

利用 SSR 标记正确判断小麦杂交种中的杂株

刘丽华, 庞斌双, 刘阳娜, 李宏博, 王娜, 张欣, 张晓旭, 赵昌平

北京市农林科学院杂交小麦工程技术研究中心; 杂交小麦分子遗传北京市重点实验室, 北京 100097

摘要 正确判断杂交种中混有的杂株, 是准确鉴定小麦杂交种种子纯度的前提。在分析 180 份杂交组合的基础上, 以“京麦 1100”为例, 提出了利用 SSR 标记正确判断小麦杂交种中杂株的方法: 1) 筛选双亲间有多态性的引物不少于 5 对; 2) 利用该引物检测亲本及杂交种的基因型, 并按照杂交种基因型记录原则记录每个个体的基因型; 3) 正确判断真实杂交种基因型: 不论亲本是否存在非纯合位点现象, 只要某个体同时具备父母本的基因型, 均视为真实杂交种的基因型; 4) 判断杂株: 当某个体在多个 SSR 位点上与真实杂交种基因型不同时, 判断为杂株。

关键词 杂交小麦; SSR 标记; 杂株

中图分类号 Q751

文献标志码 A

doi 10.3981/j.issn.1000-7857.2015.16.005

Correct judgment method of contaminated plants in hybrid wheat using SSR markers

LIU Lihua, PANG Binshuang, LIU Yangna, LI Hongbo, WANG Na, ZHANG Xin, ZHANG Xiaoxu, ZHAO Changping

Beijing Key Laboratory of Molecular Genetics in Hybrid Wheat; Engineering and Technique Research Center for Hybrid Wheat, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100097, China

Abstract Correct judgment of contaminated plants in wheat hybrid is the premise for accurate identification of seed purity. In this study, taking the hybrid wheat variety "Jingmai1100" as an example, we propose a method for judging contaminated plants in hybrid wheat using SSR markers on the basis of analysis of 180 wheat hybrids: 1) Not less than five polymorphic SSR markers on parents of different genotypes should be screened; 2) Polymorphic SSR primers are used to detect the genotype of parents and hybrids, and each plant's genotype is recorded according to the recording principle of hybrid genotypes; 3) True hybrid genotypes should be judged accurately, with the following principle: No matter whether there is the homozygous locus in parents, as long as the individual has both parents' genotype, it should be regarded as a true hybrid genotype; 4) Judgment of contaminated plants in hybrids: When the individual is different from true hybrid on multiple SSR loci, it could be regarded as a contaminated plant.

Keywords hybrid wheat; SSR markers; contaminated plants

在粮食安全问题日益凸显的背景下, 迫切期待持续、稳定提高小麦产量, 杂种优势利用则是今后小麦生产水平大幅度提高的主要途径之一。近年来, 中国杂交小麦研究与应用

取得了突破性进展, 迄今已审定杂交小麦品种 13 个, 其中部分杂交小麦已开始进入快速示范应用阶段。杂交小麦种子质量的优劣直接影响小麦的产量和品质, 其中种子纯度是衡

收稿日期: 2015-07-13; 修回日期: 2015-07-30

项目基金: 国家科技支撑计划项目(2014BAD01B00); 北京市农林科学院科技创新能力建设专项(KJCX20140202, KJCX20140421); 北京市农林科学院青年基金项目(QNJJ201509)

作者简介: 刘丽华, 助理研究员, 研究方向为小麦分子遗传育种, 电子信箱: llh216@163.com; 庞斌双(共同第一作者), 副研究员, 研究方向为小麦分子遗传育种, 电子信箱: pangbinshuang1122@aliyun.com; 赵昌平(通信作者), 研究员, 研究方向为小麦遗传育种, 电子信箱: cp_zhao@vip.sohu.com

引用格式: 刘丽华, 庞斌双, 刘阳娜, 等. 利用 SSR 标记正确判断小麦杂交种中的杂株[J]. 科技导报, 2015, 33(16): 39-45.

量种子质量的核心指标,而杂株的数量决定杂交小麦种子纯度的高低。因此在杂交小麦育种、生产和销售过程中,快速准确地判断杂株,做好种子纯度检测工作,对加快杂交小麦产业化、确保中国小麦产业发展、市场稳定以及小麦种植者和消费者的利益具有重要的社会和经济意义。

随着生物技术及小麦基因组测序的发展,目前小麦杂株快速准确的鉴别方法为DNA分子检测法,其中简单序列重复(single sequence repeat, SSR)和单核苷酸多态性(singlenucleotide polymorphism, SNP)由于均为共显性遗传、反映的是确定的目的片段或序列信息的差异、易实现高通量等优点,被国内外推荐为小麦品种鉴定优选标记技术^[1,2]。SSR标记为第二代分子标记,因具有数量丰富、多态性高、操作简单、成本低等优点,于2007年开始,相继被国际植物新品种保护联盟(UPOV)、国际种子联盟(ISF)和国际种子检验协会(ISTA)接受为现阶段作物品种鉴定的首选标记^[1]。目前,SSR标记法已趋向成熟,并被广泛应用于小麦^[3,4]、水稻^[5,6]、玉米^[7,8]、棉花^[9,10]、大豆^[11]、油菜^[12]等作物的种子纯度鉴定中,但在杂交小麦中未见报道。SNP标记是由单个核苷酸改变而导致的核酸序列多态,为第三代分子标记,因其在基因组中分布密度高且均匀、高准确性、高通量、兼容性好等优点,已被初步用于玉米^[13,14]、水稻^[15]、大豆^[16]、大麦^[17]等作物的品种鉴定,在小麦品种分子检测方面被认为是更新换代的标记。

近10年来,本课题组在利用SSR标记对180份小麦杂交种进行种子纯度检测时发现,杂交种中的种子混杂和亲本位点不纯均会造成个体间基因型差异。如不能正确区分,会导致不能正确判断杂柱,得出错误的结论。本研究拟针对以上问题,建立利用SSR标记正确判断杂交种中杂株的方法,旨在为利用SSR标记法鉴定杂交小麦种子纯度方法提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

本研究所用材料为180份杂交种及其父母本,其中参加2009—2014年国家及北京、河南等省市冬小麦区域试验的杂交小麦品系14份,北京杂交小麦工程技术研究中心选育的强势杂交组合166份。

1.2 小麦基因组DNA提取

采用简化CTAB法^[18]提取供试材料的DNA,亲本材料分别提取30个个体,杂交种提取50个个体。用紫外分光光度计测量DNA质量浓度,总DNA用1×TE稀释至50 ng·μL⁻¹备用。

1.3 SSR分析

采用北京杂交小麦工程技术研究中心筛选的30对多态性高、分辨力强的SSR引物对提取的DNA进行检测,采用引物包括19对Genomic-SSR引物和11对EST-SSR引物,均为单位点引物(表1)。Genomic-SSR和EST-SSR引物序列信息来源于<http://wheat.pw.usda.gov/GG2>。

表1 30对引物的具体信息
Table 1 Information of 30 pairs of primers

引物	引物类型	染色 体	等位变 异数目	PIC 值	退火 温度 /°C	PCR产物 长度/bp
Xcwm65*	EST-SSR	1A	7	0.73	65	220~260
Xcwm75	EST-SSR	1A	4	0.50	65	210~240
Xksum182	EST-SSR	1A	4	0.53	65	~185
Xcnl150*	EST-SSR	1B	4	0.50	63	~200
Xbarc80*	Genomic-SSR	1BL	6	0.65	65	100~125
Xcfd72*	Genomic-SSR	1DM	7	0.68	65	210~240
Xcwm334*	EST-SSR	2A	3	0.53	65	175~180
Xgwm294	Genomic-SSR	2AL	14	0.79	65	50~120
Xgwm429	Genomic-SSR	2BS	11	0.76	58	190~230
Xksum73	EST-SSR	2D	3	0.55	60	~180
Xgwm261*	Genomic-SSR	2DS	11	0.74	65	160~200
Xgwm155*	Genomic-SSR	3AL	9	0.77	60	120~160
Xswes185	EST-SSR	3B	4	0.58	65	180~190
Xgwm285	Genomic-SSR	3BS	12	0.76	65	210~250
Xcwm326*	Genomic-SSR	3BL	9	0.76	65	170~210
Xgdm72	Genomic-SSR	3DL	8	0.74	60	110~150
Xgwm610	Genomic-SSR	4AL	5	0.62	60	160~175
Xksum62*	EST-SSR	4B	8	0.82	65	160~220
Xbarc354*	Genomic-SSR	6B	7	0.75	55	180~260
Xbarc91*	Genomic-SSR	4DL	10	0.78	60	110~160
Xcwem40*	EST-SSR	5A	9	0.79	58	110~180
Xgwm67	Genomic-SSR	5BS	7	0.66	60	70~100
Xcfd29*	Genomic-SSR	5DL	12	0.85	63	180~200
Xgwm334*	Genomic-SSR	6AS	18	0.83	50	100~150
Xbarc198	Genomic-SSR	6BL	11	0.75	65	110~160
Xcfd76	Genomic-SSR	6DL	11	0.84	68	140~170
Xwmc603	Genomic-SSR	7AL	10	0.74	65	90~120
Xswes209	EST-SSR	7B	4	0.63	60	~300
Xgwm333*	Genomic-SSR	7BL	6	0.67	63	~150
Xgwm437*	Genomic-SSR	7DL	13	0.67	50	90~140

注:*表示针对“京麦1100”筛选出的双亲间有多态性的引物。

PCR反应体系为10 μL , 含10 \times buffer 1.0 μL , 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ dNTP 0.2 μL , 50 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 模板DNA 3.0 μL , 1.25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 引物 2.0 μL , 2 $\text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ Taq DNA聚合酶 0.25 μL (北京鼎国生物技术公司), ddH₂O 3.55 μL 。PCR扩增程序为:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,退火 1 min(退火温度见表1),72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s,35个循环;最后72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。PCR产物经6%聚丙烯酰胺变性凝胶分离,电压2000 V,电泳时间由PCR产物长度决定。采用简化硝酸银染色法显带^[18]。

2 结果与分析

2.1 双亲多态性引物筛选与基因型分析

采用王立新等^[9]的方法检测每个杂交种对应亲本中混有的杂株,剔除杂株后将每个亲本各个体以等体积混成2个混样,用30对SSR引物对双亲的4个样品进行基因型分析,筛选出至少5对双亲间有多态性的引物,并分析各亲本30个个体的基因型。结果显示,180份杂交种中分别筛选出了双亲间有多态性的引物8~21对。如以杂交小麦品种“京麦1100”为例,共筛选出16对双亲间有多态性的引物(表1,标*)。利用这16对引物分析“京麦1100”双亲30个个体的基因型,结果表明在Xcfd29、Xcwm65和Xwmc326位点上,母本的个体间呈现两种不同的等位变异或两种等位变异的杂合型,说明母本在这些位点上不纯;在位点Xcfd29、Xgwm334和Xbarc91上,父本的个体之间呈现两种不同的等位变异或两种等位变异的杂合型,说明父本在这些位点上不纯。

2.2 杂交种的基因型分析

2.2.1 杂交种的基因型记录

利用双亲间有多态性的SSR引物分析F₁杂交种个体的

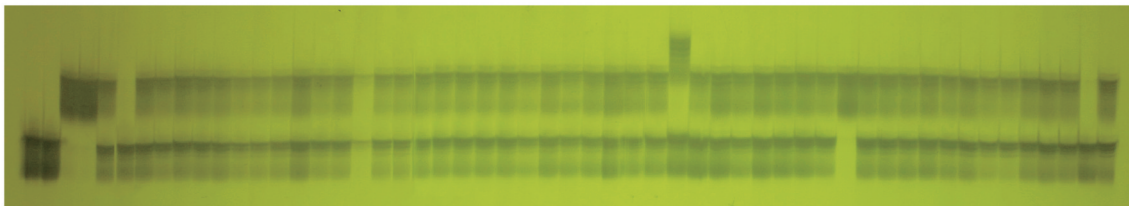
基因型,依据SSR扩增产物在电泳凝胶上的相对位置,以父母本基因型作为对照,记录杂交种各个体在各位点上的基因型。分析了180份杂交种,发现品种“京麦1100”在16个SSR位点中,能够代表所有的SSR位点杂合类型,因此以杂交种“京麦1100”为例说明杂交种基因型的记录方法。

1) 当在某个SSR位点上父母本均纯合,且仅有一种等位变异时,杂交种基因型记录方法为:以位点Xgwm261为例(图1),母本和父本均仅有一种等位变异,基因型分别记作“aa”和“bb”,杂交种个体1、3~16、18~26、28、30~36、38~48、50同时具有父母本的带型,记作“ab”;个体2和49与母本的基因型相同,记作“aa”;个体37与父本的基因型相同,记作“bb”,个体29的一种等位变异与母本相同,另一等位变异既不同于母本也不同于父本,记作“ac”。

2) 当某个位点上母本非纯合,父本纯合时,即母本的不同个体分别具有两种等位变异,而父本的不同个体仅有一种等位变异时,杂交种基因型记录方法为:以位点Xcwm65为例(图2),母本具有两种等位变异,基因型记作“aa”和“cc”;父本仅有一种等位变异,基因型记作“bb”;杂交种个体3~5、7、9、11~17、20~22、27、31、32、35、38、39、42、44、46~48、50的一种等位变异与母本的一种等位变异(aa)相同,另一种等位变异与父本(bb)相同,记作“ab”;个体6、8、10、19、23~26、28~30、33、34、36、40、41、43、45的一种等位变异与母本的一种等位变异(cc)相同,另一种等位变异与父本(bb)相同,记作“bc”;个体2和49与母本的一种等位变异相同,记作“aa”;个体1和37与父本的基因型相同,记作“bb”。

3) 当在某个位点上母本为纯合,父本非纯合时,即母本的不同个体仅有一种等位变异,父本的不同个体分别具有两

M1M2F1F2 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50



M₁, M₂—母本;F₁, F₂—父本;1~50—F₁代个体编号,下图同。

图1 引物Xgwm261对“京麦1100”的杂株检测扩增结果

Fig. 1 SSR profile of wheat hybrids “Jingmai1100” amplified by Xgwm261 primer

M1M2F1F2 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50

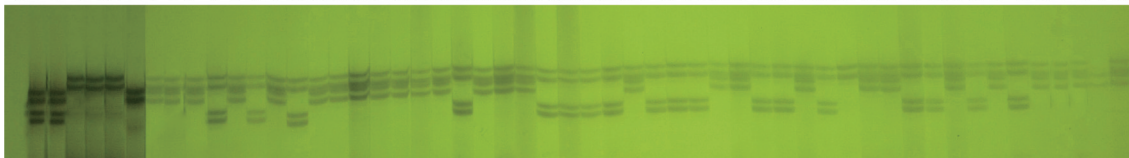


图2 引物Xcwm65对“京麦1100”的杂株检测扩增结果

Fig. 2 SSR profile of wheat hybrids “Jingmai1100” amplified by Xcwm65 primer

种等位变异,杂交种基因型记录方法为:以位点 Xbar91 为例(图3),母本仅有一种等位变异,基因型记作“aa”;父本具有两种等位变异,其中一种等位变异与母本相同,基因型记作“aa”和“bb”;杂交种个体3~7、9~17、19~26、28、30~36、39~48、50的一种等位变异与母本(aa)相同,另一等位变异与父本的一种等位变异(bb)相同,基因型记作“ab”;个体2、8、18、27、37、38、49基因型记作“aa”;个体1的一种等位变异与母本相同,另一等位变异既不同于母本也不同于父本,记作“ac”;个体29的一种等位变异与母本相同,另一等位变异既不同于母本也不同于父本,记作“ad”。

4) 当在某个位点上父母本均非纯合时,即母本和父本分

别具有两种等位变异,杂交种基因型记录方法为:以位点 Xcfd29 为例(图4),母本有两种等位变异,基因型记作“aa”和“cc”;父本具有两种等位变异,基因型记作“bb”和“dd”;杂交种个体1、5、13、21、35、38、48、50的基因型记作“ab”;个体3、4、7~9、11、12、14~18、22、31、32、39、42、44、46、47的基因型记作“ad”;个体25、30、45的基因型记作“cb”;个体6、10、19、23、24、26、28、33、34、36、40、41、43的基因型记作“cd”。个体2、37、49与母本的一种等位变异相同,记作“aa”;个体29的一种等位变异与母本的一种等位变异相同,另一等位变异既不同于母本也不同于父本,记作“ae”。

MIM2FIF21 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50

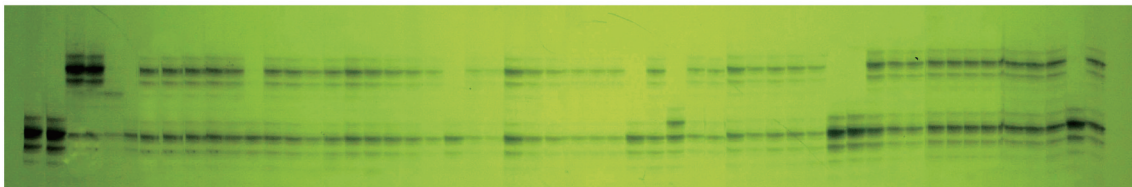


图3 引物 Xbarc91 对“京麦 1100”的杂株检测扩增结果

Fig. 3 SSR profile of wheat hybrids "Jingmai1100" amplified by Xbarc91 primer

MIM2FIF21 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50

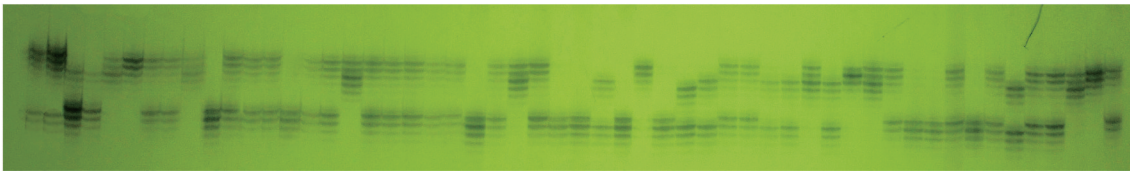


图4 引物 Xcfd29 对“京麦 1100”的杂株检测扩增结果

Fig. 4 SSR profile of wheat hybrids "Jingmai1100" amplified by Xcfd29 primer

2.2.2 真实杂交种基因型判断

理论上真实杂交种在某位点上的两种等位变异分别来自于父本和母本,虽然在某些位点上父本或母本存在SSR位点不纯合的现象,但只要个体同时具备父本(任一等位变异)和母本(任一等位变异)的基因型,均应视为真实杂交种的基因型。以“京麦1100”为例,该杂交种的父母本及其50个个体在16个SSR位点上的基因型检测结果见表2。在位点 Xcwm65 和 Xwmc326 上,仅母本位点非纯合,真实杂交种在这2个位点上均应具有2种基因型“ab”或“bc”。在 Xbarc91 位点上,仅父本位点非纯合,真实杂交种在该位点上应具有2种基因型,如为“aa”或“ab”。在位点 Xcfd29 上,父母本均为非纯合位点,真实杂交种应具有4种基因型,如为“ab”、“ad”、“bc”或“cd”。在其余11个位点上,父母本均纯合,真实杂交种应仅有1种基因型“ab”。

2.2.3 杂株判断

在正确认识真实杂交种基因型表现的基础上,分析造成杂交种个体间基因型差异的原因,当某个体在多个SSR位点

上与真实杂交种基因型不同时,判断为杂株。以杂交种“京麦1100”为例,检测结果(表2)显示个体1在位点 Xbarc91 上具有母本和非父母本的基因型,在位点 Xgwm333 上具有父本和非母本的基因型,在位点 Xcwm65 上仅有父本的基因型,在其余位点上基因型正常,说明此个体为混入杂交种中的另一杂交种,应判断为杂株。个体37在16个位点上均处于纯合状态,但在其中5个位点上均不具备父母本的基因型,说明此个体为混入杂交种中的一个常规品种,应判断为杂株。个体2和49在16个位点上均仅有母本的基因型,说明这2株是母本自交苗;个体29在12个位点上均处于杂合状态,但不同于真实杂交种的基因型,在其中10个位点一种带型与母本相同,另一种带型不同于父本,说明此个体接受了外来花粉,应判断为杂株;个体4、5、19和22均在1个位点上基因型不同于真实杂交种,为了明确这些个体基因型差异的原因,对这些个体(真实杂交种为对照)增加了10个SSR位点做进一步检测,结果4株的10个SSR位点均未检出基因型的差异,即这4株的基因型在检测的26个SSR位点中仅有1个位点与真实

表2 “京麦1100”的亲本及F₁单株16个SSR位点上的基因型
Table 2 Genotype of parents and F₁ hybrids of "Jingmai1100" in 16 SSR loci

京麦 1100	Xgwm1 55	Xcfd 29	Xgwm 334	Xcnl 150	Xbarc 80	Xcwem 40	Xgwm 437	Xcfd 72	Xbarc 354	Xbarc 91	Xcwm 334	Xcwm 65	Xgwm 261	Xgmc 326	Xgwm 333	Xksum 62
母	aa	ac	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	ac	aa	ac	aa	aa
父	bb	bd	bc	bb	bb	bb	bb	bb	bb	ab	bb	bb	bb	bb	bb	bb
1	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ac	ab	bb	ab	bc	bc	ab
2	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa
3	ab	ad	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab
4	ab	ad	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ad	ab	ab
5	ab	ab	ab	ab	ab	ac	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab
6	ab	cd	ac	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	bc	ab	bc	ab	ab
7	ab	ad	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab
8	ab	ad	ac	ab	ab	ab	ab	ab	ab	aa	ab	bc	ab	bc	ab	ab
9	ab	ad	ac	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab
10	ab	cd	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	bc	ab	bc	ab	ab
11	ab	ad	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab
12	ab	ad	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab
13	ab	ab	ac	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab
14	ab	ad	ac	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab
15	ab	ad	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab
16	ab	ad	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab
17	ab	ad	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	bb	ab	ab	ab	ab
18	ab	ad	ac	ab	ab	ab	ab	ab	ab	aa	ab	bc	ab	ab	ab	ab
19	ab	cd	ab	ab	ab	ab	ad	ab	ab	ab	ab	bc	ab	bc	ab	ab
20	ab	ad	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab
21	ab	ab	ac	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab
22	ab	ad	ac	ab	ab	ab	bc	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab
23	ab	cd	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	bc	ab	bc	ab	ab
24	ab	cd	ac	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	bc	ab	bc	ab	ab
25	ab	bc	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	bc	ab	bc	ab	ab
26	ab	cd	ac	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	bc	ab	ab	ab	ab
27	ab	aa	ac	ab	ab	ab	ab	ab	ab	aa	ab	bb	ab	ab	ab	ab
28	ab	cd	ac	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	bc	ab	bc	ab	ab
29	ac	ce	ab	aa	aa	ad	ae	ac	ac	ad	aa	bc	ac	bc	ac	aa
30	ab	bc	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	bc	ab	bc	ab	ab
31	ab	ad	ac	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab
32	ab	ad	ac	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab
33	ab	cd	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	bc	ab	ab	ab	ab
34	ab	cd	ac	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	bc	ab	bc	ab	ab
35	ab	ab	ac	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab
36	ab	cd	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	bc	ab	bc	ab	ab
37	dd	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	dd	aa	bb	bb	bb	aa	aa	aa
38	ab	ab	ac	ab	ab	ab	ab	ab	ab	aa	ab	ab	ab	ab	ab	ab
39	ab	ad	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab
40	ab	cd	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	bc	ab	bc	ab	ab
41	ab	cd	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	bc	ab	bc	ab	ab
42	ab	ad	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab
43	ab	cd	ac	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	bc	ab	bc	ab	ab
44	ab	ad	ac	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab
45	ab	bc	ac	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	bc	ab	bc	ab	ab
46	ab	ad	ac	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab
47	ab	ad	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab
48	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab
49	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa
50	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab

注:1~50为“京麦1100”F₁代个体编号。

杂交种不同。个体4、5和19分别在1个位点上产生基因型差异的原因可能是父本中混入了高度相似的姊妹系或者是父本发生基因突变。个体22在1个位点上产生基因型差异的原因可能是母本中混入了高度相似的姊妹系或者是母本发生基因突变。虽然这4株的基因型在检测的26个SSR位点中仅有1个位点与真实杂交种不同,但这种基因型差异均由父母本自身原因造成,不是杂交种中的混杂,不能判定为杂株。由此可见,只有当某个体在多个SSR位点上与真实杂交种基因型不同时,才能判断为杂株。

3 讨论

3.1 适于杂株鉴定的SSR标记

SSR标记种类和数量是影响杂株鉴定效率和成本的关键因素。杂交种中杂株的产生主要是由母本去雄不彻底、漏去雄或育性不稳定形成的自交苗、组合配制或制种过程中的串粉以及收获后的机械混杂等因素造成的。因此小麦杂交种中杂株的鉴定主要是检测自交苗、串粉株和混杂株。基于以上情况,适用于杂交种杂株鉴定的SSR引物必须具备分布均匀、带型简单清晰、多态性高、分辨力强等特征。本研究采用的30对引物是以156个来自中国不同麦区的审定品种筛选出来的,适用于常规品种种子纯度鉴定引物,多态性好,分辨力高。通过在180份杂交种中验证,发现这些引物基本满足小麦杂交种杂株鉴定的需要。

关于准确鉴定杂株所需的SSR标记数量,Yashitola等^[19]认为,选用1个特异性SSR标记就可有效检测杂交种的种子纯度,但在本研究中“京麦1100”的个体4、5、19和22均在1个位点上基因型不同于真实杂交种,但这些个体却无法判定为杂株。王风格等^[20]认为采用1个双亲间有多态性的SSR标记即可鉴别自交苗,但在本研究中“京麦1100”的个体8、18、27、38的基因型仅在位点Xbarc91上与母本相同,但此位点上父本非纯,基因型为“aa”和“bb”。因此这4个个体是由于父本非纯合引起的,基因型为“aa”的个体是真实杂交种,不能判断为杂株。由此可见,单个SSR标记难以准确鉴定杂交种种子纯度,必须应用多个SSR标记进行杂交种纯度鉴定。至于具体工作中采用多少标记,需要综合考虑待测杂交种的基因型、特异性、检测成本、效率以及可靠性等多个因素。经统计,本研究使用的180个杂交种中在30个位点中有近80个杂交种的双亲中存在非纯合位点现象,为了保证检测结果的准确性,建议先选用5个双亲间有多态性的标记进行杂交种杂株的鉴定,当个别个体无法判断为杂株时可适当增加位点。

3.2 正确区分种子混杂和位点不纯

用SSR标记检测杂交小麦种子纯度时,种子混杂和SSR位点不纯均会造成杂交种个体间基因型的差异,必须正确区分。杂交小麦种子混杂是指在生产和加工环节由于人为原因导致的自交、串粉和混杂;杂交小麦SSR位点不纯是指在品种选育过程中因亲本自交代数不够,存在亲本本身遗传背景未完全纯合稳定(即SSR位点不纯),导致杂交种不同个体

之间存在基因型差异。若错把位点不纯当成种子混杂,将增加杂株比例,降低种子纯度检测结果;若错把种子混杂当成非纯合位点,将会获得杂交种错误的指纹图谱,严重影响品种的特异性和真实性判断。本文推荐的判定杂交种中杂株的方法可有效区分这两种现象,该方法的关键步骤是准确判断真实杂交种的基因型;即不论亲本是否存在非纯合位点现象,只要某个体同时具备父母本基因型,均视为真实杂交种的基因型。在正确识别真实杂交种基因型基础上,统计每个单株的基因型,当某个体在多个SSR位点上与真实杂交种基因型不同时,判定为杂株。但最少有几个SSR位点的带型与真实杂交种不同便可确定为杂株的问题还需进一步研究。

3.3 适于杂株鉴定的标记类型

适于杂株鉴定的标记类型需满足分辨力高、准确可靠、可重复、稳定、共显性遗传、易实现高通量等条件,随着分子生物学的发展,目前SSR和SNP标记最适宜。SSR标记技术相对成熟,研究基础较强,已被广泛应用于品种鉴定领域。SNP较SSR标记具有位点丰富、自动化程度高、数据缺失率低和重复性好等优点^[13],在品种鉴定领域已经开始应用。先锋等跨国公司自2004年起就已将SNP标记成熟地应用于育种材料的真实性和纯度检测^[13];北京市农林科学院玉米中心于2012年研发了maizeSNP 3072芯片,应用于玉米真实性检测及分子育种中^[14];国际种子联盟(ISF)于2014年确定了3072个全球统一的SNP组合引物,用于判定玉米实质性派生品种(EDV)(<http://www.worldseed.org/isf/edv.html>)。由于小麦基因组比较复杂,其基因组测序完成和SNP芯片开发较晚,在小麦品种鉴定中的应用相对滞后,主要停留在评估芯片检测平台、遗传多样性和群体结构等方面的研究^[21-24]。近两年Illumina公司开发的9K和90K的iSelect assay SNP商业化芯片^[25,26]、法国和英国开发的400K和817K小麦SNP芯片以及中国农科院即将释放的670K小麦基因组特异的SNP芯片,为小麦高通量品种鉴定提供了技术支撑。北京杂交小麦工程技术研究中心已经开展了适于品种鉴定的SNP标记筛选工作,未来的种子纯度鉴定技术必然会被高通量SNP技术取代。

4 结论

利用SSR标记分析180份小麦杂交种种子纯度的基础上,以“京麦1100”为例,提出了利用SSR标记正确判断小麦杂交种中杂株的方法,有效地区分了种子混杂和SSR位点不纯现象。该结果为杂交小麦种子纯度SSR标记鉴定法提供了理论依据。

参考文献(References)

- [1] International Union for the Protection of New Varieties of Plants, UPOV. Guidelines for DNA-profiling: Molecular marker selection and database construction (“BMT guidelines”)[M]. Geneva, Switzerland: UPOV, 2007.
- [2] International Union for the Protection of New Varieties of Plants, UPOV. Guidelines for DNA-profiling: Molecular marker selection and database construction (“BMT guidelines”)[M]. Geneva: UPOV, 2010.

- [3] 王立新, 常利芳, 李宏博, 等. 小麦种子纯度的分子标记检测方法[J]. 麦类作物学报, 2009, 29(1): 1-8.
Wang Lixin, Chang Lifang, Li Hongbo, et al. Method of wheat seeds purity testing by molecular markers[J]. Journal of Triticeae Crops, 2009, 29(1): 1-8.
- [4] 刘丽华, 庞斌双, 王立新, 等. 醇溶蛋白法和SSR标记法检测小麦种子纯度的比较[J]. 麦类作物学报, 2013, 33(3): 429-434
Liu Lihua, Pang Binshuang, Wang Lixin, et al. Comparison of seed purity detection of wheat using gliadin analysis and SSR markers[J]. Journal of Triticeae Crops, 2013, 33(3): 429-434.
- [5] Nandakumar N, Singh A K, Sharma R K, et al. Molecular fingerprinting of hybrids and assessment of genetic purity of hybrid seeds in rice using microsatellite markers[J]. Euphytica, 2004, 136(3): 257-264.
- [6] Sundaram R M, Naveenkumar B, Biradar S K B, et al. Identification of informative SSR markers capable of distinguishing hybrid rice parental lines and their utilization in seed purity assessment[J]. Euphytica, 2008, 163(2): 215-224.
- [7] 李晓辉, 李新海, 李文华, 等. SSR标记技术在玉米杂交种种子纯度测定中的应用[J]. 作物学报, 2003, 29(1): 63-68.
Li Xiaohui, Li Xinhai, Li Wenhua, et al. Application of SSR markers in hybrid seed purity test of maize[J]. Acta Agronomica Sinica, 2003, 29(1): 63-68.
- [8] 王凤格, 赵久然, 郭景伦, 等. 中国玉米新品种DNA指纹库建立系列研究I. 玉米品种纯度及真伪鉴定中SSR技术标准实验体系的建立[J]. 玉米科学, 2003, 11(1): 3-6.
Wang Fengge, Zhao Jiuran, Guo Jinglun, et al. Series of Research on Establishing DNA fingerprinting pool of Chinese new maize cultivars I. The establishment of a standard SSR fitting for maize cultivar identification[J]. Journal of Maize Sciences, 2003, 11(1): 3-6.
- [9] 刘勤红, 王芙蓉, 张军, 等. 利用SSR标记鉴定鲁棉研15号杂交种纯度的研究[J]. 山东农业科学, 2003(2): 7-9.
Liu Qinhong, Wang Furong, Zhang Jun, et al. Purity detection of Lumianyan 15 hybrid with SSR markers[J]. Shandong Agricultural Sciences, 2003(2): 7-9.
- [10] 匡猛, 杨伟华, 张玉翠, 等. 棉花杂交种纯度的SSR标记检测及其与田间表型鉴定的相关性[J]. 作物学报, 2011, 37(12): 2299-2305.
Kuang Meng, Yang Weihua, Zhang Yucui, et al. Cotton hybrid purity tested by SSR markers and its correlation with phenotype identification in field[J]. Acta Agronomica Sinica, 2011, 37(12): 2299-2305.
- [11] 关荣霞, 方宏亮, 何艳琴, 等. 国家大豆区域试验品种(系)SSR位点纯合度分析[J]. 作物学报, 2012, 38(10): 1760-1765.
Guang Rongxia, Fang Hongliang, He Yanqin, et al. Molecular homozygosity of soybean varieties (Lines) in regional test of China by using SSR markers[J]. Acta Agronomica Sinica, 2012, 38(10): 1760-1765.
- [12] 王爱娜, 王灏, 赵亚军, 等. 甘蓝型化学杀雄杂交油菜品种秦优33种子纯度的SSR鉴定[J]. 农业生物技术学报, 2011, 19(6): 1011-1018.
Wang Aina, Wang Hao, Zhao Yajun, et al. Purity identification of chemical hybridizing male varieties of hybrid rape qinyou 33 using SSR markers[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2011, 19(6): 1011-1018.
- [13] Jones E S, Sullivan H, Bhatramakki D A. Comparison of simple sequence repeat and single nucleotide polymorphism marker technologies for the genotypic analysis of maize (*Zea mays* L.) [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2007, 115: 361-371.
- [14] 王凤格, 赵久然, 田红丽. 玉米真实性检测及分子育种SNP芯片-Maize SNP3072及其检测方法: 中国, 201280000286.2[P]. 2013-09-04.
Wang Fengge, Zhao Jiuran, Tian Hongli. Maize authentication detection and molecular breeding SNP chip-maize SNP3072 and detection method thereof: China, 201280000286.2[P]. 2013-09-04.
- [15] Shirasawa K, Shiokai S, Yamaguchi M, et al. Dot-blot-SNP analysis for practical plant breeding and cultivar identification in rice[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2006, 113: 147-155.
- [16] Yoon, M S, Song, Q J, Choi, I Y, et al. BARCSoySNP23: A panel of 23 selected SNPs for soybean cultivar identification[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2007, 114: 885-899.
- [17] Jones H, Norris C, Smith D, et al. Evaluation of the use of high-density SNP genotyping to implement UPOV model 2 for DUS testing in barley[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2013, 126(4): 901-911.
- [18] 季伟, 王立新, 孙辉, 等. 小麦SSR分析体系的简化[J]. 农业生物技术学报, 2007, 15(5): 907-908.
Ji Wei, Wang Lixin, Sun Hui, et al. Predigestion of wheat SSR analysis protocol[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2007, 15(5): 907-908.
- [19] Yashitola J, Thirumurugan T, Sundaram R M. Assessment of purity of rice hybrids using microsatellite and STS markers[J]. Crop Science, 2002, 42(4): 1369-1373.
- [20] 王凤格, 赵久然, 王璐, 等. 适于玉米杂交种纯度鉴定的SSR核心引物的确定[J]. 农业生物技术学报, 2007, 15(6): 964-969.
Wang Fengge, Zhao Jiuran, Wang Lu, et al. Determination of SSR core primers for maize hybrid purity identification[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2007, 15(6): 964-969.
- [21] Wurschum T, Langer S M, Longin F H, et al. Population structure, genetic diversity and linkage disequilibrium in elite winter wheat assessed with SNP and SSR markers[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2013, 126: 1477-1486.
- [22] Wu Q H, Chen Y X, Zhou S H, et al. High-density genetic linkage map construction and QTL mapping of grain shape and size in the wheat population Yanda1817 × Beiong6 [J]. PLoS One, 2015, 10(2): e0118144.
- [23] Zanke C D, Ling J, Plieske J, et al. Whole genome association mapping of plant height in winter wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. PLoS One, 2014, 9(11): e113287.
- [24] 曹廷杰, 谢青忠, 吴秋红, 等. 河南省近年审定小麦品种基于系谱和SNP标记的遗传多样性分析[J]. 作物学报, 2015, 41(2): 197-206.
Cao Tingjie, Xie Jingzhong, Wu Qihong, et al. Genetic diversity of registered wheat varieties in Henan Province based on pedigree and single-nucleotide polymorphism[J]. Acta Agronomica Sinica, 2015, 41(2): 197-206.
- [25] Cavanagh C R, Chao S, Wang S, et al. Genome-wide comparative diversity uncovers multiple targets of selection for improvement in hexaploid wheat landraces and cultivars[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2013, 110: 8057-8062.
- [26] Wang S, Wong D, Forrest K, et al. Characterization of polyploid wheat genomic diversity using a high-density 90,000 single nucleotide polymorphism array[J]. Plant Biotechnology Journal, 2014, 12: 787-796.

(责任编辑 王媛媛)