

SNP 分子标记技术在农作物种子检测中的研究与应用

李巧英 郑戈文

(山西省农业种子总站,太原 030006)

摘要:分子标记方法在农作物种子质量检测中发挥着越来越重要的作用,随着分子标记技术的发展,SNP 标记方法逐渐应用到农作物种子检测中。主要介绍了 SNP 分子标记方法的技术、特点,及其在农作物种子真实性检测、纯度检测和遗传图谱、数据库构建等方面的应用,并就其今后在种子质量检测中的研究与应用进行了探讨。

关键词: SNP 分子标记技术;农作物种子检测;研究;应用

农作物种子是农业生产的关键要素,种子质量的优劣决定着国家农业经济的发展,决定着人民的温饱问题。种子质量检测是掌握种子好坏的一个重要手段,通过检测活动了解种子的一些特性及遗传信息,从而进行种子的繁育、生产及调配。随着农作物种子品种数目增加,品种之间亲缘关系越来越紧密,依靠传统的方法和蛋白质电泳检测已经不能很明确地区分各品种,分子标记方法实现了从 DNA 水平上鉴别品种,能很好地区分亲缘关系较近的品种,并且通过分子检测能够了解各品种之间的遗传关系,因此受到了大家的青睐,同时也是种子检测技术发展的需要。

分子标记技术是近年来发展比较快的一种技术,第 1 代分子标记和第 2 代分子标记方法在种子质量检测中发挥了必不可少的作用,但是随着分子标记技术不断地推广应用,也遇到了一些问题,如试验可重复性差,数据整合较困难,大量种子检测工作任务繁重等。经过不断地研究改进,1996 年美国学者 Eric S.Lander 正式提出了第 3 代分子标记技术——SNP^[1],它是在 SSR、ISSR 第 2 代分子标记基础上发展起来的一种标记技术。SNP 是基于 PCR 技术的一种标记方法,由于其分布均匀广泛,具有可遗传性,稳定性较高,并且有效地改进了第 1 代、第 2 代分子标记方法的缺陷,近年来在农作物种子检测中被广泛研究和应用,主要用于玉米、水稻、小麦、棉花、大豆等农作物种子的真实性检测、纯度检测和遗传图谱、指纹数据库的构建等方面。

1 SNP 分子标记技术及其特点

SNP (Single Nucleotide Polymorphism, 单核苷

酸多态性)是指不同生物个体在基因组 DNA 序列中单个核苷酸的差异,即在生物不同品种的个体间染色体上存在单个碱基的差异,是由于基因序列中某个位置的单个碱基插入、缺失、转换和颠倒造成的,这种差异就作为 SNP 分子标记。

SNP 分子标记的本质是 DNA 单碱基变异,与第 1 代标记 RFLP、第 2 代标记 SSR 的主要不同之处,RFLP、SSR 是以 DNA 序列片段作为标记,SNP 是以单个碱基的变化作为标记。SNP 标记技术通过检测分析染色体上某个位置单个核苷酸的差异,可以实现区分不同个体遗传物质的差异,从而辨别不同的品种。SNP 基因分型就是用特异性的引物对某一段基因进行 PCR 扩增,实现单碱基延伸,获得 SNP 信息,通过不同技术平台(主要包括基因芯片技术、Taqman 技术、分子信标技术和焦磷酸测序法等)检测出 SNP 位点信息,与对照样品进行比对区分品种。

SNP 分子标记技术的优点是:单核苷酸变异,分布广泛均匀,数量多,遗传稳定性高,具有代表性,通量高,检测快,可以实现自动化,易于标准化操作,数据整合更简捷,适合大规模样品 SNP 检测研究与应用;它的缺点是:错误信号多,易发生假阳性,检测成本高,同时要求在该物种全基因组测序的基础上进行,并要求操作人员有一定的分子生物学理论基础和实践经验。

2 SNP 分子标记技术在农作物种子质量检测中的应用

SNP 分子标记技术由于试验重复性好、覆盖面广,结果易判定,且实验室间数据比对更容易,近年

来在种子质量检测中越来越受到大家的重视。

2.1 SNP 分子标记技术应用于种子真实性检测

种子真实性是衡量种子质量的重要指标之一,是指一批种子的特性,其所属品种、种或属与文件记录(该品种审定时所描述的内容)是否一致,即品种是否名副其实。种子真实性就是解决种子的身份问题,甲品种是不是甲,有没有被假冒,如果甲品种的种子冒充乙品种,可能会引起市场混乱、延误农时,或不适应播种地的气候条件、产生病害或者造成减产。种子真实性检测就是通过检验种子身份,了解种子的特性,使各品种因地制宜发挥其优势,应用 SNP 分子标记技术检测种子真实性,更加快速高效。李雪等^[2]比较 SSR 和 SNP 标记方法在玉米种子真实性鉴定中的应用,选择了 11 套玉米种子杂交种和亲本进行试验,用 40 对 SSR 引物和 3072 个 SNP 位点的数据,比较分析各个参数,结果表明,这 2 种方法在种子真实性鉴定方面具有较好的一致性;陆静姣等^[3]用 SNP 标记对南方 104 个籼型两系杂交水稻亲本进行遗传差异性研究,发现 SNP 标记分析的水稻品种间遗传差异与系谱分析结果一致性很高;陈广凤等^[4]通过 SNP 分子标记方法,对中国冬麦区 205 份小麦育成品种进行基因分型,研究小麦遗传多样性。试验结果证实,SNP 标记方法检测种子真实性,在品种区分能力、位点稳定性及遗传关系分析等方面简捷有效,结果准确可靠。

2.2 SNP 分子标记技术应用于种子纯度检测

种子纯度是一个品种在特征特性方面典型一致的程度,不同品种在外观表现及田间生长特性等方面有很大差异,种子纯度检测通常采用田间小区种植鉴定和蛋白质电泳方法。田间小区种植鉴定受自然环境条件和人为主观因素的影响,不能保证检测结果的及时性和准确性;蛋白质电泳方法检测受亲缘关系远近和遗传基础条件的影响不能明确鉴别出异品种。利用 SNP 标记方法进行种子纯度检测,可以从分子水平上鉴定种子特性的一致性,结果准确且效率高。吴明生等^[5]利用 1 个多态性 SNP 位点,分析 5 个杂交玉米组合,发现该位点可以将其中 2 个杂交玉米品种中混杂的亲本区分出来,结果准确;匡孟等^[6]基于 KASP 技术,利用 SNP 标记方法,从 63K 的棉花全基因组芯片中,选出 26 个杂合率高且分型效果理想的 SNP 核心位点,进行棉花杂交种纯度检

测;兰青阔等^[7]经试验筛选出 SNP 位点 CLA6 (A/G),结合焦磷酸测序技术,建立黄瓜杂交种纯度鉴定方法,研究结果与 SSR 方法鉴定结果一致。金名捺等^[8]利用水稻全基因组 9K SNP 芯片对栽培稻品种黄华占和野生稻 Y605 进行扫描,寻找两者之间的 SNP 位点,并将其开发成基于 HRM 技术的特异分子标记。利用这些标记对黄华占与野生稻 Y605 的 BC₃F₁ 和 BC₃F₂ 群体进行检测分析,发现它们都能准确区分亲本的纯合与杂合基因型。研究表明,SNP 标记方法检测种子纯度,克服了环境和人员因素的影响,能从 DNA 水平上将亲缘关系较近的和遗传关系复杂的异品种明确地辨别出,并且适合大量样本的检测,因此具有广阔的应用前景。

2.3 SNP 分子标记技术在其他方面的应用

目前 SNP 分子标记技术在农作物品种遗传图谱、数据库构建等方面的研究应用非常广泛,在小麦、油菜、大豆、甘蓝等作物中均有报道。高尚等^[9]用 90K SNP 基因芯片技术,对包含 188 个家系的小麦群体进行分析,构建小麦高密度遗传图谱;赵仁欣等^[10]通过 SNP 芯片分析 224 份国家甘蓝型油菜品种,用 60K SNP 芯片进行基因分型,筛选得到 5374 个 SNP 标记,且这些标记在油菜全基因组上分布均匀、多态性高、区分度好,用于构建甘蓝型油菜品种 DNA 指纹图谱;谭瑞娟等^[11]通过 50 个多态性 SNP 标记位点,研究分析不同的大豆品系,构建大豆基因组遗传图谱;李志远等^[12]利用 SNP 标记分析 59 个甘蓝品种,筛选出 417 个在染色体上均匀分布、多态性较好的 SNP 位点,作为构建 DNA 指纹图谱的核心标记,获得甘蓝品种 SNP 指纹图谱。遗传图谱的构建为鉴定分析农作物品种的真实性、特异性提供了依据。我国农作物品种 SNP 指纹数据库的构建正在进行中,玉米、水稻、小麦、棉花等农作物种子的数据库信息在不断完善中,油菜、番茄、辣椒等蔬菜种子的信息也在收集整理中。SNP 分子标记技术进行农作物种子质量检测的相关标准正在陆续制订与颁布,已经颁布的有 NY/T 2745-2015《水稻品种鉴定 SNP 标记法》。

3 展望

在分子生物技术迅猛发展的时代,分子标记技术推陈出新,SNP 标记作为新一代的标记方法,具有更多的技术特点,集合了 DNA 提取程序化、电泳分析自动化、数据整合标准化,与数据库信息比对,分

烟农系列小麦研究进展与展望

刘洁 于经川 王鹏 孙亮 孙妮娜 冯焯宏 殷岩

(山东省烟台市农业科学研究院,烟台 265500)

摘要: 总结分析了烟农系列小麦研究进展,共育成省级以上审(认)定品种23个,通过国家审定5次,省级审(认)定35次,获全国科学大会奖1项、国家科技进步二等奖2项、山东省科学大会奖3项、科技进步一等奖3项、科技进步二等奖4项。1982-2016年累计推广面积3969万 hm^2 ,烟农15、鲁麦7、鲁麦21的累计推广面积超过333.33万 hm^2 ,鲁麦14、烟农19的累计推广面积分别达到706.47万 hm^2 和1231.27万 hm^2 。先后创出水地和旱地全国高产纪录8次,创造的骨干亲本岫包、鲁麦13、鲁麦14被全国13省2市的158个育种单位用作亲本育成品种284个。对今后的育种方向提出了展望。

关键词: 小麦;品种;育种;种质

山东省烟台市农业科学研究院地处黄淮海片冬麦区,是北部晚熟冬麦区向黄淮冬麦区的过渡麦区^[1],兼具两大麦区的特征,因而育成品种在黄淮冬

基金项目: 国家重点研发计划项目(2017YFD0100600);国家小麦产业技术体系烟台综合试验站项目(CARS-3-2-23);山东省现代农业产业技术体系小麦产业创新团队建设项目(SDAIT-01-02)

通信作者: 殷岩

析速度更快、信息更全面、结果更可靠。随着 SNP 技术的研究与探索,检测技术和分析手段不断地改进与完善,特异性引物的开发与共享,假阳性、高成本等问题的解决,SNP 技术在种子质量检测的推广应用,将会发挥更大的技术优势,极大地提高检测工作效率,为保障农民用种安全,维护企业合法权益,确保种子市场健康有序提供强有力的技术支撑。

参考文献

- [1] 唐立群,肖层林,王伟平. SNP 分子标记的研究及其应用进展. 中国农学通报, 2012, 28 (12): 154-158
- [2] 李雪,田红丽,王凤格,赵久然,李云伏,王蕊,扬扬,易红梅. SSR 和 SNP 两种标记技术在玉米品种真实性鉴定中的比较分析. 分子植物育种, 2014, 12 (5): 1000-1004
- [3] 陆静姣,杨远柱,周斌,秦鹏,符星学,陈良碧. 基于 SNP 标记的南方籼型两系杂交水稻亲本遗传差异的分析. 杂交水稻, 2014, 29(5): 49-54
- [4] 陈广凤,田纪春. 基于 SNP 标记小麦自然群体遗传多样性及复合图谱的构建. 分子植物育种, 2015, 13 (7): 1441-1449
- [5] 吴明生,赵海艳,宋歌,律宝春. 利用 TaqMan-SNP 基因分型技术快

麦区和北部冬麦区均具有良好的适应性。位于山东半岛东部,东、北两面临海,37° 30' N, 121° 16' E, 海拔 17.6m, 大沽夹河、内夹河从东、西两侧流过,属湿润一半湿润气候,年平均相对湿度在 70% 以上,为山东省相对湿度的高值区,是白粉病、锈病等多种病害的高发地带和自然鉴定场所。特殊的生态环境及土壤类型、质地和肥力水平都有利于抗病、

速鉴别玉米杂交种与其亲本. 种子, 2015, 34 (1): 117-119

- [6] 匡孟,王延琴,周大云,马磊,方丹,徐双娇,杨伟华,魏守军,马峙英. 基于单拷贝 SNP 标记的棉花杂交种纯度高通量检测技术. 棉花学报, 2016, 28 (3): 227-233
- [7] 兰青阔,张桂华,王永,赵新,朱珠,崔兴华,郭永泽,程奕. 基于 SNP 标记的黄瓜杂交种纯度鉴定方法. 中国蔬菜, 2012 (6): 58-63
- [8] 金名捺,潘英华,丘式浚,严维,邓汉超,陈慧,梁云涛. 基于全基因组芯片开发水稻 HRM 特异分子标记. 植物遗传资源学报, 2018, 19 (6): 1055-1063
- [9] 高尚,莫洪君,石浩然,王智强,林宇,武方琨,邓梅,刘亚西,魏育明,郑有良. 利用 SNP 基因芯片技术进行小麦遗传图谱构建及重要农艺性状 QTL 分析. 应用与环境生物学报, 2016, 22 (1): 85-94
- [10] 赵仁欣,李森业,郭瑞星,曾新华,文静,马朝芝,沈金雄,涂金星,傅廷栋,易斌. 利用 SNP 芯片构建我国冬油菜参试品种 DNA 指纹图谱. 作物学报, 2018, 44 (7): 956-965
- [11] 谭瑞娟,文自翔,顾翠华,王德春,宋启建, PERRY Cregan, 邢小萍,李洪连. 大豆高密度 SNP 标记遗传图谱构建方法的比较. 河南农业大学学报, 2013, 47 (6): 671-676
- [12] 李志远,于海龙,方智远,杨丽梅,刘玉梅,庄木,吕红豪,张扬勇. 甘蓝 SNP 标记开发及主要品种的 DNA 指纹图谱构建. 中国农业科学, 2018, 51 (14): 2271-2287

(收稿日期: 2019-07-31)