	50

利用筛选出的 3 对引物在 18 个品种中共检测到 16 个多态性片段, 每对引物可以检测到 4~6 个数目不等的片段, 平均为 5.33 个, 片段大小为 152~227 bp (表 3)。

表 3 18 个早熟禾品种中检测到的 SSR 标记片段

Table 3 SSR fragments detected in 18 cultivars

引物	片段数量	片段大小/bp
Poap5	4	220, 223, 225, 227
Poap9	6	152, 154, 160, 165, 167, 170
Poap10	6	190, 192, 197, 202, 220, 222

2.2 指纹图谱构建

利用筛选到的核心引物对 18 个早熟禾品种进行指纹图谱的构建, 其中利用引物 Poap10 的指纹图谱如图 1 所示。进一步将 3 对引物对 8 个品种指纹图谱加以数字化制成表格, 如表 4 所示。单独利用 SSR 引物

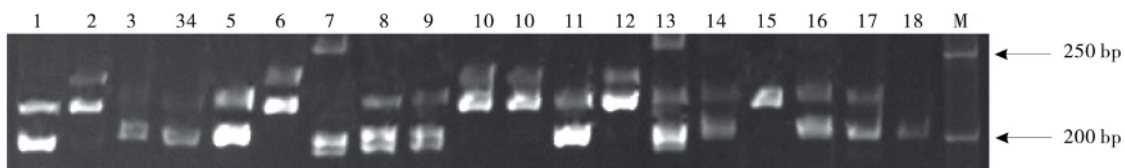


图 1 SSR 引物 Poap10 在 18 个早熟禾品种中的电泳图

Fig. 1 Electrophoresis of 18 cultivars by using SSR marker Poap10

注: M 为 DNA 分子量 marker; 1~18 为不同早熟禾品种, 序号与表 1 一致

Poap5 根据带型组合可以将 18 个品种分类成 5 种类型,利用引物 Poap9 可以将 18 个品种分成 9 种类型,利用引物 Poap10 也可以将 18 个品种分成不同的 11 种类型。利用引物组合 Poap5 和 Poap9、以及利用

Poap5 和 Poap10 可以将 18 个品种中 12 个品种进行准确区分,利用引物组合 Poap9 和 Poap10 可以将 18 个品种中 14 个品种进行区分,联合应用这 3 对对应物可以将 18 个品种中每一个品种进行准确区分。

表 4 3 对引物在 18 个早熟禾品种的 SSR 指纹图谱

Table 4 SSR fingerprint in 18 cultivars with 3 pairs of primers

引物	片段大小/bp	早熟禾品种																	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
poap5	220	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	223	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0
	225	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
	227	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
poap9	152	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
	154	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1
	160	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
	165	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0
	167	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
	170	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
poap10	190	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	192	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	197	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
	202	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1
	220	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
	222	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0

3 讨论与结论

草地早熟禾为早熟禾类植物中利用最为广泛的物种,由于其兼性无融合生殖特性,草地早熟禾在染色体数目上呈现较高的变异性,在群体中有不同倍性以及非整倍体个体的存在^[17,18,19],这种复合多倍体使得草地早熟禾种内具有很高的遗传多样性^[20]。从草地早熟禾基因组中开发的基因组 SSR 标记在草地早熟禾不同材料间呈现很高的多态性,检测到的 SSR 标记等位基因平均数量随着检测材料数量和标记数量的增多呈显著上升趋势,试验中利用 3 个 SSR 标记对 18 个品种进行检测,检测到多态性平均为 5.33 个,Honig 等利用 25 个 SSR 标记对 247 个品种(材料)进行多态性分析,检测到的多态性位点平均为 16.04 个^[11],利用 88 个 SSR 标记对 265 个品种(材料)进行多态性分析,88 个 SSR 标记能够检测到的等位基因位点平均为

38.83 个^[12]。同时,由于草地早熟禾群体遗传结构组成的特殊性,利用同一引物在不同个体或同一个体中有可能检测到 1 个以上的等位基因位点,草地早熟禾的这种变异特性,极大地提高了 SSR 标记对不同品种和材料的分辨能力。

试验研究中 18 个早熟禾品种中,16 个品种为草地早熟禾品种,其他 2 个品种分别为扁茎早熟禾和冷地早熟禾品种,而利用的 3 个 SSR 标记是从草地早熟禾中开发出来的,其中,2 个标记在扁茎早熟禾和冷地早熟禾中有扩增产物,1 个标记没有扩增产物,标记 Poap5 可以显著地将扁茎早熟禾、冷地早熟禾品种与其他草地早熟禾品种区分出来,进一步可以利用 Poap9 可将扁茎早熟禾品种和冷地早熟禾品种进行区分。由于迄今只有少量其他早熟禾物种中具有可供利用的 SSR 标记^[21],因此,在其他早熟禾物种品种鉴别中借鉴利用从草地早熟禾中开发出来的 SSR 标记,不

失为一种简便、快速的手段。

SSR 分子标记指纹图谱技术已经在小麦、水稻、玉米等农作物品种中得到广泛应用,由于 SSR 分子标记技术在早熟禾研究中起步较晚,利用 SSR 分子标记对早熟禾品种进行指纹图谱鉴定鲜见报道,在本研究中尝试利用 SSR 分子标记对 18 个早熟禾品种进行鉴别,结果表明由于早熟禾的高变异特性,利用少量的 SSR 标记就可以实现对不同品种的准确区分。同时,SSR 标记具有检测操作过程简便、结果稳定等优点,相信 SSR 指纹图谱构建技术在早熟禾品种鉴别中将会得到越来越广泛的应用。

参考文献:

- [1] 赵桂琴,刘欢,刘美. ISSR 标记的早熟禾遗传多样性分析[J]. 草地学报,2011,19(5):781-786.
- [2] 郭郁频,任永霞,张颖超,等. 早熟禾种质资源 ISSR 遗传多样性分析[J]. 中国草地学报,2014,36(3):28-34.
- [3] 邱正强,曹玉红,梁丽,等. 青海草地早熟禾坪用性状的比较研究[J]. 草原与草坪,2009(5):50-55.
- [4] 杨时海,马玉寿,施建军,等. 青海草地早熟禾(*Poa. Pratensis* L. cv. Qinghai)近几年的研究进展[J]. 种子,2010,29(8):50-52.
- [5] 周青平,颜红波,韩志林,等. 高原根茎型优质草种“青海扁茎早熟禾”的驯化选育[J]. 草地学报,2008,16(4):328-335.
- [6] 王彦荣,南志标,孙建华,等. 草地早熟禾新品种特异性、一致性和稳定性测试指南初报[J]. 草业科学,2003,20(12):58-67.
- [7] 李志勇,孙启忠,李鸿雁,等. 分子标记技术在牧草种质资源研究中的应用[J]. 草原与草坪,2010,30(5):91-95.
- [8] 冯鹏,刘荣堂,张蕴薇. 分子标记技术在植物空间诱变育种机理研究中的应用[J]. 草原与草坪,2008(2):1-4.
- [9] Curley J, Jung G. RAPD-based genetic relationships in kentucky bluegrass: Comparison of cultivars, interspecific hybrids, and plant introductions[J]. Crop Sci, 2004, 44: 1299-1306.
- [10] Johnson R C, Johnston W J, Golob C T, et al. Characterization of the USDA *Poa pratensis* collection using RAPD markers and agronomic descriptors[J]. Genet Resources Crop Evol, 2002, 49: 349-361.
- [11] 田志宏,邱永福,严寒,等. 用 RAPD 标记分析草地早熟禾遗传多样性[J]. 草地学报,2006,14(2):120-123.
- [12] Treuren R. AFLP fingerprinting of Kentucky bluegrass (*Poa pratensis* L.) from undisturbed Dutch grasslands: implications for conservation [J]. Plant Genetic Resources Newsletter, 2008, 153: 1-8.
- [13] Honig J A, Bonos S A, Meyer W A. Isolation and characterization of 88 polymorphic microsatellite markers in Kentucky bluegrass (*Poa pratensis* L.) [J]. Hort Science, 2010, 45(11): 1759-1763.
- [14] Honig J A, Vincenzo A, Bonos S A, et al. Meyer Classification of Kentucky Bluegrass (*Poa pratensis* L.) Cultivars and Accessions Based on Microsatellite (Simple Sequence Repeat) Markers [J]. HortScience, 2012, 47(9): 1356-1366.
- [15] Zhao Y Y, Yu F, Li Y, et al. Isolation and characterization of 15 polymorphic genomic simple sequence repeat markers in *Poa pratensis* L. [J]. Grassl Sci, 2005, 61: 185-187.
- [16] 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,2008,37(4):543-545.
- [17] 赵桂琴. 几种早熟禾及其人工杂种染色体数目变化的特异性[J]. 草业科学,2001,18(3):17-20.
- [18] Grazi F, Umaerus M, Akerberg E. Observations on the mode of reproduction and the embryology of *Poa pratensis* [J]. Hereditas, 1961, 47: 489-541.
- [19] Huff D R. Kentucky bluegrass [M] // Casler M D, Duncan R R. Turfgrass Biology, Genetics and Breeding. Wiley: Hoboken, 2003: 27-38.
- [20] Huff D R. Bluegrasses [M] // Boller B, Posselt U K, Veronesi F, Handbook of Plant Breeding 5, Fodder Crops and Amenity Grasses. New York: Springer Science+Business Media, LLC, 2003: 345-379.
- [21] Kindiger B, Conley T, Cai H. Generation and release of molecular markers for *Poa arachnifera* Torr [J]. Grassl Sci, 59: 160-165.

(下转 43 页)

cold resistant strains of alfalfa in seedling stage, the response of physiological and biochemical indexes to low temperature was studied and the screening of sensitive physiological and biochemical indices in seedling was conducted. The results showed that GPX, FP, APX, SOD and MDA were the most sensitive indicators, CAT, SS and SP were the more sensitive indicators for alfalfa leaves; SP, MDA and FP were the most sensitive indicators, CAT, SS and SOD were the more sensitive indicators for stems, APX and GPX were not the sensitive indicators for alfalfa leaves and stems. By using comprehensive evaluation, the cold-resistance order of alfalfa was $K2 > K3 > K1 > Ru$.

Key words: alfalfa; seedling stage; cold-resistance sensibility; physiological and biochemical index

(上接 34 页)

Fingerprint establishment of 18 *Poa pratensis* cultivars with SSR markers

ZHAO Yan-yan, YU Feng, LI Yuan, DOU Quan-wen

(Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810000, China)

Abstract: The fingerprint of 18 *Poa pratensis* cultivars was established by using 3 polymorphic simple sequences repeat (SSR) markers developed from genomic DNA of *P. pratensis*. Totally 16 polymorphic SSR fragments were detected in all tested cultivars, and 4 to 6 alleles were detected by each pair of SSR primer with an average of 5.33. The band size varied from 152 bp to 227 bp. 18 cultivars could be divided into 5 to 11 groups by single polymorphism primer, with an average of 8.33. 18 cultivars could be distinguished thoroughly by the fingerprinting maps constructed by the 3 pairs of SSR primers. The constructed fingerprinting maps are important references to discriminate the 18 tested cultivars. Furthermore, the screened 3 polymorphic SSR markers can be useful to establish fingerprint for other cultivars.

Key words: *P. pratensis*; SSR marker; fingerprinting; cultivar identification