

红麻微卫星 DNA 标记指纹图谱的构建

万雪贝^{1,2}, 徐建堂¹, 李东旭^{1,2}, 林荔辉¹, 祁建民¹, 张立武^{1,2}

(¹ 福建农林大学作物科学学院/作物遗传育种与综合利用教育部重点实验室/福建省作物设计育种重点实验室, 福州 350002; ² 福建农林大学海峡联合研究院基因组与生物技术中心, 福州 350002)

摘要: DNA 指纹图谱对新品种选育、种质资源保存和管理具有重要的意义。然而, 利用 SSR 标记构建红麻 DNA 指纹图谱的研究仍十分有限。在本研究中, 利用课题组开发并筛选出的 131 对 SSR 引物, 分析不同来源的 96 份红麻种质资源, 包括红麻品种审定的区试对照品种福红 952。结果表明, 131 对引物共扩增出 375 条带, 平均每对引物扩增出 2.6 条带。以遗传相似系数 0.614 为切割线时, 可以分为 2 个类群, 52 个为类群 P1, 44 个为类群 P2; 以遗传相似系数 0.710 做切割线, 可分为 5 个亚群。利用这 131 对引物标记所得的数据成功绘制了一份 85 个品种独特的指纹图谱, 其中福红 952 可被 HcEMS238 引物特异识别。其他 11 份因存在遗传相似性高的现象, 未被识别。上述结果为红麻品种的真实性鉴定及遗传多样性分析提供依据。

关键词: 红麻; 种质资源; SSR; DNA 指纹图谱

Construction of DNA Fingerprinting in Kenaf (*Hibiscus cannabinus*) using Microsatellite Markers

WAN Xue-bei^{1,2}, XU Jian-tang¹, LI Dong-xu^{1,2}, LIN Li-hui¹, QI Jian-min¹, ZHANG Li-wu^{1,2}

(¹ College of Crop Science, Fujian Agriculture and Forestry University/Key Laboratory for Genetics, Breeding and Multiple Utilization of Crops of Ministry of Education/Fujian Key Laboratory for Crop Breeding by Design, Fuzhou 350002; ² Center for Genomics and Biotechnology of Haixia Institute of Science and Technology, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002)

Abstract: DNA fingerprinting is very important for the breeding of new varieties, germplasm resources conservation and management. However, DNA fingerprinting in kenaf using SSR markers is still very limited. In this study, the DNA fingerprint for 96 kenaf accessions, including the control variety Fuhong 952, were constructed on the basis of 131 pairs of SSR primers. The results showed that 131 pairs of primers amplified 375 bands, with the average of 2.6 bands per primer. When genetic similarity coefficient was 0.614, all the kenaf accessions could be divided into two groups, P1 and P2. The group P1 included 52 accessions while P2 had 44 ones. When genetic similarity coefficient was 0.710, all the kenaf accessions could be divided into five subgroups. On the basis of 131 SSRs, 85 accessions had specific DNA fingerprints. Among them, HcEMS238 could differentiate Fuhong 952 from the others. The fingerprint of the other 11 accessions failed to be constructed due to the presence of high genetic similarity. These results would be helpful in varieties authenticity identification and analysis of genetic diversity in kenaf.

Key words: kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.); germplasm; SSR; DNA fingerprinting

收稿日期: 2017-05-05 修回日期: 2017-07-02 网络出版日期: 2017-12-26

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20171226.1501.004.html>

基金项目: 福建农林大学杰出青年科研基金 (xjq201401); 福建省科技厅对外合作项目 (201510001); 国家麻类产业技术体系项目 (CARS-19-E06); 农业部东南黄红麻实验观测站 (农科教发 2011); 福建省麻类种质资源共享平台 (2010N2002)

第一作者研究方向为经济作物遗传育种与综合利用, E-mail: 524073779@qq.com

通信作者: 张立武, 研究方向为作物遗传育种与生物技术, E-mail: lwzhang@fafu.edu.cn, zhang_liwu@hotmail.com

祁建民, 研究方向为作物遗传育种与生物技术, E-mail: qijm863@163.com

红麻 (*Hibiscus cannabinus* L.) 为锦葵科 (Malvaceae) 木槿属 (*Hibiscus* L.) 一年生草本韧皮纤维植物, 是我国重要的天然纤维作物之一, 具有耐旱、耐盐碱、抗逆性强、根系发达、生长速度快、生物产量高、易栽培等特点^[1-3]。红麻主要是作为麻纺工业和造纸的原料, 近年来在建材、可降解性塑料、吸污、饲料、麻油和药用等领域都有广泛的应用^[4-5]。尤其是近 10 年来在地膜方面的技术进步, 使红麻成为了代替塑料膜的良好原料之一^[5], 引起各国政府的极大重视。

1999 年《国际植物新品种保护法》颁布实施, 要求加强保护植物新品种知识产权。福建农林大学于 1993 年育成的福红 952, 丰产性好, 适应性广, 于 2002 年被列为国家重点推广品种^[6]; 2004 年选育的金光 1 号, 有茎秆光滑无刺等优良特性^[7]; 2009 年通过鉴定的福红航 992 和福红航 952 等光钝感红麻品种大大改善了我国在红麻生产上出现的早花结果减产问题, 增加了红麻在低纬度地区的推广范围^[8-9]。这些品种的选育极大提高了红麻种质资源数量和种质创新水平。然而, 在红麻育种过程中, 由于重复利用优良亲本进行杂交、测交等, 导致红麻新品种亲缘关系相近, 遗传基础越来越窄。随着各国之间种质资源交换, 部分来源相同的红麻在不同国家或地区可能有不同的名称, 这就导致种质资源的保存和利用出现混乱。而通过传统的大田试

验形态学鉴定或实验室细胞学鉴定等方法难以做到准确地鉴定红麻不同品种的基因型差异^[10]。因此, 构建红麻种质资源的指纹图谱是很有必要的。

DNA 分子标记可对作物品种的遗传差异进行鉴定。在多种分子标记中, 微卫星标记又称 SSR (简单重复序列) 标记, 是 DNA 指纹图谱构建和遗传多样性分析的理想标记之一^[11-15]。DNA 指纹图谱近年来在水稻、玉米、白菜、甘蔗和绿豆等多种作物中都有运用。而红麻的微卫星 DNA 标记指纹图谱构建才刚刚起步。郑海燕等^[16]利用 SRAP 标记对部分红麻品种构建了 DNA 指纹图谱, 汪斌等^[17]利用 ISSR 标记分析了 84 份红麻种质资源, 表明红麻部分品种的分子身份证得以绘制。然而这些 DNA 指纹图谱都是利用随机多态性引物扩增, 尚未利用 SSR 标记。本研究以课题组开发的 131 对 SSR 引物来绘制 96 个红麻品种 DNA 指纹图谱, 旨在为红麻品种的真实性鉴定及遗传多样性分析提供依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试材料为不同来源 96 份红麻种质资源, 如表 1 所示。所有材料均来源于福建农林大学麻类遗传育种与综合利用实验室。2015 年 5 月种植于福建农林大学洋中科教基地。

表 1 供试红麻种质资源的品种名及其原产地

Table 1 Cultivar names and origins of tested kenaf germplasm

序号 Number	品种名称 Cultivar name	原产地 Origin	来源 Source	序号 Number	品种名称 Cultivar name	原产地 Origin	来源 Source
1	K45R2	中国福建	品系	16	09TK-4	中国福建	品系
2	K53	中国福建	品系	17	福红 4 号	中国福建	湘红 1 号 × 粤红 1 号
3	K57	德国	德国引进	18	福红 5 号	中国福建	品系
4	K79	中国福建	品系	19	T19	中国湖南	品系
5	K83	中国福建	品系	20	福红优 2 号-1	中国福建	福红 952A × 福红 R-1
6	K96	中国福建	品系	21	福红优 5 号-1	中国福建	品系
7	K97	中国福建	品系	22	K50	中国福建	品系
8	K202	中国福建	品系	23	杂红 992-1	中国湖南	品系
9	Taihong	泰国	泰国引进	24	浙红 142-20	中国浙江	品系
10	K03-2	中国广西	品系	25	R2	中国湖南	品系
11	CMX-55	中国福建	品系	26	09C-5	中国福建	品系
12	IDN147	印度尼西亚	印度尼西亚引进	27	福红优 952-1	中国福建	品系
13	IndiaS1	印度	印度引进	28	ZH-01	中国浙江	品系
14	090-S7	中国福建	品系	29	Taihong-1	泰国	泰国引进
15	闽红 312	中国福建	品系	30	福红 992	中国福建	(福红 951 × 福红 952) × 福红 952

表 1(续)

序号 Number	品种名称 Cultivar name	原产地 Origin	来源 Source	序号 Number	品种名称 Cultivar name	原产地 Origin	来源 Source
31	福红 952	中国福建	非洲裂叶与粤红 1 号	64	KS326	中国福建	品系
32	福红优 2 号-2	中国福建	福红 952 × 福红 R-1	65	KS356	中国福建	品系
33	福红 15 号-1	中国福建	福红 2 号 × 福红 952	66	KS250	中国福建	品系
34	Hasterfibey-2	中国福建	品系	67	KS361	中国福建	品系
35	Hasterfibey-1	中国福建	品系	68	KS360	中国福建	品系
36	XK-9K2	中国福建	品系	69	KS332	中国福建	品系
37	0-0	中国福建	品系	70	KS201	中国福建	品系
38	49CMX-S4	中国福建	品系	71	Dg15-97	中国福建	品系
39	BG52-135	马里	马里引进	72	KS377	中国福建	品系
40	ID85	印度尼西亚	印度尼西亚引进	73	KS350	中国福建	品系
41	阿联红麻	埃及	埃及引进	74	KS225	中国福建	品系
42	红麻 Y-24	中国福建	品系	75	KS150	中国福建	品系
43	722-3	中国湖南	由非洲裂叶选育	76	KS280	中国福建	品系
44	KS006	中国福建	品系	77	KS375	中国福建	品系
45	KS028	中国福建	品系	78	KS376	中国福建	品系
46	KS029	中国福建	品系	79	KS378	中国福建	品系
47	KS151	中国福建	品系	80	KS379	中国福建	品系
48	KS159	中国福建	品系	81	Zanyin No. 1	赞比亚	赞比亚引进
49	KS182	中国福建	品系	82	Zanyin No. 1-1	赞比亚	由 Zanyin No. 1 选育
50	KS262	中国福建	品系	83	金山无刺-1	中国福建	品系
51	KS450	中国福建	品系	84	金山无刺-2	中国福建	品系
52	KS447	中国福建	品系	85	福红航 2A	中国福建	福红 2 号航天育种选育
53	NA126	尼日利亚	尼日利亚引进	86	H5Z	中国福建	品系
54	Ecerglades41	美国佛罗里达	美国引进	87	952FH7	中国福建	品系
55	KS141	中国福建	品系	88	P6KS1	中国福建	品系
56	KS142	中国福建	品系	89	P6MH312	中国福建	品系
57	KS149	中国福建	品系	90	H2AZBY	中国福建	品系
58	KS206	中国福建	品系	91	Pin6	中国福建	品系
59	KS438	中国福建	品系	92	HA37	中国福建	品系
60	KS284	中国福建	品系	93	HA29	中国福建	品系
61	S832-1	中国福建	品系	94	HB12LDF	中国福建	品系
62	LDF1-1	中国福建	品系	95	LDF1	中国福建	品系
63	KS412	中国福建	品系	96	LDF2	中国福建	品系

1.2 红麻基因组 DNA 的提取

采用改良的 CTAB 法提取红麻 96 个品种的基因组 DNA^[18]。用 eppendorf 生物分光光度计测定所提取 DNA 的浓度和纯度。当 DNA 浓度和纯度都符合要求 (OD 260/OD 280 在 1.8 ~2.0 之间)后,将所有 DNA 浓度用 TE 溶液稀释至 50 ng/μL,用 1% 浓度琼脂糖凝胶

电泳检测后,于 -20 ℃ 保存,用于 PCR 扩增。

1.3 SSR 引物筛选

课题组前期利用转录组测序数据,开发 11083 对 HcEMS 编号的 SSR (编号为 HcEMS001 ~ HcEMS11083)^[19] 和 94 对 HcES 编号的 SSR 引物 (编号分别为 HcES0001 ~ HcES0094)^[20]。利用形

态差异大的 12 份红麻品种(系),在 929 对引物(HcEMS001 ~ HcEMS835, HcES0001 ~ HcES0094)中,筛选多态性高、条带清晰的引物用于红麻指纹图谱研究,最终挑选出 131 对 SSR 引物,如表 2 所示。

1.4 PCR 扩增与 PAGE 电泳检测

PCR 体系为 10 μ L:2.0 μ L DNA 溶液(50 ng/L),0.5 μ L 引物(Forward + Reverse),3.75 μ L 2 \times Taq Master Mix(厦门泰京生物技术有限公司),3.75 μ L ddH₂O,另外加 10.0 μ L 液体石蜡覆盖,离心后混匀。

PCR 程序为 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min;95 $^{\circ}$ C 变性 30 s,60 $^{\circ}$ C 退火 30 s(每个循环退火温度降低 0.5 $^{\circ}$ C),72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s,共 10 个循环;95 $^{\circ}$ C 30 s,55 $^{\circ}$ C 45 s,72 $^{\circ}$ C 45 s,共 35 个循环;72 $^{\circ}$ C 10 min,4 $^{\circ}$ C 保存。

PCR 扩增程序结束后,每管加 8 μ L 6 \times Loading Buffer 上样缓冲液,离心 15 s。然后用 9% 的聚丙烯酰胺凝胶(PAGE)电泳检测,每管取 8 μ L 产物点样至泳道,电泳时保持平均每板电压 200 V,电流 100 mA,功率在 16 ~ 20 W 之间。电泳时间视情况而定,一般在 75 ~ 120 min 之间,然后进行银染显影。

1.5 读带与统计分析

表 2 本研究所用 SSR 引物及其扩增情况

Table 2 SSR primers used in the study and amplified bands

序号 Number	引物 Primer	重复单元 Repeat type	扩增条带数 No. of amplified bands
1	HcEMS004	(A)10(A)10	2
2	HcEMS010	(T)10	1
3	HcEMS014	(TGTGG)5	2
4	HcEMS022	(C)11(TCT)5	5
5	HcEMS023	(TTTC)5	5
6	HcEMS025	(TCT)5(T)11	4
7	HcEMS027	(AAGA)5	2
8	HcEMS064	(A)10(A)10	3
9	HcEMS070	(A)10(GTT)5	1
10	HcEMS123	(GTA)7	1
11	HcEMS125	(CAA)5(A)13 *	1
12	HcEMS133	(ATA)7	1
13	HcEMS140	(GGTT)5	2
14	HcEMS161	(TCTT)5	1
15	HcEMS165	(AC)10	1
16	HcEMS172	(A)13(T)10	3
17	HcEMS174	(TC)10	5
序号 Number	引物 Primer	重复单元 Repeat type	扩增条带数 No. of amplified bands
18	HcEMS177	(GAA)5(TC)9	4
19	HcEMS178	(CTT)5(CGG)5	1
20	HcEMS183	(ACCG)6	3
21	HcEMS187	(AGCCCT)9	3
22	HcEMS197	(A)12(T)11	3
23	HcEMS200	(ATAA)6	5
24	HcEMS201	(GCA)7	3
25	HcEMS208	(T)10(A)10	1
26	HcEMS209	(G)15(A)10	2
27	HcEMS213	(AT)10	2
28	HcEMS219	(A)12(A)13	2
29	HcEMS231	(GCC)5(CTG)5	1
30	HcEMS238	(A)11(T)11	1
31	HcEMS259	(TTCT)5	3
32	HcEMS265	(C)10(ATT)7	4
33	HcEMS274	(GAA)5(T)10	1
34	HcEMS277	(A)11(A)10	1

根据 Marker 各片段大小估算扩增片段大小,采用 0,1 读带法,有条带的记 1,没有条带的记 0。利用 PowerMarker 3.51 软件计算多态性信息含量(PIC, polymorphism information content)^[21],利用 NTsys 2.0 软件对这 96 份红麻品种(系)进行遗传相似系数分析,采用非加权平均数 UPGMA 方法(unweight pair-group method using arithmetic averages)进行聚类分析^[22]。利用 DNAMAN 分析软件进行品种指纹图谱分析^[23]。

2 结果与分析

2.1 SSR 扩增情况的统计分析

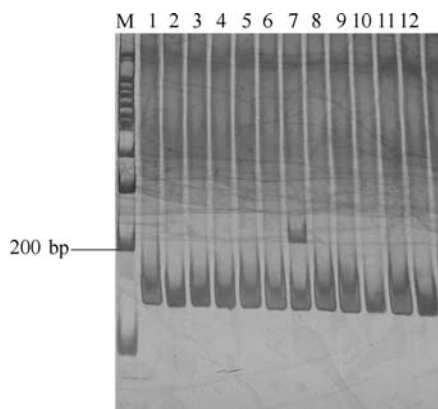
用筛选出的 131 对 SSR 引物检测 96 份红麻品种(系)的多态性,共获得 375 条带(表 2),大小在 80 ~ 1000 bp 之间。每个引物扩出的条带数在 1 ~ 9 条带之间,平均每对引物扩增出 2.6 条带。所有引物的 PIC(多态性信息含量)变化在 0.0206 ~ 0.9094 之间,平均为 0.5920,说明大部分 SSR 引物具有较高的多态性。以 HcES0008 引物为例,扩增带型清晰,主带明显,如图 1 所示,表明筛选的 SSR 引物质量好。

表 2(续)

序号 Number	引物 Primer	重复单元 Repeat type	扩增条带数 No. of amplified bands	序号 Number	引物 Primer	重复单元 Repeat type	扩增条带数 No. of amplified bands
35	HcEMS306	(GGAAG)5	1	73	HcES0028	(GAA)5	3
36	HcEMS329	(A)12g(A)10	1	74	HcES0029	(ACC)5	4
37	HcEMS337	(AT)10(TC)6	3	75	HcES0030	(GGT)5	3
38	HcEMS342	(TCTG)5	1	76	HcES0031	(CAA)5	4
39	HcEMS343	(GCT)7	2	77	HcES0032	(GAA)5	2
40	HcEMS394	(T)10(T)16	4	78	HcES0033	(GAC)5	1
41	HcEMS396	(CGC)7	1	79	HcES0034	(GCA)5	8
42	HcEMS403	(A)12(A)12	1	80	HcES0035	(ATG)5	1
43	HcEMS407	(TTGA)5	1	81	HcES0036	(ACA)5	1
44	HcEMS408	(GGT)5(T)11	3	82	HcES0037	(AT)6	3
45	HcEMS409	(GT)10	2	83	HcES0038	(GGGGTT)6	1
46	HcEMS410	(TTTC)5	2	84	HcES0039	(TA)6	3
47	HcEMS412	(AATCC)5	1	85	HcES0040	(ATT)5	1
48	HcES0001	(CAG)5	1	86	HcES0041	(TGA)6	4
49	HcES0003	(CGA)5	1	87	HcES0042	(AC)7	3
50	HcES0004	(CTT)5	1	88	HcES0043	(GA)7	7
51	HcES0005	(GAG)5	2	89	HcES0044	(CAT)5	3
52	HcES0006	(AT)6	1	90	HcES0045	(AT)8	3
53	HcES0007	(GA)10	4	91	HcES0046	(GAC)5	3
54	HcES0008	(GGA)6	2	92	HcES0047	(AT)6	3
55	HcES0009	(GAA)5	1	93	HcES0048	(GA)6	4
56	HcES0010	(GA)10	4	94	HcES0049	(GAA)5	4
57	HcES0011	(TTG)7	3	95	HcES0050	(AT)13	2
58	HcES0012	(AT)10	5	96	HcES0051	(CAT)5	3
59	HcES0013	(TGC)5	7	97	HcES0052	(TA)6	1
60	HcES0014	(TC)7	4	98	HcES0054	(AAGA)5	6
61	HcES0015	(CTT)6	6	99	HcES0055	(TG)9	6
62	HcES0016	(GAA)5	3	100	HcES0056	(ATG)5	5
63	HcES0017	(AT)7	2	101	HcES0057	(GTG,GAG)10	1
64	HcES0019	(CAA)7	1	102	HcES0058	(AT)8	3
65	HcES0020	(TA)8	6	103	HcES0059	(AAT)5	2
66	HcES0021	(TCC)6	4	104	HcES0060	(TTC)5	2
67	HcES0022	(CT)6	1	105	HcES0062	(TGC)7	2
68	HcES0023	(TTG)6	3	106	HcES0063	(TGC)5	5
69	HcES0024	(AGC)6	2	107	HcES0064	(TG)6	3
70	HcES0025	(CAG)5	2	108	HcES0066	(GAT)5	1
71	HcES0026	(GAG)5	1	109	HcES0067	(TCT)5	2
72	HcES0027	(AG)6	3	110	HcES0068	(GGT)6	1

表 2(续)

序号 Number	引物 Primer	重复单元 Repeat type	扩增条带数 No. of amplified bands	序号 Number	引物 Primer	重复单元 Repeat type	扩增条带数 No. of amplified bands
111	HcES0069	(GTT)5	2	122	HcES0082	(CT)7	1
112	HcES0070	(AAT)6	6	123	HcES0083	(ATC)6	1
113	HcES0071	(TA)6	1	124	HcES0084	(ATT)6	3
114	HcES0072	(AACT)5	5	125	HcES0085	(CT)7	6
115	HcES0073	(TTA)5	7	126	HcES0086	(AAT)5	4
116	HcES0075	(AC)6	8	127	HcES0087	(TG)8	3
117	HcES0076	(AAG)5	1	128	HcES0088	(GAA)5	3
118	HcES0077	(CGG)5	4	129	HcES0090	(TTC)5	9
119	HcES0078	(GTG, TCG)12	2	130	HcES0091	(TGC)5	5
120	HcES0079	(AT)9	9	131	HcES0093	(AT)8	5
121	HcES0080	(TGC)5	3		总计 total		375



1: K45R2; 2: K53; 3: K57; 4: K79; 5: K83; 6: K96; 7: K202; 8: IndiaS1;
9: 福红优 5 号-1; 10: K50; 11: 浙红 142-20; 12: Taihong-1;

M: 100 bp DNA Marker

1: K45R2; 2: K53; 3: K57; 4: K79; 5: K83; 6: K96; 7: K202; 8: IndiaS1;
9: Fuhongyou No. 5-1; 10: K50; 11: Zhehong142-20; 12: Taihong-1;

M: 100 bp DNA Marker

图 1 SSR 引物 HcES0008 在 12 个红麻品种(系)的扩增结果
Fig. 1 Amplification results of SSR primer HcES0008 in
12 varieties or lines of kenaf

2.2 红麻品种的聚类分析

利用 SSR 标记对供试红麻 96 份品种(系)进行聚类分析(图 2)。遗传相似系数最大的为 0.952(福红 952 和福红优 2 号-2),最小的为 0.302(K53 和 LDF2),平均为 0.686,表明大部分品种具有较大的遗传差异。以遗传相似系数 0.614 为阈值,可以将 96 份红麻品种(系)分为 2 个类群 P1 和 P2。以遗传相似系数 0.710 为阈值,可以将这 96 份红麻品种(系)分为 5 个亚群(I、II、III、IV、V)。其中 P1 类群分为 2 个亚群(I、II),I 亚群中包含 K45R2、

K83 和福红 15 号等 8 个品种,亚群 II 包含福红 952、福红优 2 号-2、LDF2 和 Zanyin No. 1-1 等 44 个品种。福红 952 和福红优 2 号-2 遗传相似系数较近,可能是福红优 2 号是由福红 952 与福红 R-1 杂交通过连续单株选择而选育成的品系。P2 类群分为 3 个亚群(III、IV、V),亚群 III 包含 K53、ID85 和 Zanyin No. 1 等 14 个品种,亚群 V 包含 K97、福红航 2A 和 T19 等 28 个品种。值得注意的是,其中亚群 IV 仅有福红优 5 号-1 和 ZH-01 这 2 个品种,说明这 2 个亚群与其他亚群遗传差异较大。

2.3 96 份红麻品种遗传相似性分析

利用 Ntsys_2 软件分析 96 份供试红麻种质资源的遗传相似系数,如表 3 所示。从整个红麻群体的群体结构分析中,96 份供试红麻品种(系)总共可以组成 4560 种组合,其遗传相似系数的变化范围在 0.302 ~ 0.952 之间,遗传相似系数的总和为 3126.317,平均值为 0.686,说明了供试的 96 份红麻种质资源表现出了丰富的遗传多样性。

从 P1 类群进行群体结构分析可以得出,其遗传相似系数的平均值为 0.774,总和为 1025.690,变化范围为 0.500 ~ 0.952。亚群 I 和 II 的遗传相似系数的平均值分别为 0.824 和 0.799,其变化范围则分别为 0.714 ~ 0.921 和 0.595 ~ 0.952,能够说明各个亚类群之内各品种之间的遗传差异较小。两个亚群的遗传相似系数的平均值均大于 P1 类群的遗传相似系数的平均值,且从变化范围可以看出两个亚群 I 和 II 的最小的遗传相似系数 0.714 和 0.595 都大于 P1 类群最小的遗传相似系数的 0.500,说明 P1 类群的两个亚群的分类是真实可信的。

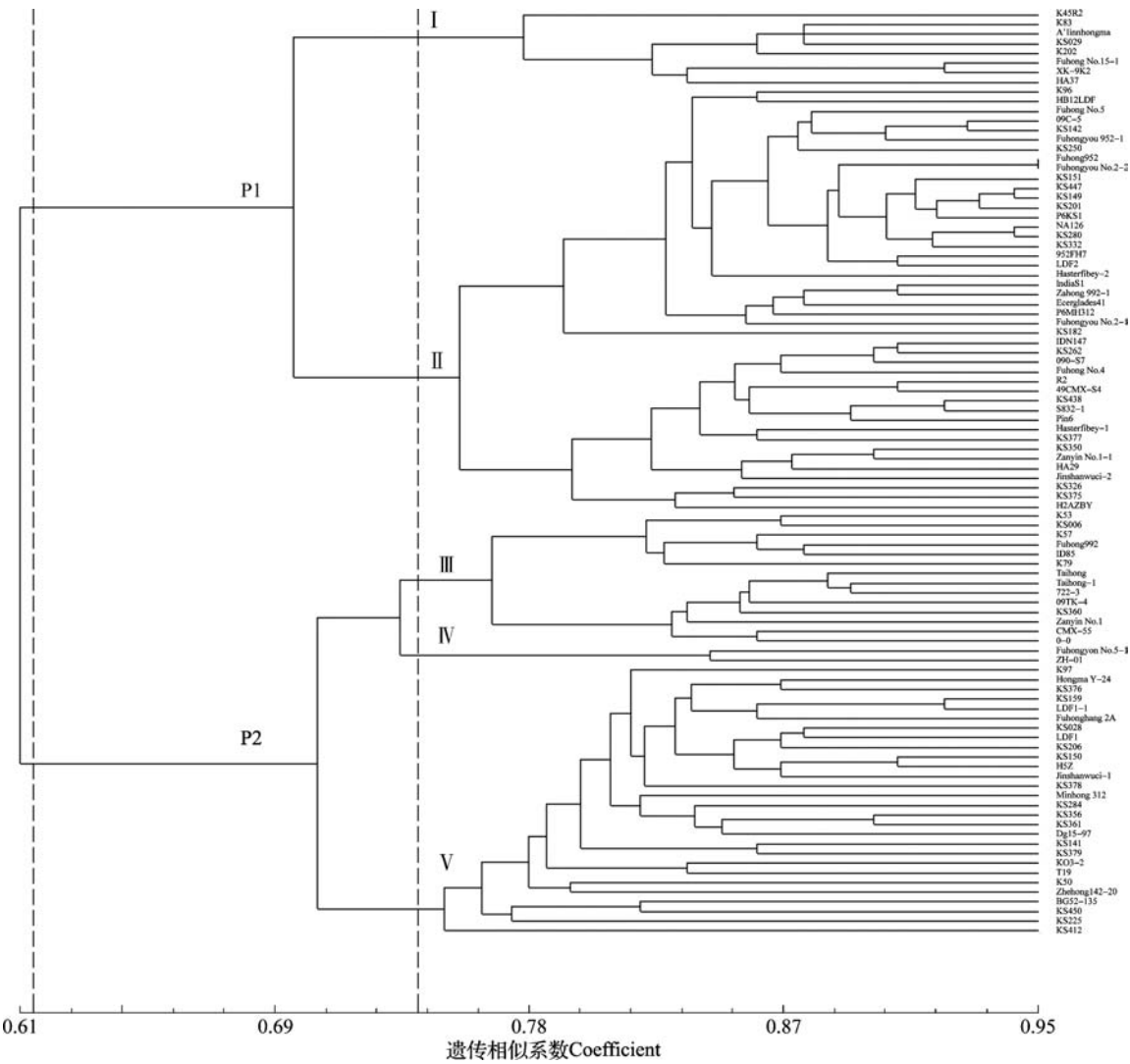


图2 96份红麻品种(系)的UPGMA聚类图

Fig.2 The UPGMA phylogenetic tree of 96 kenaf accessions

表3 96份红麻品种(系)的遗传相似系数

Table 3 Genetic similarity coefficient of 96 varieties or lines of kenaf

项目 Items	合计 Total	P1		P2				
		合计 Total	I	II	合计 Total	III	IV	V
样本量 Sample size	96	52	8	44	44	14	2	28
平均值 Mean	0.686	0.774	0.824	0.799	0.752	0.801	0.841	0.795
范围 Range	0.302 ~ 0.952	0.500 ~ 0.952	0.714 ~ 0.921	0.595 ~ 0.952	0.548 ~ 0.921	0.698 ~ 0.889	0.841 ~ 0.841	0.683 ~ 0.921
变异系数(%) CV	18.08	9.88	5.73	8.00	8.68	6.13	0.00	5.43

而 P2 类群的遗传相似系数的平均值为 0.752, 总和为 711.833,变化范围为 0.548 ~ 0.921,P2 类群的 3 个亚群Ⅲ、Ⅳ和 V 的遗传相似系数平均值分别为 0.801、0.841 和 0.795,变化范围为 0.698 ~ 0.889、0.841 ~ 0.841 和 0.683 ~ 0.921,说明 P2 类群和 P2 的 3 个亚群Ⅲ、Ⅳ和 V 的分类是可靠的。

所有品种之间的遗传相似系数最低值为 0.3016,分别为 Taihong-与印度 India S1, k53 与 LDF2,Taihong-与 LDF2,722 - 3 与 LDF2,他们之间的遗传相似性相差较大,能够作为杂交育种的候选亲本。结合农艺性状的表现,可以选取不同类群的品种作为杂种优势利用的候选亲本。

2.4 红麻品种的 DNA 指纹图谱绘制

利用 DNA 指纹图谱分析软件分析 131 对 SSR 引物标记结果,绘制 96 份红麻品种(系)的物种指纹图谱,共可识别出 85 个品种(图 3)。以 HcES0020 引物为例,在 96 份红麻品种(系)中电泳扩增出等位基因数为 6,其中,白色带型表示该引物在对应品系 K45R2 能扩增出条带,红色带型表示未能扩增出条带。以品系 K45R2 为例,需 2 对引物 HcES0020 和 HcES0070 特异识别,即指纹图谱。可识别红麻品种中,福红 952 可被 HcEMS238 引物所识别,该品种为国家品种审定的对照品种;Zanyin No. 1 可被 HcES0012、HcES0021、HcES0056、HcES0090 这 4 对引物识别,该品种是本题组从赞比亚引进的 1 份优异种质,具有短柱头、无刺、光周期钝感等特点。另有 11 个品种(系)仍无法被这些引物识别,分别为:K53、K57、福红优 952、福红优 2 号-2、49CMX-S4、NA126、KS438、LDF1、KS280、Zanyin No. 1-1、LDF1。对于 11 个无法识别的品种

(系),可能是与其他供试品种(系)中存在高度的遗传相似性,说明供试品种(系)中有同种异名现象。

在这些引物中,用 1 对引物即可识别出某一品种的有 36 个品种(系),需 2 对引物识别的有 27 个品种(系),用 3 对引物可识别的有 15 个品种(系),用 4 对引物可识别的有 6 个品种(系),用 7 对引物可识别的有 1 个品种(Taihong-1)。在识别性较好的引物中,可单独识别 4 个品种(系)的引物有 HcES0090 和 HcEMS022,其中 HcES0090 还可配合其他引物识别 17 个品种(系);可单独识别 3 个品种(系)的引物有 HcES0073、HcEMS200、HcEMS023 和 HcEMS174 共 4 个,HcES0073 可配合其他引物识别 6 个品种(系);可识别 2 个品种(系)的引物有 HcES0013、HcES0015、HcES0043、HcES0070、HcES0075、HcES0079、HcEMS177、HcEMS337 和 HcEMS394 共 9 个,除 HcEMS177 和 HcEMS337 之外均可配合其他引物识别 2~8 个品种(系)。

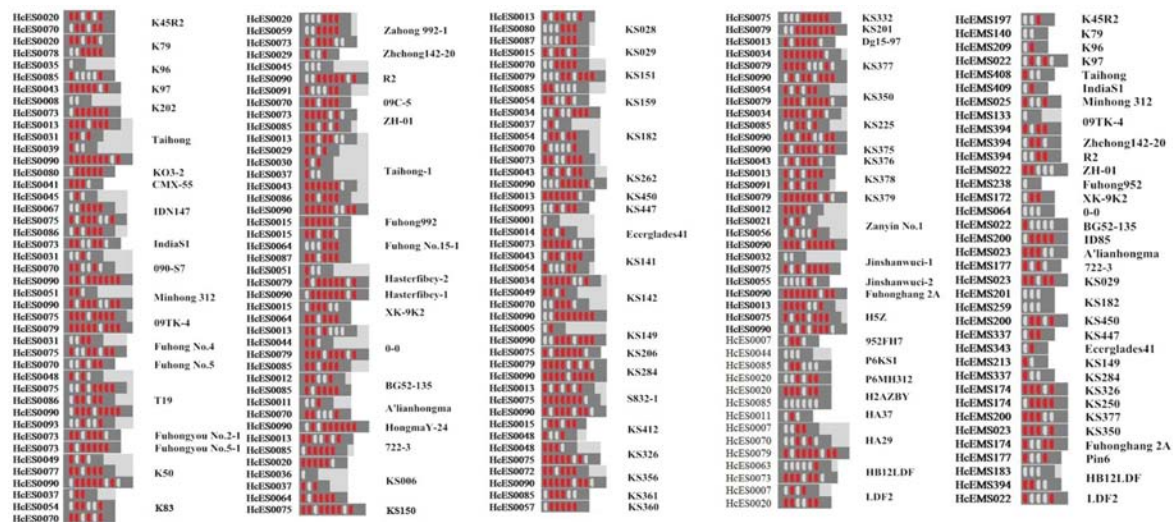


图 3 85 份红麻品种(系)SSR 指纹图谱

Fig. 3 SSR fingerprint of 85 varieties or lines of kenaf

3 讨论

近些年来,在红麻遗传育种研究领域中,各类标记都开始有了应用,如 AFLP、SRAP、SSR、ISSR 标记等^[16-18]。AFLP 标记稳定性好,少量引物可检测大量位点,但对基因组纯度要求高,扩增条带过于紧密;SRAP 标记扩增结果稳定,引物可以自由组合,但只是对编码区的扩增而不是全基因组;SSR 标记覆盖整个基因组,标记丰富、多态性高、特异性强、重复性好,近几年在红麻领域得以大量开发,如 L. W.

Zhang 等^[19]基于红麻转录组测序数据开发了 11083 对 SSR 引物;ISSR 基于 SSR 开发而来,不需要测序得到 SSR 两侧单拷贝序列,但特异性较差。其中 SSR 以价格相对低廉、多态性高、重复性好等优点成为研究作物多态性、遗传多样性分析和指纹图谱构建的首选标记之一。本研究中,SSR 多态性分析显示,挑选出的 131 对 SSR 引物呈现出高多态性和多等位基因的特性,使 SSR 标记在构建红麻 DNA 指纹图谱中成为可能。前人研究利用 SRAP^[16]、ISSR^[17]等标记对部分红麻品种构建了 DNA 指纹图

谱,但极少使用 SSR 标记构建红麻的 DNA 指纹图谱。郑海燕等^[16]用 SRAP 标记构建图谱,每个品种所需引物较多;汪斌等^[17]利用 ISSR 标记构建的指纹图谱虽然用引物很少,但引物随机性较强,条带过多,需要多个品种一起比较才方便确认;相比 SSR 标记的优势是很明显的,只需要少量几个引物,每个引物的条带数少,且利用 SSR 标记的丰富性可以选出覆盖所有基因组的多态性引物,扩大标记数量,具有区分所有红麻品种的潜力,其用于构建指纹图谱更加精准,重复性好。

在前人的研究中,以红麻野生种和栽培种等多个品种的聚类分析表明,野生种与栽培种之间的遗传差异较大^[23-24],而栽培品种之间的遗传差异相对较小,而且这些研究所用红麻品种数目偏少,很难为红麻育种提供参考。本研究利用 SSR 标记分析现有品种与新选育的品系的遗传多样性,红麻品种(系)样本量达到 96,可为遗传多样性评估提供了更加丰富的数据。聚类分析结果显示,96 份红麻品种(系)可分为 2 个类群 P1 和 P2。在红麻杂交种利用过程中,可以考虑将这 2 个类群分别向不育系和恢复系两大类推进。

本研究使用 131 对 SSR 引物可以区分 96 份红麻品种(系)中的 85 份,表明 SSR 标记在构建红麻 DNA 指纹图谱中是可行的,如 HcES0090 和 HcEMS022 这 2 个标记可以分别区分出 4 份红麻品种,表明 HcES0090 和 HcEMS022 这些 SSR 引物对识别红麻不同品种具有高效性和准确性。但仍有部分红麻品种未能识别,这有待于对红麻 InDel、SNP 等标记的进一步开发和研究。

参考文献

- [1] 陶爱芬,祁建民,林培青,等. 红麻优异种质产量和品质性状主成分聚类分析与综合评价[J]. 中国农业科学,2008,41(9):2859-2867
- [2] 祁建民,陈幼玉,周瑞阳,等. 红麻产量和纤维品质性状的遗传效应与杂种优势分析[J]. 作物学报,2005,31(4):469-475
- [3] 洪建基,祁建民,王晓飞,等. 红麻产量与品质性状的相关及其主成分分析[J]. 福建农林大学学报:自然科学版,2008,37(6):561-564
- [4] 李志明,吴星娥,周景辉. 红麻全秆纸地膜保温与降解应用试验[J]. 中国造纸,2004,23(8):22-24
- [5] 袁小红,陈东生,倪海燕. 黄/红麻在纺织领域的应用探讨[J]. 中国麻业科学,2007,29(4):217-220
- [6] 祁建民,林荔辉,林培青,等. 红麻新品种福红 952 的选育[J]. 福建农林大学学报:自然科学版,2002,31(4):433-436
- [7] 林荔辉,祁建民,方平平,等. 红麻无刺新型品种金光 1 号的选育[J]. 中国麻业,2004,26(4):2-6
- [8] 陶爱芬,祁建民,徐建堂,等. 光钝感,高产红麻新品种福红航 992 的选育[J]. 中国麻业科学,2011,33(1):1-3
- [9] 林培清. 红麻新品种“福红航 952”的选育与栽培技术[J]. 福建农业科技,2011,6(19):26-29
- [10] 李爱青,戴志刚,陈基权,等. 红麻(*Hibiscus cannabinus* L.) 种质资源的鉴定与分类研究[J]. 植物遗传资源学报,2006,7(3):352-355
- [11] Zhang L W, Li A Q, Wang X F, et al. Genetic diversity of kenaf (*Hibiscus cannabinus*) evaluated by inter-simple sequence repeat (ISSR) [J]. Biochem Genet, 2013, 51:800-810
- [12] Chen P, Ran S M, Ru L, et al. Transcriptome de novo assembly and differentially expressed genes related to cytoplasmic male sterility in kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) [J]. Mol Breeding, 2014, 34:1879-1891
- [13] 张立武,黄枝秒,万雪贝,等. 红麻光周期钝感材料的鉴定与遗传分析[J]. 作物学报,2014,40(12):2098-2103
- [14] 朱勇良,谢裕林,黄凌哲,等. 太湖稻区与国内部分香稻 SSR 指纹图谱构建及遗传多样性初析[J]. 植物遗传资源学报,2012,13(4):666-671
- [15] Zhou C, Lu B R, Sameshima K, et al. Identification and genetic relationships of kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) germplasm revealed by AFLP analysis [J]. Genet Resour Crop Eve, 2004, 51:393-401
- [16] 郑海燕,栗建光,戴志刚,等. 红麻种质资源 SRAP 指纹图谱构建及遗传多样性分析[J]. 湖北农业科学,2011,50(2):411-415
- [17] 汪斌,祁伟,兰涛,等. 应用 ISSR 分子标记绘制红麻种质资源 DNA 指纹图谱[J]. 作物学报,2011,37(6):1116-1123
- [18] 徐建堂,祁建民,方平平,等. CTAB 法提取红麻总 DNA 技术优化与 ISSR 和 SRAP 扩增效果[J]. 中国麻业科学,2007,29(4):179-183
- [19] Zhang L W, Wan X B, Xu J T, et al. De novo assembly of kenaf (*Hibiscus cannabinus*) transcriptome using Illumina sequencing for gene discovery and marker identification [J]. Mol Breeding, 2015, 10(35):192-202
- [20] 万雪贝,李东旭,徐益,等. 红麻 EST-SSR 标记的开发及其多态性评价[J]. 作物学报,2017,43(8):1170-1180
- [21] Liu K, Muse S. PowerMarker: an integrated analysis environment for genetic marker analysis [J]. Bioinformatics, 2005, 21(9):2128-2129
- [22] Rohlf F J. NTSYS-pc. Numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2. 10. Exeter Software [M]. New York: Applied Biostatistics Inc, 2002
- [23] 程舟,卢宝荣,王琼,等. 红麻种质资源遗传多样性和分子鉴定技术研究——I. 红麻 AFLP-银染技术和种质资源指纹图谱的构建[J]. 中国麻业,2003,25(2):1-6
- [24] 李建军,霍光,唐慧娟,等. 60 份红麻种质资源 ISSR 和 RAPD 的聚类分析[J]. 中国麻业科学,2015,37(6):273-279