

利用 AhMITE 分子标记对花生杂交 F<sub>1</sub> 代的真伪鉴定徐彪<sup>1,2</sup>, 李玉发<sup>2</sup>, 牛海龙<sup>2</sup>, 李伟堂<sup>2</sup>, 刘红欣<sup>2</sup>, 王伟<sup>2</sup>, 吴松权<sup>1</sup>, 何中国<sup>2\*</sup>

(1. 延边大学农学院, 吉林延吉 133000; 2. 吉林省农业科学院, 吉林公主岭 136110)

**摘要** [目的]提高花生育种效率。[方法]从 10 对 AhMITE 引物中筛选出对杂交亲本具有差异条带的标记引物, 分别对 10 个花生杂交组合 197 个 F<sub>1</sub> 代单株进行真伪杂种鉴定。[结果]根据 PCR 扩增的父母本带型, 共鉴定出 75 个真杂种单株, 真杂种比例为 38.02%。[结论]利用 AhMITE 分子标记可以快速、准确地对花生杂交 F<sub>1</sub> 代进行真伪鉴定, 为进一步使用 AhMITE 分子标记技术对吉林省花生新品种选育及花生种质资源遗传多样性分析提供技术支撑。

**关键词** 花生; F<sub>1</sub> 真伪鉴定; AhMITE 标记

中图分类号 S565.2 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2022)11-0094-04

doi:10.3969/j.issn.0517-6611.2022.11.024

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Identification of F<sub>1</sub> Generation Peanut Hybrids Using AhMITE Molecular MarkersXU Biao<sup>1,2</sup>, LI Yu-fa<sup>2</sup>, NIU Hai-long<sup>2</sup> et al (1. Agricultural College of Yanbian University, Yanji, Jilin 133000; 2. Jilin Academy of Agricultural Sciences, Gongzhuling, Jilin 136110)

**Abstract** [Objective] In order to improve the efficiency of flower breeding. [Method] Screened from 10 pairs of AhMITE primers for the marker primers with different bands in the hybrid parents, 197 F<sub>1</sub> single plants of 10 peanut cross combinations were used to identify the true and false hybrids. [Result] According to the parental band type amplified by PCR, a total of 75 true hybrid single plants were identified, and the true hybrid ratio was 38.02%. [Conclusion] The AhMITE molecular marker can be used to quickly and accurately identify the authenticity of the peanut hybrid F<sub>1</sub> generation. It is expected to provide technical support for the further use of the AhMITE molecular marker technology in the selection of new peanut varieties in Jilin Province and the analysis of the genetic diversity of peanut germplasm resources.

**Key words** Peanut; F<sub>1</sub> authenticity test; AhMITE mark

栽培花生 (*Arachis hypogaea* Linn.) 是世界上种植最广泛的食用豆类之一, 因其高蛋白质与不饱和油含量而受到重视<sup>[1]</sup>。杂交育种是花生新品种选育的主要途径, 然而在花生去雄过程中母本的 8 个雄蕊清除不彻底或不及时, 经常会导致 F<sub>1</sub> 出现假杂种<sup>[2]</sup>。传统表型鉴定花生真伪杂种的方法, 对于父母本表型差异较小的杂种很难辨认, 而通过分子标记技术鉴定花生 F<sub>1</sub> 代真伪杂种极大地提高了鉴别准确性。

微型反向重复转座子 (miniature inverted repeat transposable element, MITE) 是由 Bureau 等<sup>[3]</sup> 最先在玉米中发现并命名的, 且大多数分布于真核组织中。MITE 通常在植物基因组中扩增, 像 DNA 转座子一样, 拥有 TIR 和 TSD, 但不编码转座酶<sup>[4]</sup>。MITE 标记技术扩增结果用琼脂糖凝胶即可鉴定, 相比聚丙烯酰胺凝胶鉴定, 操作简单方便, 在玉米、水稻等植物上得到有效应用<sup>[5-6]</sup>。

有关 AhMITE 在花生上的应用, Patel 等<sup>[7]</sup> 利用 MITE 标记将 2 种含有插入的突变体与正常油酸花生品种和天然存在的高油酸突变体区分开。Gayathri 等<sup>[8]</sup> 从 33 个不同基因型的花生全基因组重测序数据 (WGRS) 中鉴定出 465 个已报道的标记, 共获得 2 957 个新的 AhMITE1 标记。Kolekar 等<sup>[9]</sup> 使用 MITE 标记对锈病抗性进行了验证。王辉等<sup>[10]</sup> 通过 AhMITE 分子标记技术对 115 份花生材料进行 DNA 多态性及聚类分析。以上结果表明, MITE 可以广泛地应用于花

生育种, 为花生新品种选育及优异种质创制奠定基础。目前关于利用 AhMITE 转座子分子标记技术对花生进行真伪鉴定的报道很少, 王洁等<sup>[11]</sup> 利用 7 对转座子引物对 166 个 F<sub>1</sub> 单株进行鉴定, 真杂种比率为 47.59%。尹亮等<sup>[12]</sup> 建立了使用杂交种子子叶 DNA 并结合 AhMITE 技术对 F<sub>1</sub> 代杂种进行真伪鉴定技术的研究。笔者利用 10 对多态性 AhMITE 引物对 10 个花生杂交组合进行 F<sub>1</sub> 代真伪杂种鉴定, 旨在为吉林省选育花生新品种和种质创新提供技术支撑, 同时为今后使用 AhMITE 分子标记技术进行遗传多样性分析及遗传连锁图谱构建提供前期基础。

## 1 材料与方法

**1.1 试验材料** 共选用 10 个花生杂交组合, 共 14 份花生 F<sub>1</sub> 代亲本材料 (表 1)。亲本及 F<sub>1</sub> 代均于 2021 年 5 月 7 日种植于吉林省农业科学院花生育种研究团队杂交池。

**1.2 基因组 DNA 提取及检测** 采用 TIANGEN 公司 DNasecure 新型植物基因组 DNA 提取试剂盒的方法, 提取花生基因组 DNA, 使用超微量分光光度计 (Nano Drop 2000) 和琼脂糖电泳检测 DNA 质量和浓度, 将总 DNA 稀释为 20 ng/μL, 置于 -20 °C 保存备用。

**1.3 AhMITE 标记引物筛选** 从文献 [13] 中选取 10 对 AhMITE 引物 (表 2), 由北京鼎国昌盛生物技术有限公司合成。利用这 10 对 AhMITE 引物对亲本进行多态性分析, 选出条带清晰、稳定、有明显差异的标记用于 F<sub>1</sub> 代杂种鉴定。

**1.4 PCR 扩增程序及扩增产物检测** PCR 反应体系 (10 μL): Taq PCR Master Mix 5 μL, AhMITE 正向引物 (15 μmol/L) 1 μL, AhMITE 反向引物 (15 μmol/L) 1 μL, DNA 模板 (20 ng/μL) 1 μL, 其余用 ddH<sub>2</sub>O 补足。PCR 反应程序:

**基金项目** 吉林省农业科技创新工程人才基金-研究生基金 (C02103506); 吉林省农业农村厅-现代农业产业技术示范推广 (202106)。

**作者简介** 徐彪 (1996—), 男, 黑龙江齐齐哈尔人, 硕士研究生, 研究方向: 作物遗传育种。\* 通信作者, 研究员, 硕士生导师, 从事花生遗传育种研究。

**收稿日期** 2021-08-03; **修回日期** 2021-09-02

95 °C 预变性 3 min; 95 °C 变性 30 s, 55~58 °C 退火 40 s, 72 °C 延伸 30 s, 30 个循环; 72 °C 延伸 7 min, 4 °C 保存。PCR 产物

使用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳进行检测, 添加 0.8 μL Gold View I 型核酸染色剂在凝胶分子成像仪器上成像保存。

表 1 供试材料及鉴定引物

Table 1 Test materials and identification primers

组合编号 Combination No.	母本代号 Maternal code	父本代号 Paternal code	F <sub>1</sub> 种子粒数 F <sub>1</sub> seed number	真杂种个体数 Number of true hybrids	真杂种比例 True hybrid ratio//%	鉴定引物 Identification primers
1	2017-116	2018-31	20	5	25.00	AhTE0544
2	2020-46	2014-26	23	9	39.13	AhTE0577
3	吉花 9 号	2020-48	22	10	45.45	AhTE0577
4	2019-33	2020-45	18	7	38.89	AhTE0544
5	2019-33	2020-48	19	9	47.37	AhTE0544
6	吉花 50	2020-47	17	7	41.18	AhTE0544
7	吉花 50	2020-48	18	8	44.44	AhTE0544
8	2017-116	2019-75	24	9	37.50	AhTE0544
9	2017-116	2019-33	16	5	31.25	AhTE0577
10	2019-67	2019-36	20	6	30.00	AhTE0544
合计 Total			197	75	38.02	

表 2 AhMITE 引物序列

Table 2 AhMITE primer sequence

编号 No.	引物 Primers	正向引物序列(5'—3') Forward primer sequence(5'—3')	反向引物序列(5'—3') Reverse primer sequence(5'—3')
1	AhTE0544	TTGTTTTTGTAGAAAGAGGCGG	TTTTTGCCATTCATACTTTTTGG
2	AhTE0577	GAGTTGGCTCTGTGATTTGTGA	GCAAGGTGTATTAATGAAACCAA
3	AhTE0180	GAAAGAATCCGTGGGATATTCA	TTCACAATGAAAGAGGAGAATCAA
4	AhTE0633	TCCTTCAGTGAACACATGGC	ATTCTTGTTCGGTTTTGCG
5	AhTE0660	AAAGATTTGCCACGTGTATC	TAACCGGTTTAATCCGACG
6	AhTE0641	TGTTTAAACATGATCCCAATAAA	TCTTTTCCTTTTCCCTTTTGC
7	AhTE0369	TGAGGCGAGTTGTTGAGATG	TGTTGAACGATTTGCGCTAC
8	AhTE0167	GGCTGAACAAATGAATCACAAA	CCACTGTCGGTAAATGTATTGC
9	AhTE0254	CTTTCTTTCTATTTCCTGCCAAAA	TTAAAGATCTGTAGCTGCCAAA
10	AhTE0610	CAGTTAGCAAATTTGGGACAA	TGAAGAATGATAATCCCAAAAG

**1.5 真伪杂种鉴定** 使用对父母本有多态性的 AhMITE 引物, 对杂种 F<sub>1</sub> 代进行 PCR 扩增, 扩增带型表现为杂合的为真杂种, 带型与母本相同为假杂种。

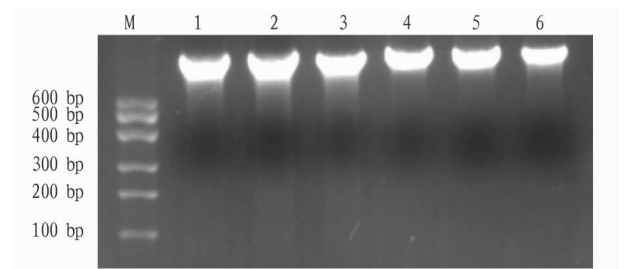
## 2 结果与分析

**2.1 F<sub>1</sub> 代群体 DNA 提取** 该试验提取的花生组 DNA, 经超微量分光光度计检测 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 在 2.0 左右。琼脂糖凝胶电泳检测结果显示, 条带清晰, 质量较高, 可以用于后续试验, 结果见图 1。

**2.2 亲本多态性 AhMITE 标记引物的筛选** 该试验选择的 10 对 AhMITE 引物在 14 个杂交亲本中均可扩增出条带。其中, 引物 AhTE0544 使组合 1、4、5、6、7、8、10 的双亲条带具有明显差异, 父母本带型的分子量在 100~500 bp (图 2、3); AhTE0577 使组合 2、3、9 的双亲条带具有明显差异, 父母本带型的分子量在 100~500 bp (图 4、5)。因此选用 AhTE0544 和 AhTE0577 引物对 14 个杂交亲本 F<sub>1</sub> 代进行真伪鉴定。

**2.3 F<sub>1</sub> 后代真伪杂种鉴定** 筛选出对父母本有显著差异的 AhMITE 标记引物, 分别对 10 个花生杂交组合进行真伪杂种鉴定。扩增条带仅表现为父本或者母本的为伪杂种, 表现为杂合带型的为真杂种。部分鉴定结果见图 3、5~6, 10 个杂交

组合的真杂种比例见表 1。其中, 第 5 个组合真杂种率最高, 达 47.37%, 第 1 个组合真杂种率最低, 仅 25.00%, 10 个杂交组合平均真杂种比例为 38.02%。



注: M. 100 bp Ladder I; 1~6. 部分 F<sub>1</sub> 花生 DNA 样品编号

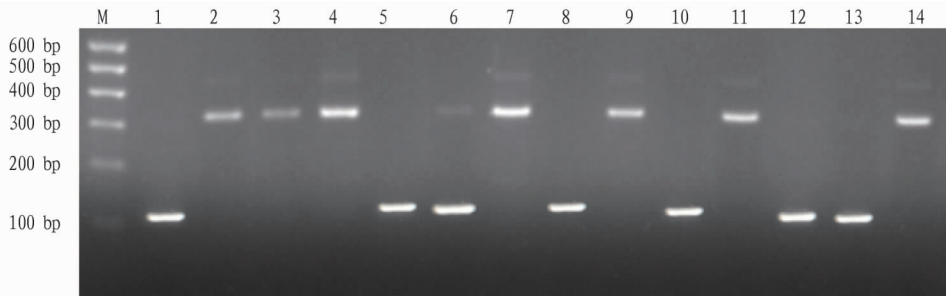
Note: M. 100 bp Ladder I; 1~6. Part F<sub>1</sub> peanut DNA sample number

图 1 DNA 电泳结果

Fig. 1 Electrophoresis result of DNA

## 3 讨论

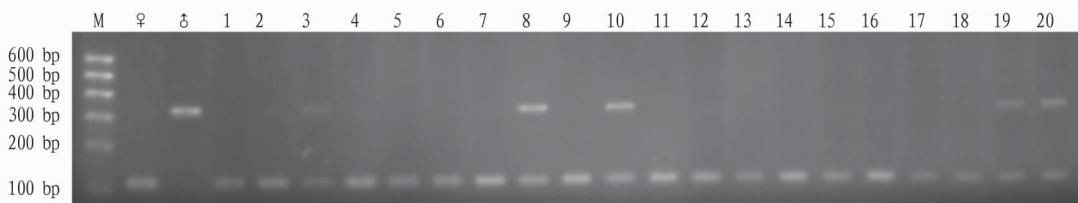
花生杂交是选育优异新品种和种质创新最常用、最简单的方法之一<sup>[14]</sup>。为了提高杂交群体的质量, 对杂种 F<sub>1</sub> 代进行准确鉴定至关重要。由于花生染色体数目和基因型差异较大, 导致花生不同品种间表型上差异也较大<sup>[15]</sup>。在分子



注: M. 100 bp Ladder I; 1~14. 2017-116、2018-31、2020-46、2014-26、吉花 9、2020-48、2019-33、2020-45、吉花 50、2020-47、2019-33、2019-67、2019-75、2019-36

图 2 引物 AhTE0544 在亲本中的扩增图谱

Fig. 2 Amplification profile of primer AhTE0544 in parent

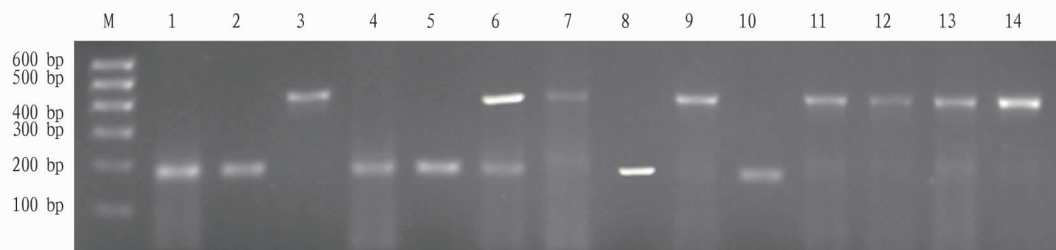


注: M. 100 bp Ladder I; 1~20. 杂交组合 2017-116(母) × 2018-31(父) F<sub>1</sub> 后代

Note: M. 100 bp ladder I; 1~20. Hybrid combination 2017-116 (female) × 2018-31 (parent) F<sub>1</sub> offspring

图 3 引物 AhTE0544 对杂交组合 2017-116(母) × 2018-31(父) F<sub>1</sub> 代的扩增结果

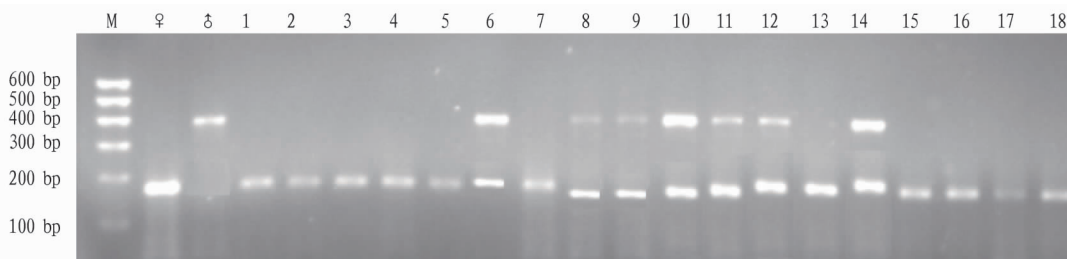
Fig. 3 Amplification result of the F<sub>1</sub> generation of the hybrid combination 2017-116 (female) × 2018-31 (male) of primer AhTE0544



注: M. 100 bp Ladder I; 1~14. 2017-116、2018-31、2020-46、2014-26、吉花 9、2020-48、2019-33、2020-45、吉花 50、2020-47、2019-33、2019-67、2019-75、2019-36

图 4 引物 AhTE0577 在亲本中的扩增图谱

Fig. 4 Amplification profile of primer AhTE0577 in parent



注: M. 100 bp Ladder I; 1~18. 杂交组合吉花 9 号(母) × 2020-48(父) F<sub>1</sub> 后代

Note: M. 100 bp ladder I; 1~18. Hybrid combination Jihua 9 (female) × 2020-48 (male) F<sub>1</sub> offspring

图 5 引物 AhTE0577 对杂交组合吉花 9 号(母) × 2020-48(父) F<sub>1</sub> 代的扩增结果

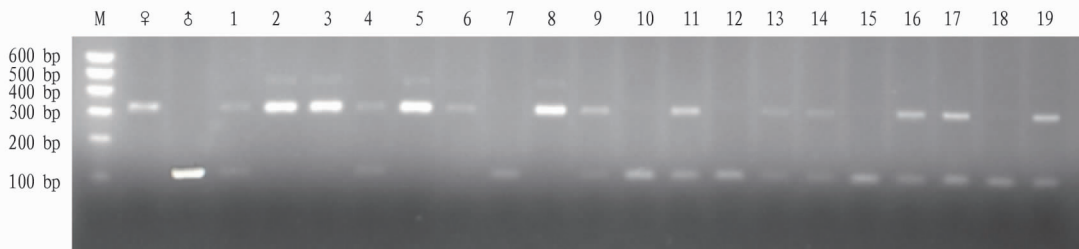
Fig. 5 Amplification result of the F<sub>1</sub> generation of the hybrid combination Jihua 9 (female) × 2020-48 (male) of primer AhTE0577

标记未被广泛应用之前,对于 F<sub>1</sub> 代真伪杂种的鉴定基本采用形态标记法,费时费力,且准确性不高。分子标记的鉴定不受外界环境的制约,直接反应不同品种间差异,在作物早

期即可鉴定<sup>[16]</sup>。花生 F<sub>1</sub> 杂种鉴定大多采用简单重复序列(SSR)标记,鉴定结果较好,但是制作聚丙烯酰胺凝胶及跑胶过程较为复杂。此外,利用 SNP 位点进行鉴定,准确性高,但

是对于 DNA 浓度要求极高<sup>[17]</sup>。该试验利用 AhMITE 转座子标记技术对 F<sub>1</sub> 杂种进行真伪鉴定, AhMITE 重复性好, 稳定

性高, 易操作, 极大地提高了鉴定效率。



注: M. 100 bp Ladder I; 1~19. 杂交组合 2019-33(母)×2020-45(父)F<sub>1</sub> 后代

Note: M. 100 bp ladder I; 1~19. Hybrid combination 2019-33 (female) × 2020-45 (male) F<sub>1</sub> offspring

图 6 引物 AhTE0544 对杂交组合 2019-33(母)×2020-45(父)F<sub>1</sub> 代的扩增结果

Fig. 6 Amplification result of the F<sub>1</sub> generation of the hybrid combination 2019-33 (female) × 2020-45 (male) of primer AhTE0544

近年来, 祁雪等<sup>[18]</sup>采用原位胚拯救技术并利用 MITE 转座子分子标记对 F<sub>1</sub> 代进行鉴定, 真杂种率为 44.3%; 和小燕等<sup>[19]</sup>采用 SNP 位点突变碱基 G-T、籽仁表型性状、SSR 多态性标记分析、四引物扩增突变体系 PCR 和 Sanger 测序基因峰值图分析 4 种方法对 F<sub>1</sub> 代进行真伪杂种鉴定; 宁龙龙等<sup>[20]</sup>利用 AhMITE 转座子标记对 F<sub>1</sub> 后代群体 78 个单株进行了鉴定, 真杂种率为 25.64%; 仇静静等<sup>[21]</sup>利用 MITE 转座子和 SSR 标记对各杂交组合的 F<sub>1</sub> 代杂交种进行真伪检测, 254 粒杂交 F<sub>1</sub> 中共鉴定出 96 粒真杂交种。

#### 4 结论

该研究利用 AhMITE 分子标记可以快速、准确地对花生杂交 F<sub>1</sub> 代进行真伪鉴定, 可极大地提高花生育种效率, 也可为进一步使用 AhMITE 分子标记技术对吉林省花生新品种选育及花生种质资源遗传多样性分析奠定理论基础。

#### 参考文献

- [1] 周小静, 任小平, 黄莉, 等. 花生种质资源研究进展与展望[J]. 植物遗传资源学报, 2020, 21(1): 33-39.
- [2] 熊发前, 钟瑞春, 韩柱强, 等. 花生的一种高效育种和种植方法[J]. 农业与技术, 2018, 38(11): 87-88.
- [3] BUREAU T E, WESSLER S R. Tourist: A large family of small inverted repeat elements frequently associated with maize genes[J]. The plant cell, 1992, 4(10): 1283-1294.
- [4] FESCHOTTE C, JIANG N, WESSLER S R. Plant transposable elements: Where genetics meets genomics[J]. Nature reviews genetics, 2002, 3(5): 329-341.
- [5] ZHANG X, FESCHOTTE C, ZHANG Q, et al. P instability factor: An active maize transposon system associated with the amplification of Tourist-like MITEs and a new superfamily of transposases[J]. Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America, 2001, 98(22): 12572-12577.

- [6] KIKUCHI K, TERAUCHI K, WADA M, et al. The plant MITE mPing is mobilized in anther culture[J]. Nature, 2003, 421(6919): 167-170.
- [7] PATEL M, JUNG S, MOORE K, et al. High-oleate peanut mutants result from a MITE insertion into the FAD2 gene[J]. Theoretical and applied genetics, 2004, 108(8): 1492-1502.
- [8] GAYATHRI M, SHIRASAWA K, VARSHNEY R K, et al. Development of AhMITE1 markers through genome-wide analysis in peanut (*Arachis hypogaea* L.) [J]. BMC research notes, 2018, 11: 1-6.
- [9] KOLEKAR R M, SUJAY V, SHIRASAWA K, et al. QTL mapping for late leaf spot and rust resistance using an improved genetic map and extensive phenotypic data on a recombinant inbred line population in peanut (*Arachis hypogaea* L.) [J]. Euphytica, 2016, 209(1): 147-156.
- [10] 王辉, 李双铃, 任艳, 等. 利用 AhMITE 转座子分子标记研究花生栽培种及高世代材料的亲缘关系[J]. 农业生物技术学报, 2013, 21(10): 1176-1184.
- [11] 王洁, 李双铃, 王辉, 等. 利用 AhMITE1 转座子分子标记鉴定花生 F<sub>1</sub> 代杂种[J]. 花生学报, 2012, 41(2): 8-12.
- [12] 尹亮, 任艳, 石延茂, 等. 利用 AhMITE1 转座子分子标记鉴定栽培花生杂交 F<sub>1</sub> 代种子真伪[J]. 山东农业科学, 2015, 47(12): 1-5.
- [13] 黄璐. 栽培花生种质资源遗传多样性研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2018: 18-19.
- [14] 曹广英, 吴琪, 王云云, 等. 利用 SSR 标记鉴定花生杂交 F<sub>1</sub> 代真假杂种[J]. 山东农业科学, 2016, 48(1): 7-10, 15.
- [15] 严玫, 韩锁义, 董文召, 等. SSR 标记在中国花生研究中的应用[J]. 中国农学通报, 2012, 28(6): 1-7.
- [16] 苏君伟, 于树涛, 史普想, 等. 花生分子标记的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(10): 5704-5705, 5710.
- [17] 赵婷, 王俊宏, 徐国忠, 等. 花生高产优质育种与生物技术应用的研究进展[J]. 热带作物学报, 2011, 32(11): 2187-2195.
- [18] 祁雪, 王传堂, 王秀贞, 等. 原位胚拯救技术获得花生属区组间杂种的研究[J]. 花生学报, 2017, 46(1): 21-25.
- [19] 和小燕, 张建航, 刘婷, 等. 花生 F<sub>1</sub> 代真伪杂种鉴定方法分析[J]. 分子植物育种, 2018, 16(2): 477-483.
- [20] 宁龙龙, 刘佳佳, 赵昆昆, 等. 利用 AhMITE 转座子标记鉴定花生 F<sub>1</sub> 代真伪杂种[J]. 山东农业科学, 2019, 51(9): 63-67.
- [21] 仇静静, 赵钰涵, 邓丽, 等. 花生杂交 F<sub>1</sub> 种子真伪的分子鉴定研究[J]. 山东农业科学, 2018, 50(2): 13-18.