

基于 SSR 标记的六倍体小黑麦遗传多样性分析

胡立芹, 张 超, 徐林涛, 张一铎, 马莹雪, 王洪刚

(山东农业大学作物生物学国家重点实验室/国家小麦改良中心泰安分中心/山东农业大学农学院, 泰安 271018)

摘要: 采用已筛选出的多态性较好的分布于六倍体小黑麦 21 对染色体上的 100 对 SSR 引物对从国际玉米小麦改良中心 (CIMMYT) 引进的 339 份六倍体小黑麦进行了遗传多样性分析。结果显示, 100 对引物共检测出 323 个等位变异, 变幅是 1 ~ 6 个, 平均等位变异丰富度为 3.23; 多态信息含量 (PIC) 的变幅为 0 ~ 0.748, 平均多态信息含量为 0.465; 平均遗传多样性指数 (H') 为 0.1439, 说明供试的 339 份六倍体小黑麦品种的 SSR 遗传多样性较为丰富。同时基于 Nei's 遗传距离对 339 份材料进行聚类分析, 可以将供试材料分为 6 个类群。其中, 第 VI 类群与其他类群的遗传距离较大、遗传差异较明显。研究结果为将六倍体小黑麦的优良基因应用于普通小麦的遗传改良提供了理论依据。

关键词: 六倍体小黑麦; SSR; 遗传多样性分析

Genetic Diversity of Hexaploid *Triticale* Analyzed by SSR Markers

HU Li-qin, ZHANG Chao, XU Lin-tao, ZHANG Yi-duo, MA Ying-xue,

WANG Hong-gang

(State Key Laboratory of Crop Biology, Shandong Agricultural University / Tai'an Subcenter of National Wheat Improvement Center / Agronomy College of Shandong Agricultural University, Tai'an 271018)

Abstract: Genetic diversity of 339 Hexaploid *Triticale* from International Maize and Wheat Improvement Center (CIMMYT), was analyzed based on 100 microsatellite markers distributed across the whole *Triticale* genome. A total of 323 alleles were detected with 3.23 alleles per locus. The polymorphic information content (PIC) ranged from 0 to 0.748, with an average of 0.465 and the average genetic diversity index (H') was 0.1439. These indicated that genetic diversity of 339 tested cultivars was rich based on SSR markers. Clustering results based on Nei's genetic distance showed that the tested materials could be divided into six groups, and groups VI was clearly distinct from the other species. The results would provide a theoretical basis on genetic improvement of wheat by using fine genes from Hexaploid *Triticale*.

Key words: Hexaploid *Triticale*; SSR; genetic diversity analysis

六倍体小黑麦是由四倍体小麦 (AABB) 与黑麦 (RR) 杂交, 然后对杂种一代进行染色体加倍而形成的双二倍体, 其染色体组构成为 AABBRR, 将小麦的早熟、优质和黑麦的多穗、抗逆性强、适应性广、赖氨酸含量高等特性较好的结合在一起^[1-2], 在小麦遗传改良中具有重要利用价值。特别是 1B/1R 种质在小麦育种中被广泛利用, 培育了一批高产抗病的优良新品种, 促进了小麦育种水平的显著提高。

遗传多样性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。物种的遗传多样性可以从形态学特征、细胞学特征、生理特征、基因位点及 DNA 序列等不同方面来体现^[3]。目前, 六倍体小黑麦种质资源的遗传多样性研究, 主要以表型性状的分析为主^[4-7], 而利用 DNA 分子标记技术分析其遗传多样性的研究较少。周福平等^[8]利用 RAPD 标记对 10 份六倍体小黑麦、1 份普通小麦和 1 份黑

收稿日期: 2014-07-15 修回日期: 2014-08-01 网络出版日期: 2015-06-11

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20150611.0942.007.html>

基金项目: “十二五”农村领域国家科技计划课题 (2013BAD01B02-8); 小麦种质资源发掘与创新利用

第一作者研究方向为六倍体小黑麦遗传多样性研究。E-mail: lqhu926@126.com

通信作者: 王洪刚, 主要从事小麦远缘杂交及其遗传改良研究。E-mail: hgwang@sdaa.edu.cn

麦种质资源的遗传多样性进行了分析。但 RAPD 标记的稳定性较差,而 SSR 标记检测效率显著高于 RAPD 等标记^[9]。SSR(simple sequence repeats),亦称微卫星(microsatellite DNA)标记,是一类短的串联重复序列基序(2~4 个核苷酸)组成的简单重复序列。与其他分子标记相比,SSR 分子标记具有较高的多态性、共显性分离、位点专化性、标记覆盖整个基因组且分布均匀、DNA 样本用量少等优点,已被广泛应用于小麦^[10-12]、水稻^[13-16]、大麦^[17-19]、荞麦^[20-21]等作物的遗传差异和亲缘关系研究,但利用 SSR 标记技术分析六倍体小黑麦种质资源遗传多样

性的报道较少。本研究采用 SSR 标记技术,对从国际玉米小麦改良中心(CIMMYT)引进的 339 份六倍体小黑麦材料进行遗传多样性分析,旨在从分子水平上明确遗传差异,为其在小麦遗传改良中的有效利用提供参考信息。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试材料为引自国际玉米小麦改良中心(CIMMYT)的 339 份六倍体小黑麦(表 1),由国家小麦改良中心山东(泰安)分中心保存。

表 1 339 份供试六倍体小黑麦材料及其来源

Table 1 339 Hexaploid *Triticale* cultivars and their sources used in this study

编号 Code	来源 Origin	编号 Code	来源 Origin	编号 Code	来源 Origin	编号 Code	来源 Origin
1	12th3	28	35th18	55	35th45	82	35th73
2	12th4	29	35th19	56	35th46	83	35th74
3	12th6	30	35th20	57	35th47	84	35th75
4	12th7	31	35th21	58	35th48	85	35th76
5	12th8	32	35th22	59	35th49	86	35th77
6	12th9	33	35th23	60	35th50	87	35th78
7	12th10	34	35th24	61	35th51	88	35th79
8	12th11	35	35th25	62	35th52	89	35th80
9	12th15	36	35th26	63	35th53	90	35th81
10	12th17	37	35th27	64	35th54	91	35th82
11	12th19	38	35th28	65	35th55	92	35th83
12	12th22	39	35th29	66	35th56	93	35th84
13	12th48	40	35th30	67	35th57	94	35th85
14	35th1	41	35th31	68	35th58	95	35th86
15	35th2	42	35th32	69	35th59	96	35th87
16	35th3	43	35th33	70	35th60	97	35th88
17	35th4	44	35th34	71	35th61	98	35th89
18	35th5	45	35th35	72	35th62	99	35th90
19	35th8	46	35th36	73	35th63	100	35th91
20	35th9	47	35th37	74	35th64	101	35th92
21	35th10	48	35th38	75	35th65	102	35th93
22	35th11	49	35th39	76	35th66	103	35th94
23	35th12	50	35th40	77	35th67	104	35th95
24	35th13	51	35th41	78	35th68	105	35th96
25	35th15	52	35th42	79	35th69	106	35th97
26	35th16	53	35th43	80	35th70	107	35th99
27	35th17	54	35th44	81	35th72	108	35th100

表 1(续)

编号 Code	来源 Origin	编号 Code	来源 Origin	编号 Code	来源 Origin	编号 Code	来源 Origin
109	35th101	149	2006837	189	20068028	229	20068068
110	35th102	150	2006838	190	20068029	230	20068069
111	35th103	151	2006839	191	20068030	231	20068070
112	35th104	152	2006840	192	20068031	232	20068071
113	35th105	153	2006841	193	20068032	233	20068072
114	2006802	154	2006842	194	20068033	234	20068073
115	2006803	155	2006843	195	20068034	235	20068074
116	2006804	156	2006844	196	20068035	236	20068075
117	2006805	157	2006845	197	20068036	237	20068076
118	2006806	158	2006846	198	20068037	238	20068077
119	2006807	159	2006847	199	20068038	239	20068078
120	2006808	160	2006848	200	20068039	240	20068079
121	2006809	161	2006849	201	20068040	241	20068080
122	2006810	162	2006850	202	20068041	242	20068081
123	2006811	163	20068002	203	20068042	243	20068082
124	2006812	164	20068003	201	20068043	244	20068083
125	2006813	165	20068004	205	20068044	245	2006884
126	2006814	166	20068005	206	20068045	246	20068085
127	2006815	167	20068006	207	20068046	247	20068086
128	2006816	168	20068007	208	20068047	248	20068087
129	2006817	169	20068008	209	20068048	249	20068088
130	2006818	170	20068009	210	20068049	250	20068089
131	2006819	171	20068010	211	20068050	251	20068090
132	2006820	172	20068011	212	20068051	252	20068091
133	2006821	173	20068012	213	20068052	253	20068092
134	2006822	174	20068013	214	20068053	254	20068093
135	2006823	175	20068014	215	20068054	255	20068094
136	2006824	176	20068015	216	20068055	256	20068095
137	2006825	177	20068016	217	20068056	257	20068096
138	2006826	178	20068017	218	20068057	258	20068097
139	2006827	179	20068018	219	20068058	259	20068098
140	2006828	180	20068019	220	20068059	260	20068099
141	2006829	181	20068020	221	20068060	261	20068100
142	2006830	182	20068021	222	20068061	262	20068101
143	2006831	183	20068022	223	20068062	263	20068102
144	2006832	184	20068023	224	20068063	264	20068103
145	2006833	185	20068024	225	20068064	265	20068104
146	2006834	186	20068025	226	20068065	266	20068105
147	2006835	187	20068026	227	20068066	267	20068106
148	2006836	188	20068027	228	20068067	268	20068107

表 1(续)

编号	来源	编号	来源	编号	来源	编号	来源
Code	Origin	Code	Origin	Code	Origin	Code	Origin
269	20068108	287	20068126	305	20058065	323	20058084
270	20068109	288	20068127	306	20058067	324	20058085
271	20068110	289	20058049	307	20058068	325	20058086
272	20068111	290	20058050	308	20058069	326	20058087
273	20068112	291	20058051	309	20058070	327	20058088
274	20068113	292	20058052	310	20058071	328	20058089
275	20068114	293	20058053	311	20058072	329	20058090
276	20068115	294	20058054	312	20058073	330	20058091
277	20068116	295	20058055	313	20058074	331	20058092
278	20068117	296	20058056	314	20058075	332	20058093
279	20068118	297	20058057	315	20058076	333	20058094
280	20068119	298	20058058	316	20058077	334	20058095
281	20068120	299	20058059	317	20058078	335	20058096
282	20068121	300	20058060	318	20058079	336	20058097
283	20068122	301	20058061	319	20058080	337	20058098
284	20068123	302	20058062	320	20058081	338	20058099
285	20068124	303	20058063	321	20058082	339	20058100
286	20068125	304	20058064	322	20058083		

1.2 试验方法

1.2.1 DNA 提取 取幼嫩叶片,在液氮中研磨后采用 CTAB 法^[22]提取基因组 DNA,取适量 DNA 稀释为 80 ng/μL 浓度备用。

1.2.2 六倍体小黑麦特异分子标记的筛选 选取田间性状差异较大的 16 份六倍体小黑麦对覆盖六倍体小黑麦全基因组的 1000 对进行多态性引物初步筛选,淘汰无多态性和扩增条带模糊不稳定的引物,最后确定 100 对扩增效果好、条带差异明显的 SSR 引物用于全部材料的多样性分析。引物的有关信息通过参考文献或在 GrainGenes2.0 (<http://wheat.pw.usda.gov/>) 中查阅获得,所有引物由上海生工生物工程技术公司合成。

1.2.3 PCR 多态性扩增及产物检测 利用已筛选出的 100 对引物对 339 个六倍体小黑麦的基因组 DNA 进行 PCR 扩增分析,扩增反应在 Bio-Rad 公司生产的 T100 Thermal Cycler 型热循环仪上进行。PCR 反应体积为 25 μL,其中含 10 × Buffer 2 μL, dNTP (2.5 mmol/L) 1.5 μL, Mg²⁺ (25 mmol/L) 1.5 μL, 25 μmol/L 的 5'和 3'端引物各 1.5 μL, 5 U/μL 的 TaqDNA 聚合酶 0.2 μL,模板 DNA 各 2 μL, ddH₂O 补足至 25 μL。反应程序:采用降落 PCR

(Touchdown PCR) 程序,即 94 ℃ 变性 4 min,接着 15 个循环的复性温度降落程序,每个循环 94 ℃ 变性 45 s, 65 ℃ 复性 50 s (−1 ℃/循环) 和 72 ℃ 延伸 55 s;最后 30 个循环的普通 PCR 程序即:94 ℃ 变性 40 s, 50 ℃ 复性 40 s, 72 ℃ 延伸 40 s;最后 72 ℃ 延伸 5 min;扩增结束后 10 ℃ 保存。扩增产物用 8% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 检测,硝酸银染色法染色, Tanon Gis-2010 凝胶成像仪拍照并进行条带统计分析。

1.3 数据处理

遗传多样性分析采用国际上通用的多态性信息含量 (PIC, polymorphism information content) 方法,此方法最初由研究人类遗传学的 D. Botstein 等^[23]提出,考虑到小麦品种 (系) 基因型的纯合性,现在大多采用 I. A. Anderson 等^[24]的简化式。标记 i 的 PIC 计算公式为

$$PIC_i = 1 - \sum P_{ij}^2$$

其中 P_{ij} 表示标记 i 的第 j 个带型出现的频率,标记 i 的总带型从 1 到 n。在统计所有位点多态性信息含量的同时,进行每个位点的等位变异丰富度 (A_{ij}) 及六倍体小黑麦每个基因组的遗传丰富度 (R)、多样性指数 (H') 计算^[25-27]。

遗传丰富度(R)计算公式:

$$R = \sum_{i=1}^{j=100} A_{ij}/n$$

其中 A_{ij} 表示第 i 个基因组上第 j 个位点的等位变异总数; n 表示检测位点总数。

多样性指数(H')计算公式:

$$H' = \sum_{i=1}^{j=100} H_i/n$$

其中, H_i 表示第 i 个引物对的多态信息含量, n 表示检测位点总数。

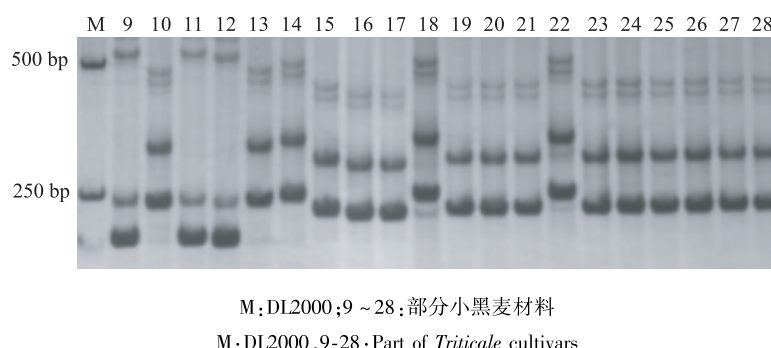
利用 SSR 分子数据建立的 0-1 矩阵, 每个样品的电泳条带按有或无记录, 电泳条带存在时赋值 1, 否则赋值 0。按 M. Nei 等^[25] 的方法计算品种间的遗传相似系数(GS): $GS = 2N_{ij}/(N_i + N_j)$ 和遗传距离(genetic distance) $GD = 1 - GS$ 。其中 N_i 为 i 品种出现的谱带数, N_j 为 j 品种出现的谱带数。利用 GD 值

按不加权成对群算术平均法(UPGMA)进行遗传相似性聚类分析。应用 Powermarker 软件, 进行品种间遗传距离的计算、聚类分析和聚类分析树状图的绘制。

2 结果与分析

2.1 小黑麦的 SSR 多态性分析

选取田间性状差异较大的 16 份六倍体小黑麦对覆盖六倍体小黑麦全基因组的 1000 对进行多态性引物初步筛选, 淘汰无多态性和扩增条带模糊不稳定的引物, 最后确定 100 对扩增效果好、条带差异明显的 SSR 引物用于 339 份材料的多样性分析。引物 Gli-B1 对部分六倍体小黑麦材料的扩增结果如图 1 所示。



M: DL2000; 9~28: 部分小黑麦材料

M: DL2000, 9-28: Part of *Triticale* cultivars

图 1 Gli-B1 对部分六倍体小黑麦的扩增结果

Fig. 1 Amplification results detected by Gli-B1 in part of *Triticale* cultivars

分析结果(表 2)表明, 100 对 SSR 引物共检测到 323 个等位变异, 变幅为 1~6, 平均每对 SSR 引物能检测到 3.23 个等位变异。检测到多态性等位变异最多的是 Gli-B1、wmc24 和 Xwmc479, 均检测到 6 个等位变异, 而 Xgwm359 检测到的等位变异数最少, 仅检测到 1 个等位变异。

多态性信息含量(PIC)是用来衡量某个基因位点等位变异程度高低的指标, $PIC \geq 0.5$, 为高度多态性位点; $0.25 < PIC < 0.5$, 为中度多态性位点; $PIC \leq 0.25$, 为低度多态性位点^[22]。本研究中, 339 份供试材料的多态信息含量(PIC)的变幅为 0~0.748, 平均为 0.465, 属于中度多态性位点。其中, $PIC \geq 0.5$ 的有 49 个, 占 49%。Xwmc596-7A 的多态性信息含量最高(0.748), 对小黑麦基因组 DNA 变异检测最为有效; Xgwm359-2A 只检测到 1 个等位变异, PIC 值为 0, 为无效位点。上述结果表明供试六倍体小黑麦的等位变异类型较为丰富。

2.2 A、B、R 染色体组的遗传多样性

筛选出的 100 对 SSR 多态性引物在 A、B、R 3 个染色体组中的分布分别为 43、48 和 9 对。在检测到的 323 个等位变异中, B 染色体组检测到的等位变异总数最多, 为 152 个, A 染色体组的等位变异总数是 142, R 染色体组最少, 总数为 29 个。但是从平均等位变异丰富度来看, A、B、R 3 个染色体组平均等位变异丰富度分别为 3.300、3.167、3.222 ($A > R > B$) (表 3); PIC 平均值分别为 0.488、0.481、0.266 ($A > B > R$); 遗传多样性指数分别为 0.1479、0.1519、0.0826 ($B > A > R$)。因此, 综合平均等位变异丰富度、多态性信息含量和多样性指数 3 个指标可以看出, A、B、R 3 个染色体组中, SSR 位点发生的变异以 A 染色体组表现最为明显, 其 SSR 位点多态性信息含量相对较高, 在 3 个染色体组中拥有最高的多样性, 而 R 染色体组的多样性相对较低。

表 2 100 对引物检测到的等位变异数和各位点的 *PIC* 值Table 2 Number of alleles and *PIC* value detected by 100 primers

引物 Primer	位点 Locus	等位变异数 No. of alleles	多态性信息含量 <i>PIC</i>	引物 Primer	位点 Locus	等位变异数 No. of alleles	多态性信息含量 <i>PIC</i>
Xgwm135	1A	5	0.610	Xgwm148	2B	2	0.497
BARC028	1AS	3	0.588	Xgwm374	2B	2	0.432
BARC083	1AL	2	0.499	wmc161	2B	3	0.544
BARC263	1AL	3	0.420	wmc326	2B	5	0.684
Xwmc120	1A	3	0.607	wmc327	2B	4	0.686
Xcnl76	1A	2	0.156	BARC055	2B	4	0.733
Xgwm95	2A	3	0.603	BARC101	2BL	3	0.529
Xgwm122	2A	4	0.466	BARC128	2BS	3	0.555
Xgwm294	2A	4	0.711	Xwmc317	2B	3	0.534
Xgwm312	2A	3	0.628	Xcfa2278	2B	2	0.476
Xgwm356	2A	2	0.490	Xgwm299	3B	4	0.673
Xgwm359	2A	1	0	Xgwm108	3B	2	0.495
Xgwm372	2A	2	0.442	Xcnl62	3B	3	0.624
Xgwm425	2A	3	0.291	Xgwm149	4B	2	0.412
Xgwm614	2A	3	0.619	Xgwm251	4B	2	0.440
Xgwm636	2A	4	0.686	Xgwm6	4B	4	0.472
wmc24	2A	6	0.670	Xbare227	4B	2	0.386
BARC015	2AL	3	0.470	Xgwm213	5B	4	0.503
Xgwm155	3A	3	0.563	Xgwm234	5B	3	0.539
wmc169	3A	3	0.343	Xgwm335	5B	4	0.500
wmc175	3A	3	0.176	Xgwm408	5B	3	0.480
wmc177	3A	3	0.424	Xgwm540	5B	4	0.556
wmc182	3A	2	0.196	Xgwm544	5B	2	0.156
wmc264	3A	3	0.659	BARC004	5BS	5	0.590
BARC012	3AS	4	0.588	BARC032	5BS	3	0.517
BARC070	4AL	5	0.602	BARC059	5BL	4	0.535
BARC170	4AL	4	0.608	BARC069	5BL	2	0.022
Xwmc722	4A	4	0.532	Xwmc75	5B	2	0.194
CFE186	5A	2	0.495	wmc105	6BS	3	0.207
Xgwm156	5A	4	0.318	Xcnl64	6B	4	0.512
Xgwm291	5A	3	0.495	BE473227	6B	4	0.520
Xbare319	5A	3	0.422	CFE214	6B	3	0.329
BARC037	6A	2	0.070	SWES222	6B	4	0.341
CFE179	6A	3	0.638	SWES180	6B	3	0.592
Xcnl153	6A	4	0.609	BARC014	6BS	3	0.446
Xwmc479	7A	6	0.648	BARC072	7BS	3	0.522
CAU3	7A	3	0.573	BARC255	7BL	4	0.554
Xwmc596	7A	5	0.748	Xwmc335	7B	3	0.600
BARC108	7AS	3	0.406	Xwmc364	7B	4	0.406

表 2(续)

引物 Primer	位点 Locus	等位变异数 No. of alleles	多态性信息含量 <i>PIC</i>	引物 Primer	位点 Locus	等位变异数 No. of alleles	多态性信息含量 <i>PIC</i>
BARC029	7AL	3	0.468	Xwmc76	7B	2	0.430
Xgwm471	7A	4	0.320	Xcfa2106	7B	3	0.246
Xgwm332	7A	3	0.554	SCM39	1R	3	0.085
Xgwm282	7A	4	0.593	Gli-B1	1R	6	0.341
Xgwm268	1B	3	0.637	w-sec-P3	1R	2	0.106
wmc44	1B	4	0.665	SCM9	1R	2	0.074
BARC081	1BL	3	0.440	Xgwm162	3R	2	0.155
BARC137	1BL	4	0.471	Xgwm495	4R	4	0.607
BARC240	1BL	3	0.341	SCM138	5RS	3	0.364
BARC181	1BL	3	0.400	Xcinau146	6RS	5	0.529
Xgwm120	2B	3	0.662	SCM40	7RS	2	0.135

表 3 不同染色体组的遗传多样性

Table 3 Genetic diversity of different genomes

参数 Parameter	基因组 Genome				总体 Total
	A	B	R	A/B	
位点数 No. of loci	43	48	9	91	100
等位变异总数 No. of alleles	142	152	29	294	323
平均等位变异丰富度 AGR	3.300	3.167	3.222	3.231	3.23
平均多态性信息含量 <i>PIC</i>	0.488	0.481	0.266	0.485	0.465
多样性指数 <i>H'</i>	0.1479	0.1519	0.0826	0.1500	0.1439

AGR: Average genetic richness, The same as below

2.3 A/B 与 R 染色体组的遗传多样性比较

六倍体小黑麦是由四倍体硬粒小麦或二粒小麦 (AABB) 与二倍体黑麦 (RR) 杂交之后经染色体加倍获得, 所以 A/B 染色体组的多样性直接反映四倍体小麦亲本的遗传多样性, 而 R 染色体组的多样性则反映了二倍体黑麦的遗传多样性。由表 3 可以看出, A/B 染色体组检测到的多态性位点以及等位变异数要高于 R 基因组。A/B 基因组共检测到 294 个等位变异, 检测到的位点有 91 个, 平均等位变异丰富度为 3.231, 平均多态性信息指数为 0.485, 多样性指数为 0.1500; R 染色体组共检测到 29 个等位变异, 位点有 9 个, 平均等位变异丰富度为 3.222, 平均多态性信息指数为 0.266, 多样性指数为 0.0826。因此, A/B 染色体组的遗传多样性要高于 R 染色体组的遗传多样性, 这表明合成六倍体小黑麦的四倍体小麦亲本的遗传多样性高于二倍体黑麦亲本。

2.4 7 个部分同源群的遗传多样性分析

进一步对六倍体小黑麦 7 个部分同源群之间的遗

传多样性进行分析(表 4)结果表明, 7 个部分同源群的多态性位点数目分别是 16、23、11、8、16、11、15, 检测到的等位变异数目分别是 51、72、32、27、51、38、52。

表 4 7 个部分同源群的遗传多样性

Table 4 Genetic diversity of 7 homoeologous groups

参数 Parameter	部分同源群 Homoeologous groups						
	1	2	3	4	5	6	7
位点数 No. of loci	16	23	11	8	16	11	15
等位变异总数 No. of alleles	51	72	32	27	51	38	52
平均等位变异丰 富度 AGR	3.188	3.130	2.909	3.375	3.188	3.455	3.467
平均多态性信息 含量 <i>PIC</i>	0.403	0.539	0.445	0.507	0.418	0.436	0.480
多样性指数 <i>H'</i>	0.1263	0.1723	0.1530	0.1503	0.1311	0.1261	0.1385

从表 4 可以看出: 7 个部分同源群的平均等位变异丰富度相差不大, 第 7 部分同源群和第 6 部分同源群的平均等位变异丰富度最高, 第 3 部分同源群的平均等位变异丰富度最低, 7 个部分同源群排序为 7 > 6 > 4 > 5 = 1 > 2 > 3; 7 个部分同源群的多态性信息含量的排序为 2 > 4 > 7 > 3 > 6 > 5 > 1; 7 个部分同源群的多样性指数也相差不大, 其中第 2 部分同源群的多样性指数较高, 而第 1 部分同源群和第 6 部分同源群的多样性指数较低, 其排序为 2 > 3 > 4 > 7 > 5 > 1 > 6。

综合平均多态性信息含量和多样性指数 2 个指标进行评价(表 4)可以看出, 第 2 部分同源群具有

最高的遗传多样性,而第 1 部分同源群的遗传多样性相对较低。结合平均等位变异丰富度进行比较,第 1 部分同源群的平均等位变异丰富度与第 5 部分同源群相同,但平均多态信息含量和多样性指数均低于第 5 部分同源群,暗示第 1 部分同源群的等位变异分布较为集中。

2.5 基于 SSR 多态性的聚类分析

利用 Power Marker 3.25 软件对 339 份六倍体

小黑麦建立了基于 Nei's 遗传距离(GD)的 UPGMA 聚类树,如图 2 所示。聚类分析结果表明:339 份供试材料间的遗传距离变幅为 0 ~ 0.4582,平均为 0.2920,其中以 35th48 与 12th17 和 12th19 这两类材料间的遗传距离最远(0.4582);而以 2006828 与 2006827 间的遗传距离最近(0),所用 100 对 SSR 引物不能够将两者分开,说明两类材料的亲缘关系最近。

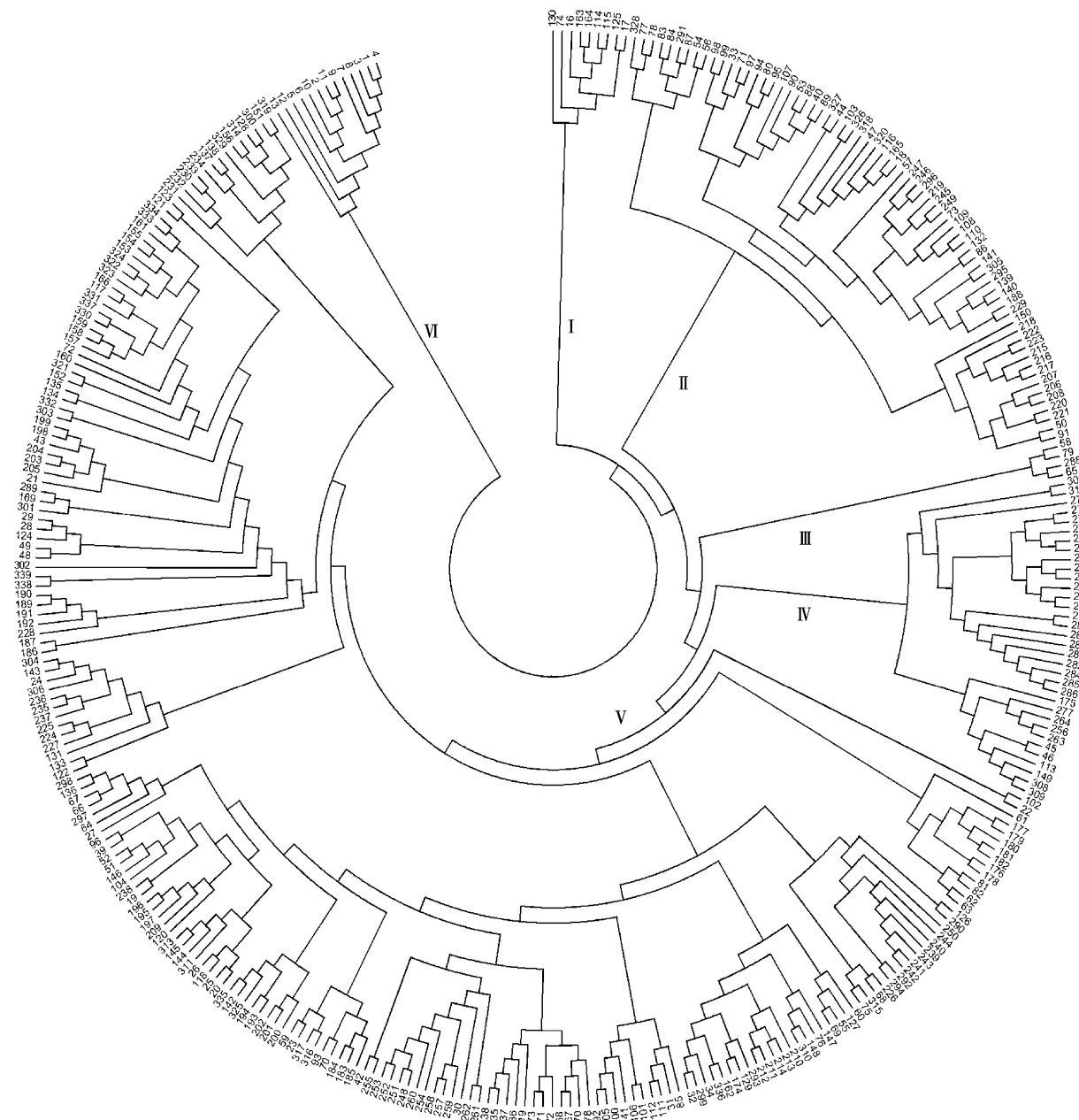


图 2 基于 Nei's 遗传相似系数的聚类图

Fig. 2 Dendrogram based on Nei's genetic similarity coefficient

UPGMA 聚类结果显示,100 对 SSR 引物按其遗传距离可将 339 份六倍体小黑麦分为 6 大类群。其

中,第 VI 类群包括 13 份材料,其来源全部是从 CIM-MYT 引进的 12th 材料,与其他类群具有较大的遗传

差异,说明这 13 份材料具有独特的遗传背景。第 I 类群包含 9 份材料,其中 35th 的有 5 份,占 55.56%,其余材料均是 2006 年从 CIMMYT 引进的小黑麦材料。第 II 类群材料较多,共 67 份,其中 31 份材料来自于 35th,7 份是于 2005 年引进的,其余 25 份为 2006 年从 CIMMYT 引进的。第 III 类群材料最少,仅 4 份,说明这 4 份材料与其他类群的遗传差异较大,独成 1 类。第 IV 类群有 34 份材料,除少量几份材料是 35th 和 2005 年引进的以外,其余全部是 2006 年引进的材料。第 V 类群包含的材料数最多,共 213 份,占总数的 62.83%,说明绝大多数的六倍体小黑麦材料聚在第 V 类群,它们的遗传距离较小。

3 讨论

现代小麦育种中长期利用少数遗传资源导致育成小麦品种的遗传基础渐趋狭窄,对环境的适应能力不断下降。将小麦近缘物种中的优良基因导入到普通小麦中,拓宽小麦的遗传基础、提高小麦的适应性、丰富其遗传多样性是现代小麦品种遗传改良的重要途径。黑麦属作为小麦的三级基因库^[28],蕴藏着许多优良基因资源,是进行小麦品种遗传改良的重要物质基础^[29-30]。黑麦有益基因向小麦的转移,大都是通过远缘杂种获得异附加系、异代换系、异易位系等而实现的;此外,还可以利用小麦-黑麦异染色体系与其他近缘种属杂交选育小麦新品系、创造新种质。在所有小麦-黑麦异染色体系中,染色体易位是公认的向小麦中转移外源有益基因最有效的方式。薛秀庄^[31]利用中国春 5B 单体与澳大利亚黑麦杂交,获得 2R/2B 和 5R/5B 易位系,并将黑麦抗条锈基因顺利导入普通小麦,育成陕麦 8003 新品种。但由于所获得的多数易位系中外源染色体片段不能很好补偿缺失小麦染色体的功能或与有益基因连锁的不利基因太多,难以被生产利用^[32],而黑麦的 1RS 染色体上具有多个小麦所没有的抗性基因,并且与小麦相应的染色体具有优良互补性。目前,只有 1RS/1BL 易位系成功地用于小麦遗传改良,并在生产上广泛应用,取得显著成效。据相关数据显示,1BL/1RS 易位系在中国小麦品系中分布相当广泛,目前中国大面积推广的小麦品种中 90% 含有洛类材料血缘^[33],由于洛类品种的抗性和农艺性状兼优,为中国小麦育种和生产做出了巨大的贡献。然而,绝大多数 1BL/1RS 易位系品种的 1RS 染色体来源于“Petkus”^[34],只有极少数的 1RS 来源于其他材

料^[35-38],1BL/1RS 易位系的遗传基础狭窄。随着新的致病生理小种的产生和发展,1BL/1RS 易位系的抗病性逐渐丧失,加之其品质缺陷,限制了 1BL/1RS 的继续使用^[33]。拓宽 1BL/1RS 易位系的来源,充分挖掘利用 1R 上优良基因的等位变异或黑麦其他染色体上的优良基因^[39-40],对于小麦育种具有重要意义。

本研究在 339 份六倍体小黑麦的 100 个 SSR 位点共检测到等位变异 323 个,每个位点等位变异范围为 1~6 个,平均为 3.23 个,高于李瑞奇等^[41]对河北省冬小麦分析报道的结果(2.215 个),同时也高于王丽侠等^[42]应用 SSR 标记对小豆种质资源遗传多样性的研究结果(3.0 个和 2.6 个)。周福平等^[8]利用 RAPD 标记测得六倍体小黑麦材料间平均多态性信息含量(PIC)为 0.138,本研究测得的 3 个染色体组的平均多态性信息含量为 0.465,高于前者的结果。339 份六倍体小黑麦间的遗传距离变幅为 0~0.4582,平均为 0.2920,高于侯永翠等^[43]应用 RAPD 标记对 12 份黑麦属的遗传多样性分析的研究结果(0.2712)。以上结果说明本研究所用的六倍体小黑麦具有较丰富的遗传多样性。本研究发现,A、B 染色体组的平均等位变异丰富度、平均多态性信息含量和多样性指数等指标均高于 R 染色体组,推测提供 A/B 染色体组的四倍体小麦的遗传多样性较提供 R 染色体组的黑麦更为丰富。

在现代小麦育种工作中,由于大量使用相同的骨干亲本,导致育成的普通小麦品种群体内的遗传基础狭窄,在分子水平上的大量研究也进一步证实了这一点^[44-47]。因此,采用不同来源的遗传变异,拓宽小麦育种亲本的遗传基础具有十分重要的意义。贾继增等^[46]发现普通小麦的近缘种硬粒小麦、二粒小麦、提莫菲维小麦、粗山羊草、偏凸山羊草中存在丰富的遗传变异,是丰富小麦遗传多样性的重要资源。因此,研究六倍体小黑麦的遗传多样性不仅是为了了解小黑麦的亲缘关系、种质资源,同时也为普通小麦的改良提供遗传变异基础。

目前,关于六倍体小黑麦的遗传多样性研究相对较少,品种间的亲缘关系并不明确,黑麦的遗传标记不够丰富(除 1R 染色体)。通过开发、运用多种分子标记,并结合形态学、细胞学研究,对现有六倍体小黑麦种质资源遗传多样性进行全面深入研究,有利于资源的有效利用,并为核心种质的构建提供指导。

参考文献

- [1] 孙元枢. 中国小黑麦遗传育种研究和利用[M]. 杭州:浙江科学技术出版社,2002
- [2] 董卫民,张少敏. 小黑麦的生产特性及开发利用前景[J]. 当代畜牧,2002(2):33-35
- [3] 张永明,孟令国,张跃伟. 遗传多样性研究在种质资源保护和利用中的应用[J]. 西藏科技,2005(4):11-13
- [4] Igrejas G, Guedes-Pinto H, Carnide V, et al. Seed storage protein diversity in triticale varieties commonly grown in Portugal[J]. Plant Breeding, 1999, 118(4):303-306
- [5] 王曙光,孙黛珍,李瑞,等. 六倍体小黑麦品种资源 Glu-1 位点的多态性[J]. 中国生态农业学报,2013,21(2):179-183
- [6] 焦文英,王曙光,孙黛珍. 六倍体小黑麦品种资源的抗旱性聚类分析[J]. 中国农学通报,2009,25(3):283-287
- [7] 张红. 引进 CIMMYT 小黑麦的鉴定及其遗传多样性分析[D]. 泰安:山东农业大学,2005
- [8] 周福平,孙黛珍,王曙光,等. 六倍体小黑麦种质资源遗传多样性分析[J]. 华北农学报,2006,21(6):33-36
- [9] Bohn M, Utz H F, Melchinger A E. Genetic similarities among winter wheat cultivars determined on the basis of RFLPs, AFLPs, and SSRs and their use for predicting progeny variance[J]. Crop Sci, 1999, 39:228-237
- [10] 高睦枪,刘冬成,郭小丽,等. 我国部分冬小麦新品种(系)SSR 标记遗传差异的研究[J]. 农业生物技术学报,2001(9):49-54
- [11] 耿惠敏,刘红彦,宋玉立. 40 个河南省审定小麦品种遗传多样性的 SSR 标记分析[J]. 西北农业学报,2005,14(2):27-32
- [12] 陈新民,何中虎,史建荣,等. 利用 SSR 标记进行优质冬小麦品种(系)的遗传多样性研究[J]. 作物学报,2003,29(1):13-19
- [13] 应杰政,施勇峰,庄杰云,等. 用微卫星标记评估中国水稻主栽品种的遗传多样性[J]. 中国农业科学,2007,40(4):649-654
- [14] 金伟栋,程保山,洪德林. 基于 SSR 标记的太湖流域粳稻地方品种遗传多样性研究[J]. 中国农业科学,2008,41(11):3822-3830
- [15] Zhou H F, Xie Z W, Ge S. Microsatellite analysis of genetic diversity and population genetic structure of a wild rice (*Oryza rufipogon* Griff.) in China [J]. Theor Appl Genet, 2003, 107:332-339
- [16] Ni J, Colowit P M, Mackill D J. Evaluation of genetic diversity in rice subspecies using microsatellite markers[J]. Crop Sci, 2002, 42(2):601-607
- [17] 张赤红,张京,赵会英,等. 应用 SSR 标记对 61 个国家大麦遗传多样性的研究[J]. 植物遗传资源学报,2008,9(1):15-19
- [18] 张赤红,张京. 大麦品种资源遗传多样性的 SSR 标记评价[J]. 麦类作物学报,2008,28(2):214-219
- [19] 白盼,李荣华,郭培国,等. 19 个亚洲国家大麦种质材料的遗传多样性分析[J]. 麦类作物学报,2012,32(2):215-222
- [20] Ma K H, Kim N S, Lee G A. Development of SSR markers for studies of diversity in the genus *Fagopyrum* [J]. Theor Appl Genet, 2009, 119:1247-1254
- [21] 杨学文,丁素荣,胡陶,等. 基于 SSR 标记的赤峰地区甜荞种质的遗传多样性研究[J]. 中国农学通报,2013,29(33):129-134
- [22] 李荣华,夏岩石,刘顺枝,等. 改进的 CTAB 提取植物 DNA 方法[J]. 实验室研究与探索,2009,28(9):14-16
- [23] Botstein D, White R L, Skolnick M, et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms[J]. Am J Hum Genet, 1980, 32(3):314-331
- [24] Anderson I A, Churchil L G A, Suttrique J E, et al. Optimizing parental selection for genetic linkage maps[J]. Genome, 1993, 36:181-186
- [25] Nei M, Li W. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases [A]. Proc Natl Acad USA, 1979, 76:5269-5273
- [26] Mashall D R, Allard R W. Isozyme polymorphisms in natural population of *Avena fatua* and *Abarbata* [J]. Heredity, 1970, 25:347-382
- [27] Weir B. Genetic data analysis for discrete population genetic data [M]. Sanderland: Sinauer Assoc Publishing Company, 1990
- [28] 董玉琛. 小麦的基因源[J]. 麦类作物学报, 2000, 20(3):78-81
- [29] Zeller F J, Fuchs E. Cytology and disease resistance of 1A/1R and some 1B/1R wheat-rye translocation cultivars [J]. Z Pflanzenzuchtg, 1983, 90:285-296
- [30] Berzonsky W A, Clements R L, Lafever H N. Identification of 'Amigo' and 'Kavkaz' translocations in Ohio soft red winter wheats (*Triticum aestivum* L.) [J]. Theor Appl Genet, 1991, 81:629-634
- [31] 薛秀庄. 小麦染色体工程与育种[M]. 石家庄:河北科学技术出版社,1993:109-155
- [32] 苏亚蕊,李玉阁,李锁平. 小麦-黑麦 1BL/1RS 易位系在小麦育种中的应用及改良[J]. 河南农业科学,2006(3):12-16
- [33] 任燕, Graybosch R A, 王涛. 小麦中的 1BL/1RS 染色体易位[J]. 麦类作物学报,2006,26(3):152-157
- [34] Baum M, Appels R. The cytogenetic and molecular architecture of chromosome 1R-one of the most widely utilized sources of alien chromatin in wheat varieties[J]. Chromosoma, 1991, 101:1-10
- [35] Ko J M, Seo B B, Suh D Y, et al. Production of a new wheat line possessing the 1BL. 1RS wheat-rye translocation derived from Korean rye cultivar Paldanghomil[J]. Theor Appl Genet, 2002, 104:171-176
- [36] Kim W, Johnson J W, Baenziger P S, et al. Agronomic effect of wheat-rye translocation carrying rye chromatin (1R) from different sources[J]. Crop Sci, 2004, 44:1254-1258
- [37] Kumlay A M, Baenziger P S, Gill K S, et al. Understanding the effect of rye chromatin in bread wheat[J]. Crop Sci, 2003, 43:1643-1651
- [38] Tsunewaki K. Genetic studies of a 6x-derivative from an 8x triticale[J]. Can J Genet Cytol, 1964, 6:1-11
- [39] 余玲,邵彦坡,李春莲,等. 小麦抗条锈新种质根尖细胞染色体初步鉴定[J]. 麦类作物学报,2004,24(4):32-34
- [40] Nagy E D, Christoph E, Molnar-Lang M, et al. Genetic mapping of sequence-specific PCR-based markers in the short arm of the 1BL/1RS wheat-rye translocation[J]. Euphytica, 2003, 132:243-250
- [41] 李瑞奇,杨鑫雷,张艳,等. 河北省冬小麦品种 SSR 标记遗传多样性分析[J]. 植物遗传资源学报,2014,15(3):526-533
- [42] 王丽侠,程须珍,王素华,等. 应用 SSR 标记对小豆种质资源的遗传多样性分析[J]. 作物学报,2009,35(10):1858-1865
- [43] 侯永翠,郑有良,魏育明,等. 应用 RAPD 标记分析黑麦属的遗传多样性[J]. 西南农业学报,2002,15(4):30-33
- [44] 孙其信,黄铁城,倪中福,等. 小麦杂种优势群研究 I. 利用 RAPD 标记研究小麦品种间遗传差异[J]. 农业生物技术学报,1996,4(2):103-110
- [45] Sun Q X, Ni Z F, Liu Z Y. Genetic relationships and diversity among Tibetan wheat, common wheat and European spelt wheat revealed by RAPD markers [J]. Euphytica, 1998, 99:205-211
- [46] 贾继增,张正斌,Devos K,等. 小麦 21 条染色体 RFLP 作图位点遗传多样性分析[J]. 中国科学:C 辑,2001,31(1):13-21
- [47] 杜金昆,姚颖垠,倪中福,等. 普通小麦、斯卑尔脱小麦、密穗小麦和轮回选择后代材料 ISSR 分子标记遗传差异研究[J]. 遗传学报,2002,29(5):445-452