

利用 SSR 标记分析青稞白粉病抗性遗传多样性

杨春葆,原红军*

(省部共建青稞和牦牛种质资源与遗传改良国家重点实验室/西藏自治区农牧科学院农业研究所,西藏 拉萨 850002)

摘要:本研究对 158 份青稞材料进行白粉病的抗性鉴定,经卡方检验, F_2 代的抗病与感病分离比符合孟德尔遗传定律。利用 SSR 标记评估了 158 份青稞的遗传多样性。选择的 100 个 SSR 标记中,20 个标记扩增良好且具有多态性,平均每个位点有 3.8 个等位变异,每个标记产生 5.8 个基因型,杂合度在 0~0.529 之间,20 个标记的多态性信息量 (poly-morphism information content, PIC) 平均值为 0.39。 PIC 值超过 0.5 的标记共 9 个,占有初步筛选标记的 9%,占所选 20 对标记的 45%。这表明青稞具有丰富的遗传多样性。经 SSR 标记聚类分析将材料分为 3 类,并将其与白粉病抗性相结合分析,发现一类抗病性较强的材料。聚类图显示了不同材料间的遗传距离或遗传相似程度,可为材料选择提供參考。

关键词:SSR 标记;青稞;遗传多样性;白粉病;抗病性

中图分类号:S565.1 文献标识码:A

Genetic Analysis of Powdery Mildew Resistance in Hulless Barley (*Hordeum vulgare* Linn. var. *nudum* Hook. F.) by SSR Markers

YANG Chun-bao, YUAN Hong-jun*

(Research Institute of Agriculture, Tibet Academy of Agriculture and Animal Husbandry Sciences/State Key Laboratory of Barley and Yak Germplasm Resources and Genetic Improvement, Tibet Lhasa 850002, China)

Abstract:In this study, we found segregation ratio of disease resistant and susceptible in accordance with Mendelian inheritance by the chi square test, with identification of resistance to powdery mildew for 158 hulless barley materials. SSR markers were used to evaluate genetic diversity of 158 Hulless barley materials. 20 specific-polymorphic SSR primers were selected from 100 SSR markers, with averaged 3.8 alleles per locus, 5.8 genotypes generated by each marker, heterozygosity between 0~0.529, average 0.39 poly-morphism information content (PIC) of 20 markers. There were 9 SSR markers with PIC more than 0.5, accounting for 9% of all initial screening marks, accounting for 45% of the 20 selected SSR primers. These showed that Hulless barley had rich genetic diversity. 158 Hulless barley materials were divided into three groups with the analysis of SSR cluster combined with powdery mildew resistance. And we found a class of materials with strong resistance. The clustering graph shows the genetic distance and genetic similarity between different materials, which can provide reference for selection of materials.

Key words:SSR markers; Hulless barley; Genetic diversity; Powdery mildew; Disease resistance

青稞 (*Hordeum vulgare* Linn. var. *nudum* Hook. F.) 属禾本科 (Poaceae) 大麦属 (*Hordeum*), 是大麦的变种,因其内外颖与颖果分离,籽粒裸露,故称裸大麦^[1]。青稞是一种很重要的高原谷类作物,在海拔 4500 m 以上的局部高海拔高寒地带,是唯一可以

正常成熟的作物^[2],是一种具有上千年历史的古老栽培作物,主要分布在我国青藏高原、北非高原、南美安地斯高原及俄罗斯的考克萨斯等山区^[3]。在国外,青稞主要作为一种饲料,我国藏族居民将其作为一种主食,青稞亦可作为酿酒原料和保健食品^[4-5]。在西藏、青海、四川省甘孜和阿坝藏族自治州、甘肃省甘南藏族自治州以及云南、贵州的部分地区均有青稞的分布^[6]。

白粉病是青稞生产上的常发性病害之一,是由布氏白粉菌大麦专化型 (*Blumeria graminis* f. sp. *Hordei* L.) 引起的真菌病害,其病原菌是专性的活体

收稿日期:2019-08-11
基金项目:西藏自然科学基金项目(XZ 2018 ZR G-45)
作者简介:杨春葆(1985-),男,助理研究员,主要从事青稞遗传育种研究,E-mail:361503453@qq.com,*为通讯作者:原红军(1981-),男,副研究员,主要从事青稞遗传育种研究,E-mail: yuanzhenbin@126.com。

寄生菌,属于囊菌纲白粉菌目。白粉病是制约青稞高产、优质、稳定发展的因素之一^[7]。选育抗病品种是防治青稞白粉病的最有效途径。国外很多学者已筛选出大量适宜特定生态环境的大麦抗白粉病种质材料,用于白粉病抗性育种、抗病基因的定位、抗病分子机理等方面的研究^[8]。我国学者先后利用田间发病条件鉴定了所收集的大麦品种的白粉病田间抗性,并筛选出一些抗病材料,用于大麦白粉病育种和抗性遗传分析,但尚未选育出能应用于生产的抗病品种^[9]。西藏的青稞抗病虫害基因工程还处于起步阶段,与玉米、水稻等其他作物基因工程抗病虫害育种相比,研究相对滞后,各方面仍需要深入研究^[10]。原红军等对西藏 330 份青稞材料白粉病抗性做了鉴定,并筛选出了 7 份抗白粉病材料^[11]。

SSR(simple sequence repeat,简单重复序列)也称微卫星(microsatellite),是一种由 2~5 个核苷酸为重复单位串联组成的长达几十个核苷酸的序列,是当今最常用的四大分子标记技术之一^[12],被广泛应用于油菜、玉米、大豆、水稻等作物的品质鉴定研究中^[13]。利用分子标记技术能加快对已知抗性基因的鉴定,加快培育抗病品种的进程,并可聚合不同的抗病基因,获得持久抗病性的品种。目前这方面研究成功的报道较少,因此需要不断地筛选新抗源,鉴定新的分子标记,用于大麦抗白粉病育种^[14]。SaghaiMaroof 等^[15]首先进行了大麦 SSR 标记的研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料及试剂 实验材料:158 份青稞材料,包括 gannongda7 与 zangqing13 等 2 个亲本,以及其 F₁ 代自交所得的 F₂ 分离群体(156 份材料)。试剂:液氮、琼脂糖、Tris、硼酸、EDTA、ddH₂O、酶、mix、HiDi 内标等。

1.1.2 实验器材 植物基因组 DNA 提取试剂盒、水浴锅、PCR 仪、各量程移液器、配对枪头、国产 96 孔反应板、大中小型台式离心机、电泳仪、凝胶成像仪、金属浴加热器、3730 测序仪等。

1.2 抗病性鉴定

对 F₂ 分离群体的 156 份青稞材料进行抗病性鉴定,鉴定按四级标准:免疫(R+)、高抗(R)、感病(S)、高感(S-)。以免疫与高抗为抗病,感病及高感为感病,统计 F₂ 代分离群体中抗病单株与感病单株株数,对抗感分离比进行 χ^2 检验。 χ^2 的计算公式: $\chi^2 = \sum(|O - E| - 0.5)^2 / E$ 。其中, O 为抗病

或感病单株株数的观察值, E 为抗病或感病单株株数的理论值。

1.3 植物 DNA 提取及鉴定

随机选取 8 个个体,各提取 2 份 DNA 以备引物筛选,其他个体提取一份。

1.4 SSR 标记分析

1.4.1 DNA 扩增及引物筛选 ①将提取并纯化好的 DNA 样品用不同的普通引物分别进行扩增。②将扩增好的 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳(2 μ l 样品 + 6 μ l 溴酚蓝),300 V 电压下 12 min,获取鉴定胶图。③根据胶图确定是否扩增出目的 DNA 片段,对引物进行 1 次筛选,准备 2 次扩增。

1.4.2 2 次扩增及 2 次筛选 用带荧光的接头引物和反向引物对 1 次扩增的产物进行 2 次扩增,扩增体系及条件与第 1 次相同;将上一步获得的 PCR 产物进行电泳鉴定,获取鉴定胶图;通过胶图确定模板浓度,加水稀释到电泳所需浓度。

1.4.3 毛细管电泳检测 (1)将 HiDi 与 500 bp 的内标按 130:1 混合,配成 mix。

(2)用国产 96 孔反应板分装 mix,每个孔中加入 10 μ l mix。

(3)对应着在 96 孔板中加入 0.5 μ l 样品模板,离心到 4000 r/min 即停。

(4)用金属浴加热器将混合板 95 $^{\circ}$ C 加热预变性 5 min,拿出后立即放入 -20 $^{\circ}$ C。

(5)冷却后拿出,4000 r/min 离心,解冻混匀。

(6)上 3730 测序仪进行毛细管电泳。

(7)获取结果并分析,筛选出多态性较好的位点。

1.5 统计分析

依据 SSR 扩增产物的具体片段大小构建基因型原始数据阵,用 Power Marker V3.25 软件进行后续分析。依据 SSR 扩增产物在毛细管电泳中呈现的大小,对扩增条带进行记录,分别以“1”和“0”表示同一大小谱带的有无,建立原始数据阵,用 NT-SYS-pc 2.10e 软件进行后续分析。

2 结果与分析

2.1 白粉病抗性鉴定

对青稞 F₂ 代分离群体的 156 份材料进行白粉病抗性鉴定,统计可得:3 株免疫,112 株高抗,37 株感病,4 株高感。即 115 株抗病,41 株感病,经卡方检验,符合 3:1 的分离比。即青稞白粉病的抗病与感病这一相对性状在 F₂ 代的分离比符合一对等位基因的遗传规律(表 1)。

表 1 抗病性鉴定结果

Table 1 Results of disease resistance identification

世代	鉴定株数	抗病株数	感病株数	分离比例		χ^2 检验
				实际比值	理论比值	
F ₂	156	115	41	2.8:1	3:1	0.076 9

2.2 基因组 DNA 提取

随机抽取一部分提取的 DNA 用 1 % 的琼脂糖凝胶电泳检测,结果显示,DNA 条带清晰整齐,泳道无明显拖尾现象,结果如图 1 所示,可用于后续的实验。

2.3 SSR 标记筛选

2.3.1 SSR 引物一次筛选结果 选用 100 对引物对其中提取的 8 个双份的样本(均为随机挑选,其中包括父母本)进行初步筛选,根据扩增出来的条带,选取条带单一且浓度较好的位点。共筛选出引物 34 对。部分胶图如图 2 所示。

2.3.2 加荧光 SSR 引物二次扩增结果 将一次筛选得到的 34 个位点,用相应荧光接头的引物进行二

次扩增。部分胶图如图 3 所示。

2.3.3 毛细管电泳结果 根据每对 SSR 引物以 158 份 DNA 为模板扩增产物的检测结果,挑选出扩增产物峰值高易辨识的 SSR 引物,并进行 SSR 标记位点的确定和判别。一对 SSR 引物在群体标记中,同时扩增出多个片段视为多个位点,即多个 SSR 标记;如果一个位点不表现为大小的变异,而只是有和无的差异,即不符合 SSR 标记为共显性标记的特征,则视为无效位点,在以后的统计中予以去除。若特异性高,多态性好,则位点可用,如图 4;若不同 DNA 模板扩增结果只有一种或两种片段大小,则引物的多态性不理想,如图 5。

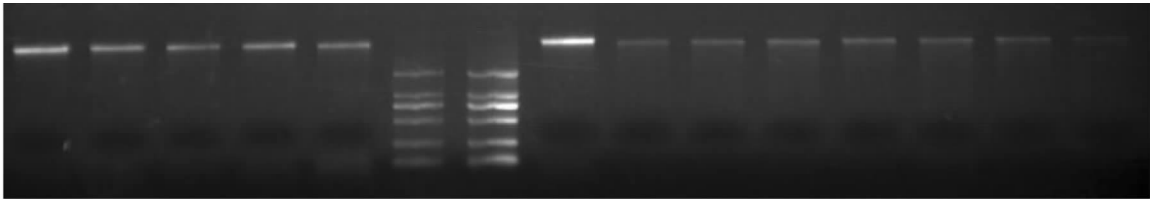


图 1 青稞基因组 DNA 琼脂糖凝胶电泳检测结果

Fig.1 Results of agarose gel electrophoresis detection of scorpion genomic DNA

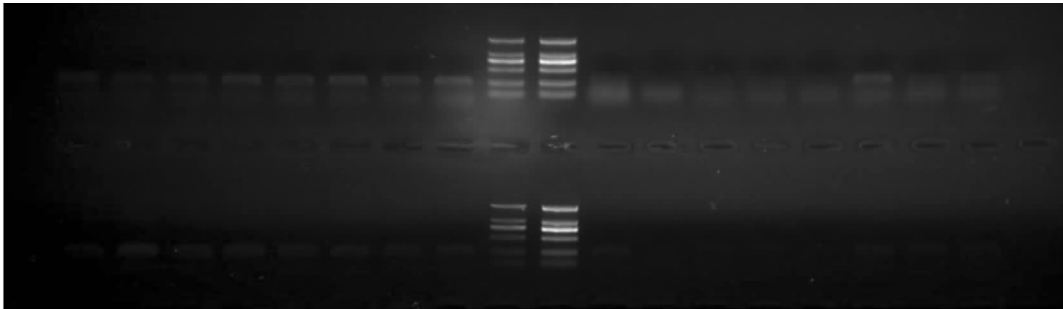


图 2 SSR 引物一次筛选条带情况

Fig.2 SSR primers for screening strips at one time

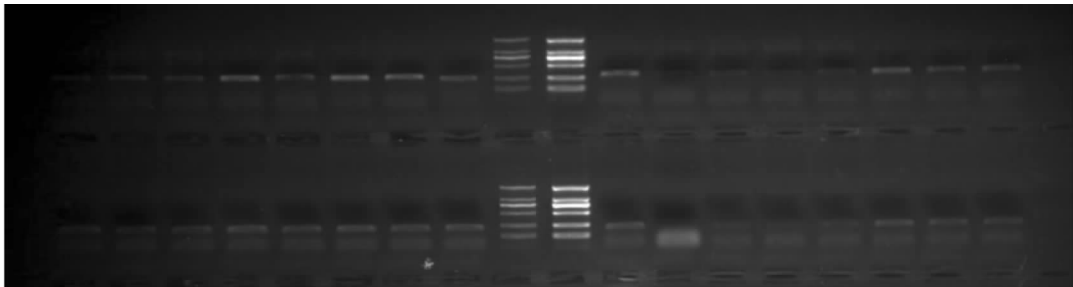


图 3 SSR 引物二次筛选条带情况

Fig.3 SSR primer secondary screening strips

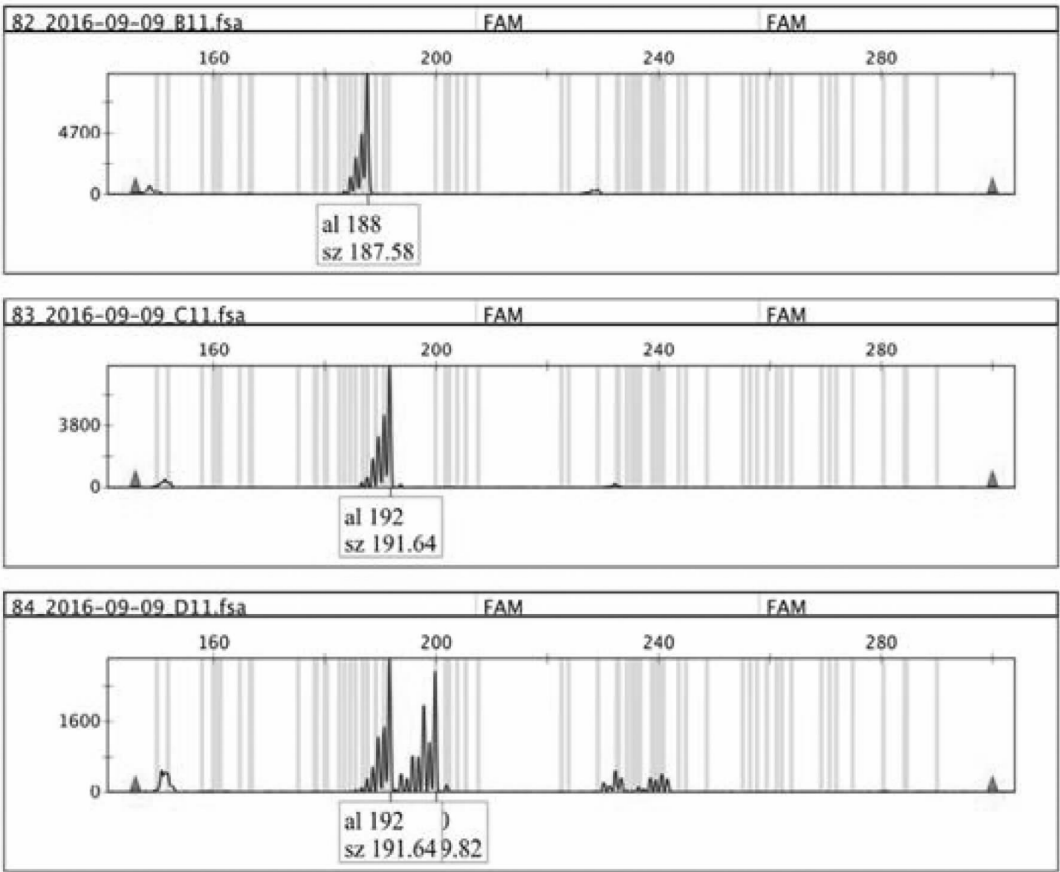


图 4 特异多态性 SSR 引物在 3 个不同材料中的标记结果

Fig. 4 Labeling results of specific polymorphic SSR primers in 3 different materials

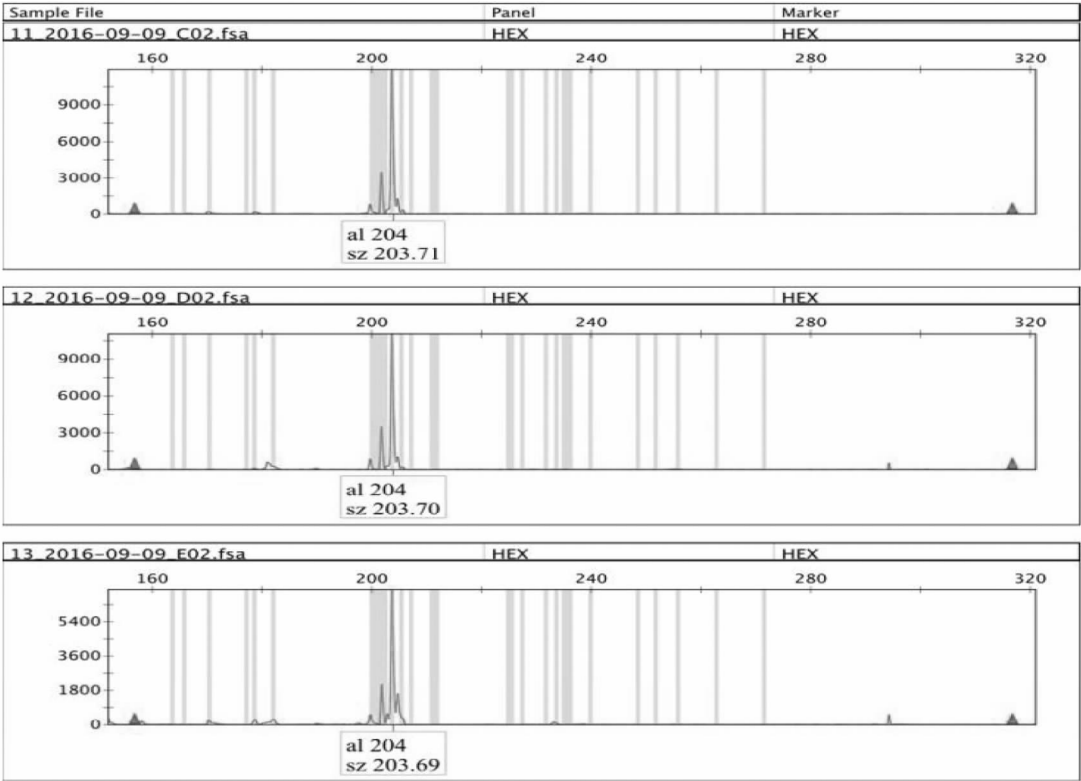


图 5 非多态性 SSR 引物在 3 个不同材料中的标记结果

Fig. 5 Labeling results of non-polymorphic SSR primers in 3 different materials

2.4 特异多态性引物的确定

根据以上方法,共筛选出了 20 对特异性高,多态性较好的引物,引物名称及正反向序列分别如表 2 所示。

表 2 20 对 SSR 引物的序列信息

Table 2 Sequence information of 20 pairs of SSR primers

引物名称	引物序列	等位变异大小 (bp)				亲本带型 (bp)	
						P1-GND7	P2-ZQ13
QK1	F:TCTGGTCATAGTTGGTGGCA	216	226	228		--	230
	R:CAGGTAAGTCACGGGAAGGT	230	234	238			
QK6	F:GCATCGATACTGGCGAACTT	229	234	237		229	239
	R:TCGACCAGCATCACTTTGTC	239					
QK14	F:CTTGTACCGTGCCACTGCTA	221	224	229		--	229
	R:TCGGGGATGAACTTTAGGA						
QK23	F:CCTGAGCTAGCAAAACGAGG	239	241	246		239	246
	R:ATACGGGGAAACAATCCACA	254					
QK41	F:AAGTGGCCTTGGGGTTATTC	230	232	234		234	230
	R:GCGAGCCACTTTACCAAGAG						
QK44	F:GCAGAGCGGAGAAGAAGAGA	144				144	144
	R:ATCCGTGTGGTGTGTGTTG						
QK45	F:TATGATTGCACGTCCGTTGT	181	189	191		195	181
	R:AGGTTTTGATGCCTTGTTTG	193	195	197	199		
QK52	F:CTCACTCACGTTCTTGCTCG	237	241	245		245	241
	R:CGTGCATCGAGTTTTTCATTG						
QK56	F:CTGCACACACACACCCTAGC	258	264	266		--	258
	R:CCCTACTTTGAGAAGAGGCG						
QK60	F:GCATTACATCATTCGGCCTT	258	260	266	268	--	274
	R:CGGAAAGATCTCTGCTTTCC	270	272	274	276		
QK61	F:GTCAAGCTTCGATCCTCTGC	252	255	258		255	255
	R:TGGAATAGGAAGGGTTCACG						
QK66	F:CATGACTTGCCTGATTGGTG	244	246	254	256	244	244
	R:ATTCATCGGTCGTTAGGTGC						
QK71	F:TCAAATTCAGTTGCTGCTGG	161	165	169		165	169
	R:CTCCTACCTATCTCGGCGTG						
QK75	F:CCAATAGTCCTTGCGGATGT	222				--	222
	R:TCAAGTCCTCTGCAAAACACG						
QK82	F:CCAGCAATAACAACGTGTGG	240	244	246		240	246
	R:TGTCTTTTATTTCCGGAGCG						
QK83	F:GCAAGGTATCTCTGTATTTTG	170	174	182		182	170
	R:TGGCATCTACAATCTAAAACA						
QK87	F:ACGCACAGATACGTACACGC	234	238			238	234
	R:GCCCCCTCCTAGAACACAACA						
QK90	F:GGAACTAATGCTTCGGTCCA	208	213	215	216	208	213
	R:TGGTGCAAGTGAGCACCTAC	217	218				
QK91	F:TTCATCATAACAGCAATGG	184	186	190	192	184	190
	R:TTCGTCAAGGCTATGTAGG						
QK97	F:CACTAGGCACCAATGACTG	181	183	186	189	186	183
	R:ATCGAAAATCTAGCTTTGG	191					

2.5 群体遗传多样性分析

利用筛选出的有多态性的 20 对引物对全部 158 个样品进行 2 次扩增,并使用毛细管 3730xl 检测(表 3)。Allele 1 表示该样品该位点的第 1 个片段,Allele 2 表示第 2 个片段。如表 4 所示:有 2 对引物无多态性,即 QK44 与 QK75;其他位点的多态性为 2~8 个;TRF2 分离群体与亲本带型完全一致的只有 QK87,推测该标记可能与青稞对白粉病的抗性相关。

通过 Power Marker V3.25 软件分析 20 对 SSR 引物在 158 份青稞材料的毛细管电泳结果,得到各对引物的 *PIC* 值(表 4)。20 个位点共有 76 个等位变异,平均每个位点有 3.8 个等位变异;产生的基因型数量为 116 个,平均每个标记产生 5.8 个基因型;杂合度在 0~0.529 之间;20 个标记的多态性信息量 *PIC* 平均值为 0.39,引物 QK90 标记的多态性信息量最大,*PIC* 值达 0.68,引物 QK44 与 QK75 所产生的标记多态性信息量最小,*PIC* 值为 0.00。*PIC*

值超过 0.5 的标记共 9 个,占有初步筛选标记的 9%,占所选 20 对标记的 45%。

使用 NTSYS-pc 2.10e 软件对该群体的基因型数据进行遗传相似系数分析及聚类分析(图 6)。具体表现为:F2 代分离群体各个体间遗传相似系数范围在 0.526~0.974 之间,两两之间遗传相似系数大于 90%的占全部数据的 2.32%;F2 分离群体的各个个体与两亲本间的遗传相似系数范围为 0.500~0.842;两亲本间的相似系数为 0.632。由 SSR 聚类分析图可知,包括两亲本以及 F2 代分离群体的两个个体在内的 4 份材料与其它材料有较大的遗传距离,分离在其它材料之外,且抗病和感病材料数的比值为 1:1。剩余的 154 份材料可分为 2 个大类。其中一类包含 62 份材料,80.6%的材料为抗病材料,19.4%的为感病材料;另一类包含 92 份材料,其中 66.3%为抗病材料,3.3%为免疫材料,26.1%为感病材料,4.3%为高感材料。

表 3 引物 QK14 毛细管电泳部分结果

Table 3 Partial results of capillary electrophoresis of primer QK14

Sample File	Sample	NzPanel	Marker	Dye	Allele 1	Allele 2	Size 1	Size 2	Height 1	Height 2
QK14_001_D08.fsa	60	FAM	FAM	B	224		225.55		16537	
QK14_002_E07.fsa	53	FAM	FAM	B	224		224.47		32656	
QK14_003_B07.fsa	50	FAM	FAM	B	224	229	224.5	228.4	18009	16886
QK14_004_C07.fsa	51	FAM	FAM	B	221		220.46		32297	
QK14_005_E04.fsa	29	FAM	FAM	B	224		225.56		5657	
QK14_006_C03.fsa	19	FAM	FAM	B	224		224.41		7826	
QK14_007_H01.fsa	8	FAM	FAM	B	229		228.75		15090	
QK14_008_H02.fsa	16	FAM	FAM	B	221	229	220.62	228.58	12680	11001
QK14_009_A04.fsa	25	FAM	FAM	B	221	229	220.58	228.46	5147	4005
QK14_010_H04.fsa	32	FAM	FAM	B	224		225.75		2309	
QK14_012_F01.fsa	6	FAM	FAM	B	224		224.59		9429	
QK14_013_E12.fsa	93	FAM	FAM	B	221	229	220.54	228.51	17457	17194
QK14_014_A02.fsa	9	FAM	FAM	B	229		228.56		5809	
QK14_015_A01.fsa	1	FAM	FAM	B	224		224.64		19763	
QK14_016_B02.fsa	10	FAM	FAM	B	224	229	224.58	228.53	5562	5417
QK14_017_F04.fsa	30	FAM	FAM	B	229		228.43		32567	
QK14_018_D04.fsa	28	FAM	FAM	B						
QK14_019_D07.fsa	52	FAM	FAM	B	224	229	224.47	228.38	19099	18065
QK14_020_A07.fsa	49	FAM	FAM	B	224	229	224.51	228.42	15719	14291
QK14_021_H06.fsa	48	FAM	FAM	B	221		220.51		33580	
QK14_022_E06.fsa	45	FAM	FAM	B	221		220.52		32505	
QK14_023_B08.fsa	58	FAM	FAM	B	221	229	220.6	228.53	5261	4207
QK14_024_C08.fsa	59	FAM	FAM	B	221	229	220.48	228.44	14451	12661
QK14_025_D06.fsa	44	FAM	FAM	B	221		220.5		31041	
QK14_026_A08.fsa	57	FAM	FAM	B	221	229	220.56	228.47	8830	7545
QK14_027_A06.fsa	41	FAM	FAM	B	229		228.47		27368	
QK14_028_C07.fsa	55	FAM	FAM	B	221	229	220.57	228.45	18633	16464
QK14_029_H05.fsa	40	FAM	FAM	B	224		224.57		7444	
QK14_030_C05.fsa	39	FAM	FAM	B	221	229	220.51	228.43	6922	8073
QK14_031_H03.fsa	24	FAM	FAM	B	221	229	220.61	228.54	8208	7572
QK14_032_D12.fsa	92	FAM	FAM	B	229		228.37		32501	
QK14_033_B11.fsa	82	FAM	FAM	B	221		220.52		19386	
QK14_034_F11.fsa	86	FAM	FAM	B	229		228.55		25350	
QK14_035_H10.fsa	80	FAM	FAM	B	221	229	220.65	228.6	20597	17511
QK14_036_D10.fsa	76	FAM	FAM	B	221	229	220.58	228.46	17671	16938
QK14_037_H09.fsa	72	FAM	FAM	B	224	229	224.62	228.58	19150	17129
QK14_038_E11.fsa	85	FAM	FAM	B	229		228.46		28353	
QK14_039_C02.fsa	15	FAM	FAM	B	221	229	220.68	228.59	8409	8551
QK14_040_H07.fsa	56	FAM	FAM	B	229		228.41		32650	

表 4 158 份青稞材料在 20 个 SSR 标记的多态性信息
Table 4 Polymorphism information of 158 sapphire materials in 20 SSR markers

标记	主等位变异频率	基因型数	等位变异数	基因多样性	杂合度	多态性信息量
QK1	0.496774	11	6	0.562 081	0.458 065	0.467 177
QK6	0.598639	9	4	0.568 559	0.360 544	0.513 500
QK14	0.461290	5	3	0.635 734	0.406 452	0.561 645
QK23	0.759494	5	4	0.371 174	0.177 215	0.311 182
QK41	0.515924	4	3	0.505 578	0.433 121	0.384 053
QK44	1.000000	1	1	0.000 000	0.000 000	0.000 000
QK45	0.516026	10	7	0.623 993	0.455 128	0.560 745
QK52	0.535714	5	3	0.601 556	0.528 571	0.532 165
QK56	0.987097	3	3	0.025 557	0.000 000	0.025 394
QK60	0.417219	15	8	0.701 921	0.463 576	0.651 855
QK61	0.473333	5	3	0.631 578	0.466 667	0.558 039
QK66	0.482993	7	4	0.634 643	0.442 177	0.564 782
QK71	0.974684	3	3	0.049 591	0.000 000	0.048 830
QK75	1.000000	1	1	0.000 000	0.000 000	0.000 000
QK82	0.513072	4	3	0.505 938	0.464 052	0.384 395
QK83	0.509554	4	3	0.505 984	0.496 815	0.384 259
QK87	0.566225	3	2	0.491 228	0.483 444	0.370 576
QK90	0.351974	9	6	0.724 745	0.506 579	0.675 667
QK91	0.490385	6	4	0.625 062	0.455 128	0.553 325
QK97	0.794304	6	5	0.334 101	0.208 861	0.289 953
总共		116	76			
平均	0.622235	5.8	3.8	0.454 951	0.340 320	0.391 877

表 5 4 个不同类群的 20 个 SSR 标记的多态性信息
Table 5 Polymorphism information of 20 SSR markers in 4 different taxa

标记	抗病群体	主等位变异频率	基因型数	等位变异数	基因多样性	杂合度	多态性信息量
QK1	S -	0.375 000	4	3	0.656 250	0.250 000	0.581 543
	S	0.662 162	7	5	0.499 270	0.405 405	0.444 289
	R +	0.666 667	2	2	0.444 444	0.000 000	0.345 679
	R	0.509 091	9	6	0.549 298	0.500 000	0.449 594
QK6	S -	0.375 000	2	3	0.656 250	0.750 000	0.581 543
	S	0.594 595	5	4	0.573 776	0.297 297	0.519 744
	R +	1.000 000	1	1	0.000 000	0.000 000	0.000 000
	R	0.613 861	6	4	0.549 897	0.376 238	0.492 072
QK14	S -	0.375 000	4	3	0.656 250	0.250 000	0.581 543
	S	0.486 486	5	3	0.630 022	0.378 378	0.558 421
	R +	0.833 333	2	2	0.277 778	0.333 333	0.239 198

续表 5 Continued table 5

标记	抗病群体	主等位变异频率	基因型数	等位变异数	基因多样性	杂合度	多态性信息量
QK23	R	0.459 091	5	3	0.635 413	0.427 273	0.560 945
	S -	0.875 000	2	2	0.218 750	0.250 000	0.194 824
	S	0.756 757	3	2	0.368 152	0.162 162	0.300 384
	R +	1.000 000	1	1	0.000 000	0.000 000	0.000 000
QK41	R	0.763 393	3	2	0.361 248	0.187 500	0.295 998
	S -	0.625 000	2	2	0.468 750	0.750 000	0.358 887
	S	0.554 054	3	2	0.494 156	0.351 351	0.372 061
	R +	1.000 000	1	1	0.000 000	0.000 000	0.000 000
QK44	R	0.513 514	3	2	0.499 635	0.468 468	0.374 817
	S -	1.000 000	1	1	0.000 000	0.000 000	0.000 000
	S	1.000 000	1	1	0.000 000	0.000 000	0.000 000
	R +	1.000 000	1	1	0.000 000	0.000 000	0.000 000
QK45	R	1.000 000	1	1	0.000 000	0.000 000	0.000 000
	S -	0.625 000	3	3	0.531 250	0.250 000	0.468 262
	S	0.675 676	7	5	0.497 443	0.432 432	0.454 478
	R +	0.666 667	2	2	0.444 444	0.000 000	0.345 679
QK52	R	0.454 545	8	6	0.647 893	0.490 909	0.579 533
	S -	0.625 000	3	3	0.531 250	0.750 000	0.468 262
	S	0.514 286	5	3	0.615 918	0.457 143	0.545 891
	R +	0.666 667	2	2	0.444 444	0.666 667	0.345 679
QK56	R	0.536 458	5	3	0.600 857	0.552 083	0.531 406
	S -	1.000 000	1	1	0.000 000	0.000 000	0.000 000
	S	1.000 000	1	1	0.000 000	0.000 000	0.000 000
	R +	1.000 000	1	1	0.000 000	0.000 000	0.000 000
QK60	R	0.990 991	2	2	0.017 856	0.000 000	0.017 696
	S -	0.625 000	3	3	0.531 250	0.250 000	0.468 262
	S	0.414 286	10	6	0.711 429	0.542 857	0.664 106
	R +	0.666 667	2	2	0.444 444	0.000 000	0.345 679
QK61	R	0.421 296	12	7	0.688 786	0.462 963	0.633 586
	S -	0.875 000	2	2	0.218 750	0.250 000	0.194 824
	S	0.485 714	5	3	0.631 429	0.514 286	0.560 148
	R +	0.666 667	2	2	0.444 444	0.000 000	0.345 679
QK66	R	0.448 113	5	3	0.638 795	0.481 132	0.563 983
	S -	0.625 000	3	2	0.468 750	0.250 000	0.358 887
	S	0.416 667	6	4	0.657 407	0.277 778	0.588 613
	R +	0.500 000	1	2	0.500 000	1.000 000	0.375 000
QK71	R	0.519 608	6	3	0.612 889	0.500 000	0.543 188
	S -	1.000 000	1	1	0.000 000	0.000 000	0.000 000

续表 5 Continued table 5

标记	抗病群体	主等位变异频率	基因型数	等位变异数	基因多样性	杂合度	多态性信息量
QK75	S	0.945 946	2	2	0.102 264	0.000 000	0.097 035
	R +	1.000 000	1	1	0.000 000	0.000 000	0.000 000
	R	1.000 000	1	1	0.000 000	0.000 000	0.000 000
	S -	1.000 000	1	1	0.000 000	0.000 000	0.000 000
	S	1.000 000	1	1	0.000 000	0.000 000	0.000 000
QK82	R +	1.000 000	1	1	0.000 000	0.000 000	0.000 000
	R	1.000 000	1	1	0.000 000	0.000 000	0.000 000
	S -	0.750 000	2	2	0.375 000	0.000 000	0.304 688
	S	0.541 667	3	2	0.496 528	0.361 111	0.373 258
	R +	0.500 000	1	2	0.500 000	1.000 000	0.375 000
QK83	R	0.523 148	3	2	0.498 928	0.509 259	0.374 464
	S -	0.625 000	3	2	0.468 750	0.250 000	0.358 887
	S	0.567 568	3	2	0.490 869	0.486 486	0.370 393
	R +	0.500 000	1	2	0.500 000	1.000 000	0.375 000
	R	0.540 541	3	2	0.496 713	0.504 505	0.373 351
QK87	S -	0.500 000	3	2	0.500 000	0.500 000	0.375 000
	S	0.529 412	3	2	0.498 270	0.470 588	0.374 133
	R +	0.666 667	2	2	0.444 444	0.666 667	0.345 679
	R	0.578 704	3	2	0.487 611	0.490 741	0.368 729
	S -	0.375 000	4	3	0.656 250	0.250 000	0.581 543
QK90	S	0.385 714	6	4	0.706 531	0.571 429	0.653 434
	R +	0.333 333	2	4	0.722 222	1.000 000	0.671 296
	R	0.379 630	6	4	0.709 405	0.490 741	0.656 738
	S -	0.500 000	3	3	0.593 750	0.250 000	0.511 230
	S	0.500 000	5	3	0.611 111	0.388 889	0.535 494
QK91	R +	0.500 000	1	2	0.500 000	1.000 000	0.375 000
	R	0.490 991	5	3	0.621 987	0.477 477	0.548 501
	S -	0.500 000	3	2	0.500 000	0.500 000	0.375 000
	S	0.783 784	4	3	0.349 160	0.216 216	0.304 234
	R +	1.000 000	1	1	0.000 000	0.000 000	0.000 000
QK97	R	0.816 964	3	2	0.299 067	0.205 357	0.254 347
	S -		50	44			
	S		85	58			
	R +		28	34			
	R		90	59			
平均	S -	0.662 500	2.5	2.2	0.401 563	0.287 500	0.338 159
	S	0.640 739	4.25	2.9	0.446 687	0.315 691	0.385 806
	R +	0.758 333	1.4	1.7	0.283 333	0.333 333	0.224 228
	R	0.627 997	4.5	2.95	0.445 814	0.356 232	0.380 947

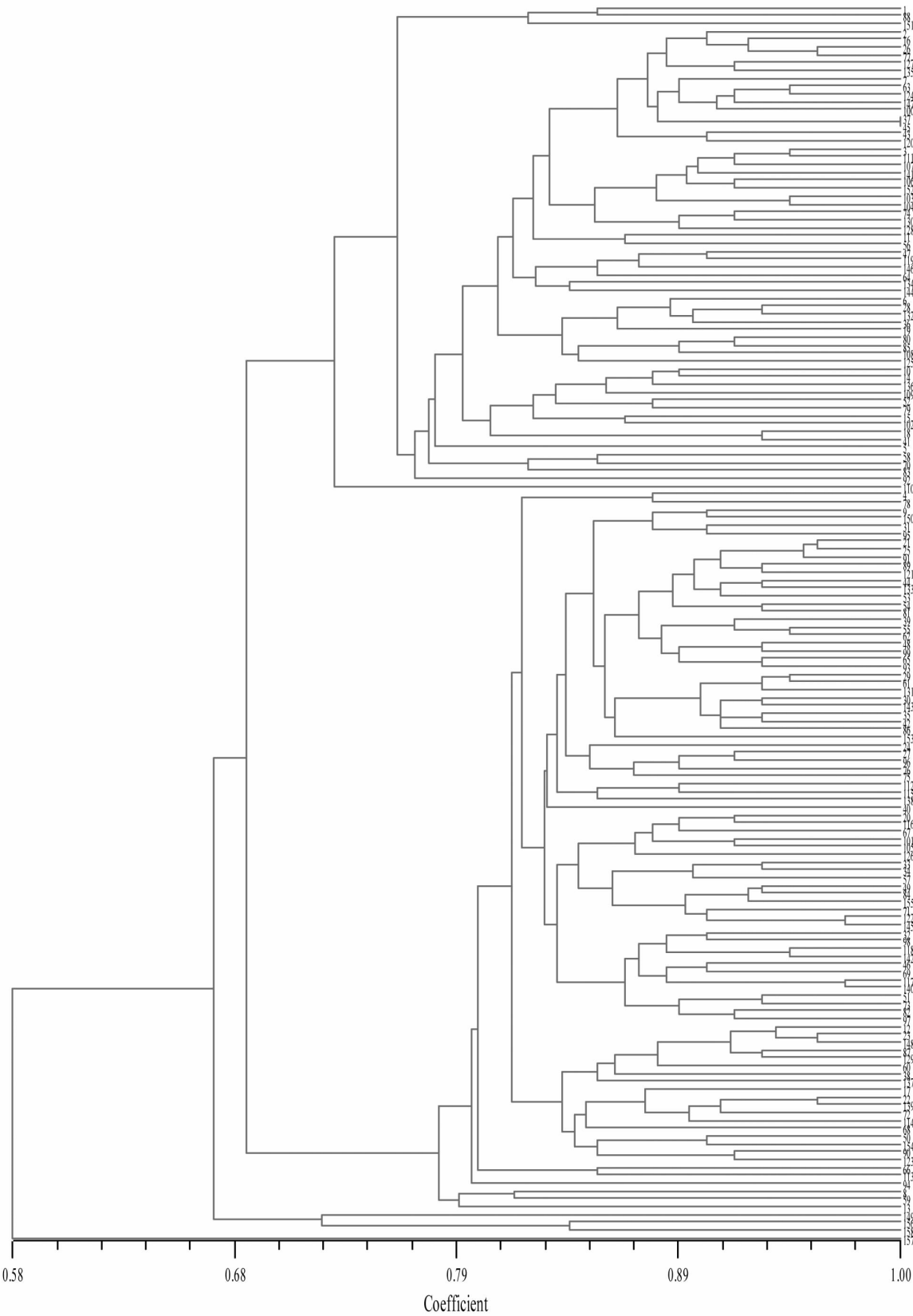


图 6 聚类分析结果

Fig. 6 Cluster analysis results

3 讨论与结论

本研究针对青稞对白粉病的抗性,利用抗病差异较大的 2 个亲本构建 F_2 代群体的抗病与感病材料的分离比符合孟德尔遗传定律(表 1),表明青稞对白粉病的抗性可能受到一对主效基因的控制,属于质量性状,这与前人研究小麦白粉病的抗性结果一致^[16]。

通过表型分析方法往往不能鉴定与目标抗病基因连锁的其它抗病基因,分子标记技术可以鉴定出与标记紧密连锁或共分离的抗病基因,弥补表型分析方法的不足,为快速、准确地鉴定抗病基因提供了有效的工具^[17-18]。本研究利用筛选出的 20 对具有特异多态性的 SSR 标记对 158 份双亲以及其 F_2 代分离群体材料进行扩增,并利用毛细管电泳技术得到扩增产物的具体信息从而构建群体的 SSR 标记基因型数据阵。由于整个群体来源于相同亲本,遗传多样性分析发现群体的相似系数普遍较高。这表明筛选出的 SSR 引物具有一定的代表性,可为之后青稞的资源多态性及抗病性的鉴定提供一定的参考。

参考文献:

[1]李涛,赫晓岚. 20 份青稞的农艺性状鉴定及 SSR 标记分析[J]. 农业科技与信息,2016(25):112-115.
[2]吕远平,熊莱君,贾利蓉,等. 青稞特性及在食品中的应用[J]. 食品科学,2005,26(7):266-270.
[3]曾兴权,王玉林,徐齐君,等. 利用 SSR 引物分析西藏青稞种质资源的遗传多样性[J]. 麦类作物学报,2013,33(2):260-267.
[4]江春艳,严冬,谭进,等. 青稞的研究进展及应用现状[J]. 西藏科技,2010(2):14-16.

[5]苟安春,李良. 青稞产品开发大有可为[J]. 大麦科学,2004(4):40-44.
[6]臧靖巍,阚建全,陈宗道,等. 青稞的成分研究及其应用现状[J]. 中国食品添加剂,2004(4):43-46.
[7]杨向红,刘猛道,字尚永,等. 国家大麦区试品种白粉病抗性鉴定评价[J]. 大麦与谷类科学,2015(4):44-46.
[8]朱靖环,杨建明,汪军妹,等. 大麦抗白粉病研究进展[J]. 大麦与谷类科学,2006(4):41-45.
[9]雷雪萍. 大麦品种白粉病抗病性鉴定研究进展[J]. 现代农业科技,2016(21):105-106.
[10]李杨. 青稞主要病虫害综合防治研究进展与发展方向[J]. 现代农业科技,2016(1):179,181.
[11]原红军. 西藏青稞种质资源材料白粉病抗性鉴定[J]. 大麦与谷类科学,2014(4):8-14.
[12]杨菁,迟德钊,吴昆仑,等. 青海省栽培青稞 SSR 标记遗传多样性研究[J]. 安徽农业科学,2010,38(8):4307-4309.
[13]王娟娟,赵明,韩雨威,等. 微卫星 DNA 标记开发技术进展及其在经济植物研究中的应用[J]. 生命科学研究,2016,20(3):260-266.
[14]朱靖环,华为,尚毅,等. 大麦抗白粉病基因分子标记应用研究进展[J]. 麦类作物学报,2014,34(6):758-764.
[15]SAGHAI MAROOF M A, BIYASHEV R M, YANG G P, et al. Extraordinarily polymorphic microsatellite DNA in barley: species diversity, chromosomal locations, and population dynamics[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences,1994,91(12):5466-5470.
[16]刘联正,李华,杨睿,等. 小麦抗白粉病基因 SSR 标记定位[J]. 西北植物学报,2012,32(7):1322-1327.
[17]GRANER A, JAHOOOR A, SCHONDELMAIER J, et al. Construction of an RFLP map of barley[J]. Theoretical and Applied Genetics,1991,83(2):250-256.
[18]RAMSAY L, MACAULAY M, DEGLI IVANISSEVICH S, et al. A simple sequence repeat-based linkage map of barley[J]. Genetics,2000,156(4):1997-2005.