

小麦 DUS 测试已知品种 DNA 指纹数据库构建及其应用

郑永胜, 张 晗, 王雪梅, 王东建, 孙加梅, 王穆穆, 王 晖, 王 玮, 李 华, 段丽丽, 李汝玉
(山东省农业科学院作物研究所, 济南 250100)

摘要: 为解决 DUS 测试中特异性测试近似品种筛选难的问题, 本研究基于 2256 份 DUS 测试小麦已知品种构建 DNA 指纹数据库。首先利用 81 对 SSR 引物对 96 份小麦品种进行遗传相似性分析。结果表明, 81 对 SSR 引物扩增出 84 个位点, 共检测到 731 个等位变异, 每个位点的等位变异数在 3~18 之间, 多态性信息指数 (PIC) 变化范围为 0.29~0.89。选取 42 个 SSR 标记构建了 2256 份小麦品种 DNA 指纹数据库, 共获得 148493 个数据, 除引物 *barc14*、*xgwm341* 之外, 其他引物数据缺失率在 5% 以内。对 176 份小麦品种进行 DNA 指纹数据采集和特异性测试, 结果表明不具有特异性的申请品种与其最近近似品种的遗传相似性都在 90% 以上; 本研究基于 42 对 SSR 荧光标记引物构建了我国小麦 DUS 测试已知品种的 DNA 指纹数据库, 确定近似品种筛选的遗传相似性阈值为 80%, 建议将与申请品种遗传相似性高于 80% 的已知品种作为近似品种进行田间种植和特异性评价。

关键词: DUS 测试; 已知品种; 特异性测试; SSR 标记; DNA 指纹库

Construction of DNA Profile Database of Wheat Reference Varieties and Its Application in Wheat DUS Test

ZHENG Yong-sheng, ZHANG Han, WANG Xue-mei, WANG Dong-jian, SUN Jia-mei, WANG Mu-mu,
WANG Hui, WANG Wei, LI Hua, DUAN Li-li, LI Ru-yu
(Crop Research Institute, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan 250100)

Abstract: Based on 2256 common wheat reference varieties for DUS test in China, a DNA profile database was established to assist in distinctness test. We first analyzed the DNA profiles of 96 reference varieties using 84 fluorescently labeled SSR markers. A total of 731 alleles were detected with the number of alleles varying between 3 and 18 and the PIC values from 0.29 to 0.89. A DNA profile database consisting of 2256 wheat reference varieties was constructed using 42 fluorescently labeled SSR markers. A total of 148493 datapoint were included with a missing rate of less than 5% for each maker except makers *barc14* and *xgwm341*. The genetic and genotypic datasets of 176 wheat varieties were collected and analyzed. The genetic similarities between the non-distinct candidate varieties and their most similar varieties were above 90%. The candidate varieties with a genetic similarity of over 80% are assumed to be similar varieties, which are suggested to be further investigated for phenotypic variations in the field.

Key words: DUS testing; reference variety; distinctness test; SSR markers; DNA profile Database

植物新品种授予品种权的前提是具备新颖性、特异性、一致性、稳定性及适当的命名^[1]。特异性、一致性和稳定性又是主要农作物品种审定和非主要

农作物登记的必备条件^[2]。为此, 需要对申请品种权保护、审定或登记的新品种 (申请品种) 进行特异性、一致性和稳定性测试 (DUS 测试)。特异性是指

收稿日期: 2018-10-29 修回日期: 2019-02-13 网络出版日期: 2019-03-20

URL: <http://www.doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20181029001>

第一作者研究方向为作物种质资源创新与利用, E-mail: zhengyongsheng123@163.com; 张晗为共同第一作者

通信作者: 李汝玉, 研究方向为植物新品种测试, E-mail: li_ruyun@sina.com

基金项目: 山东省农业科学院农业科技创新工程 (CXGC2017A02); 山东省农业科学院青年基金 (2015YQN14)

Foundation project: Agricultural Science and Technology Innovation Project of Shandong Academy of Agricultural Sciences (CXGC2017A02), Youth Foundation of Shandong Academy of Agricultural Sciences (2015YQN14)

新品种在表型性状上能够区别于申请时的其他任何公知存在的品种(已知品种)。特异性测试一般需要首先利用育种人在技术问卷中提供的或测试机构采集的新品种性状信息,对已知品种表型性状库进行筛选,排除与新品种有明显差异的品种,将剩余不能与新品种明显区分的品种(近似品种)与新品种进行种植试验和特异性评价。小麦是我国主要农作物之一,已知品种数以千计。由于表型性状的表达极易受环境影响,基于表型性状的传统近似品种筛选方法,近似品种筛选效率低、试验成本高^[3-4]。技术问卷提供的品种性状信息量少且可靠性较低,导致选入的近似品种数量多且不可靠。测试机构采集表型性状后进行近似品种筛选,虽然相对减少了近似品种数量,但一方面需要增加一个测试周期,另一方面仍未能从根本上解决需要种植大量近似品种的问题。利用表型数据不能准确进行近似品种筛选。

DNA 指纹技术直接检测品种间 DNA 水平上的差异,不受环境影响和季节限制,检测周期短、准确率高,已经被应用于种质资源管理、新品种测试、种子纯度检验等领域^[5-8]。SSR (simple sequence repeats) 标记具有多态性高、呈共显性遗传、重复性好等优点,是目前品种鉴定中应用最多的分子标记之一,已经广泛地应用到小麦品种审定、种质资源核心种质库的构建及种质资源遗传多样性分析^[5-8]。国内外已在黄瓜、油菜、水稻、马铃薯、玉米、生菜、茶树、辣椒等作物上应用分子标记技术辅助筛选 DUS 测试近似品种^[9-17]。利用分子标记技术进行近似品种筛选的前提之一是构建已知品种 DNA 指纹数据库。在小麦方面,已报道的我国 DNA 指纹数据库主要包括小麦种质资源地方品种和 2000 年以前选育的小麦品种^[18]。中国农业科学院作物科学研究所联合国际玉米小麦改良中心(CIMMYT)、国际干旱地区农业研究中心(ICARDA)和法国 Agropolis 研究所,建立了包括基于 134 对 SSR 引物、2457 个小麦基因型的指纹数据库,但这些品种主要是国外种质资源和选育品种^[19]。王立新等^[20-21]采用 15 个 SSR 标记和 20 个 AFLP-SCAR 标记分析了来自我国不同麦区的 455 个小麦品种,建立了构建 DNA 指纹的方法模式和区试小麦品种 DNA 指纹库。李莉等^[22]以山东省 41 份小麦种质资源为材料,使用 46 对 SSR 引物,构建了 DNA 指纹库。李远等^[23]利用 86 对 SSR 引物对河北省审定品种构建了河北审定的小麦品种 DNA 指纹库。迄今尚未建立一个

覆盖 DUS 测试已知品种的 DNA 指纹数据库。利用分子标记技术进行近似品种筛选的另一个前提是确定一个近似品种筛选的分子距离阈值。王立新等^[20]提出小麦区域试验疑似品种筛查的遗传相似性阈值为 0.90。小麦 DUS 测试近似品种筛选的分子距离阈值缺少研究。本课题组前期已经构建了基于荧光 SSR 标记高通量普通小麦品种鉴定体系^[24-25],本研究构建了我国普通小麦 DUS 测试参照品种 DNA 指纹库,确定了近似品种筛选的遗传相似性阈值,实现了近似品种的高效精准筛选。

1 材料与方法

1.1 材料

用于遗传相似性与相似矩阵分析的 96 份小麦已知品种(具体信息见表 1)。用于 DNA 指纹采集的 2256 份小麦已知品种,具体材料信息见电子版附件(<http://www.doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20181029001>),主要来源于我国 20 世纪 90 年代以后审定的品种和申请品种权保护的品种。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取 采用 CTAB 法提取样品 DNA^[26]。每份品种进行 3 次生物学重复,每次重复选取 10~20 粒种子,双氧水消毒后水培发芽,生长至 2 叶 1 心期,取 10 株叶片混合,称 0.5 g 提取 DNA。

1.2.2 PCR 扩增及等位基因检测 本研究所采用的 SSR 标记主要为《NY/T 2470-2013 小麦品种鉴定技术规程 SSR 分子标记法》^[25]和《NY/T 2859-2015 主要农作物品种真实性 SSR 分子标记检测 普通小麦》^[27]中的 81 对 SSR 引物(表 2),SSR 引物的染色体位置引自这两个标准的引物信息。PCR 反应体系为:12.5 μ L 的反应体积,含每种 dNTP 0.25 mmol/L,正向引物、反向引物各 0.4 mmol/L, Taq DNA 聚合酶 0.5 U, 1 \times PCR 缓冲液(不含 Mg^{2+}), $MgCl_2$ 1.5 mmol/L,样品 DNA 30~50 ng。利用 3730XL DNA 分析仪对扩增 PCR 产物进行毛细管电泳,分析核酸片段大小,定义等位基因大小(bp),确定每一个 SSR 标记位点的等位基因大小范围。

1.2.3 已知品种 DNA 指纹数据库构建 对 3730XL DNA 分析仪采集的 DNA 指纹数据,利用《NY/T 2470-2013 小麦品种鉴定技术规程 SSR 分子标记法》标准中的 42 对 SSR 引物和等位基因命名信息,对采集的 DNA 指纹数据进行整理,构建 DNA 指纹数据库。

表 1 本研究采用的 96 份小麦已知品种

Table 1 96 wheat varieties of common knowledge used in the study

序号 No.	品种名称 Variety name						
1	郑麦 98	25	泰麦一号	49	汶航 6 号	73	生选 6 号
2	内乡 991	26	轮选 987	50	聊 0801	74	龙辐麦 18
3	开麦 18	27	金麦 54 号	51	龙麦 30	75	陕麦 509
4	太空 5 号	28	邯麦 9 号	52	攀枝花 5	76	陕麦 159
5	科农 1091	29	耷拉头	53	攀枝花 30	77	山农 10-2
6	泰山 23 号	30	淮麦 19 号	54	静 2009-12	78	山农 20
7	豫农 9901	31	运旱 618	55	鲲鹏一号	79	轮选 496
8	PH3259	32	洛麦 99220	56	山农 080187	80	登峰 168
9	薯麦 2 号	33	石 4185	57	07F6-135	81	鲁麦 11 号
10	JNM-1072-1	34	泰山 044304	58	郑丰 99379	82	豫麦 1 号
11	花培 5 号	35	西农 13	59	08CA95	83	天麦五三五
12	浏虎 98	36	遗传所 3519	60	徐麦 7086	84	九麦 2 号
13	豫农 010	37	中优 9507	61	中梁 9598	85	婴泊 700
14	多丰 2000	38	运麦 2411	62	中洛铁秆 1	86	先麦 8 号
15	石麦 15 号	39	兰引 1 号	63	淮麦 20 号	87	中麦 816
16	良星 66	40	兰天 083	64	周麦 18	88	西农 509
17	河农 822	41	甘肃 00-385-17	65	宁麦 11	89	郑麦 1023
18	鲁原 301	42	A3-5	66	淮麦 26	90	宝麦 8 号
19	京冬 12	43	抗秆锈材料 -21	67	淮麦 28	91	宛麦 98
20	中麦 175	44	抗秆锈材料 -26	68	定红 201	92	淮麦 35
21	郑丰 5 号	45	抗秆锈材料 -31	69	新冬 33 号	93	瑞麦 1 号
22	科农 9204	46	抗秆锈材料 -1	70	普冰 701	94	连麦 8 号
23	鹤麦 1 号	47	Kukrj 澳大利亚 70E	71	西昌 19	95	石农 086
24	济麦 4 号	48	泰农 2987	72	西农 3517	96	中麦 818

1.2.4 数据分析

利用 Powermarker 3.25 计算每个位点的基因型、等位基因数目、主要等位基因频率、基因多样性、杂合度、数据缺失率和 PIC 值 (polymorphism information content); 利用 Excel 2007 计算基于不同 SSR 位点组合的遗传相似系数矩阵之间的相关性^[18]; 遗传相似度 (GS) 的计算公式为: $GS = 2N_{ij} / (N_i + N_j)$, 其中, N_i 和 N_j 分别为 i 和 j 两品种的等位基因数, N_{ij} 为两者共有的等位基因数; SSR 标记缺失率 (DDR) = 缺失数据 / 2256 × 100%。

1.2.5 特异性测试

特异性测试按照《GB/T 19557.2-2004 植物新品种特异性、一致性和稳定性测试指南 普通小麦》^[28] 进行。

2 结果与分析

2.1 构建小麦已知品种 DNA 指纹数据库的引物筛选

首先利用 81 对 SSR 引物对表 1 中的 96 份已知品种进行等位基因检测。结果显示 (表 2), 81 对 SSR 引物共检测到 84 个位点, 共计 731 个等位基

表 2 81 个 SSR 标记的多态性信息

Table 2 The polymorphism information of 81 SSR markers in 96 reference varieties

标记 Marker	染色体位置 Chromosome position	等位基因大小 范围 (bp) Size range of alleles	等位 基因数 No. of alleles	多态性 指数 PIC	标记 Marker	染色体位置 Chromosome position	等位基因大小 范围 (bp) Size range of alleles	等位 基因数 No. of alleles	多态性 指数 PIC
xgwm357	1A	121~127	4	0.51	barc1	5A	274~280	3	0.38
barc61	1A	127~165	10	0.74	barc4	5B	152~209	18	0.87
xgdm111	1A	193~209	8	0.70	xgdm43	5D	143~163	7	0.63
barc5	2A	295~304	3	0.51	xgwm617	6A	120~142	6	0.78
xgwm429	2B	201~229	12	0.77	xgwm219	6B	151~222	15	0.84
cau15	2D	197~233	6	0.54	cfid33	6D	170~176	4	0.42
xgwm155	3A	122~150	9	0.78	cfa2123	7A	167~193	12	0.74
cau5	3B	162~184	12	0.82	xgwm344	7B	125~147	10	0.60
xgwm161	3D	125~154	9	0.69	xgwm44	7D	164~192	13	0.83
xgwm610	4A	146~178	6	0.63	wmc1	3B	140~150	7	0.64
xgwm513	4B	145~155	5	0.67	cfa2028	7A	238~260	7	0.51
cfid84	4D	168~195	9	0.73	barc80	1B	103~119	6	0.70
cfa2155	5A	209~217	5	0.70	barc170	4A	145~199	15	0.85
bhw129	5B	185~231	11	0.72	barc198	6B	112~158	8	0.80
cfid8	5D	157~171	6	0.58	barc240	1B	237~270	7	0.71
xgwm570	6A	137~160	10	0.78	barc243	5B	177~216	9	0.80
barc14-1	6B	235~256	4	0.29	barc324	3A	227~251	9	0.73
barc14-2	6B	263~284	5	0.66	barc354	6B	121~153	11	0.82
cfid76	6D	143~169	12	0.82	barc1121	6D	106~147	7	0.60
xgpm2269	7A	163~173	6	0.64	cfid9	3D	188~252	16	0.88
wmc73	7B	185~199	5	0.63	cfid51-1	2D	89~129	12	0.67
xgwm428	7D	122~142	5	0.55	cfid51-2	2D	146~160	7	0.71
cfa2153	1A	120~180	11	0.73	cfid72	1D	216~240	9	0.67
barc81	1B	184~218	4	0.58	cwm65	1A	217~251	9	0.70
cfid28	1D	178~202	8	0.61	gwm261	2D	167~207	7	0.68
xgwm445	2A	188~196	5	0.37	gwm304	5A	198~226	13	0.79
barc7	2B	271~277	3	0.32	ksum62	4B	178~208	10	0.73
xgwm296-1	2D	128~154	6	0.67	wmc312	1A	224~248	11	0.78
xgwm296-2	2A	156~174	9	0.77	wmc476	7B	189~215	11	0.75
xgwm2-3	3A	112~130	6	0.59	wmc522	2A	169~215	14	0.89
xgwm566	3B	113~131	8	0.80	xgwm67	5B	85~99	7	0.71
xgwm341	3D	125~157	14	0.79	xgwm169	6A	176~221	14	0.83
cau2	4A	209~231	3	0.45	xgwm186	5A	142~160	6	0.59
xgwm495	4B	147~181	12	0.74	xgwm285	3B	216~254	9	0.79
barc105	4D	124~174	9	0.85	barc127	6B	176~228	7	0.77
xgwm294	2A	72~116	12	0.83	barc125	3D	142~158	8	0.62
xgwm408	5B	145~192	9	0.78	barc168	2D	177~216	9	0.80
xgwm443	5B	115~169	12	0.85	barc18	2B	215~257	13	0.79
xgwm459	6A	111~123	7	0.74	barc197	5A	156~207	9	0.74
xgwm540	5B	101~134	11	0.71	cfid54	4B/4D	148~182	12	0.84
barc28	1A	241~259	5	0.54	xgwm437	7D	88~128	12	0.69
xgwm43	7B	147~157	6	0.58	barc204	6D	150~171	8	0.80

因;每个位点的等位基因数在 3~18 之间,其中 *barc1*、*barc5*、*barc7* 和 *cau2* 检测出的等位基因数较少为 3 个, *barc4* 检测出的等位基因数最多为 18 个。不同位点间的多态性信息指数 (PIC) 变化范围为 0.29~0.89; 其中 *barc14-1* 位点的 PIC 指数最低为 0.29; *wmc522* 的 PIC 指数最高为 0.89。

为了确定用于构建 DNA 指纹数据库的最少标记数目,本研究利用 3 次模拟重复所得的数据,比较了不同大小样本 (24、48 和 96) 基于 84 个 SSR 位点与其他 11 组不同数量 SSR 位点获得的遗传相似系数矩阵之间平均相关系数和标准误^[18]。从平均相关系数的变化范围可以看出,基于不同数量标记

的相似系数矩阵随着标记数量的增加与基于 84 个位点的相似系数矩阵的相关系数逐渐增加 (图 1)。当位点数量大于 35 个时,与 84 个位点遗传相似系数矩阵的相关系数达到 0.90 以上。当位点数量为 42 时,与 84 个位点遗传相似系数矩阵的相关系数接近 0.95,且趋于稳定;从标准误的变化趋势看,当位点个数达到 42 之前,不同大小样本间相关系数的标准误变化较大,都大于 0.01。可见 42 个 SSR 位点能够较好反映品种间的遗传关系。本研究选择了覆盖 21 条染色体的 42 个 SSR 标记用于构建 DNA 指纹库,每条染色体的长短臂上各选择 1 个标记。

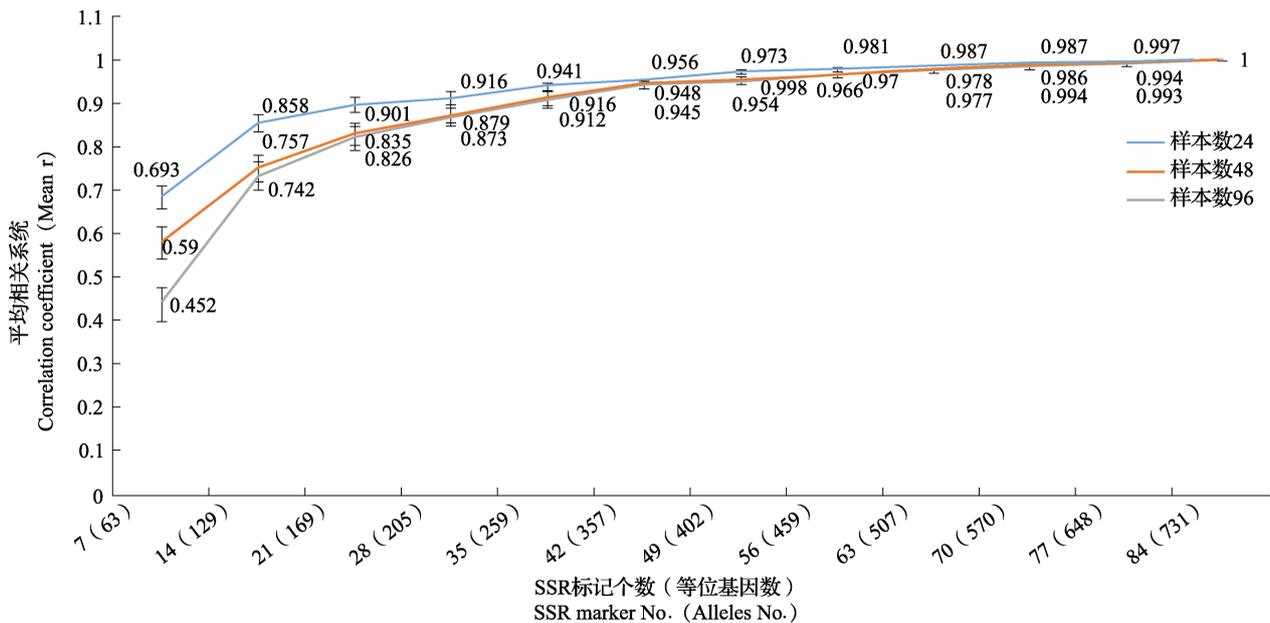


图 1 基于不同样本大小和标记数量的遗传相似系数矩阵之间的相关系数比较

Fig.1 Correlation coefficients of the genetic similarity matrix based on different sample sizes and marker sets

2.2 已知品种 DNA 指纹数据库的构建

利用均匀分布于 21 对小麦染色体的 42 对 SSR 引物,对 2256 份已知品种进行 PCR 扩增和 DNA 指纹采集,共获得数据 148493 个。检测出的 42 个 SSR 标记中,除 *barc14* 和 *xgwm341* 标记之外,其余标记的数据缺失率均低于 5%;除标记 *xgwm344* 之外,其余 SSR 标记的杂合度都在 0.05 以下,表明我国小麦已知品种的整体纯合度较高。2256 份已知品种中,共检测到 442 个等位基因,标记间等位基因数变异范围为 3~22 个。多态性信息指数 (PIC) 变化范围为 0.2424~0.8198,平均为 0.61 (表 3)。

2.3 近似品种筛选遗传相似度阈值的确定

本研究选取了 2014-2017 年申请品种权保护的 130 份小麦新品种与其遗传最近似品种的遗传相似度和特异性测试结果进行了比较。将申请品种与其遗传最近似品种进行了成对田间种植试验,对申请品种进行了特异性评价。结果表明,近似品种遗传相似度高于 95% 的 35 份小麦申请品种中,26 份申请品种不具备特异性;近似品种遗传相似度在 90%~95% 之间的 15 份小麦申请品种中,7 份申请品种不具备特异性;近似品种遗传相似度低于 90% 的 80 份申请品种都具备特异性 (表 4)。

表 3 42 个 SSR 标记位点的遗传多样性信息

Table 3 The polymorphism information of 42 SSR markers

标记 Marker	主要等位基因频率 Major allele frequency	基因型 / 等位基因数 Genotype/No. of alleles	基因多样性 Gene diversity	杂合度 Heterozygosity	数据缺失率 (%) Data default rate	多态性指数 PIC
xgwm357	0.6092	7/4	0.5390	0.0111	4.57	0.4705
barc61	0.3255	30/12	0.7817	0.0375	1.69	0.7515
xgdm111	0.5114	17/8	0.6584	0.0228	0.89	0.6134
barc5	0.5354	9/4	0.6002	0.0357	1.02	0.5303
xgwm429	0.3814	31/13	0.7195	0.0275	4.63	0.6754
cau15	0.7375	13/7	0.4189	0.0164	1.20	0.3784
xgwm155	0.2715	20/9	0.7777	0.0351	0.75	0.7411
cau5	0.2339	32/13	0.8249	0.0320	0.53	0.8020
xgwm161	0.4487	27/13	0.6923	0.0384	1.91	0.6445
xgwm610	0.5484	16/10	0.6261	0.0286	1.33	0.5792
xgwm513	0.4384	14/7	0.6602	0.0193	0.67	0.5980
cf84	0.3577	19/11	0.7382	0.0262	4.35	0.6943
cfa2155	0.3618	26/14	0.7294	0.0320	0.49	0.6840
bhw129	0.3657	40/19	0.7804	0.0421	1.02	0.7526
cf8	0.4446	16/8	0.6908	0.0263	0.84	0.6413
xgwm570	0.4912	23/12	0.6946	0.0193	4.53	0.6616
Barc14	0.4647	14/7	0.6629	0.0306	7.36	0.6036
cf76	0.3135	41/14	0.8192	0.0297	0.58	0.7985
xgpw2269	0.3469	19/11	0.7049	0.0308	0.31	0.6478
wmc73	0.3885	16/6	0.6961	0.0279	0.31	0.6404
xgwm428	0.4456	15/8	0.6776	0.0298	4.98	0.6232
cfa2153	0.3937	45/20	0.7803	0.0393	2.04	0.7572
barc81	0.4389	13/6	0.6501	0.0277	3.28	0.5820
cf28	0.6350	16/10	0.5349	0.0314	2.44	0.4846
xgwm445	0.8209	10/5	0.3096	0.0152	0.53	0.2871
barc7	0.8304	4/3	0.2818	0.0134	0.35	0.2424
xgwm296	0.3323	20/12	0.7573	0.0223	2.44	0.7197
xgwm2	0.6111	16/9	0.5482	0.0279	0.22	0.4888
xgwm566	0.2844	22/8	0.7938	0.0381	1.15	0.7631
xgwm341	0.4820	41/18	0.7175	0.0402	8.74	0.6927
cau2	0.6337	6/3	0.5234	0.0349	0.40	0.4613
xgwm495	0.4820	35/16	0.7110	0.0378	0.18	0.6825
barc105	0.4441	47/18	0.7487	0.0269	1.60	0.7256
barc1	0.6973	7/4	0.4377	0.0233	4.79	0.3636
barc4	0.2509	53/22	0.8214	0.0477	0.44	0.7985
xgdm43	0.3870	21/9	0.6999	0.0331	0.53	0.6448
xgwm617	0.3944	21/11	0.7604	0.0186	3.42	0.7293
xgwm219	0.4116	30/17	0.7481	0.0205	4.59	0.7163
cf33	0.6418	8/5	0.5038	0.0210	0.80	0.4336
cfa2123	0.3668	28/13	0.7402	0.0341	1.38	0.6991
xgwm344	0.5795	26/12	0.6046	0.0550	4.79	0.5638
xgwm44	0.2988	38/12	0.8371	0.0379	0.67	0.8198

表 4 遗传相似度与特异性的关系

Table 4 Relationship between genetic similarity and percentage of non-distinct varieties

	遗传相似度 Genetic similarity				
	GS \geq 95%	90% \leq GS<95%	85% \leq GS<90%	80% \leq GS<85%	GS<80%
品种对数量 Number of variety pairs	35	15	9	10	61
不具备特异性品种对数量 Number of non-distinct variety pairs	26	7	0	0	0
不具备特异性品种对比例 (%) Percentage of non-distinct variety pairs	74.3	46.7	0	0	0

以遗传相似度 80% 为阈值,利用小麦已知品种 DNA 指纹数据库对 2013-2015 年 329 份 DUS 申请品种进行了近似品种筛选(表 5)。212 份(64.4%)申请品种未筛选到近似品种,117 份(35.6%)筛选到 1 份及以上近似品种。在筛选到近似品种的 117 份申请品种中,75 份筛选到 1~3 份近似品种,筛选到 4~6 份、7~9 份、10~12 份、13~15 份和 15 份以上近似品种的申请品种数量分别为 15 份、11 份、7 份、7 份和 2 份,即大多数近似品种数量为 1~3 份。2013-2015 年 329 份 DUS 参试品种共筛选出 474 份近似品种,平均每个申请品种有 1.44 份近似品种。如果只考虑筛选到近似品种的申请品种,

每份申请品种的近似品种数量平均为 4.05 份。选取 80% 的遗传相似度阈值作为小麦近似品种筛选的遗传距离阈值,对 2013-2015 年 117 份小麦申请品种及其近似品种进行了相邻种植试验,按照小麦 DUS 测试指南将申请品种与其近似品种进行了性状比对和特异性评价,鉴定出 39 份申请品种不具备特异性。2014 年以来,利用该数据库为农业农村部植物新品种测试体系其他开展小麦 DUS 测试的分中心进行了申请品种近似品种筛选,共筛选申请品种 2380 份,筛选出近似品种 3590 份,通过田间 DUS 测试,鉴定出 85 份不具备特异性的品种。

表 5 329 份小麦申请品种的近似品种筛选结果

Table 5 Similar variety screening results for 329 candidate varieties

测试年份 Test year	申请品种数量 No. of candidate varieties	不同近似品种数量的申请品种分布 Distribution of candidate varieties with different no. of similar varieties							近似品种数量 No. of similar varieties
		0	1~3	4~6	7~9	10~12	13~15	>15	
2013	110	68	27	5	2	4	4	0	181
2014	38	27	9	1	0	0	0	1	32
2015	181	117	39	9	9	3	3	1	261
合计 Total	329	212	75	15	11	7	7	2	474
百分比 (%) Percentage	100	64.4	22.8	4.6	3.3	2.1	2.1	0.6	—

3 讨论

DUS 测试中的特异性测试是基于表型性状进行的。SSR 等分子标记可以用于估算品种间的遗传相似度,一定程度上反映表型差异,不能直接用于品种鉴定和 DUS 测试,但可以作为辅助手段筛选近似品种^[29]。本研究通过小麦品种间的遗传相似度与表型差异的对比研究,发现申请品种不具备特异性的情况发生于这些申请品种的近似品种与其遗传相

似度高于 90% 时。近似品种与申请品种间的遗传相似度越高,出现不具备特异性的可能性越大。王立新等^[21]研究发现相似度大于 90% 的品种间农艺性状及田间表型极度相似,与本研究结果基本一致。本研究将遗传相似度 80% 作为小麦近似品种筛选的阈值,从 329 份 DUS 参试品种中筛选出 474 份近似品种,平均每个申请品种有 1.44 份近似品种。如果只考虑筛选到近似品种的申请品种,每份申请品种的近似品种数量为 4.05 份。由此可见,即使以

80% 作为近似品种筛选的遗传相似度阈值,筛选出的近似品种数量也远低于基于表型性状筛选出的通常 10 个以上的近似品种数量^[30]。而采用 80% 的遗传相似度阈值筛选近似品种,能降低遗漏应与申请品种进行田间比较品种的可能性。因此,本研究建议以 80% 作为利用基于 SSR 标记的 DNA 指纹库进行小麦近似品种筛选的遗传相似度阈值。

在利用遗传距离筛选 DUS 测试近似品种方面,国际上已在黄瓜、油菜、水稻、马铃薯、玉米、生菜等作物上应用分子标记技术辅助筛选 DUS 测试近似品种^[9-15],但在小麦上尚没有应用先例。国际植物新品种保护联盟(UPOV)提出了基于表型距离和分子距离筛选近似品种的模式^[29]。小麦是 2 年生作物,生育期长,生育期内气候条件年度间变化大,不同年度间品种的表型性状表达不够一致。另外,在中国由于同一小麦生态区内有数家测试机构开展小麦 DUS 测试,不同测试机构采集的表型数据可比性差,导致品种间的表型距离不可靠。上述因素限制了 UPOV 模式在小麦上的应用。在 DUS 测试应用的分子标记种类方面,由于 SNP 标记相对 SSR 标记检测自动化程度高,不同来源的数据可比性强等优势,国际上正经历由 SSR 标记过渡到 SNP 标记的阶段。法国自 2017 年起,已正式使用 SNP 标记替代 SSR 标记进行玉米近似品种筛选^[13]。本课题组正在积极研究将 SNP 标记应用于小麦 DUS 测试近似品种筛选的可行性。

本研究利用 42 对 SSR 标记对 2256 份小麦已知品种进行了 DNA 指纹采集,构建了我国小麦品种 DNA 指纹数据库,确定了遗传相似度 80% 是对 DUS 测试近似品种筛选的合适遗传距离阈值,为精准高效测试小麦近似品种提供了新的手段。同时,本研究构建的小麦品种 DNA 指纹数据库也可用于我国小麦品种的遗传多样性水平研究和小麦品种快速鉴定等工作。

参考文献

- [1] 中华人民共和国国务院. 植物新品种保护条例. 北京: 中国农业出版社, 1997: 4-5
State Council of the People's Republic of China. Regulations on Protection of New Varieties of Plants. Beijing: China Agricultural Publishing House, 1997: 4-5
- [2] 全国人民代表大会常务委员会. 中华人民共和国种子法. 北京: 法律出版社, 2015: 4-7
Standing Committee of the National People's Congress. People's Republic of China Seed Law. Beijing: Law press, 2015: 4-7
- [3] 戴剑,李华勇,丁奎敏,洪德林. 植物新品种 DUS 测试技术的现状与展望. 种子, 2007, 26(9): 44-47
Dai J, Li H Y, Ding K M, Hong D L. Current status and prospects on DUS testing technique system for new plant variety protection. Seed, 2007, 26(9): 44-47
- [4] Cooke R J. New Diagnostics in Crop Sciences. First edition. Wallingford: CAB International, 1995: 33-34
- [5] Morgante M, Olivieri A M. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. The Plant Journal, 1993, 3(1): 175-182
- [6] Powell W, Morgante M, Andre C, McNicol J W, Machray G C, Doyle J J, Tingey S V, Rafalski J A. Hypervariable microsatellites provide a general source of polymorphic DNA markers for the chloroplast genome. Current Biology, 1995, 5(9): 1023-1029
- [7] McGregor C E, Lambert C A, Greyling M M, Louw J H, Warnich L. A comparative assessment of DNA fingerprinting techniques (RAPD, ISSR, AFLP and SSR) in tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L.) germplasm. Euphytica, 2012, 113(2): 135-144
- [8] Roder M S, Wendehake K, Korzun V, Bredemeijer G, Laborie D, Bertrand L, Isaac P, Rendell S, Jackson J, Cooke R, Vosman B, Ganai M. Construction and analysis of a microsatellite-based database of European wheat varieties. Theoretical and Applied Genetics, 2002, 106(1): 67-73
- [9] Bernet G P, Bramardi S, Calvache D, Carbonell E, Asins M. Applicability of molecular markers in the context of protection of new varieties of cucumber. Plant Breeding, 2003, 122(2): 146-152
- [10] Tommasini L, Batley J, Arnold G M, Cooke R, Donini P, Lee D, Law J, Lowe C, Moule C, Trick M. The development of multiplex simple sequence repeat (SSR) markers to complement distinctness, uniformity and stability testing of rape (*Brassica napus* L.) varieties. Theoretical and Applied Genetics, 2003, 106(6): 1091-1101
- [11] Singh R K, Sharma R K, Singh A K, Singh V, Singh N, Tiwari S, Mohapatra T. Suitability of mapped sequence tagged microsatellite site markers for establishing distinctness, uniformity and stability in aromatic rice. Euphytica, 2004, 135(2): 135-143
- [12] Reid A, Hof L, Felix G, Rücker B, Tams S, Milczynska E, Esselink D, Uenk G, Vosman B, Weitz A. Construction of an integrated microsatellite and key morphological characteristic database of potato varieties on the EU common catalogue. Euphytica, 2011, 182(2): 239-249
- [13] Working Group on Biochemical and Molecular Techniques and DNA-Profiling in Particular. The use of molecular markers (SNP) for maize DUS testing: development and official applications to assess distinctness of hybrids varieties. Geneva: UPOV, 2017
- [14] Working Group on Biochemical and Molecular Techniques and DNA-Profiling in Particular. Genetic selection of similar varieties for the first growing cycle: example French bean. Geneva: UPOV, 2017
- [15] Working Group on Biochemical and Molecular Techniques and DNA-Profiling in Particular. Developments and use of molecular techniques for plant variety protection in the republic

- of Korea. Geneva: UPOV, 2017
- [16] 管俊娇, 余志慧, 杨晓洪, 王江民, 张鹏, 黄清梅, 张建华. SSR 标记在辣椒 DUS 测试中的应用研究. 植物遗传资源学报, 2019, 20(2): 396-405
Guan J J, Yu Z H, Yang X H, Wang J M, Zhang P, Huang Q M, Zhang J H. Study on the application of SSR markers in Pepper (*Capsicum annuum* L.) DUS testing. Journal of Plant Genetic Resources, 2019, 20(2): 396-405
- [17] 乔大河, 郭燕, 杨春, 李燕, 陈娟, 陈正武. 贵州省主要栽培茶树品种指纹图谱构建与遗传结构分析. 植物遗传资源学报, 2019, 20(2): 412-425
Qiao D H, Guo Y, Yang C, Li Y, Chen J, Chen Z W. Fingerprinting construction and genetic structure analysis of the main cultivated tea varieties in Guizhou province. Journal of Plant Genetic Resources, 2019, 20(2): 412-425
- [18] 郝晨阳, 王兰芬, 张学勇, 游光霞, 董玉琛, 贾继增, 刘旭, 尚勋武, 刘三才, 曹永生. 我国育成小麦品种的遗传多样性演变. 中国科学, C 辑, 生命科学. 2005, 35(5): 408-415
Hao C Y, Wang L F, Zhang X Y, You G X, Dong Y C, Jia J Z, Liu X, Shang X W, Liu S C, Cao Y S. Evolution of genetic diversity of the wheat varieties grown in China. Science in China Series C: Life Sciences. 2005, 35(5): 408-415
- [19] 李根英, Dreisigacker S, Warburton M L, 夏先春, 何中虎, 孙其信. 小麦指纹图谱数据库的建立及 SSR 分子标记试剂盒的研发. 作物学报, 2006, 32(12): 1771-1778
Li G Y, Dreisigacker S, warburton M L, Xia X C, He Z H, Sun Q X. Development of a fingerprinting database and assembling an SSR reference kit for genetic diversity analysis of wheat. Acta Agronomica Sinica, 2006, 32(12): 1771-1778
- [20] 王立新, 李云伏, 常利芳, 黄岚, 李宏博, 葛玲玲, 刘丽华, 姚骥, 赵昌平. 建立小麦品种 DNA 指纹的方法研究. 作物学报, 2007, 33(10): 1738-1740
Wang L X, Li Y F, Chang L F, Huang L, Li H B, Ge L L, Liu L H, Yao J, Zhao C P. Method of ID constitution for wheat cultivars. Acta Agronomica Sinica, 2007, 33(10): 1738-1740
- [21] 王立新, 李宏博, 廖琴, 邱军, 常利芳, 刘丽华, 任立平, 高新欢, 赵昌平. 利用分子标记筛查小麦相似品种(系). 作物学报, 2010, 36(9): 1490-1497
Wang L X, Li H B, Liao Q, Qiu J, Chang L F, Liu L H, Ren L P, Gao X H, Zhao C P. Screening wheat cultivars with genetic similarity using molecular markers. Acta Agronomica Sinica, 2010, 36(9): 1490-1497
- [22] 李莉, 王俊峰, 颜廷进, 李娜娜, 丁汉凤, 樊守金. 基于 SSR 标记的山东省小麦 DNA 指纹图谱的构建. 植物遗传资源学报, 2013, 14(3): 537-541
Li L, Wang J F, Yan T J, Li N N, Ding H F, Fan S J. Establishment of DNA fingerprinting for wheat in Shandong province by SSR markers. Journal of Plant Genetic Resources, 2013, 14(3): 537-541
- [23] 李远, 赵檀, 王睿辉, 陈景堂, 刘桂茹, 温树敏, 谷俊涛. 河北省小麦品种基于 SSR 标记的遗传多样性研究. 河北农业大学学报, 2012, 35(4): 1-5
Li Y, Zhao T, Wang R H, Chen J T, Liu G R, Wen S M, Gu J T. Genetic diversity of bread wheat in Hebei province, China based on microsatellite markers. Journal of Agricultural University of Hebei, 2012, 35(4): 1-5
- [24] 郑永胜, 张哈, 王东建, 孙加梅, 王雪梅, 段丽丽, 李华, 王玮, 李汝玉. 基于荧光检测技术的小麦品种 SSR 鉴定体系的建立. 中国农业科学, 2014, 47(19): 3725-3735
Zheng Y S, Zhang H, Wang D J, Sun J M, Wang X M, Duan L L, Li H, Wang W, Li R Y. Development of a wheat variety identification system based on fluorescently labeled SSR markers. Scientia Agricultura Sinica, 2014, 47(19): 3725-3735
- [25] 李汝玉, 张哈, 王东建, 孙加梅, 姚凤霞, 郑永胜, 许金芳, 段丽丽, 李华. NY/T 2470-2013 小麦品种鉴定技术规程-SSR 分子标记法. 北京: 中国标准出版社, 2014
Li R Y, Zhang H, Wang D J, Sun J M, Yao F X, Zheng Y S, Xu J F, Duan L L, Li H. NY/T 2470-2013 Protocol for the identification of wheat varieties-SSR marker method. Beijing: Standards Press of China, 2014
- [26] Allen G, Flores-Vergara M, Krasynanski S, Kumar S, Thompson W. A modified protocol for rapid DNA isolation from plant tissues using CTAB. Nature Protocols, 2006, 1(5): 2320-2325
- [27] 赵昌平, 支巨振, 邱军, 庞斌双, 刘丽华, 王立新, 谷铁城, 刘丰泽, 吴明生, 刘阳娜, 张立平, 张凤廷, 李宏博, 赵海艳. 主要农作物品种真实性 SSR 分子标记检测普通小麦. 北京: 中国标准出版社, 2015
Zhao C P, Zhi J Z, Qiu J, Pang B S, Liu L H, Wang L X, Gu T C, Liu F Z, Wu M S, Liu Y N, Zhang L P, Zhang F T, Li H B, Zhao H Y. Variety genuineness testing of main crops with SSR markers-wheat (*Triticum aestivum* L.). Beijing: Standards Press of China, 2015
- [28] 王汝锋, 李立会, 郑殿升, 吕波, 王晓鸣, 翁跃进, 杨金华. 植物新品种特异性、一致性和稳定性测试指南-普通小麦. 北京: 中国标准出版社, 2004
Wang R F, Li L H, Zheng D S, Lv B, Wang X M, Weng Y J, Yang J H. Guidelines for the conduct of tests for distinctness, uniformity and stability-Wheat (*Triticum aestivum* L.). Beijing: Standards Press of China, 2004
- [29] UPOV.TGP/15. Guidance on the use of biochemical and molecular markers in the examination of distinctness, uniformity and stability (DUS). Geneva: UPOV, 2013
- [30] 孙加梅, 王鹏, 王玮, 王穆穆, 张哈, 郑永胜, 王雪梅, 李华, 王秀娟, 段丽丽, 李汝玉. 基于表型性状的玉米特异性测试近似品种筛选方法. 植物遗传资源学报, 2018, 19(2): 271-278
Sun J M, Wang P, Wang W, Wang M M, Zhang H, Zheng Y S, Wang X M, Li H, Wang X J, Duan L L, Li R Y. Screening for similar varieties for maize distinctness test using phenotypic characteristics. Journal of Plant Genetic Resources, 2018, 19(2): 271-278