

# 显性核不育亚麻种质资源聚类分析及核心种质库的建立

张 辉 斯钦巴特尔 亢鲁毅 贾霄云 高凤云

(内蒙古农牧业科学院,内蒙古 呼和浩特 010031)

**摘要:** 为核不育亚麻资源的有效利用提供依据,构建了核不育亚麻核心种质库。以 78 份核不育亚麻资源材料为研究材料,通过 10 个农艺性状的形态学观察、RAPD 标记和聚类分析,采用随机抽样和最大遗传距离法结合的策略,构建了由 22 个材料组成的核心种质库。通过各性状的均值、方差、变幅及变幅保持率等进行评价。结果表明,根据 10 个农艺性状聚类分析结果,将 78 份不育亚麻种质资源,可分为 8 个类群,其欧氏距离在 0.394 0~10.709 1 之间,均值为 4.050 0。而根据 RAPD 遗传多样性分析结果,将其可分为 3 个类群,其遗传相异系数在 0.013~0.897 之间,均值为 0.361。构建的核不育亚麻核心种质库基本上能够代表原有种质资源的遗传多样性。

**关键词:** 显性核不育亚麻;种质资源;聚类分析;核心种质;遗传多样性

中图分类号:S563.2 文献标识码:A 文章编号:1000-7091(2012)04-0118-05

## Cluster Analysis and Developing of Core Collection of Dominant Genic Male Sterile Flax Germplasm

ZHANG Hui, Siqin Bateer, KANG Lu-yi, JIA Xiao-yun, GAO Feng-yun

(Inner Mongolia Academy of Agricultural and Husbandry Sciences, Huhhot 010031, China)

**Abstract:** Based on morphological markers, RAPD markers and the cluster analysis, a core collection comprised of 22 samples from 78 flax germplasm was developed using strategy of random sampling and max-distance combined. Mean value, variance, amplitude and range maintenance were used to test the validity sampling scheme. The 78 male sterile flax germplasms were classified into 8 groups according to 10 morphological characteristics cluster analysis in which euclidean distance ranged between 0.394 0 and 10.709 1, with means of 4.05. While RAPD genetic diversity analysis divided the germplasms into 3 groups, with genetic difference coefficient ranging from 0.013 to 0.897, and means being 0.361. Sampling validity test showed that the core collection of the genic male sterile flax could well represent the genetic diversity of the whole collection.

**Key words:** Dominant genic male sterile flax; Germplasm resources; Genetic diversity; Cluster analysis; Core collection

核心种质是以最少数量的种质材料代表一个物种及其近缘野生种最大限度的遗传多样性。核心种质库的建立对遗传资源的有效利用和新基因的挖掘具有重要的意义。显性雄性核不育亚麻是内蒙古农牧业科学院于 1975 年发现的核不育材料。该材料柱头发育正常,花药干扁,属无花粉型,不育材料标记性状明显,育性稳定,经检索查新,该材料属国内外首次发现<sup>[1]</sup>。为了充分利用这珍贵的不育材料,利用不育材料作母本,与国内外资源材料进行回交转育,经过多年的拓建,建立了一个拥有各类资源

材料性状的核不育基因库<sup>[2]</sup>。

本研究以核不育基因库中具有代表性的 78 份核不育资源作为研究材料,通过形态学分析和 RAPD 分子标记,在聚类分析的基础上,构建了初步的核不育亚麻核心种质库,旨在为核不育亚麻资源的有效利用提供依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

供试植物材料:在本课题组经过多年回交转育

收稿日期:2012-02-23

基金项目:国家自然科学基金项目(30860148)

作者简介:张 辉(1961-),女,内蒙古乌兰察布人,研究员,硕士生导师,主要从事亚麻遗传育种研究。

拓建的核不育基因库中,选择有代表性的 78 份核不育资源材料分离出的兄妹可育株作为供试材料,其标号分别为: H894、H532、H101、H405、H075、H010、H027、H022、H007、H204、H110、H031、H068、H601、H503、H016、H005、H103、H309、H008、H066、H064、H087、H067、H715、H750、H575、H319、H100、H032、H120、H021、H116、H138、H139、H164、H305、H172、H161、H111、H508、H279、H795、H355、H563、H019、H521、H743、H805、H973、H253、H222、H475、H637、H524、H725、H965、H165、H258、H711、H624、H325、H456、H472、H635、H578、H623、H911、H715、H818、H206、H398、H730、H122、H611、H801、H354、H369。

主要试剂: 10 个碱基的随机引物 230 条,植物基因组 DNA 提取试剂盒、100 bp DNA Maker、2 × Taq PCR Master Mix 等。

## 1.2 形态学与生理指标的分析

将供试种质资源于 2007 年和 2008 年种植于内蒙古农牧业科学院试验基地,小区随机排列,土壤肥力基本一致,田间管理与生产田类似。

室内考种项目: 株高( cm)、工艺长度( cm)、主茎分枝( 个)、单株果数( 个)、果粒数( 个)、单株生产力( g)、千粒质量( g)、产量( kg/hm<sup>2</sup>)、生育天数( d)。

## 1.3 RAPD 分子标记

利用植物 DNA 提取试剂盒提取亚麻叶片 DNA。用琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测 DNA 的质量和浓度,并将 DNA 稀释到 60 ng/L。PCR 反应体系为 20 μL,包括: 10.0 μL 2 × Taq PCR Master Mix、1.0 μL 引物、2.0 μL DNA、7.0 μL 超纯水。PCR 扩增反应条件为: 94℃ 预变性 4 min; 94℃ 变性 40 s、37℃ 退火 1.5 min、72℃ 延伸 70 s; 40 个循环; 72℃ 延伸 10 min。取 10.0 μL PCR 产物,用 1.5% 琼脂糖凝胶进行电泳,用多通道分子成像仪进行观测拍照。

## 1.4 数据统计及分析

根据 RAPD 扩增结果,同一引物的扩增产物中电泳迁移率一致的条带被认为代表同源性。将清晰可辨的电泳条带全部用于统计分析,按扩增条带有无记数,当某一扩增带出现时,同一位置 3 次重复结果的条带都清晰明亮时,赋值为“1”,否则赋值为“0”,从而把图形资料转换成数据资料。

条带多态性计算:

$$\text{多态带比例} = \frac{\text{扩增多态性片段条数}}{\text{总扩增片段数}} \times 100\%$$

相似系数与聚类分析: 根据 DPS 软件采用 Nei-Li

相似系数法(也称为 Dice 法),运用类平均聚类方法(UPGMA)对其进行聚类分析。品种  $i$  和  $j$  之间的相似系数为:  $S_{ij}$ :  $S_{ij} = 2N_{ij} / (N_i + N_j)$ 。其中,  $N_i$  表示品种  $i$  中的条带数目;  $N_j$  表示品种  $j$  的条带数目;  $N_{ij}$  表示品种  $i$ 、 $j$  共有的条带数目。

## 1.5 核心样品的抽提

在聚类分析的基础上,以 20% 的抽样对样品进行进一步划分群,对每一类群品种中选取与其他品种遗传距离最大的一个品种的方法进行抽样。再增加一些特殊种质材料,构成初步核心样品。

# 2 结果与分析

## 2.1 78 份亚麻资源的形态学分析

为研究参试亚麻种质资源在形态学上的亲缘关系,采用 DPS 软件,利用 10 个性状的考种指标计算了 78 份种质间的欧式距离。结果表明,78 份种质的欧氏距离在 0.394 0 ~ 10.709 1,均值为 4.050 0。在种质间的欧式距离中,以种质 H521 和 H472 间的最大,为 10.709 1;欧式距离最小的是种质 H075 和 H008,为 0.393。在遗传距离为 2.71 时,将 78 份资源分为 8 个类群。第 I 类: H101、H405、H075、H010、H027、H022、H007、H008、H110、H031、H068、H601、H503、H016、H005、H103、H309、H204、H066、H319、H355、H563、H019、H521、H743、H805、H973、H325、H456; 第 II 类: H894、H087、H715、H750、H319、H032、H120、H021、H116、H138、H139、H164、H305、H172、H161、H111、H508、H279、H795、H475、H524、H725、H965、H165、H258、H711、H624、H472、H578、H623、H911、H715、H818、H206、H398、H730、H122、H611、H801、H354、H369; 第 III 类: H532、H064; 第 IV 类: H100; 第 V 类: H253、H222; 第 VI 类: H637; 第 VII 类: H575; 第 VIII 类: H635(图 1)。

## 2.2 亚麻总 DNA 的提取

琼脂糖凝胶电泳检测结果显示,提取的亚麻 DNA 条带型亮而整齐,无拖尾和弥散现象,可以作为 PCR 反应的模板(图 2)。

## 2.3 RAPD 标记多态性分析

本研究选用的 RAPD 引物,由于在不同种质间的扩增情况不同,因而选用 5 个具有代表性的材料 H075、H068、H575、H138 和 H258 对引物进行筛选。选择条带清晰、重复性高、多态性强的引物用于全部供试材料的分子标记。从 230 条引物中筛选出了 12 条引物,其序列如表 1 所示。

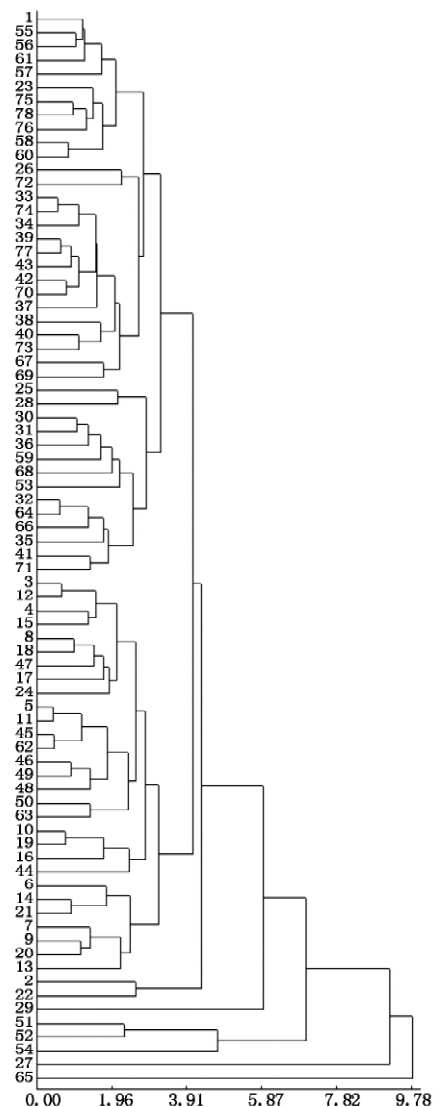


图 1 基于 10 个形态学性状的 78 份核不育亚麻种质聚类

Fig.1 The cluster analysis of genic male sterile flax germplasms on 10 morphological characteristics

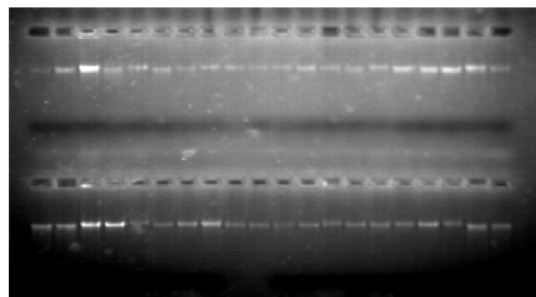


图 2 部分核不育亚麻材料 DNA 琼脂糖凝胶电泳检测

Fig.2 Gel electrophoresis graph of partial genic male sterile flax DNA extractde

利用筛选出的 12 条引物分别对 78 份亚麻材料基因组 DNA 进行 PCR 扩增,12 条引物共扩增出 128 条 DNA 带,每个引物扩增的条带数在 6~12 条之间,平均每个引物产生 9 条,条带的大小在 100~5 000 bp。进一步分析表明,在扩增的 128 条带中,多态性条带数为 52 条,占总条带的 40.6%。S38 引

物对 78 份资源材料 DNA 的扩增产物电泳结果如图 3~6 所示。

表 1 筛选得到的引物序列

Tab.1 The sequences of selected primers

引物 Primer	序列 Sequence	引物 Primer	序列 Sequence
S1	GTTTCGCTCC	S135	CCAGTACTCC
S38	AGGTGACCGT	S162	GGAGGAGAGG
S39	CAAACGTCCG	S278	TTCAGGGCAC
S67	GTCCCGACGA	S270	TCGCATCCCT
S99	GTCAGGGCAA	S1025	GTCGTAGCGG
S1061	TCTGCTACGG	S1050	GTTACCGCGA

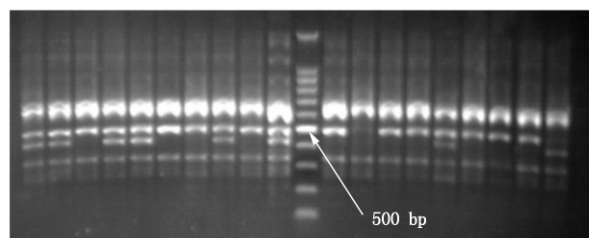


图 3 引物 S38 对 1~19 号亚麻资源的 PCR 扩增结果的琼脂糖凝胶电泳

Fig.3 PCR amplification of No.1-19 DNA using primer S38

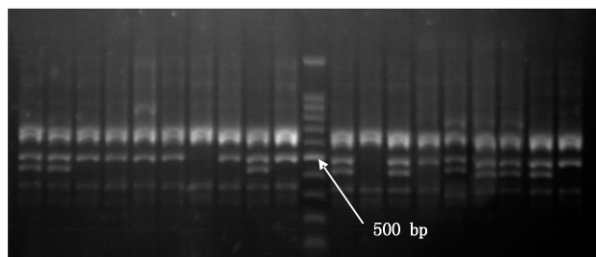


图 4 引物 S38 对 20~38 号亚麻资源的 PCR 扩增结果的琼脂糖凝胶电泳

Fig.4 PCR amplification of No.20-38 DNA using primer S38

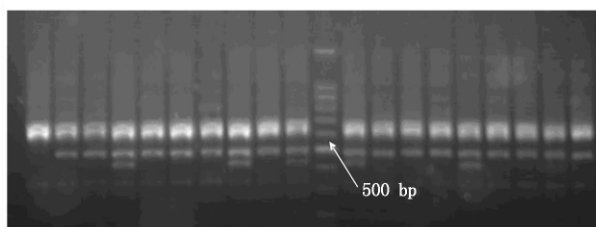


图 5 引物 S38 对 39~57 号亚麻资源的 PCR 扩增结果的琼脂糖凝胶电泳

Fig.5 PCR amplification of No.39-57 DNA using primer S38

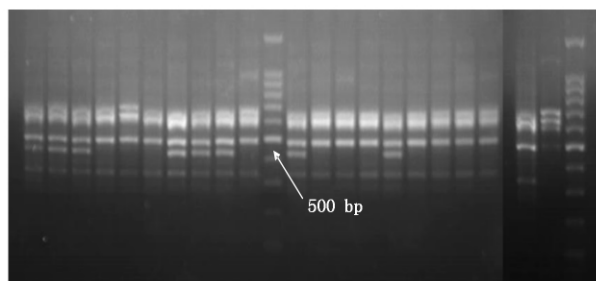


图 6 引物 S38 对 58~78 号亚麻资源的 PCR 扩增结果的琼脂糖凝胶电泳

Fig.6 PCR amplification of No.58-78 DNA using primer S38

## 2.4 基于 RAPD 分子标记多态性的聚类分析

根据 RAPD 分子标记多态性,采用 DPS 软件,分析 78 份亚麻种质资源在分子水平的遗传关系,计算出参试种质间的相异系数。78 份种质的相异系数在 0.013 ~ 0.897 之间,均值为 0.361,将供试材料可分 3 个类群。

第 I 类: H101、H405、H075、H010、H022、H008、H110、H031、H068、H005、H103、H309、H066、H064、H087、H067、H750、H319、H111、H795、H563、H019、H521、H743、H973、H253、H222、H637、H725、H624、H325、H456、H623; 第 II 类: H894、H027、H007、H601、H204、H032、H120、H021、H138、H139、H164、H305、H172、H116、H508、H279、H355、H805、H253、H475、H524、H165、H258、H711、H472、H635、H578、H911、H715、H818、H206、H398、H730、H122、H611、H801、H354、H369; 第 III 类: H532、H503、H016、H575、H116、H161(图 7)。

## 2.5 形态学标记和 RAPD 标记结果的比较

从聚类分析来看,形态学标记与 RAPD 标记的遗传关系基本一致,但它们之间存在一定的差异。形态学只是反映了直观的品质特性,而 RAPD 反映了其中内在的遗传关系。所以在实际应用中应当将二者方法的结果综合考虑,对育种材料进行适当选择。

## 2.6 核心种质库的初步建立及其评价

根据样品聚类分析结果的特殊性,在遗传距离为 1.7 时,将第 I 类和第 II 类进一步分为 14 个类群。在每一个类群中,采用随机取样和选择遗传距离最大的一个品种方法结合抽取候选核心品种。再将第 III、第 IV、第 V、第 VI、第 VII 和第 VIII 类群作为特殊种质材料加入其中,构成由 22 个种质组成的初步核种质库,其资源编号分别为: H405、H010、H007、H309、H019、H521、H715、H139、H111、H795、H624、H911、H715、H801、H532、H064、H575、H100、H253、H222、H637、H635。

对抽出的 22 份核心样品进行评价,发现初步核心样品各性状的平均数与总样品数接近,各性状的方差均大于原群体的方差。千粒质量和主茎分枝的保持率分别为 83.3%、80%。其他性状的保持率都在 96.7% ~ 100% 之间。取样比例为 28%。以此判断,抽取的核心种质资源能够代表原有种质资源的遗传多样性(表 2)。

## 3 讨论

种质资源核心库由种质库中一部分材料所组

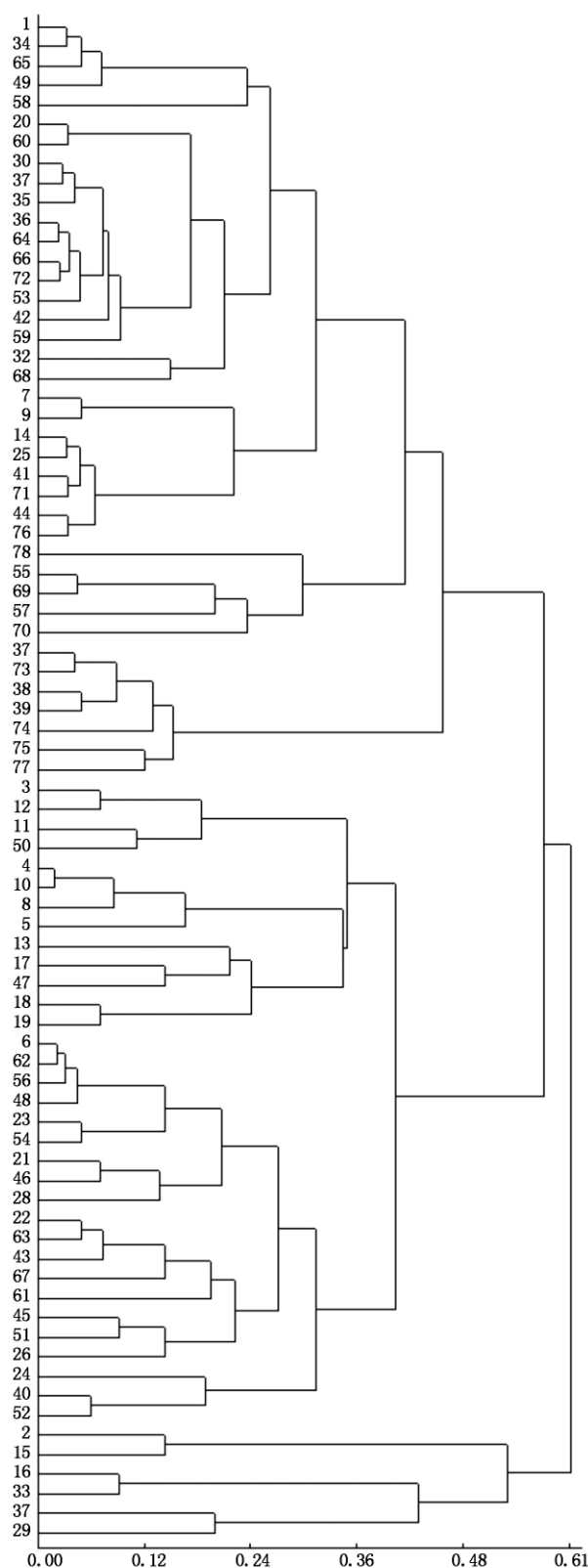


图 7 基于 RAPD 标记的 78 份核不育亚麻种质的聚类

Fig.7 The cluster analysis of genic male sterile flax germplasms based on RAPD markers

成,用于代表整个种质库的遗传范围<sup>[4]</sup>。国际植物遗传资源委员会认为,核心库能以最少的重复代表一个种及其野生近缘种的遗传多样性<sup>[3]</sup>。在核心种质库构建中,核心种质一般应占总体种质资源的

表 2 原始群体和核心样品库中 10 个农艺性状的均值、方差、变幅及变幅保持率的比较

Tab.2 Comparison of mean ,variance ,amplitude and range of maintenance  
between original population and core collection

性 状 Agronomic traits	原 始 资 源 Original population			核 心 库 Core collection			
	均值 Mean	方差 Variance	变幅 Amplitude	均值 Mean	方差 Variance	变幅 Amplitude	保持率/% Range of maintenance
株高/cm	58.20	86.20	50.92	61.00	191.50	50.92	100.00
工艺长度/cm	40.50	54.40	46.22	41.60	143.90	46.22	100.00
主茎分枝/个	4.30	0.60	4.26	4.10	0.75	3.55	83.30
单株果数/个	16.30	49.70	62.00	18.60	157.0	62.00	100.00
果粒数/个	7.50	0.85	8.00	7.60	2.00	8.00	100.00
单株生产力/g	0.82	0.99	8.77	1.14	3.37	8.77	100.00
千粒质量/g	5.78	1.46	7.00	5.23	1.58	5.60	80.00
产量/( kg/hm <sup>2</sup> )	1 524.00	8 294.25	1 519.05	1 478.40	10 144.50	1 468.95	1 450.50
生育天数/d	92.15	81.70	34.00	92.00	84.95	33.00	99.90
抗病性/%	0.65	0.23	1.00	0.50	0.26	1.00	100.00

5% ~ 10%。但有人认为,核心种质所占总资源的比例应根据总资源群体的大小来决定,总资源多的物种其核心种质所占的比例可小一些,总资源份数较少的物种核心种质所占比例可相对大一些,一般为 5% ~ 30%<sup>[4]</sup>。在抽取样品策略上,系统取样(分层次取样)与随机取样相结合的取样策略已被许多研究证明是合理有效的<sup>[5]</sup>。构建的资源核心库是否有效地保存了原有资源群体的遗传多样性,可以用各种性状的均值、方差、变幅及变幅保持率等进行评价。构建核心库的先决条件是各性状平均数、变幅等各项指标的保持率不小于 70%,同时,各性状的方差应不小于原群体的方差<sup>[6]</sup>。

本研究通过对 78 份核不育亚麻资源材料 10 个农艺性状的聚类分析,采用选取 22 份材料构建初步的核心种质库。核心样品各性状的平均数与总样品数接近,方差均大于原群体的方差。变幅保持率都在 80% 以上,取样比例为 28%。构建的核不育亚麻

核心种质库基本上能够代表原有种质资源的遗传多样性,为进一步利用核不育亚麻资源培育新品种奠定了基础。

#### 参考文献:

- [1] 陈洪山,王宜林,张辉,等.核不育亚麻的研究利用[J].内蒙古农业科技,1989(5):1-2.
- [2] 张辉,丁维,王宜林.显性核不育亚麻在育种上的应用研究初报[J].华北农学报,1996,11(2):38-42.
- [3] 徐海明,胡晋,朱军.构建作物种质资源核心库的一种有效抽样方法[J].作物学报,2000,26(2):157-162.
- [4] 李自超,张洪亮,曾亚文,等.云南地方稻种资源核心种质取样方案研究[J].中国农业科学,2000,33(5):1-7.
- [5] 路颖.亚麻种质资源聚类分析及核心品种抽取方法[J].中国麻业,2005,27(2):66-69.
- [6] 王述民,曹永生,胡家蓬.中国小豆种质资源核心样品的初步建立[J].华北农学报,2002,17(1):35-40.