

## 小麦K-CMS保持系的SRAP鉴定及遗传多样性分析

范可章<sup>1</sup>,祝旋<sup>1</sup>,邢斌<sup>1,2</sup>,赵翔<sup>1</sup>,马同富<sup>1</sup>,卢良峰<sup>3</sup>,蔡健<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>阜阳师范学院生命科学学院,安徽阜阳 236037;<sup>2</sup>乐桥第二中学,安徽庐江 231581;  
<sup>3</sup>河南农业职业学院现代农业工程系,河南中牟 451460)

**摘要:**为更好地对小麦K-CMS保持系的遗传背景进行分析,筛选优良亲本,以进一步提高小麦杂交育种的效率。利用SRAP技术,对30份小麦K-CMS保持系的遗传背景进行研究,以SRAP标记在30个品种之间扩增的多态性位点数据,采用Nei和Li的方法,计算品种间的遗传距离;以2年田间试验得到的品种株高、穗长、小穗数、穗下节长、穗粒重、穗粒数、穗粒重、旗叶长等表现型性状平均数经正态标准化后,采用欧氏距离计算品种间遗传距离,再比较分析。分析表明,82对SRAP引物揭示出多态性,多态率68.3%,获得208条多态性谱带,平均每对引物产生3.68条多态性谱带,表现出较高的多态性。基于分子标记的聚类分析结果与系谱分析结果基本一致。若以整个遗传距离的总平均数作尺度对聚类图的结果进行分类,大致可分为6类。Mantel检测表明,SRAP标记数据计算的遗传距离矩阵和表现型计算的遗传距离矩阵存在极显著的相关性 $0.8123(t=11.325>t_{0.01})$ 。SRAP标记是检测品种间遗传差异的有效方法,可为小麦K-CMS保持系种质资源遗传差异的研究提供理论依据。研究还证实,一个骨干亲本与其衍生出来的品种(系)之间的遗传差异一般较小。

**关键词:**小麦;K-CMS保持系;遗传多样性;SRAP;农艺性状

中图分类号:S330.2+5

文献标志码:A

论文编号:casb16070044

### Analysis of Genetic Diversity and Identification of Maintainer Line for K-CMS Germplasm Resources in Wheat Using SRAP Markers

Fan Kezhang<sup>1</sup>, Zhu Xuan<sup>1</sup>, Xing Bin<sup>1,2</sup>, Zhao Xiang<sup>1</sup>, Ma Tongfu<sup>1</sup>, Lu Liangfeng<sup>3</sup>, Cai Jian<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>School of Life Science, Fuyang Teachers College, Fuyang Anhui 236037; <sup>2</sup>The Second Middle School of Leqiao, Lujiang Anhui 231581; <sup>3</sup>School of Modern Agricultural Engineering, Henan Vocational College of Agriculture, Zhongmu Henan 451460)

**Abstract:** To analyze the genetic background of the maintainer line for K-type cytoplasmic male sterility (CMS) in wheat, screen the excellent parents for breeding, and improve hybrid breeding efficiency in wheat, the genetic diversity of 30 maintainer lines for K-CMS germplasm resources of wheat were assessed using SRAP markers in this study. SRAP markers were used to amplify the polymorphic loci in the 30 lines, the genetic distances between cultivars were calculated by using Nei and Li methods. In 2 years field experiment, the average of phenotypic traits about plant height, panicle length, spikelet number, spike length, spike grass weight, grain number and grain weight per spike, length of flag leaf and so on were carried out in normal standard, using Euclidean distance to calculate the genetic distance among varieties, and comparative analysis

**基金项目:**国家星火计划项目“皖北草莓良种引种栽培及工厂化育苗示范推广”(2013GA710018);安徽省高校省级自然科学基金重点项目“小麦T-CMS相关基因 *orf256/cox1* 的克隆及功能分析”(KJ2014A194);安徽省高校省级自然科学基金项目“皖北农作物秸秆栽培食用菌综合利用研究”(KJ2013B197)。

**第一作者简介:**范可章,男,1970年出生,安徽阜阳人,副教授,硕士,主要从事生物学教学与研究。通信地址:236041 安徽省阜阳市阜阳师范学院生物与食品工程学院,E-mail:fankezhang@126.com。

**通讯作者:**蔡健,男,1965年出生,安徽阜阳人,教授,博士,主要从事植物生物技术研究。通信地址:236041 安徽省阜阳市阜阳师范学院生物与食品工程学院,E-mail:fycaijian@163.com;卢良峰,男,1956年生,河南郑州人,副教授,硕士研究生,主要从事小麦细胞质雄性不育的应用研究。通信地址:451450 郑州市青年西路38号(近中牟县电视塔),Tel:0371-60219490,E-mail:luliangf845969181@qq.com。

收稿日期:2016-07-09,修回日期:2016-09-20。

was conducted. Analysis showed that 82 pairs of SRAP primers revealed polymorphism, the polymorphism rate was 68.3%, 208 polymorphic bands were obtained, the average of each pair of primers produced 3.68 polymorphic bands, showed high polymorphism. The results of cluster analysis based on molecular markers and pedigree analysis results were consistent. Taking the total average genetic distance as the scale, the results of cluster graph could be divided into 6 categories. Mantel detection showed that there was a very significant correlation between the genetic distance matrix of SRAP marker data and the expression pattern of the genetic distance matrix ( $r=0.8123$ ,  $t=11.325>t_{0.01}$ ). SRAP marker is an effective method to detect the genetic difference among cultivars, which can provide theoretical basis for the research of genetic difference of germplasm resources of K-CMS in wheat. Studies also confirm that the genetic difference between a backbone parent and the breed derived from it is generally small.

**Key words:** wheat; maintainer line for K-type cytoplasmic male sterility (CMS); genetic diversity; SRAP; agronomic character

### 0 引言

作物育种研究表明,育种方法的改进和作物新材料或新基因资源的发现将会给作物育种带来新的突破<sup>[1]</sup>。迄今为止,作物杂种优势相继在玉米、高粱、水稻、油菜等农作物中取得成功,获得巨大的经济效益<sup>[2]</sup>。K型小麦细胞质雄性不育系(cytoplasmic male sterility, K-CMS)是有应用潜力的理想不育类型,在小麦杂种优势研究中占有重要地位。随着研究的深入逐渐发现,1B/1R类型K型不育系虽有恢复源较广、种子较正常的特点,但随小麦条锈病生理小种的变迁,多数1B/1R类型小麦已丧失抗性,且1B/1R类型小麦一般品质欠佳,遇雨麦穗较易发芽,一些1B/1R类型小麦不育系产生频率不等的单倍体,因而近年来小麦育种很少利用其作为亲本和育成品种,K型不育系利用面临保持系资源逐渐不足的潜在问题<sup>[3]</sup>。何蓓如等<sup>[4]</sup>1994年选育出一种非1B/1R类型的K型不育系,该类型K型不育系与1B/1R类型K型不育系相比虽然具有易恢复、不产生单倍体和生长势较强等优点<sup>[5]</sup>,但实际应用中发现该类型K型不育系的易恢性有一定差别。K-CMS保持系的筛选是扩大K-CMS小麦种质资源研究的重要手段,且K-CMS小麦杂种优势利用的突破在于特殊类型种质——新保持系的出现<sup>[6]</sup>。作为K-CMS保持系的种类较多,研究表明,凡具有1B/1R易位的普通小麦品种(系)一般都是小麦K-CMS雄性不育保持系<sup>[7]</sup>。通过对K-CMS保持系遗传多样性的研究,对于在育种过程中尽可能增加和丰富普通小麦的遗传变异,扩大其种质资源和提高小麦产量潜力具有意义。SRAP<sup>[8]</sup>标记通过特有的引物设计对ORFs(Open reading frames)进行扩增,已在水稻、大蒜、玉米、丹参等植物中构建了图谱<sup>[9]</sup>、比较基因组学<sup>[10]</sup>、遗传多样性分析等研究,具有稳定性好、重复性高、经济、简便、且

便于目标片段的克隆<sup>[11]</sup>。将作物的表型分析和分子检测相结合,已成为检测遗传多样性的手段<sup>[12]</sup>。作物的表型是遗传基因与环境互作的结果,在分子标记大发展的今天,表型以其便于观察的特点仍受到育种工作者的重视<sup>[13]</sup>。本研究采用分子标记和表型相结合的方法,对30份K-CMS保持系种质资源进行遗传多样性分析,旨在探讨这30份K-CMS保持系之间的遗传差异,对2种方法进行遗传多样性分析进行了比较,讨论较为可靠的小麦亲本聚类方法。

### 1 材料与方法

#### 1.1 试验材料

30个小麦K-CMS保持系由河南农业职业学院卢良峰老师提供(表1)。

#### 1.2 材料种植

田间实验于2013—2014年在河南农业职业学院试验基地进行。采用随机完全区组设计,3次重复。每小区定株调查10株。对以下8种性状分别进行田间考查及实验室考种:株高、穗长、小穗数、穗下节长、穗粒草重、穗粒数、穗粒重、旗叶长等。

#### 1.3 SRAP标记分析

取叶片,DNA提取和SRAP标记分析均参照Murray和Thompson<sup>[14]</sup>的CTAB方法,并略作修改。用于SRAP标记分析的120对引物参照Li和Quiros<sup>[8]</sup>报道的设计原理进行设计,由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。PCR扩增产物在6.0%变性聚丙烯酰胺凝胶电泳上分离,0.1%的硝酸银染色<sup>[15]</sup>。统计SRAP产物银染结果,有带记为“1”,无带记为“0”,缺失记为“9”,建立数据矩阵。按Nei和Li的方法<sup>[16]</sup>分别计算各材料间的遗传距离(Genetic distance,简称GD),分别见公式(1)、(2)。

$$\text{遗传相似系数: } GS = 2N_{ij} / (N_i + N_j) \dots\dots\dots (1)$$

表1 30个小麦K-CMS保持系的名称、系谱、来源

编号	名称	系谱	来源地	种类
1	轮选126	矮败小麦轮选群体	河南	育成品种
2	宝亮1号	周麦16/烟农19	河南	育成品种
3	天麦106	百农64诱变体	河南	育成品种
4	粮源26	绵阳11/矮早781	河南	育成品种
5	金源6号	兰考906/郑麦9023	河南	育成品种
6	财源1号	周麦16/07-141	河南	育成品种
7	许麦6号	利农9968/矮抗58	河南	引进品种
8	郑大121	天禾047/周麦16	河南	育成品种
9	许科890	许科1号/04中36	河南	引进品种
10	上麦1号	洛麦21/百农03-46661	河南	育成品种
11	耕麦787	内乡188/矮抗58	河南	育成品种
12	百农419	周麦18/矮抗58	河南	育成品种
13	瑞德麦1号	1604r/周麦13	河南	引进品种
14	南04-59	2001-43-1/攀早抗	四川	引进品种
15	宝麦6号	周麦16/百农64//矮抗58	河南	育成品种
16	鑫麦68	周麦16/矮抗58	河南	育成品种
17	金诚麦6号	新原958/豫麦49	河南	引进品种
18	金科1号	郑农17变异单株	河南	育成品种
19	农科668	豫麦70-36/周麦13	河南	育成品种
20	红满天1号	周麦18/泛麦5号	河南	育成品种
21	中农60	周18/白齐麦	河南	育成品种
22	河科大527	周12温麦8号	河南	育成品种
23	科林7371-2	周16/偃展4110	河南	育成品种
24	宇丰1号	内乡991/矮抗58	河南	育成品种
25	中联1号	豫教0502/矮抗58	河南	引进品种
26	凭心2号	豫麦49/豫麦69	河南	育成品种
27	科森05-11	偃科956/周麦18	河南	育成品种
28	豫龙1号	周麦18/矮抗58	河南	育成品种
29	丰优68	豫麦34/济19//西安8号	河南	引进品种
30	濮208	藁城9801/博爱96-2	河南	育成品种

遗传距离:  $GD = -\ln GS$  ..... (2)

其中  $N_{ij}$  是材料  $i$  和  $j$  之间共同的扩增位点数目,  $N_i$ 、 $N_j$  分别是材料  $i$  和材料  $j$  的扩增位点数目。根据所得遗传距离,用UPGMA法对供试材料进行聚类分析。

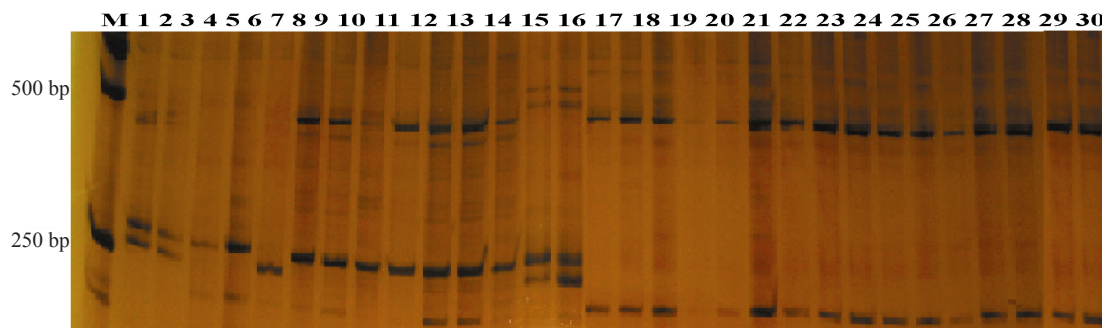
#### 1.4 聚类分析

对测得的原始数据分别进行标准化预处理,种质间遗传距离为欧氏距离,聚类方法采用类平均法<sup>[17]</sup>(Unweight pair group method using arithmetic averages,简称UPGMA法),用DPS 3.01专业软件<sup>[18]</sup>聚类。

## 2 结果与分析

### 2.1 SRAP标记的多态性

从30个供试材料中随机选取‘轮选126’、‘宝亮1号’、‘丰优68’和‘濮208’等4个品种的DNA作为模板,对选取前人设计的120对SRAP引物组合进行多态性试验,结果有82对SRAP引物揭示出多态性,多态率68.3%,呈现出较高的多态性。82对引物共扩增出302条谱带,其中多态性谱带为208条,多态率为68.8%,平均每对引物扩增出3.68条谱带,表明30份小



M 指标记条带

图1 SRAP引物在30个不同小麦K-CMS保持系品种间的多态性

麦K-CMS保持系种质具有非常丰富的DNA多态性差异。

### 2.2 SRAP分子标记的系统聚类分析

以SRAP标记在30个品种中的多态性数据计算遗传距离,采用UPGMA聚类分析,结果表明,品种遗传距离矩阵与UPGMA聚类树表型相关系数矩阵的相关系数为0.8240,相关极显著,说明聚类结果可靠。若以整个遗传距离的总平均数作尺度对聚类图的结果进行分类,大致可分为6类(图2)。I类为‘轮选126’、‘宝亮1号’、‘天麦106’、‘粮源26’、‘金源6号’、‘财源1号’、‘许麦6号’、‘郑大121’、‘许科890’和‘上麦1

号’共10个材料;II类为‘耕麦787’、‘百农419’、‘瑞德麦1号’和‘南04-59’共4个材料;III类为‘宝麦6号’和‘鑫麦68’共2个材料;IV类为‘金诚麦6号’、‘金科1号’、‘农科668’和‘红满天1号’共4个材料;V类为‘中农60’、‘河科大527’、‘科林7371-2’、‘宇丰1号’、‘中联一号’、‘凭心2号’和‘科森05-11’共7个材料;VI类为‘豫龙1号’、‘丰优68’和‘濮208’共3个材料。

### 2.3 依据农艺性状的系统聚类分析

对30个供试材料的株高、穗长、小穗数、穗下节长、穗粒草重、穗粒数、穗粒重、旗叶长等8个农艺性状的测定结果作方差分析,并对各性状的原始数据作标

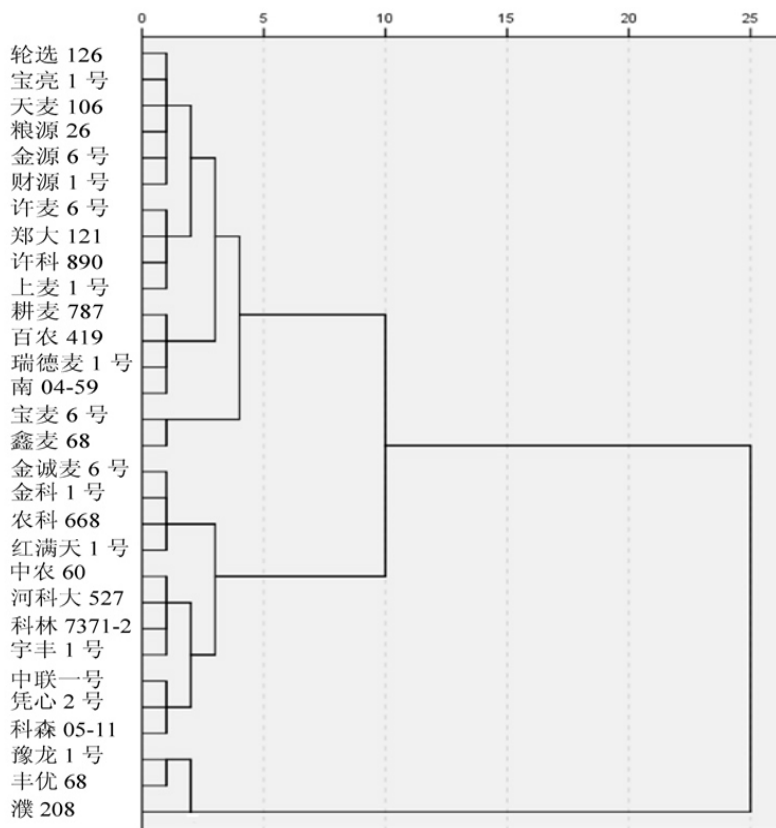


图2 30份小麦K-CMS保持系种质基于SRAP标记的系统聚类图



准差标准化变换。对品种遗传距离的类平均法聚类结果(图3)进行共表型相关分析,表明品种遗传距离矩阵与类平均法聚类树表型相关系数矩阵的相关系数为0.8124,达极显著,说明聚类结果可靠。若以整个遗传距离的总平均数作尺度对聚类图的结果进行分类,可将供试材料划分为10个类群。I类为‘科森05-11’、‘豫龙1号’、‘丰优68’、‘濮208’、‘中联一号’、‘凭心2号’、‘中农60’、‘河科大527’、‘科林7371-2’和‘宇丰1号’共10个材料;II类为‘红满天1号’、‘农科668’、‘金科1号’和‘鑫麦68’共4个材料;III类为‘宝麦6号’、‘金诚麦6号’、‘耕麦787’、‘百农419’、‘郑大

121’、‘许科890’、‘财源1号’和‘许麦6号’共8个材料;IV类为‘粮源26’、‘金源6号’、‘宝亮1号’、‘天麦106’、‘轮选126’、‘上麦1号’和‘瑞德麦1号’共7个材料;V类仅‘南04-59’一个材料。

#### 2.4 依据SRAP标记和农艺性状聚类分析结果的比较

对聚类结果的比较可知,30份小麦K-CMS保持系种质基于SRAP标记聚类分析的第I-1亚群、I-2亚群、IV类群、V类群和VI类群的品种(系)分别集中在农艺性状聚类分析的第IV类群、III-2亚群、II类群和I类群中,表现出较大的农艺性状的相似性;而SRAP聚类分析的第III类群所包括的品种(系)农艺性状差异较

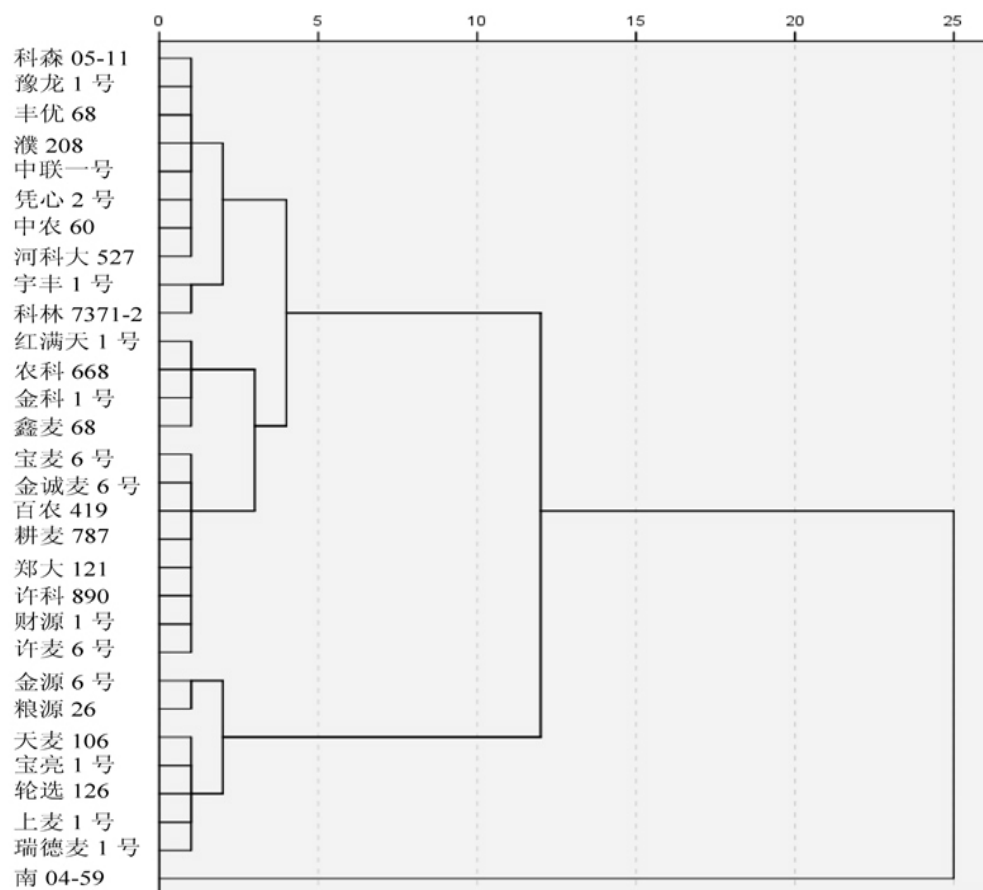


图3 30份小麦K-CMS保持系种质基于农艺性状的系统聚类图

大。‘南04-59’农艺性状聚类分析中单独构成第V类群,而在SRAP聚类分析中则被聚在第II类群中,与‘耕麦787’、‘百农419’、‘瑞德麦1号’聚为同一类群,表现出农艺性状聚类与SRAP聚类分析的差异性。

#### 2.5 SRAP标记和形态学之间的相关分析

利用Mantel检测对由SRAP标记计算的遗传距离矩阵和基于品种农艺性状计算的遗传距离矩阵作相关分析,相关系数为0.8123( $t=11.325 > t_{0.01}$ ),2个矩阵存在极显著的相关关系,说明分子标记检测的多态性基本上反映了品种间的遗传变异。

### 3 讨论

作物杂交育种的实践中,保持系对不育系授粉生产出不育后代的同时,在一定程度上把新的遗传特性贡献给下一代不育系,从而使其遗传多样性增加,使培育优质杂交种成为可能<sup>[19]</sup>。遗传育种的基础是遗传变异,实践证明,合理选择遗传差异大的亲本是在后代中出现理想性状组合的关键,因此,育种工作者总是把基因型差异大的个体作为亲本组合进行育种实践。本研究利用SRAP标记和作物表型对30个小麦K-CMS保持系种质进行聚类分析,二者均可形成一个较大的类

群,表明供试材料遗传差异不明显,间接反映中国育成品种(系)的骨干亲本遗传背景不宽泛,与前人的研究相一致<sup>[20-21]</sup>。育种时,选择遗传差异大的亲本往往是参考聚类分析的结果,优先选择遗传距离较远的亲本。为扩大小麦育种亲本的选择范围,有必要加强国外优良种质资源的引进。

另外,根据作物表型和SRAP标记进行聚类分析的结果并不完全一致,这也与前人研究结果相吻合<sup>[22]</sup>。作物表型是遗传与环境综合作用的结果,可以简单、直观地反映材料间的表型差异,但其清晰性、均一性和稳定性易受环境因素和发育时期的影响。分子标记可以不依赖表型性状而直接度量遗传变异,从基因组水平上揭示遗传变异的程度,因此更能真实反映遗传差异。因此,在进行小麦育种材料筛选和亲本选配时,以分子标记分析其遗传距离,同时结合作物表型性状、品质性状、抗病性、抗虫性等指标进行综合考察,可提高筛选的效率和准确性。

#### 4 结论

利用SRAP引物对30份小麦K-CMS保持系种质材料的基因组DNA进行PCR扩增,平均每对引物产生3.68条多态性谱带,表现出较高的多态性。SRAP标记聚类分析表明,以整个SRAP标记遗传距离的总平均数作尺度对聚类图的结果进行分类,大致可分为6类,遗传聚类与系谱吻合性较好,SRAP标记可以用来对小麦亲本进行聚类。

#### 参考文献

- [1] 黄群英.中国两系法籼稻杂交水稻育种的研究新进展[J].科技导报,1995(11):46-48.
- [2] Gomma A S, Khalil O I S. Genetics and another score and seed s et and their correlation in certain wheat hybrides with *T. timopheevi* cytoplasm [J]. *Ag r Res Revi*, 1980,58:1-20.
- [3] 宋喜悦,方鹏,马翎健,等.非1B/1R类型和1B/1R类型小麦K型雄性不育系比较研究[J].西北农林科技大学学报:自然科学版,2002,30(1):1-4.
- [4] 何蓓如.一种选育小麦雄性不育保持系和不育系的方法[P].中国专利,ZL94116837.X,1994.
- [5] 卢良峰,朱凤荣. K型小麦保持系及恢复系筛选研究[J].河南农业科学,2004(10):3-5.
- [6] 何蓓茹,宁毓华,刘曙东. 1B/1R类型小麦雄性不育系初步研究[J].西北农业大学学报,1987,15(3):107-109.
- [7] 曹士亮,曹靖生,王成波,等.玉米SSR分子标记技术操作流程研究进展[J].中国农学通报,2012,28(15):1-4.
- [8] Li G, Quiros C F. Sequence- related amplified polymorphism (SRAP), A new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in *Brassica* [J]. *Theoretical and Applied Genetics*,2001,103: 455-461.
- [9] Lin Z X, Zhang X L, Nie Y C, et al. Construction of a genetic linkage map for cotton based on SRAP [J]. *Chinese Science Bulletin*,2003,48(19):2064-2068.
- [10] Li G, Gao M, Yang B, et al. Gene for gene alignment between the *Brassica* and *Arabidopsis* genomes by direct transcription mapping [J]. *Theoretical and Applied Genetics*,2003,107:271-282.
- [11] Ferriol M, Picó B, Nuez F. Genetic diversity of a germplasm collection of *Cucurbita pepo* using SRAP and AFLP markers [J]. *Theoretical and Applied Genetics*,2003,107:256-261.
- [12] Ge S, Hong D Y. Genetic diversity and its detection. //Biodiversity Committee of Chinese Academy of Sciences. Principles and Methodologies of Biodiversity Studies[M]. Beijing: Chinese Science and Technology Press,1994:123-140.
- [13] 王林海,王晓伟,詹克慧.黄淮麦区部分小麦种质资源农艺性状的聚类分析[J].中国农学通报,2008,24(4):186-190.
- [14] Murray M G, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA[J]. *Nucleic Acids Res*, 1980,8(19):4321-4325.
- [15] 李强,刘庆昌,翟红,等.中国甘薯主要亲本遗传多样性的ISSR分析[J].作物学报,2008,34(6):972-977.
- [16] Nei M, Li W H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1979,76:569-572.
- [17] 钟扬,陈家宽,黄德世.数量分类的方法与程序[M].武昌:武汉大学出版社,1990:47.
- [18] 唐启义,冯明光.实用统计分析及其DPS数据处理系统[M].北京:科学出版社,2002:551-603.
- [19] 黄寿松,李万隆,徐浩,等.蓝标型小麦核雄性不育保持系的选育研究[J].作物学报,1991,17(2):81-87.
- [20] 苏春华,李育明,黄迎冬,等.甘薯主要亲本材料的主成分分析及聚类分析[J].杂粮作物,2007,27(6):405-409.
- [21] 吴洁,谭文芳,阎文昭,等.甘薯种质资源亲缘关系SRAP标记分析[J].四川大学学报:自然科学版,2007,44(4):878-882.
- [22] 马代夫,李强,李秀英,等.甘薯高胡萝卜素食用品种的亲本筛选[J].中国农业科学,2009,42(3):798-808.