

文章编号:1001-4829(2014)02-0530-05

# 利用 SRAP 标记分析胡麻资源遗传多样性

安泽山<sup>1</sup>, 严兴初<sup>2</sup>, 党占海<sup>1</sup>, 李闻娟<sup>1</sup>, 郝荣楷<sup>1</sup>, 赵利<sup>1</sup>, 张建平<sup>1\*</sup>

(1. 甘肃农业科学院作物研究所, 甘肃 兰州 730070; 2. 中国农业科学院油料研究所, 农业部油料作物生物学与遗传育种重点实验室, 湖北 武汉 430062)

**摘要:**用 19 对 SRAP 引物对 58 份来自不同国家和地区的胡麻种质资源进行 SRAP 分子标记遗传多样性分析。结果显示 19 对引物共扩增出 105 条多态性位点, 平均多态性含量 (PIC) 为 0.47, 具有较好的多态性。通过聚类分析发现国内外品种资源总体多态性不高, 但国内资源比外引资源相对更具遗传多样性, 且能够各自成簇, 表明国内外资源之间存在遗传差异。这为研究者准确评估胡麻遗传资源, 挖掘有价值的遗传组分, 拓宽胡麻亲本的遗传差异以及加快胡麻育种的选择效率提供了理论依据。

**关键词:**胡麻; SRAP; 遗传多样性

中图分类号: S563 文献标识码: A

## Genetic Diversities Analysis of Flax Based on SRAP

AN Ze-shan<sup>1</sup>, YAN Xing-chu<sup>2</sup>, DANG Zhan-hai<sup>1</sup>, LI Wen-juan<sup>1</sup>, HAO Rong-kai<sup>1</sup>, ZHAO Li<sup>1</sup>, ZHANG Jian-ping<sup>1\*</sup>

(1. Crops Research Institute, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Gansu Lanzhou 730070, China; 2. Oilcrops Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Hubei Wuhan 430062, China)

**Abstract:** 19 primer pairs were used to analyze the genetic diversities of 58 flax materials from different countries and regions based on SRAP technique. The results showed that 105 polymorphic loci were amplified, and the average polymorphic information content (PIC) value was 0.47, with better polymorphism. The polymorphism was not high in varieties from home and abroad by cluster analysis, but the domestic varieties had more genetic diversity than introduced species and were clustered each other, which indicated that there were genetic variation between domestic and foreign varieties. The result provided a theoretical basis for an accurate assessment of flax genetic resources, mining valuable genetic component, broaden the genetic differences between the flax parental and improve the efficiency of flax breeding for researchers.

**Key words:** Flax; SRAP; Genetic diversities

胡麻在我国各地都有栽培, 主产区是内蒙古、甘肃、宁夏、河北、新疆等地。胡麻从原茎到种子都能加工利用, 是重要的油料作物之一, 也是主要韧皮纤维作物, 其中胡麻油中所含的 ( $\alpha$ -亚麻酸还有重要的营养保健作用, 广受人们喜爱<sup>[1]</sup>。近年来, 在胡麻的品种改良研究中, 人们已经把注意力转向生物技术育种, 但在我国, 胡麻的育种方法还主要是通过杂交育种。高产、抗逆仍然是胡麻育种的重要方向, 而杂种优势的利用则是提高胡麻产量和抗逆性的有效途径。而在我国的胡麻育种中, 选配组合随机性

大, 胡麻遗传基础狭窄等造成胡麻育种的效率不高, 杂种优势不明显。因此, 有必要对胡麻进行系统的遗传多样性研究, 把握胡麻种质遗传差异, 避免同质化育种, 对提高胡麻品种的杂种优势及抗逆性具有重要意义, 同时也为从国外更好得引进优良资源提供理论依据。SRAP 标记技术具有操作简单、过程快速、费用低以及多态性和信息量丰富的特点, 被广泛应用于植物遗传多样性分析<sup>[2-3]</sup>。本研究采用 SRAP 标记方法对 58 个国内外胡麻栽培资源进行了多态性和遗传相似性研究, 探索了胡麻品种之间的遗传差异, 为今后胡麻亲本选配、选育和资源利用提供了分子生物学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

本研究所用的 58 份胡麻资源 (包括 26 份国外

收稿日期: 2013-05-10

基金项目: 农业部油料作物生物学与遗传育种综合性重点实验室 2011 年开放课题

作者简介: 安泽山 (1985-), 男, 甘肃武威人, 硕士, E-mail: nifengchuilang@126.com, \* 为通讯作者; 张建平 (1972-), 男, 研究员, 主要从事亚麻育种工作, E-mail: zhangjianpinglanzhou@yahoo.com.cn.

引进资源,29 份甘肃地方品种,3 份国内育成品种)是从甘肃省农科院胡麻课题组征集的,品质均为自交稳定材料(表 1)。

### 1.2 DNA 提取

取胡麻植株幼嫩叶片,采用 CTAB<sup>[4]</sup> 法略作改动提取 58 份胡麻材料全基因组 DNA,紫外分光光度计检测 DNA 浓度和纯度,并稀释到 35 ng/ $\mu$ l 备用。

### 1.3 SRAP 标记

SRAP 引物序列参考 Li<sup>[3]</sup>,对 13 条正向引物和 13 条反向引物组成的 169 对引物进行筛选,选择扩

增带型稳定、多态性丰富、重复性较好的 19 对引物用于胡麻的 SRAP 标记遗传多样性分析。PCR 反应采用 25  $\mu$ l 体系,75 ng DNA 模板,引物 0.2  $\mu$ mol/L, *Taq* 酶 1.0 U/25  $\mu$ l, dNTPs 0.25 mmol/L,  $Mg^{+2}$  3.0 mmol/L。反应条件为 95  $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94  $^{\circ}$ C 变性 1 min,35  $^{\circ}$ C 复性 1 min,72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min,5 个循环;94  $^{\circ}$ C 变性 1 min,50  $^{\circ}$ C 复性 1 min,72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min,35 个循环;72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min;16  $^{\circ}$ C 保温 10 min,4  $^{\circ}$ C 保存。扩增产物用 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离检测。

表 1 供试胡麻材料及来源

Table 1 List of 58 flax accessions used in this study

序号 Code	品种名称 Accession	来源 Origin	序号 Code	品种名称 Accession	来源 Origin
1	DEHISCINT L CREPITAN-1	俄罗斯	30	低角胡麻	甘肃卓尼
2	古浪白花	甘肃古浪	31	BUDA $\times$ (19 $\times$ 112)SE	北美
3	1159-S	阿富汗	32	康乐-2 Kangle-2	甘肃康乐
4	Viking	加拿大	33	肃南红胡麻	甘肃肃南
5	舟曲除瓦胡麻	甘肃舟曲	34	NOVA ROSSISK SELECTI	美国
6	Macbeth	加拿大	35	TASH	阿富汗
7	灵台五星	甘肃灵台	36	Food-grade 1	加拿大
8	AC Watson	加拿大	37	AC Lirora	加拿大
9	P. I. 178974	土耳其	38	CDC Bethune	加拿大
10	庆阳老	甘肃庆阳	39	天水渭南胡麻	甘肃天水
11	BGOLD $\times$ REDWING644 $\times$ 3-1	美国	40	安西红胡麻	甘肃安西
12	西礼宽川胡麻	甘肃礼县	41	NO. 6566-1938	北美
13	临夏杂胡麻	甘肃临夏	42	AC Emerson	加拿大
14	J. W. S	非洲	43	齐胡麻	甘肃甘谷
15	酒泉 078	甘肃酒泉	44	LINA GRDSSES	法国
16	临夏大红	甘肃临夏	45	康乐白胡麻	甘肃康乐
17	红古胡麻	甘肃红古	46	TAMMES TYPE 12	荷兰
18	P. I. 171700	土耳其	47	天亚 3 号	甘肃清水
19	山丹白胡麻	甘肃山丹	48	天亚 6 号	甘肃清水
20	清水老胡麻	甘肃清水	49	P. I. 171704	土耳其
21	P. I. 1181058	土耳其	50	线胡麻	甘肃甘谷
22	KOREAN	阿富汗	51	天水市老胡麻	甘肃天水
23	RUSSIAN INTRO-4	俄罗斯	52	AC Lightning	加拿大
24	西和老胡麻	甘肃西和	53	酒泉白胡麻	甘肃酒泉
25	P. I. 179341	土耳其	54	榆中胡麻	甘肃榆中
26	COMMON WHITE	俄罗斯	55	宕昌高角胡麻	甘肃宕昌
27	TAMMES #5 LIGHT BLUE	荷兰	56	广河白胡麻	甘肃广河
28	合水红胡麻	甘肃合水	57	华亭胡麻	甘肃华亭
29	PALE BLUE	美国	58	LUSATIA	德国

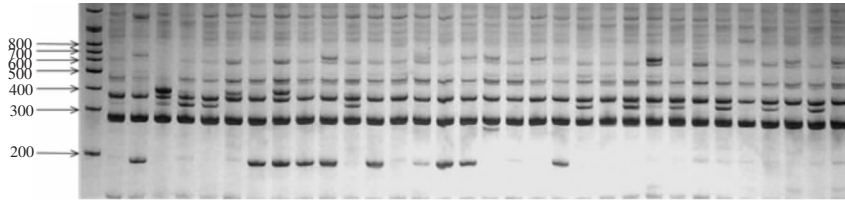


图1 引物对 M10/E5 在胡麻中的扩增产物

Fig. 1 PCR product with SRAP primer pair of M10/E5

## 1.4 统计分析

电泳检测后统计有差异、易于识别的多态性条带,有带记为“1”,无带记为“0”。遗传多样性指数(H)用来估计 Nei's (1973) 遗传多样性, I 用来估计 Shannon-Weiner (Shannon Information index) 指数<sup>[5]</sup>,这 2 个指标使用 Popgene 软件计算 (Francis Yeh, Rongcai Yang and Timothy Boyle)。应用 NT-SYS-PC<sup>[6]</sup> 计算引物的多态性含量 (PIC), 计算公式为  $PIC = 1 - \sum p_i^2$ , 其中  $p_i$  是指  $p$  样品的第  $i$  个等位点的频率。并计算各品种间的遗传相似系数, 用非加权类平均法 (unweighted pair group method with arithmetic mean, UPGMA) 进行聚类分析, 利用遗传距离进行主成分分析 (PCA 分析)。

## 2 结果与分析

### 2.1 标记的多态性分析

19 对引物在 58 个品种中表现出多态性, 共扩增出多态性位点 105 个, 每对引物扩增的多态性条带从 2 ~ 10 个, 平均每对引物产生多态性带 5.5 个。每对引物的多态性含量 (PIC) 从 0.36 ~ 0.62, 平均 PIC 为 0.47。按照标准,  $PIC > 0.5$  为高多态性,  $0.25 < PIC < 0.5$  为中多态性,  $PIC < 0.25$  为低多态性<sup>[7]</sup>。8 对引物的 PIC 达到 0.5 以上, 其它 11 对均在 0.25 到 0.5 之间, 其中 M1/E9 和 M3/E7 引物对的 PIC 达到 0.6 以上, 表明这些引物具有较好的多态性。有些 SRAP 引物扩增的多态性位点较多, 如引物对 M1/E3 和 M2/E9 能够扩增出 10 条多态性带。这些引物总体上具有较好的多态性和鉴别力,

适合应用于胡麻的遗传多样性分析。图 1 是引物 M10/E5 在部分胡麻品种中的扩增图。

### 2.2 遗传多样性分析

将品种地域来源信息明确的 58 分胡麻材料分为国内品种和外引资源, 外引资源分为欧洲区域 (荷兰、法国、德国、俄罗斯)、地中海沿岸区域 (土耳其、非洲、阿富汗) 和北美区 (加拿大、美国)。通过比较分析多样性指数, 所有材料 H 和 I 分别为 0.314 和 0.476, 国内品种 H 和 I 为 0.320 和 0.481, 外引品种为 0.277 和 0.421, 其中北美区域略高为 0.271 和 0.404。这表明国内外品种总体遗传多样性不高, 而国内品种其遗传多样性较之外引品种略具多样性, 更丰富。各多样性指数见表 2。

### 2.3 聚类和主成分分析

通过聚类分析, 全部 58 个品种被分为 2 大类, 如图 2。其中第二大类包括 3 个外引品种 (22、42、58) 和一个国内品种 (57), 说明这些品种遗传关系较近, 而与其他品种遗传差异较大。第一大类在遗传相似系数 0.47 的位置又分为 5 小类, 第 I 小类包含了大部分外引品种, 包括 18 个外引品种而只有 6 个国内品种。第 II 小类则被再分为两个部分, 第 1 部分包括 6 个外引品种和 3 个国内品种, 第 2 部分除了 1 个国内品种 (21) 其它 11 个均为外引品种。第 III 小类和第 V 小类分别只有 1 个国内品种 2 和 15。第 IV 小类则大多是国内品种, 除了 1 个外引品种 (34)。这些结果表明, 国内外品种在地域上存在着微小的遗传差异, 而各品种之间的遗传多样性比较丰富。通过主成分分析 (图 3), 可以看出, 除了个

表 2 不同区域胡麻资源的多样性分析

Table 2 Genetic diversity of flax in different area

区域 Area	材料数目 Number of flax	多态性位点数 Number of polymorphic loci	多态性位点 百分率 Percentage of polymorphic loci	等位基因数 Number of alleles	有效等位 基因数 Effective alleles	Nei 多样性 指数 Nei's diversity index	Shannon 多样性指 Shannon information index
中国	29	100	95.24	1.952	1.551	0.320	0.481
外引	29	95	90.48	1.905	1.471	0.277	0.421
欧洲	7	71	67.62	1.676	1.419	0.247	0.369
地中海	9	76	72.38	1.724	1.429	0.253	0.380
北美	13	79	75.24	1.752	1.566	0.271	0.404

别品种,国内品种和国外品种各自成簇,说明国内外品种存在一定的遗传差异,但差异微小,这与聚类结

果类似。

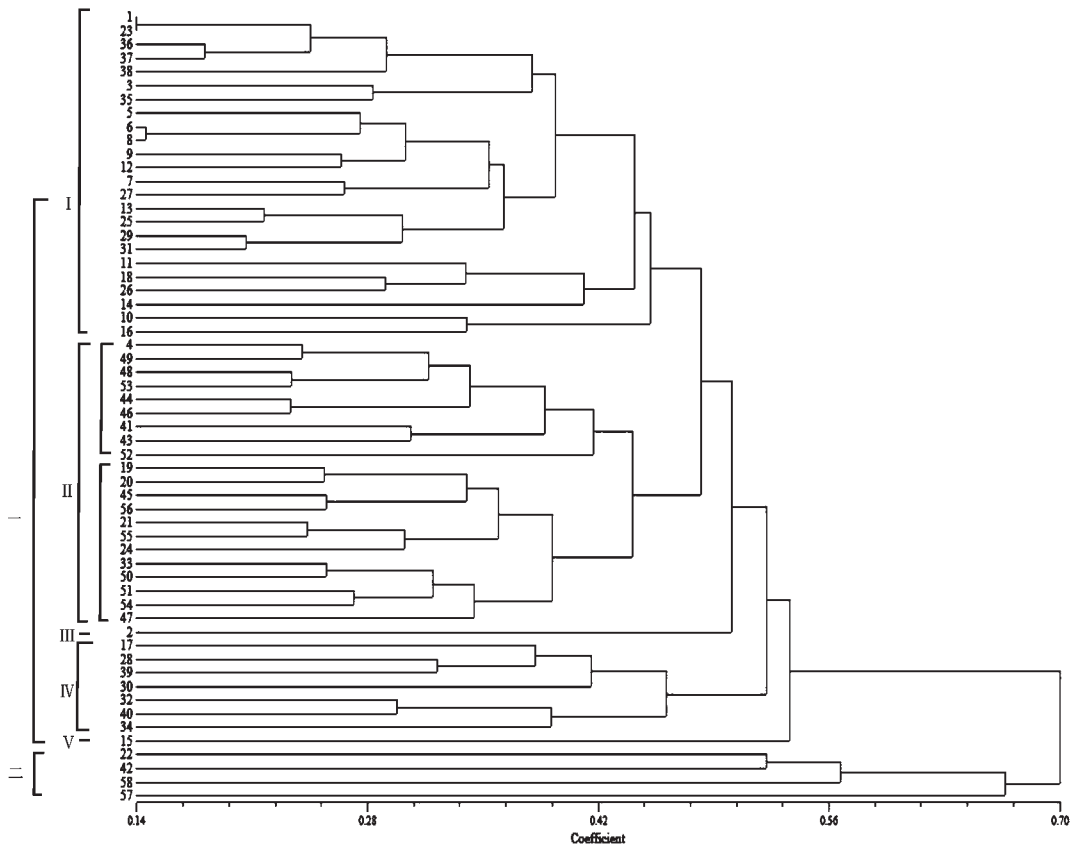
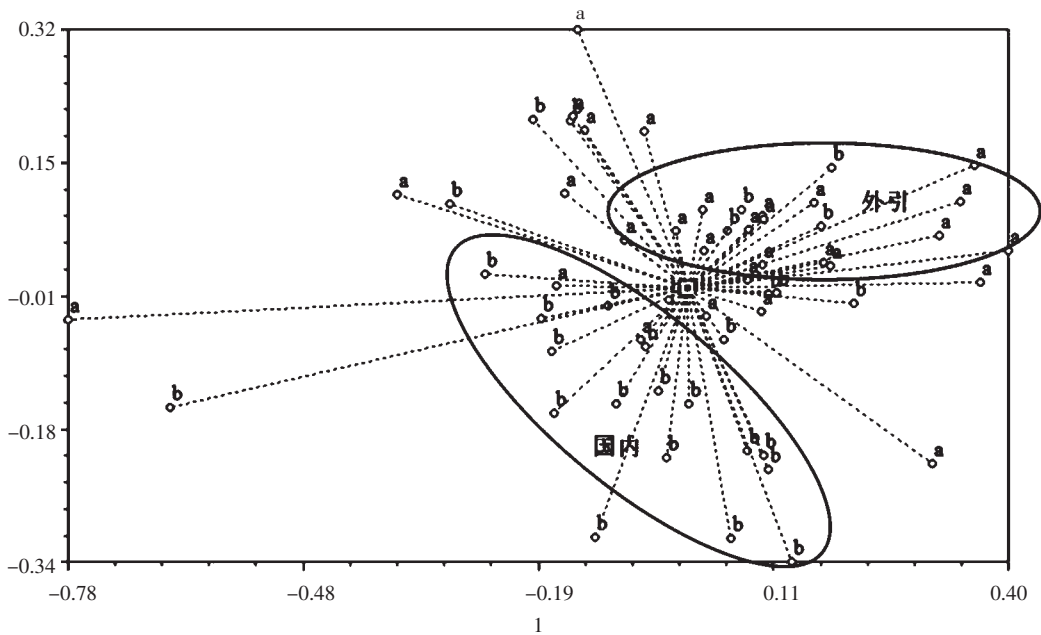


图 2 58 份国内外胡麻资源的聚类

Fig. 2 Dendrogram of genetic relationship among 58 flax



a 表示外引品种, b 表示国内品种

图 3 胡麻主成分分析

Fig. 3 Principal component analysis among 58 flax

### 3 讨 论

许多分子标记技术如 RAPD、AFLP 等已经应用于亚麻的种质遗传多样性研究。但是这些研究结果表明,相对于野生亚麻和其他作物,栽培亚麻的遗传多样性比较低。而对亚麻的形态学研究也同样证明了这一点<sup>[8-9]</sup>。本实验的结果表明胡麻的总体遗传多样性较低,但国内外品种仍然存在遗传差异。而此前有对国内外胡麻的农艺性状分析也表明与国内品种相比国外品种更倾向于矮秆和种子多产的油纤兼用品质<sup>[10]</sup>。亲本间遗传距离的大小和遗传多样性大小是决定杂交组合是否具有杂种优势及杂交后代生活力强弱的因素。通过多样性信息选择正确的亲本对杂种优势利用具有重要意义。在本实验中,国外品种 KOREAN(22,阿富汗)、AC Emerson(42,加拿大)、LUSATIA(58,德国)和国内品种华亭胡麻(57,甘肃华亭)相比其他品种具有较大的遗传差异,为国内胡麻育种提供了重要的种质来源,也是胡麻种质研究必备材料。

胡麻分布地域广泛,但遗传多样性较低,其主要原因可能是胡麻拥有比较单一的驯化祖先<sup>[11]</sup>。而另一方面可能是目前胡麻育种的结果,由于育种家利用常规品种的杂交育种及其杂种优势,育种目标又趋近相同,导致胡麻品种间多样性下降。而 Vromans 则认为亚麻遗传多样性的降低,将导致品种同质化现象发生,对环境的适应能力减弱<sup>[12]</sup>。因此有必要准确评估遗传资源,挖掘有价值的遗传组分,拓宽亲本的遗传差异,加大生物技术的不断利用,扩大新的种质资源的不断渗透。

#### 参考文献:

[1] P. Smykal N. Bacova-Kertesova, R. Kalendar, et al. Genetic diversity of cultivated flax (*Linum usitatissimum* L.) germplasm as-

essed by retrotransposon-based markers [J]. Theor Appl Genet, 2011, 122:1385 - 1397.

[2] 吴建忠,赵东升,黄文功,等. 12 个亚麻品种亲缘关系的 SRAP 分析[J]. 中国麻业科学, 2012, 34(4): 153 - 156.

[3] 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]. TheorAppl Genet, 2001, 103(3): 455 - 461.

[4] Stewart C N Jr., Via L E. A rapid CTAB DNA isolation technique useful for RAPD fingerprinting and other PCR applications [J]. Biotechniques, 1993, 14(5): 748 - 750.

[5] Shannon C E. A mathematical theory of communication [J]. Bell System Technical Journal, 1948, 27:379 - 423.

[6] Rohlf F. NTSYS-PC 2.1. Numerical taxonomy and multivariate analysis system [A]. In Exeter Software Setauket ed. NY, 1997.

[7] Botstein D, White R L, Skolnick M, et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms [J]. Am J Hum Genet, 1980, 32(3):314 - 331.

[8] Diederichsen A, Fu Y B. Phenotypic and molecular (RAPD) differentiation of four infraspecific groups of cultivated flax (*Linum usitatissimum* L. subsp. *usitatissimum*) [J]. Genet Resour Crop Evol., 2006, 53:77 - 90.

[9] Everaert I, de Riek J, de Loose M, et al. Most similar variety grouping for distinctness evaluation of flax and linseed (*Linum usitatissimum* L.) varieties by means of AFLP and morphological data [J]. Plant Var Seeds, 2001, 14:69 - 87.

[10] 王玉富,贾婉琪,薛召东,等. 国外引进亚麻种质资源的聚类分析及评价 [J]. 植物遗传资源学报, 2010, 11(5): 548 - 554.

[11] Allaby RG, Peterson GW, Merriwether DA, et al. Evidence of the domestication history of flax (*Linum usitatissimum* L.) from genetic diversity of the sad2 locus [J]. Theor Appl Genet, 2005, 112:58 - 65.

[12] Vromans J. Molecular genetic studies in flax (*Linum usitatissimum* L.) [D]. Ph. D. Thesis, Wageningen University, The Netherlands, 2006.

(责任编辑 陈虹)