

利用 IRAP 分子标记对小麦抗旱品种筛选的研究

李卫涛¹, 陈秋芳¹, 押辉远², 谷运红¹

(1. 郑州大学 河南省离子束生物工程重点实验室, 河南 郑州 450052; 2. 洛阳师范学院 生命科学系, 河南 洛阳 471022)

摘要:采用 IRAP 分子标记方法, 设计引物对 36 份小麦材料进行 PCR 扩增, 得到多态性丰富的指纹图谱, 并进行聚类分析。结果显示: 扩增出清晰稳定条带 246 条, 片段大小多集中在 250~2 000 bp, 多态性位点总计 13 个, 各个品种扩增的位点数为 0~12 个, 聚类分析结果能够反映 36 份小麦材料抗性有无以及强弱关系, 表明 IRAP 分子标记适合应用于小麦抗旱品种筛选的研究分析。

关键词:IRAP 分子标记; 小麦; 抗旱性; 聚类分析

中图分类号:S512.03 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-7091(2014)03-0105-04

Analysis of Screening Wheat Drought Resistance Varieties by IRAP

LI Wei-tao¹, CHEN Qiu-fang¹, YA Hui-yuan², GU Yun-hong¹

(1. Henan Provincial Key Laboratory of Ion Beam Bio-engineering, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China; 2. Institution of Life Science, Luoyang Normal University, Luoyang 471022, China)

Abstract: Using IRAP molecular method, design primers and 36 wheat varieties were used for PCR amplification, polymorphic finger maps were obtained and clustering analysis. The results were as follows: 246 bands were produced by IRAP, the range of amplification fragments were 250-2 000 bp, a total of 13 polymorphic loci, the range of different varieties was 0-12. the results of clustering analysis can be clearly differentiate drought resistance between 36 wheat varieties. The study showed that IRAP were suitable for screening drought resistance varieties in wheat.

Key words: IRAP molecular marker; Wheat; Drought resistance; Cluster analysis

小麦是我国北方地区主要的夏粮作物, 主要分布在我国的干旱和半干旱地区, 种植面积和总产量在我国粮食作物中占很大比例。近年来, 随着气候变化, 干旱已经成为制约我国小麦可持续发展的重要因素之一, 抗旱、节水、高产稳产小麦品种的培育和筛选成为迫切需要解决的问题^[1]。目前, 国内外学者在作物抗旱性鉴定方面做了大量工作, 并从不同角度提出了许多鉴定方法和筛选指标^[2-8], 但针对不同类型抗性品种的科学、简便和可操作性强的鉴定指标仍然缺乏, 小麦抗旱的性能评价系统还不够完善, 从基因水平对小麦抗旱性研究已经成为一个重要方向。

IRAP (Inter-retrotransposon amplified polymorphism) 是一种检测反转录转座子插入位点间多态性

的分子标记^[9-10], 是根据长末端重复序列 (Long terminal repeat, LTR) 中包含的保守序列设计引物, 在 PCR 过程中扩增出特异性反转录转座子的 DNA 片段, IRAP 分子标记技术已经应用于大麦^[11]、豌豆^[12]、柑橘^[13]等的遗传研究中。植物中反转录转座子存在广泛, 其中小麦中反转录转座子的含量达到 90%^[14], 更为采用 IRAP 分子标记进行植物基因组组成、表达调控研究, 作物品种及纯度鉴定, 生物多样性分析提供了有利条件。

本研究利用 IRAP 分子标记技术, 对 36 份供试小麦材料进行扩增, 得到不同的扩增条带, 利用聚类分析软件对扩增结果进行聚类分析, 基本能够把原来已经得到评价的小麦抗旱品种进行分类, 可以作为评价小麦抗旱性能的一种分子生物学方法, 为培

收稿日期: 2014-03-26

基金项目: 国家自然科学基金项目 (11375154)

作者简介: 李卫涛 (1987-), 男, 河南荥阳人, 在读硕士, 主要从事离子束生物效应和生物物理学研究。

通讯作者: 谷运红 (1976-), 女, 河南新密人, 副教授, 博士, 主要从事分子遗传学与生物物理学研究。

育、筛选抗旱小麦品种提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

供试 36 份小麦材料由洛阳市农林科学院提供,

表 1 小麦材料及编号

Tab. 1 Wheat materials and numbers

抗性水平 Resistance level	小麦品种 Wheat materials													
无抗 NDR	C1 II	C2 I	C3 II	C4 I	C4 II	C7 I	C8 I	C9 II	C10 II					
高抗 HDR	H1 II	H2 I	H3 I	H3 II	H4 I	H5 II	H6 I	H7 II	H8 I	H9 II	H10 I	H11 I	H12 I	
中抗 MDR	Z1 II	Z2 I	Z3 II	Z4 I	Z5 I	Z6 I	Z7 I	Z8 I	Z9 I	Z10 I	Z10 II	Z12 I	Z13 II	Z14 II

注:为了表示方便,以后用编号代替小麦的品种名称,如 1 表示 C1 II,2 表示 C2 I,以此类推,36 表示 Z14 II。

Note: For convenience, we replaced the variety names of wheat by number, such as 1 for C1 II, 2 for C2 I, and so on, 36 for Z14 II.

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 提取 采用改良的 CTAB 法提取小麦叶片的基因组 DNA,1% 琼脂糖凝胶电泳检测后,使用紫外可见分光光度计检测 DNA 纯度和浓度。

1.2.2 IRAP 分子标记引物设计 根据已报道的小麦反转录转座子 LTRs 保守序列设计 IRAP 引物,由北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司合成,引物序列为:5'-ATTGCGAGCCTATTTCCAGTTTGC-3',5'-TGAGTCCAAACCGGTCC-3'。

1.2.3 PCR 扩增分析 PCR 反应体系(25 μ L)为:双蒸水 15.3 μ L,10 \times Buffer(含 Mg^{2+})2.5 μ L,DNA 模板(50 ng/ μ L)4 μ L,dNTPs(2.5 mmol/L)2 μ L,引物(10 μ mol/L)各 0.5 μ L,*Taq* DNA 聚合酶(5 U/ μ L)0.2 μ L。扩增程序为:94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,40 $^{\circ}$ C 复性 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,共 5 个循环;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,55 $^{\circ}$ C 复性 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,共 35 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min,4 $^{\circ}$ C 保存。扩增反应在 Biometra 梯度 PCR 仪上进

其中包括 H 系列(高抗旱性)13 份、Z 系列(中抗旱性)14 份和 C 系列(无抗旱性)9 份。各材料基本抗性信息详见表 1。采集各小麦材料幼苗期嫩叶,置于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱保存待用。

行。PCR 扩增产物在 1% 琼脂糖凝胶上进行电泳检测,采用紫外凝胶成像系统(天能科技有限公司)观察并拍照记录。

1.2.4 数据统计分析 扩增出的电泳图谱根据相同迁移位置上是否有条带进行人工记数,有条带记为“1”,无条带记为“0”,建立 0/1 矩阵。利用 NT-SYS 统计分析软件的类平均法(UPGMA)进行聚类分析,绘制聚类分析图。

2 结果与分析

2.1 IRAP 分子标记在小麦抗旱品种间的多态性位点分析

使用设计的引物进行 IRAP 扩增能够检测到明显的多态性条带(图 1),带型稳定、清晰条带共计 246 条,每个小麦品种扩增出的带数为 0~12 条,扩增产物的大小多集中在 250~2 000 bp。由此可见,采用 IRAP 分子标记构建小麦抗旱品种指纹图谱能够产生丰富的多态性位点条带,将其应用于小麦抗旱性品种鉴定是可行的。

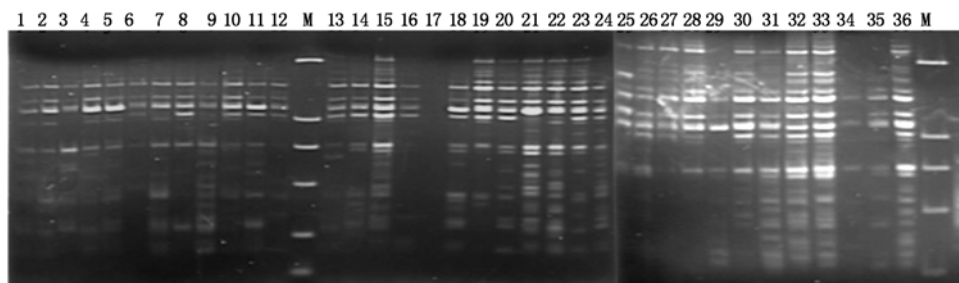


图 1 36 个小麦品种的 IRAP-PCR 扩增结果

Fig. 1 The amplification result of 36 wheat varieties by IRAP-PCR

2.2 小麦 IRAP 指纹图谱

将扩增出的产物在图谱分布水平上进行归类编号,统计出每个品种扩增位点分布和扩增位点数(表 2)。结果表明,不同小麦品种扩增位点数和位

点分布不同,具有各自的特异性,多态性位点数总计 13 个,各个品种扩增的位点数为 0~12 个,使用 IRAP 分子标记能够把各个品种进行较好的区分。

表 2 36 个小麦品种 IRAP 扩增位点统计
Tab.2 The statistics of IRAP amplification
loci in 36 wheat varieties

品种编号 Species number	扩增出的 位点数/个 The number of the amplification sites	扩增位点分布 The distribution of the amplification loci
1	5	7,8,9,11,12
2	5	7,8,9,11,12
3	4	7,8,9,12
4	7	7,8,9,10,11,12,13
5	6	7,8,9,10,11,12
6	5	7,8,9,10,12
7	5	7,8,9,11,12
8	6	7,8,9,10,11,12
9	4	7,8,9,12
10	6	7,8,9,10,11,12
11	5	7,8,9,10,12
12	4	7,8,9,10
13	6	7,8,9,10,11,12
14	7	7,8,9,10,11,12,13
15	11	3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13
16	4	7,8,9,10
17	0	0
18	6	7,8,9,10,12,13
19	10	3,4,5,6,7,8,9,10,11,12
20	7	3,7,8,9,10,12,13
21	9	3,4,5,6,7,8,9,11,12,13
22	10	3,4,5,6,7,8,9,11,12,13
23	11	3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13
24	5	7,8,9,10,12
25	6	2,5,6,7,8,9,12
26	9	2,4,5,6,7,8,9,10,12
27	8	2,4,5,6,7,8,9,10
28	11	1,2,4,5,6,7,8,9,10,11,12
29	3	7,9,12
30	11	1,2,4,5,6,7,8,9,10,11,12
31	8	2,6,7,8,9,10,12,13
32	12	1,2,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13
33	12	1,2,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13
34	3	7,9,12
35	4	6,7,9,12
36	11	1,2,4,5,6,7,8,9,10,11,13

2.3 聚类分析

根据图谱构建的矩阵,对供试的 36 份材料进行相似性分析,结果表明:各个品种间的遗传相似系数在 0~1.055 1,以此为基础利用 UPGMA 法进行聚类分析作图(图 2)。结果表明:当距离指标 D 值水平等于 0.61 时,供试的 36 份材料划分为 2 个大的类群(17 号材料未扩增出条带)。第 1 类群中包括了所有的无抗材料、8 份(约占高抗材料的 62%)高抗材料和 6 份(约占中抗材料的 43%)中抗材料,第 2 类群所有材料均为有抗性材料,其中包括 8 份(约

占中抗材料的 57%)中抗材料和 4 份(约占高抗材料的 31%)高抗材料,所以在此分类水平下无抗性材料能够聚在同一类群中,而高抗和中抗材料在 2 个类群中交叉存在。当 D 值水平等于 0.71 时,供试 36 份材料分为四大类群,第 1 大类群中包括了 9 份无抗材料、8 份高抗材料(约占高抗材料的 62%)和 2 份中抗材料,第 2 类群聚集 4 份中抗材料,第 3 类群聚集 4 份高抗材料和 1 份中抗材料,第 4 类群中包括了 7 份(占中抗材料的 50%)中抗材料。通过分析,无抗材料全部集中在第 1 类群,中抗材料主要集中在第 2 类群和第 4 类群,高抗材料主要集中在第 1 类群和第 3 类群。所以在 D=0.71 水平下,聚类分析虽然不能将各个已经得到鉴定的抗性品种进行准确区分,但分析结果也形成了一定的聚类规律,基本能够得出小麦抗性在聚类分析上的关系。

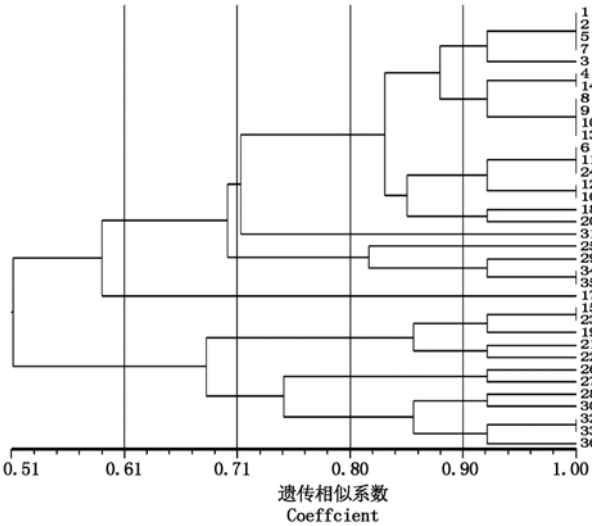


图 2 基于遗传相似系数对 36 份小麦材料构建的 UPGMA 系统进化树
Fig.2 UPGMA tree established on the basis of the genetic similar coefficient of 36 wheat varieties

3 结论与讨论

抗性育种已经成为遗传育种科研人员关注的重要课题,其关键是通过准确、快速的方法筛选鉴定出具有抗性的种质资源。目前应用于小麦抗旱性检测的方法有多种,抗旱性指标众多,可以从小麦抗旱形态结构指标进行鉴定,如:叶片、根系;也可以从小麦苗期生理生化指标进行鉴定,如:种子发芽率、幼苗存活率、贮藏物质转运率、抗氧化酶活性、叶片相对含水量、脱落酸含量^[15]。但是小麦抗旱性状是受多个基因控制的,这些生理生化指标在一定程度上与品种最终的抗旱性存在间接关系。Kristin 等认为,对抗旱性一样的数量性状育种,借助分子标记辅助选择更易实现,可在早期世代对表现优良的基因型

进行鉴定^[16]。近年来,小麦基因组测序信息不断更新,通过分子标记辅助选择快速鉴定抗旱品种类型发展迅速。本研究利用 IRAP 分子标记技术对 3 个抗旱层次的 36 份小麦材料进行 PCR 扩增,构建指纹图谱并进行聚类分析,能够将小麦抗旱性情况进行鉴定,找出了一种能够辅助鉴定小麦抗性的快速、有效的分子生物学方法,为小麦抗性分子标记辅助选择研究工作做出了探索。本研究仅仅使用了 1 种分子生物学方法对小麦材料进行分析,在农业生产过程中,结合生理生化指标、形态结构指标对小麦抗旱资源进行鉴定将会更有利于小麦抗性材料筛选。抗旱性是受多基因控制的复杂性状,是多个抗旱性状的综合反映,单一指标的选用具有一定局限性,应构建形态、生理、生化等方面筛选的综合性指标体系。

参考文献:

- [1] 郭凤芝,刘凤洲,郭凌云,等. 小麦抗旱性品种筛选与分析[J]. 山东农业科学,2013,45(1):46-48.
- [2] 魏添梅,吕小平,闵东红,等. 小麦抗旱品种的遗传多样性分析及株高优异等位变异挖掘[J]. 作物学报,2010,36(6):895-904.
- [3] 敬礼恒,刘利成,梅 坤,等. 水稻抗旱性能鉴定方法及评价指标研究进展[J]. 中国农学通报,2013,29(12):1-5.
- [4] 杨 琳,景继海,赵伯图. 旱地小麦抗旱性鉴定指标研究[J]. 现代农业科技,2009(17):19-20.
- [5] 赵会君,张怀刚,王海庆. 抗旱性不同的春小麦品种籽粒萌发期 α -淀粉酶活性及其同工酶分析[J]. 麦类作物学报,2008,28(4):633-637.
- [6] 张文英,柳斌辉,彭海城,等. 小麦品种抗旱性鉴定指标遗传规律研究[J]. 华北农学报,2008,23(增刊):92-95.
- [7] 贾寿山,朱俊刚,王曙光,等. 山西小麦地方品种萌发期的抗旱性[J]. 华北农学报,2011,26(2):213-217.
- [8] 张立生,温辉芹,程天灵,等. 小麦高产抗旱育种实践[J]. 山西农业科学,2011,39(12):1243-1246.
- [9] Kalendar R, Grob T, Regina M, et al. IRAP and REMAP: two new retrotransposon-based DNA finger-printing techniques[J]. Theor Appl Genet, 1999, 98:704-711.
- [10] Kumar A, Bennetzen J I. Plant retrotransposons[J]. Annu Rev Genet, 1999, 33:479-532.
- [11] Leigh F, Kalendar R, Lea V, et al. Comparison of the utility of barley retrotransposon families for genetic analysis by molecular marker techniques[J]. Mol Genet Genom, 2003, 269(4):464-474.
- [12] Petr Smykal. Development of an efficient retrotransposon-based fingerprinting method for rapid pea variety identification[J]. J Appl Genetic, 2006, 47(3):221-230.
- [13] Breto M P, Ruiz C, Pina JA. The diversification of *Citrus clementina* Hort. ex Tan. , a vegetatively propagated crop species[J]. Mol Phylogenet Evol, 2001, 21(2):285-293.
- [14] Gao L, McCarthy E M, Ganko E W, et al. Evolutionary history of *Oryza sativa* LTR retrotransposons: a preliminary survey of the rice genome sequences [J]. BMC Genomics, 2004, 5(1):18.
- [15] 侯清松,车京玉,邵立刚,等. 小麦抗旱性遗传与研究进展[J]. 小麦研究,2013,34(2):6-13.
- [16] Kristin A, Schneider, Mary E B, et al. Marker assisted selection to improve drought resistance in common Bean [J]. Crop Sci, 1997, 37:51-60.