

红花油脂相关性状与 SSR 分子标记的关联分析

向妮艳¹, 湛蔚¹, 陈贤军¹, 黄稳¹, 覃尔岱¹, 李刚¹, 严兴初², 覃瑞¹

(¹中南民族大学生命科学院 / 生物技术国家民委重点实验室 / 武陵山区特色资源植物种质保护与

利用湖北省重点实验室, 武汉 430074; ²中国农业科学院油料作物研究所, 武汉 430062)

摘要: 红花 (*Carthamus tinctorius* L.) 是一种富含不饱和脂肪酸的重要油料作物。为寻找与红花油脂性状相关联的分子标记, 本研究利用已经开发的多态性良好的 48 对 SSR 引物, 系统分析了来自 27 个国家 74 份红花种质资源的遗传多样性和群体结构, 并结合红花油脂相关性状的表型数据, 应用 TASSEL3.0 中的一般线性模型 (GLM, general linear model) 和混合线性模型 (MLM, mixed linear model) 对红花油脂性状和标记进行关联分析。研究结果显示: 48 对 SSR 分子标记的多态性信息含量 (PIC) 变异范围为 0.0632~0.3750, 平均值为 0.2937; 基因多样性指数变异范围为 0.0653~0.5000, 平均值为 0.3700。UPGMA 聚类将 74 份红花分为 3 个类群, 分别包括 7 份、52 份和 15 份材料。群体结构分析结果显示, 74 份红花可分为 3 个亚群, 各亚群分别包括 7 份、55 份和 12 份材料。在显著水平 $P < 0.05$ 条件下, 通过 GLM 和 MLM 两种模型都检测到了 18 个与油脂性状相关联的分子标记, 各标记对表型变异的解释率变幅分别为 5.42%~20.69% 和 4.35%~20.69%。两种分析方法相比, 除标记 Ct589 和 Ct178 不同外, 剩余 16 个标记在两种分析方法中都能检测到。研究表明: 所选 74 份红花种质资源的群体遗传多样性丰富, 结构差异性显著, 适用于红花油脂相关性状的关联分析。本研究为高含油量红花辅助育种提供了新的分子标记资源。

关键词: 红花; SSR 标记; 油脂相关性状; 关联分析

Association Analysis of Oil-related Traits with SSR Molecular Markers in Safflower

XIANG Ni-yan¹, ZHAN Wei¹, CHEN Xian-jun¹, HUANG Wen¹,
QIN Er-dai¹, LI Gang¹, YAN Xing-chu², QIN Rui¹

(¹College of Life Science, South-Central University for Nationalities/Key Laboratory of State Ethnic Affairs Commission for Biological Technology/Hubei Provincial Key Laboratory for Protection and Application of Special Plant Germplasm in Wuling Area of China, Wuhan 430074; ²Chinese Academy of Agricultural Sciences, Oil Crops Research Institute, Wuhan 430062)

Abstract: Safflower (*Carthamus tinctorius* L.), which serves as an important oil crop, contains higher content of the unsaturated fatty acids. Forty-eight SSR markers were used to unlock the genetic diversity and the population structure of 74 safflower germplasm resources from 27 countries. The association analysis using the general linear model (GLM) and the mixed linear model (MLM) was conducted to identify the molecular markers associated with oil-related traits. The results showed that the polymorphism information content (PIC) value ranged from 0.0632 to 0.3750, with an average of 0.2937, and the genetic diversity index ranged from 0.0653 to 0.5000, with an average of 0.3700. The cluster analysis using UPGMA assigned 74 safflowers into 3 groups, including 7, 52 and 15 genotypes, respectively. The population structure analysis suggested three subgroups consisting of 7, 55 and 12 genotypes, respectively. At a

收稿日期: 2019-03-29 修回日期: 2019-04-26 网络出版日期: 2019-06-05

URL: <http://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20190329001>

第一作者研究方向为植物遗传学, E-mail: xiangniyan2018@163.com

通信作者: 覃瑞, 研究方向为植物遗传学与植物资源学, E-mail: qinrui@scuec.edu.cn

基金项目: 湖北省科技创新条件共享平台项目 (2017BEC014); 湖北省技术创新重大项目 (2018ABA093); 湖北省重点实验室建设基金 (2018BFC360)

Foundation project: The Construction Plan of Hubei Province Science and Technology Basic Conditions Platform (2017BEC014), The Major Technological of Hubei Province of China (2018ABA093), Fund for Key Laboratory Construction of Hubei Province (2018BFC360)

significant level of $P < 0.05$, 18 markers associated with oil-related traits were detected by either GLM or MLM models, which explained the phenotypic variation with a range of 5.42% to 20.69% and 4.35% to 20.69%, respectively. Out of that, eighteen markers, except for Ct589 and Ct178, were detected by both approaches. Taken together, this study suggested an abundant genetic diversity and revealed several markers associating with oil-related traits, which provided the marker resource in future breeding for high-oil content safflower.

Key words: safflower; SSR marker; oil-related traits; association analysis

红花 (*Carthamus tinctorius* L.), 别名草红花、红蓝花或刺红花, 为菊科 (Compositae) 红花属 (*Carthamus* L.) 一年或两年生草本双子叶植物。红花作为我国一种传统中药材, 其花丝中富含羟基红花黄色素 A 等多种黄酮类化合物, 具有抑制血栓形成、修复血管内皮损伤、抗氧化等多重药效^[1-2]。红花籽粒含油量高达 20%, 是新型的油料作物^[3]。红花籽油主要成分为亚油酸 (63%~72%) 和油酸 (16%~25%)^[4], 不饱和脂肪酸比例高, 尤其亚油酸含量在所有已知作物中最高, 被誉为“亚油酸之王”^[5]。

红花作为一种集药用、食用、染料、油料、观赏和饲料于一体的经济作物, 具有巨大潜在研究价值和利用价值。但在过去相当长的一段时间里, 红花的发展并没有得到足够的重视, 在中国乃至世界的红花种植十分有限。源于对红花种植和产品开发信息的缺乏, 使得几百年来人们仅仅视红花为一种次要农作物^[6]。近年来, 随着红花籽在食用油、饲料以及生物能源开发中所占比重呈现逐年增加的趋势, 人们对红花的关注和研究也逐年增加。这主要归结于以下的两大原因: 一方面, 人们的预期寿命增加, 渴望拥有健康的生活方式, 因而不饱和脂肪酸含量高的红花籽油逐渐成为消费者青睐的具有保健功能的食用油; 另一方面, 红花适宜种植的区域有限, 造成了红花籽油产量与需求量之间的缺口加大。因此, 进一步解析红花油脂合成的遗传机理, 改良并提高红花籽油产量具有重要意义。

生物油脂合成经历了多基因调控的复杂生物代谢途径, 其基本的生化反应和步骤已经在模式植物中研究得比较清楚^[7-8]。其途径主要包括脂肪酸的从头合成、脂肪酸的去饱和、三酰甘油的合成及油体形成 4 个过程, 参与反应的亚细胞结构有质体、内质网和细胞质^[9-10]。

随着大量分子标记的开发, 关联分析逐渐成为研究植物数量性状的热点, 为复杂的数量性状基因定位和分子标记辅助育种提供了快捷、有效的途径。研究者在油料作物的油脂相关研究中取得了不少的成果, 如赵新燕^[11]利用 TASSEL2.1 软件对 79 份

二倍体野生花生材料进行油脂相关性状关联分析, 共检测到 65 个与目标性状相关联的 SSR 位点。宫慧慧等^[12]利用 72 对多态性 SSR 标记对来自国内外 96 份芝麻品种资源的 8 个产量相关性状进行关联分析, 获得了 51 个 SSR 位点与产量性状显著关联。王佩佩^[13]以 36 份产油量较好、观赏性较佳的牡丹为试验材料, 利用 16 对 SSR 标记与 25 个牡丹主要相关性状进行关联分析, 检测到 11 个 SSR 标记与 16 个目标性状显著关联。通过关联分析方法寻找与红花油脂相关性状紧密连锁的分子标记, 这不仅可以加快高品质红花分子标记辅助育种进程, 而且可为快速有效地进行相关基因定位和克隆提供了依据。

本研究以来自国内外不同地区的 74 份红花种质资源为研究对象, 利用 48 对多态性 SSR 标记分析其遗传多样性和群体遗传结构。并在此基础上采用 TASSEL3.0 软件进行关联分析, 寻找与红花种子油脂相关性状关联的 SSR 位点, 实现油脂性状关联的分子标记的定位, 为红花种质资源的创新和高油的红花品种培育提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究的红花种质资源来自中国农业科学院油料作物研究所的国家油料种质资源平台 (NICGR2018-014), 选取了 74 份遗传背景不同的红花品种为试验材料, 包括来自中国 12 个不同省、自治区的 28 份材料和国外 26 个不同国家的 46 份材料 (表 1)。所有红花材料种植于中南民族大学生命科学院红花种植基地中, 设置 3 次区组重复试验, 播种时间为 2018 年 10 月 13 日。待种子萌发至 3 周左右, 植株高度达到 10 cm 左右时取幼嫩叶片, 用于基因组 DNA 提取。收获后, 取颗粒饱满的种子测定油脂含量。

脂肪酸的测定参照李培江等^[14]的方法。

含油量测定: 将干燥的红花种子磨碎, 称取 2.00 g 与 50 mL 石油醚混合后, 超声波震荡 10 min, 提取液倒入干净的三角烧瓶中, 提取 2 次。随后回收石油

表 1 74 份红花品种名称及来源
Table 1 Name and the collection site of 74 safflower accessions

编号 Code	品种名称 Varieties name	来源 Countries or regions	编号 Code	品种名称 Varieties name	来源 Countries or regions	编号 Code	品种名称 Varieties name	来源 Countries or regions
1	吐鲁番有刺 -81	中国新疆	26	YH2239-1	中国云南	51	YH1431-1	伊朗
2	S-400-3	中国新疆	27	YH2353-1	中国云南	52	YH1441-1	叙利亚
3	花海有刺	中国甘肃	28	YH1839-1	中国云南	53	YH1441-2	叙利亚
4	临泽红花	中国甘肃	29	YH1296-1	土耳其	54	YH1442-1	阿富汗
5	延津有刺大红袍	中国河南	30	YH1453-1	印度	55	YH0404-1	伊朗
6	82- 选 -2	中国宁夏	31	YH1302-1	土耳其	56	YH0443-1	以色列
7	彰武红花	中国辽宁	32	YH1312-2	阿富汗	57	YH0445-1	西班牙
8	北镇红花	中国辽宁	33	YH1314-1	巴基斯坦	58	YH0446-1	西班牙
9	四川红花	中国四川	34	YH1314-2	巴基斯坦	59	YH0458-1	德国
10	813-1-1-4	中国新疆	35	YH1325-1	法国	60	YH0458-2	德国
11	高青红	中国山东	36	YH1335-1	比利时	61	YH0461-1	澳大利亚
12	资阳有刺	中国四川	37	YH1338-1	法国	62	YH0462-1	意大利
13	射阳红花	中国江苏	38	YH1339-1	匈牙利	63	YH0112-1	加拿大
14	YH1587-1	中国河南	39	YH1365-1	捷克	64	YH1163-1	阿根廷
15	YH1588-1	中国河北	40	YH1381-1	埃塞俄比亚	65	YH1311-1	墨西哥
16	YH1645-1	中国山东	41	YH1381-1	埃塞俄比亚	66	YH1323-1	墨西哥
17	YH1687-1	中国江苏	42	YH1394-1	利比亚	67	YH1358-1	美国
18	YH1687-2	中国江苏	43	YH1399-1	印度	68	YH1361-1	美国
19	YH1722-1	中国四川	44	YH1401-1	肯尼亚	69	YH1448-1	俄罗斯
20	YH1621-1	中国浙江	45	YH1198-1	摩洛哥	70	YH1482-2	埃及
21	YH1632-1	中国河南	46	YH1198-2	摩洛哥	71	YH1502-2	印度
22	YH1639-1	中国山东	47	YH1207-1	亚速尔群岛	72	YH1503-1	印度
23	YH1681-1	中国河北	48	YH1207-2	亚速尔群岛	73	YH1508-1	印度
24	YH1696-1	中国安徽	49	YH1224-1	印度	74	YH1534-1	俄罗斯
25	YH1760-1	中国云南	50	YH1225-1	伊朗			

醚,直至三角烧瓶无石油醚。含油量=[(油脂+三角烧瓶的质量)-三角烧瓶的质量]/样品质量×100%。试验重复3次。

1.2 种子含油量和脂肪酸组成测定

脂肪酸组成测定:干燥红花种子磨碎并称取 0.20 g,加入石油醚:乙醚(1:1,v:v)溶液 400 μL,振荡混匀,放置 40 min。再加入 KOH- 甲醇(0.4 mol/L)溶液 800 μL 混匀,放入超声波清洗器中振荡 10 min,再沿管壁加入 600 μL 双蒸水。待分层后,吸取 1 mL 上清液到自动进样小瓶,进行气相色谱测定。气相色谱条件:柱温 185 ℃,汽化室温度 250 ℃,检测室温度 250 ℃,载气(氮气)流速 60 mL/min,氢气流速 40 mL/min,空气流速 400 mL/min,出峰保留时间 13 min,进样量 2 μL,分流比 30:1。脂肪酸种类由峰保留时间与标准品对比确定,含量则用峰面积百分比表示,从而求出各个组分占脂肪酸总量的百分比。

1.3 基因组 DNA 提取及 SSR 标记扩增

采用改良后的 CTAB 法提取基因组 DNA,并用 1% 琼脂糖凝胶电泳和超微量紫外分光光度仪检测 DNA 的质量和浓度,将浓度统一稀释至 50 mg/L 左

右,-20 ℃下冰箱保存备用。在已开发的 SSR 标记中筛选出 48 对多态性及特异性好的引物(SSR 引物均由武汉擎科生物公司合成),引物详细信息见表 2。PCR 总反应体系为 10 μL,其中包含红花基因组 DNA 1 μL,2×Taq Plus Master Mix II(武汉擎科生物公司)5 μL,正反向引物各 0.25 μL,用 ddH₂O 补齐至 10 μL。PCR 反应程序为 94 ℃预变性 3 min;94 ℃变性 30 s,退火温度根据引物 T_m 值设定,时间为 30 s,72 ℃延伸 30 s,共 35 个循环;总延伸 5 min。扩增产物经 4.0% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,银染显色。

1.4 SSR 数据分析

电泳扩增条带在相同迁移率位置上,有带记为 1,无带记为 0,并将数据输入 Excel 中形成“01”数据矩阵。利用 Powermarker V 3.25 软件分析 SSR 遗传多样性,计算每个位点的等位基因数(Allele number)、多态性信息含量(PIC, polymorphism information content)和基因多样性系数(Gene diversity)。利用 NTSYS-pc2.1 软件计算不同红花品种间的遗传相似系数,并按照 UPGMA 方法进行聚类分析。

表 2 48 对 SSR 引物信息

Table 2 Information of 48 SSR markers used in the study

引物名称 Primer name	引物序列 (5' → 3') Primer sequence (5' → 3')	引物名称 Primer name	引物序列 (5' → 3') Primer sequence (5' → 3')
Ct82	F: ACCTTACCTGTCTCAAAAAGACAT R: TCCATATTCGTTCGTTGGTCT	Ct470	F: ATGGTCGAAGCCATAGAAGG R: ACTGTAAGCATCAATCAACCGA
Ct137	F: TGGCCTAAGGGTCAAATACCT R: CCATGTCCCCGTGTGTGAC	Ct486	F: GAACTCCACGTCTAAATAGTTG R: TAAGGCCCTGAATGTCGTTG
Ct147	F: TCGTGTTTAAGCAAAACAGCACA R: TGTGGGATCAGTTGAGGTGC	Ct488	F: TGGAGCTCTGAAAAGGCTTG R: TGGATGGAAGACACTTGAGA
Ct201	F: CTTTTATGTTTACCGTTGTTCCAA R: GCTCAACGCTACAAGTCTTACT	Ct496	F: AGAGTTCCCATGATCAGCT R: TTAGTTGTCGGTGCAGTGAG
Ct229	F: GGGTCAACTTGATCAAAGCCA R: CCAGATGGAATCGATGTATGTTAGT	Ct506	F: CGGCAACAAGTGTCCTTTAC R: CCATTCAGCAACTGCCAAAC
Ct253	F: TGGGCCTGAAATGATCCATG R: CCTAATGCCTTCTTCGCCAT	Ct509	F: GCAATTGGCCATAGGTGTTC R: TGGACCTTCCATTCTTACTTCTG
Ct272	F: TGGCGTTGTTGTTTCGGATA R: CCAAATGAAGAACACCGCCT	Ct520	F: CACAAAACCCACTTTCGCTTT R: GATAAGTCAAACACCGGCT
Ct280	F: AATGTTGTTGGTGAGCGAGA R: AGGGTCGATTGACTTTACGC	Ct525	F: GCTATGTGAATTTAGCGGCG R: CTCCTTCCATCTCCAATGGC
Ct285	F: CTTATGTCGGCTGCAGAACT R: AAGTGTTCGAAGCTTGGTG	Ct530	F: TGGAAGAAGGTGAGAAGAGAGA R: GTTGATACTGCTGGCTACCG
Ct293	F: ACATTCAAAGACCCATCCG R: CGCCGTTCTAGAGCACTATC	Ct535	F: TCTGGTTGGCGTTGAATTGA R: ACCAGAACTGCAATCCCAAC
Ct300	F: TCTAAGGACGAAAATAGCCA R: ACGGTTTCTCTATTTGGGGA	Ct538	F: TGGTTGCTAGTTTCGAGTTCG R: GACAAATTTGCCCACTGCT
Ct306	F: CACATCAGTCTCATCGCCAT R: CACATCTCCTCCTTCAACCG	Ct545	F: GTACCACCAATTTCAGCACT R: CACCTCTTCGTCTTCACTTG
Ct388	F: AAGAGATCTTTGATCGCGGG R: TGTACGGTGGAGGTTTCAGAT	Ct551	F: AAGACTGAGGTGAGACGAA R: CCAAATTTGTCTGCCTCCCT
Ct395	F: ATCTTTGCCCTTGCTGCGTG R: ATGAGATCCCAGGATGACCA	Ct554	F: TCCGGTGTCTAAAATGGA R: ACTCCTTTCCAATGATCGGT
Ct400	F: CCAAACCATCAATACAGGT R: CGGACGCTTTCGAAATTGG	Ct564	F: TGTGTTAATGATCCACAGGT R: ACGGCAGGATCAATCAACTC
Ct424	F: AGGAATGTTGGGCATTGGGA R: TCTCCAACTCAAACCTGCAA	Ct573	F: GTGGGCAGTCATCGGTTTAT R: ATTGGTTGCCCGTGTGTTGTA
Ct431	F: TCCATCTAATTCTGCAGCA R: GGTGATGAACCCATGATGTGA	Ct577	F: TGCCCATAAAGAACCTGGTT R: GGTAACATGGTTGGGTGGAG
Ct452	F: TTGCACCTCTTTAATGGCGT R: ATTGCTGCTTCTTCTCCGAG	Ct597	F: GTCAGTCTTTCCTCATAATTGC R: CAACTCCACCAAGGGAACT
Ct461	F: CTCATTGGCTCCCACTTTCA R: TAAACTCGAAGAAGCCGGTG	Ct600	F: TTAGGCACTTGAAGCACCAA R: AGCTCCAATGCTCGATCTTT
Ct602	F: GGTGGAGACCAACCTCAAAT R: GTATGAACCCGAGAACGAC	Ct631	F: ACATCCACAACACCTGCAAT R: GAGGAGGAAGGTGAGGAAGT
Ct609	F: GGGAATGCAGATGCCATTA R: TGAAATTGCTCCACCACCAA	Ct635	F: CCGTGCTCAAACTTTGACC R: GCGGATCGTCACTTATGAA
Ct613	F: CGAATCTCGATCATACCCC R: TGATCGAGAGACGGTGATGA	Ct641	F: TCGTACAACGGATTTAGCGG R: AGTCAACGGAAATGTCGATGA
Ct618	F: AATCGACCGCTCAAGATCAC R: AGGGAATCAAACGTCGTTAGG	Ct654	F: CCAACTCGTTTGCAACCCTA R: GCTCGAACTTATGGTCCCTC
Ct629	F: AGGTCAATCTTTGCGGTTT R: ACACAGTTTAATCCACACCGA	Ct658	F: TAGGTCCAACCATGCCACTA R: GGCCATTCCGATCGAAATCT

1.5 群体遗传结构分析

采用 Structure 2.3.4 软件对 74 个红花品种进行群体遗传结构分析,估计最佳亚群数 K,并计算

出材料相应 Q 值(第 I 材料属于第 k 亚群的概率)。具体分析方法:首先将多态性引物检测结果转换成 Structure 的数据格式,亚群数 K 值定义为 2~10,

采用的模拟算法为 MCMC (Markov Chain Monte Carlo), 并将开始时的不作数迭代设置为 50000, 再把不作数迭代后的 MCMC 均设置为 100000 次, 计算得到每个 K 值的后验概率 $\text{LnP}(D)$ 值, 并重复 3 次, 计算平均值, 但此数据绘制的折线图不能准确反映真正的 K 值, 需要通过 ΔK 值来确定一个合适的 K 值, ΔK 表示对数变化率, 公式为 $\Delta K = \text{mean}(|L''(K)|) / \text{sd}(L(K))$, 通过分析 ΔK 值的变化规律, 来判别合适的 K 值作为亚群数目。

1.6 标记与性状的关联分析

运用 TASSEL 3.0 软件中的一般线性模型 (GLM) 和混合线性模型 (MLM) 分别进行关联分析。在 GLM 分析中, 以每个材料的 Q 值作为分析的协变量, 对遗传标记变异和油脂相关性状变异数据进行回归分析, 找出与油脂相关性状相关联的标记并确定其解释率; 在 MLM 分析中, 采用群体结构 Q 值和亲缘关系 K 值相结合的方法进行回归分析, 确定关联位点及其解释率。

2 结果与分析

2.1 含油量和脂肪酸组成分析

对红花成熟种子脂肪酸含量进行测定, 获得了 C16:0 (棕榈酸)、C18:0 (硬脂酸)、C18:1 (油酸) 和 C18:2 (亚油酸), C18:3 (亚麻酸) 5 种脂肪酸的含量和含油量 (表 3), 并将测定结果进行了统计分析和相关分析 (表 4)。结果表明不同脂肪酸的含量和含油量在不同的红花品种之间有较大的变异。从含油量来看, 含量最高的红花是来源于伊朗的 YH0404-1 (21.84%), 最低的为中国安徽的 YH1696-1 (11.82%)。从脂肪酸组成含量来看, 来自法国的红花 FRA-1 与其他材料的脂肪酸组成差异很大, 油酸占比高达 81.30%, 而亚油酸占比才 11.29%, 与其他高亚油酸红花品种不同, 属于高油酸品种, 这为后续红花品种改良提供了宝贵材料。从变异系数来看, 亚麻酸的变异系数最大 (129.35%), 棕榈酸的变异系数最小 (10.16%)。相关分析结果表明油酸与亚油酸成显著负相关, 这与油脂代谢途径中油酸转化为亚油酸一致。

2.2 SSR 分子标记多态性分析

利用 48 对 SSR 引物对 74 份不同红花材料的基因组 DNA 进行 PCR 扩增, 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳分析得到“01”数据矩阵表, 并利用 Powermarker V 3.25 软件计算 SSR 分子标记的遗

传多样性 (表 5)。结果显示, 标记的多态性信息含量变异范围为 0.0632~0.3750, 平均为 0.2937; 基因多样性指数的变异范围为 0.0653~0.5000, 平均值为 0.3700; 48 对 SSR 引物的等位基因数均为 2。

2.3 红花种质资源的聚类分析

聚类分析结果表明, 74 份红花材料的遗传相似系数范围为 0.31~0.92, 平均值为 0.69, 在遗传相似系数为 0.66 处可将 74 份红花材料被分成 3 个类群 (图 1)。第 I 类群包含 7 份材料, 主要来自新疆、甘肃、云南、四川、辽宁 5 个地区; 第 II 类群包含了 52 份材料, 几乎涵盖了全部国外红花品种 (除西班牙和美国), 还包括了 8 个中国红花品种。第 III 类群有 15 份材料, 包括中国 13 个红花品种和 2 个国外品种。通过聚类分析发现, 红花之间的遗传相似性与红花的生长环境有很大关系, 这也表明红花种群内不同亚种间存在一定的遗传相似性。

2.4 群体遗传结构分析

利用 Structure 2.3.4 软件进行红花群体遗传结构分析, 对 74 份红花品种的 SSR 分析数据进行了重复 3 次的 1~10 亚群划分测试, 结果显示似然数 $\ln(P(D))$ 随假定亚群数 K 值的增大而持续增大, 没有出现明显的拐点, 因此通过 $\ln(P(D))$ 绘制 K 与 ΔK 曲线 (图 2)。当 K=3 时, ΔK 出现明显的峰值。由此推断, 74 个红花品种可以划分为 3 个亚群。以 K=3 时绘制供试材料群体结构的贝叶斯分配图 (图 3), 其中不同的颜色代表不同的亚群, 红色代表第 1 亚群, 绿色代表第 2 亚群, 蓝色代表第 3 亚群。通过亚群划分结果知道, 第 1 亚群包括 7 个品种, 占有所有材料总数的 9.5%。第 2 亚群包含了 55 品种, 占有所有材料的 74.3%。第 3 亚群包含了 12 个品种, 占有所有材料的 16.2%。根据遗传结构分析得到的 K 值计算出 74 份红花品种的 Q 值。当某一材料在某群体中 Q 值大于或等于 0.600 时, 则认为该材料的血缘关系比较单一, 相反则认为该材料的血缘关系来源复杂。一般 Q 值越大, 表示该品种属于该亚群的可能性就越大。根据供试材料在各个群体中的 Q 值分布可以表示各材料之间的关系。74 个红花品种中 $Q \leq 0.600$, 仅有 12 个品种, 占有所有供试材料总数的 16.2%, 包括来自中国山东、河南、辽宁、浙江、江苏和安徽的红花。Q 值大于 0.8 和 0.9 的品种分别占 74.3% 和 58.1%, 说明大部分品种在各群体中血缘关系比较单一, 较少的品种含有其他类群的遗传成分。

表 3 红花种子含油量及其脂肪酸组成

Table 3 Oil content and fatty acid composition of safflower seeds

序号 Code	品种名称 Varieties name	含油量 Oil content	脂肪酸				亚油酸 Linoleic acid	亚麻酸 Linolenic acid
			棕榈酸 Palmitic acid	硬脂酸 Stearic acid	油酸 Oleic acid	亚油酸 Linoleic acid		
1	吐鲁番有刺-81	20.70	5.01	1.99	8.46	83.61	0.03	
2	S-400-3	13.20	5.28	1.95	9.04	82.70	0.09	
3	花海有刺	17.30	4.74	1.99	10.00	81.93	0.04	
4	临泽红花	19.27	4.66	2.06	8.97	83.41	0.03	
5	延津有刺	17.58	5.14	1.39	11.34	80.56	0	
6	大红袍	18.29	4.39	1.73	17.41	75.34	0	
7	82-选-2	18.99	4.13	1.56	9.46	83.60	0.07	
8	彰武红花	17.24	4.22	1.60	9.01	83.55	0.03	
9	北镇红花	17.87	4.66	1.96	14.82	77.34	0	
10	四川红花	19.61	4.44	2.05	8.43	84.02	0.08	
11	813-1-14	19.18	4.98	2.08	10.25	81.37	0.03	
12	高青红	18.39	5.07	1.92	8.46	83.49	0	
13	资阳有刺	16.50	4.24	1.49	9.87	83.49	0	
14	射阳红花	18.67	4.57	2.05	10.73	81.45	0.04	
15	YH1587-1	16.95	4.66	1.58	12.50	79.87	0	
16	YH1588-1	18.31	4.67	1.86	12.79	79.27	0.04	
17	YH1645-1	18.61	5.32	2.08	8.51	83.09	0	
18	YH1687-1	17.75	4.87	1.93	9.86	81.88	0.05	
19	YH1687-2	16.32	4.44	2.16	13.09	79.15	0.04	
20	YH1722-1	18.33	4.68	1.83	11.03	81.37	0	
21	YH1621-1	18.10	4.85	2.14	10.91	80.90	0	
22	YH1632-1	19.01	4.82	2.23	10.76	81.11	0	
23	YH1639-1	16.67	5.24	1.83	11.84	80.02	0.06	
24	YH1681-1	11.82	4.32	1.88	12.30	80.33	0.03	
25	YH1696-1	15.36	4.89	1.97	12.00	79.87	0.06	
26	YH1760-1	17.63	4.93	2.04	14.78	77.20	0.04	
27	YH2239-1	19.54	4.92	2.43	12.73	79.03	0	
28	YH2353-1	17.55	5.86	2.11	10.41	80.59	0	
29	YH1839-1	20.20	5.56	2.38	12.52	78.57	0	
30	YH1296-1	19.20	4.80	2.12	11.97	80.18	0	
31	YH1453-1	18.99	5.33	2.17	10.10	81.41	0	
32	YH1302-1	14.62	4.65	1.89	8.38	84.15	0	
33	YH1312-2	17.99	2.79	2.07	10.85	83.36	0	
34	YH1314-1	18.09	5.10	1.90	10.26	81.77	0.04	
35	YH1314-2	20.75	4.31	2.15	81.30	11.29	0	
36	YH1325-1	18.72	5.17	3.22	7.13	83.36	0.04	
37	YH1335-1	17.09	5.09	2.09	13.07	78.79	0	
38	YH1339-1	19.60	5.27	2.41	9.25	81.93	0.04	
39	YH1365-1	16.93	5.67	1.85	16.42	75.01	0	
40	YH1381-1	14.08	5.39	2.02	8.97	82.64	0	
41	YH1381-1	14.03	5.32	2.85	10.05	80.59	0.04	
42	YH1394-1	18.03	5.39	2.45	14.42	76.52	0	
43	YH1399-1	17.91	4.66	1.73	11.29	81.45	0	
44	YH1401-1	20.78	5.38	2.19	11.51	79.83	0	
45	YH1198-1	18.90	4.54	2.06	11.28	81.08	0.08	
46	YH1198-2	18.25	4.74	2.58	13.05	78.45	0	
47	YH1207-1	15.18	5.44	2.33	8.85	82.21	0	
48	YH1207-2	17.17	5.72	2.64	10.14	80.33	0	
49	YH1224-1	19.50	5.27	2.10	10.56	81.03	0.04	
50	YH1225-1	16.31	5.26	2.04	14.69	76.96	0	
51	YH1431-1	16.96	5.28	2.20	11.59	79.99	0	
52	YH1441-1	16.41	5.60	1.94	10.10	81.17	0.08	
53	YH1441-2	17.29	5.68	1.96	11.66	79.64	0	
54	YH1442-1	18.36	5.52	1.82	9.84	81.93	0	
55	YH0404-1	21.84	5.61	2.07	10.66	80.72	0	
56	YH0443-1	17.70	5.11	2.09	14.57	77.28	0	
57	YH0445-1	17.75	5.11	2.21	11.47	80.25	0.17	
58	YH0446-1	20.17	5.33	2.15	7.75	83.79	0.04	
59	YH0458-1	20.38	5.10	1.84	10.02	82.15	0.03	
60	YH0458-2	17.87	5.66	1.68	9.82	82.00	0.03	
61	YH0461-1	20.03	5.19	2.77	8.59	82.40	0	
62	YH0462-1	18.83	5.34	2.35	10.30	80.94	0	
63	YH0112-1	18.83	4.98	2.27	12.51	79.14	0	
64	YH1163-1	18.93	6.04	2.57	9.51	80.71	0.04	
65	YH1311-1	21.19	5.01	2.44	8.81	82.73	0.04	
66	YH1323-1	19.52	4.71	2.71	12.39	79.00	0.07	
67	YH1358-1	18.82	5.03	2.23	12.09	79.81	0	
68	YH1361-1	19.11	5.96	2.12	9.22	81.20	0.04	
69	YH1448-1	20.58	4.82	1.76	12.13	80.59	0	
70	YH1482-2	14.39	4.60	2.03	10.74	81.83	0	
71	YH1502-2	16.71	4.96	2.12	12.77	79.25	0.09	
72	YH1503-1	16.57	4.48	2.13	12.00	80.24	0.06	
73	YH1508-1	17.25	4.83	2.14	10.50	81.45	0.06	
74	YH1534-1	20.98	5.61	1.57	7.84	84.07	0.08	

表 4 含油量和 5 种脂肪酸组成的统计分析

Table 4 Statistical analysis of oil content and five compositional traits

项目 Project	含量指标 Content index	含油量 Oil content	棕榈酸 Palmitic acid	硬脂酸 Stearic acid	油酸 Oleic acid	亚油酸 Linoleic acid	亚麻酸 Linolenic acid
统计分析 Statistical analysis	最大值(%)	21.84	6.04	3.22	81.30	84.15	0.17
	最小值(%)	11.82	2.79	1.39	7.13	11.29	0
	平均值(%)	18.02	5.01	2.09	11.93	79.90	0.03
	方差	3.62	0.26	0.10	70.96	69.54	0
	标准差	1.90	0.51	0.32	8.42	8.34	0.03
	变异系数(%)	10.56	10.16	15.62	70.62	10.44	129.35
相关分析 Related analysis	含油量		0.09	0.13	0.13	-0.14	-0.06
	棕榈酸	0.09		0.24*	-0.19	0.12	-0.03
	硬脂酸	0.13	0.24*		0	-0.05	0
	油酸	0.13	-0.19	0		-0.99**	-0.14
	亚油酸	-0.14	0.12	-0.05	-0.99**		0.14
	亚麻酸	-0.06	-0.03	0.00	-0.14	0.14	

* 在 0.05 水平(双侧)上显著相关,** 在 0.01 水平(双侧)上显著相关

**significant correlation at 0.05 level(bilateral) and **significant correlation at 0.01 level(bilateral)

表 5 SSR 引物的遗传多样性分析

Table 5 Genetic diversity analysis of 22 SSR markers

标记 Marker	等位基因数 No.of allele	基因多样性 Gene diversity	多态信息含量 <i>PIC</i>	标记 Marker	等位基因数 No.of allele	基因多样性 Gene diversity	多态信息含量 <i>PIC</i>
Ct82	2.0000	0.0653	0.0632	Ct509	2.0000	0.4942	0.3721
Ct137	2.0000	0.4383	0.3422	Ct520	2.0000	0.2137	0.1908
Ct147	2.0000	0.4795	0.3645	Ct525	2.0000	0.4668	0.3579
Ct201	2.0000	0.2747	0.2370	Ct530	2.0000	0.2717	0.2348
Ct229	2.0000	0.2137	0.1908	Ct535	2.0000	0.4533	0.3506
Ct253	2.0000	0.4795	0.3645	Ct538	2.0000	0.3539	0.2913
Ct272	2.0000	0.1713	0.1566	Ct545	2.0000	0.4890	0.3694
Ct280	2.0000	0.4843	0.3670	Ct551	2.0000	0.5000	0.3750
Ct285	2.0000	0.4635	0.3561	Ct554	2.0000	0.4977	0.3739
Ct293	2.0000	0.1734	0.1584	Ct564	2.0000	0.4284	0.3366
Ct300	2.0000	0.3232	0.2710	Ct573	2.0000	0.2625	0.2281
Ct306	2.0000	0.3716	0.3025	Ct577	2.0000	0.2896	0.2477
Ct388	2.0000	0.3944	0.3167	Ct597	2.0000	0.4429	0.3448
Ct395	2.0000	0.2137	0.1908	Ct600	2.0000	0.3682	0.3004
Ct400	2.0000	0.4297	0.3374	Ct602	2.0000	0.2896	0.2477
Ct424	2.0000	0.4996	0.3748	Ct609	2.0000	0.1822	0.1656
Ct431	2.0000	0.2337	0.2064	Ct613	2.0000	0.3944	0.3167
Ct452	2.0000	0.4334	0.3395	Ct618	2.0000	0.0778	0.0748
Ct461	2.0000	0.4890	0.3694	Ct629	2.0000	0.4586	0.3535
Ct470	2.0000	0.4397	0.3430	Ct631	2.0000	0.4635	0.3561
Ct486	2.0000	0.1602	0.1474	Ct635	2.0000	0.4766	0.3630
Ct488	2.0000	0.4766	0.3630	Ct641	2.0000	0.4736	0.3615
Ct496	2.0000	0.4985	0.3743	Ct654	2.0000	0.5000	0.3750
Ct506	2.0000	0.2580	0.2247	Ct658	2.0000	0.4474	0.3473

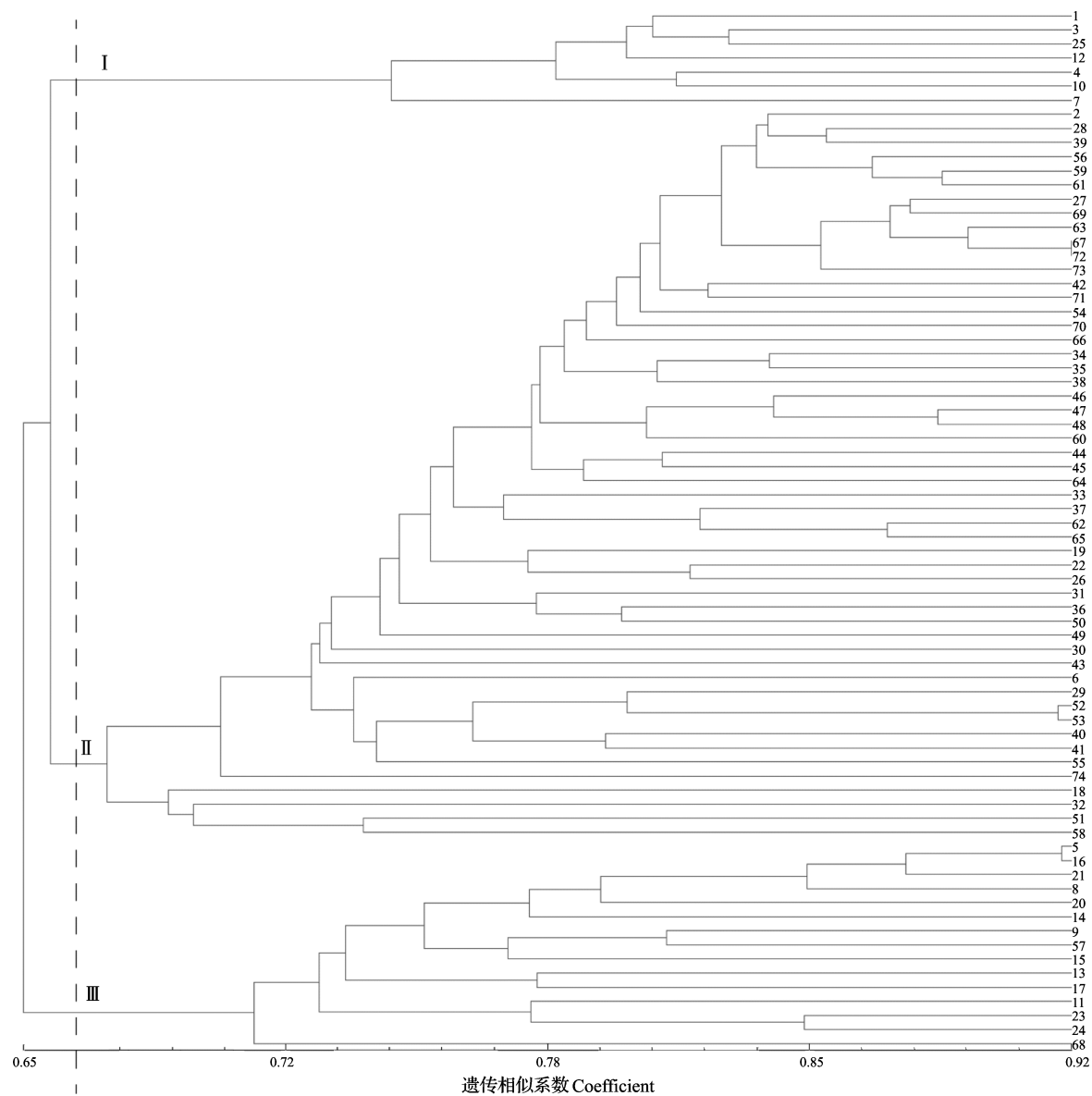


图 1 74 个红花品种的 UPGMA 聚类图
Fig.1 UPGMA clustering diagram of 74 safflower varieties

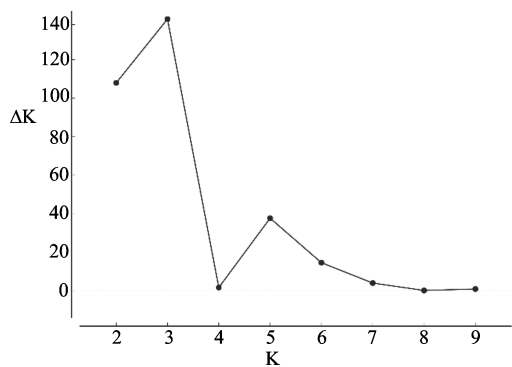


图 2 似然对数的变化折线图
Fig.2 Line chart of ΔK with change of K-values

2.5 SSR 标记与油脂性状的关联分析

运用 TASSEL3.0 软件,以每个个体对应的 Q

值作为协变量,分别基于 GLM 和 MLM 模型,将 48 对引物的分子数据与 74 份红花品种 6 个油脂性状的测定值,包括含油量、棕榈酸、硬脂酸、油酸、亚油酸、亚麻酸进行关联分析,找到与数量性状基因相关的表型变异及其等位变异,并确定表型变异的解释率(表 6)。

GLM 分析结果显示,在 $P<0.05$ 显著性水平下,有 18 个标记与所检测的油脂性状相关联,占关联引物的 37.50%,各标记对表型变异的解释率在 5.42%~20.69% 之间,平均值为 8.03%,解释率最大的标记为 Ct568,与棕榈酸相关,解释率为 20.69%;解释率最小的标记为 Ct545,与棕榈酸相关,解释率为 5.42%。其中标记 Ct82、Ct178、Ct520 和 Ct649

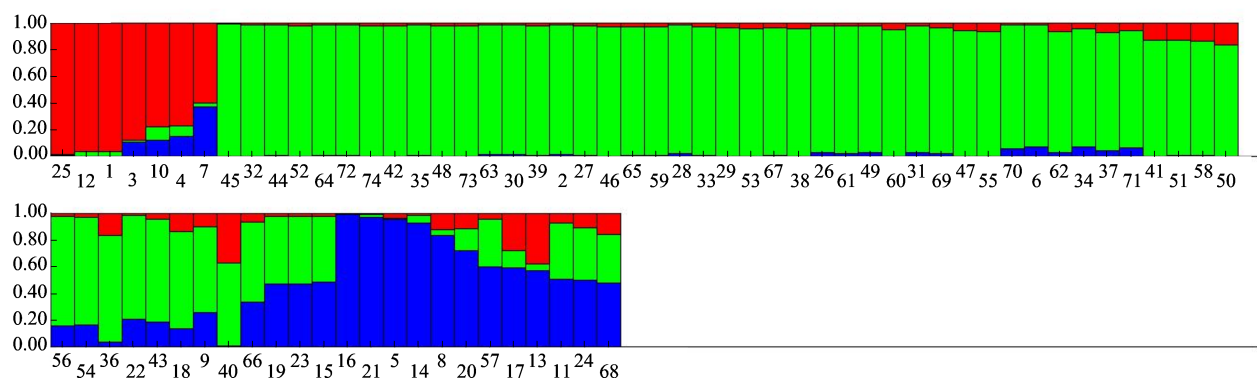


图3 红花群体遗传结构 (K=3)
Fig.3 Population structure of 74 safflower accessions (K=3)

表 6 与性状显著关联 ($P<0.05$) 的标记及其对表型变异的解释率
Table 6 The molecular markers associating with traits and the phenotypic variation (%)

标记 Marker	含油量		棕榈酸		硬脂酸		油酸		亚油酸		亚麻酸	
	Oild content		Palmitic acid		Stearic acid		Oleic acid		Linoleic acid		Linolenic acid	
	GLM	MLM	GLM	MLM	GLM	MLM	GLM	MLM	GLM	MLM	GLM	MLM
Ct82	5.57	5.72	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Ct90	—	—	6.47	6.47	—	—	—	—	—	—	—	—
Ct178	5.50	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Ct285	—	—	9.61	9.61	—	—	—	—	—	—	—	—
Ct424	—	—	—	—	6.46	5.60	—	—	—	—	—	—
Ct461	—	—	—	—	5.79	6.02	—	—	—	—	—	—
Ct484	—	—	5.56	5.56	—	—	—	—	—	—	—	—
Ct489	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	6.05	6.10
Ct519	—	—	—	—	—	—	5.99	6.00	6.24	6.24	—	—
Ct520	9.54	9.31	—	—	—	—	—	—	—	—	6.65	6.58
Ct545	—	—	5.42	5.42	—	—	—	—	—	—	—	—
Ct568	—	—	20.69	20.69	—	—	—	—	—	—	6.57	6.54
Ct589	—	—	—	—	—	4.35	—	—	—	—	—	—
Ct597	—	—	—	—	—	—	13.40	13.37	12.86	12.86	—	—
Ct600	—	—	—	—	7.77	8.87	—	—	—	—	—	—
Ct613	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	6.88	6.89
Ct649	7.37	7.44	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Ct658	—	—	8.19	8.19	—	—	—	—	—	—	—	—

— 表示标记与性状未关联
—indicates that the marker is not associated with the trait

同时与含油量关联; 标记 Ct90、Ct285、Ct484、Ct545、Ct568 和 Ct658 同时与棕榈酸关联; 标记 Ct424、Ct461 和 Ct600 同时与硬脂酸关联; 标记 Ct519 和 Ct597 同时与油酸和亚油酸关联; 标记 Ct489、Ct520、Ct568 和 Ct613 同时与亚麻酸关联。18 个标记中有 4 个标记同时与 2 个油脂性状关联。

MLM 分析结果显示, 在 $P<0.05$ 显著性水平下, 有 18 个标记与所检测的 6 个油脂性状相关联, 占关联引物的 37.50%, 各标记对性状的表型变异的解释率为 4.35%~20.69%, 平均值为 7.99%, 解释率最大的标记为 Ct568, 与棕榈酸相关, 解释率为 20.69%; 解释率最小的标记为 Ct589, 与硬脂酸相关, 解释率为 4.35%。MLM 分析结果与 GLM 比较, 除标记 Ct589 在 MLM 中检测到与硬脂酸相关, 但在 GLM 中未检测到与硬脂酸相关, Ct178 在 GLM

中检测到与含油量相关, 但在 MLM 中未检测到, 其他标记只是表型解释率存在微小差异。

3 讨论

在进行关联分析前, 首先要对种质资源进行遗传多样性及群体结构分析, 这是为了消除群体引起的伪关联, 保证了关联分析的准确性^[15]。种质资源的遗传多样性研究是遗传改良及新品种选育中亲本选配的重要依据。利用分子标记技术开展红花遗传多样性及遗传背景的研究, 已有较多报道^[16-24]。如江磊等^[21]利用 SRAP 技术对来源于中国不同地区的 11 份红花品种进行了遗传多样性分析, 并将 11 份红花材料分为四类。唐小慧等^[22]利用 SSR 分子标记分析了我国 34 份红花品种的遗传多样性, 并将其分为 4 个类群。闫诚等^[23]利用 RAPD 分子标

记技术分析了国内 11 个省的 20 份红花品种间的遗传多样性,在遗传距离为 0.38 处将 20 个红花品种分为 4 个类群,发现红花不同品种之间的遗传多样性可能与地理分布存在一定相关性。本研究选用了 48 对 SSR 分子标记分析了 74 份红花材料的遗传多样性,48 对 SSR 标记的平均多态性信息含量为 0.2937,其中 32 个标记的多态性信息含量大于 0.25,属于中度多态性信息含量。通过遗传相似系数对红花进行聚类分析,在遗传相似系数为 0.66 水平上可以聚类为 3 个类群,分别包括 7 份、52 份和 15 份材料,群体结构分析将 74 份材料分为 3 大亚群,分别包括 7 份、55 份和 12 份材料。两者聚类结果差异很小。UPGMA 聚类中第Ⅲ类群中的 YH1588、YH1681 和四川红花在群体结构分析中被聚类为第 2 亚群,可能是因为这 3 个品种红花 Q 值接近 0.50,所以在群体结构分析时被分在第 2 亚群,其他红花品种两种聚类结果一致。结果说明本研究群体结构分析结果可靠,适合用于关联分析。本研究与前人相比,所选择的红花材料数目多、遗传多样性丰富,进行遗传分析的标记为 SSR 标记,多态性信息含量较高,选择的标记数目较多,得到的结果比较准确可靠。

王娟等^[25]利用 ASSEL 软件对 118 份陆地棉种质资源的衣分、单铃重、单株铃数及子指等 4 个产量相关性状与 214 对 SSR 标记进行了关联分析。在显著条件下 ($-\lg(p) > 1.3$),共有 39 个标记位点能够在两个及两个以上环境中同时检测到,其中有 4 个标记位点同时与两个以上性状相关联,有 7 个位点与前人研究结果一致,其余 32 个位点为新发现的位点。顾竞等^[26]采用 TASSEL 软件的一般线性模型,利用 59 个 SSR 标记对 192 份豌豆种质的 19 个形态性状进行关联分析,共检测出 32 个 SSR 标记位点与 14 个表型性状相关联,一些 SSR 标记与 2 个或多个形态性状相关联。在红花中,目前研究较多的为农艺性状与遗传标记的相关性^[27-28],而品质性状与遗传标记的关联分析鲜有报道。本研究通过 GLM 和 MLM 两种模型分析,在显著水平 $P < 0.05$ 的条件下,都检测到了 18 个与 6 个油脂相关联的标记,在 MLM 中检测的 16 个标记在 GLM 同样能检测到,但某些标记对表型的解释率存在微小差异。其中标记 Ct519 和 Ct597 同时与油酸和亚油酸关联, Ct520 同时与含油量和亚麻酸关联, Ct568 同时与棕榈酸和亚麻酸关联,说明这些标记可以实现多个目标性状的同步改良。本研究中,采用了两种模型分析了标记与目标性状的关联性,不仅考虑

了群体结构 Q 值的影响,还考虑了亲缘关系 K 值对关联分析的影响,提高了关联分析的准确性。本研究使用关联分析确定了与红花油脂相关性状显著相关的 SSR 标记,研究结果为红花种质资源的合理利用与保护、分子标记辅助育种奠定重要的理论基础。然而,各个标记是如何调节红花种子含量以及脂肪酸组成的分子机制,仍然需要开展更深入的研究来验证。

综上所述,本研究首次将 SSR 标记与油脂相关性状的关联分析应用于红花中,所选择群体的油脂相关性状等遗传变异丰富。研究结果得出,通过 GLM 和 MLM 两种模型分析,在显著水平 $P < 0.05$ 的条件下,都检测到了 18 个与含油量、棕榈酸、硬脂酸、油酸、亚油酸和亚麻酸关联的标记。研究表明,关联分析对红花油脂相关性状的分析提供了一种有效的方法,有助于找到红花中与油脂相关性状紧密连锁的分子标记,为更好的研究红花油脂相关性状的基因定位和分子标记辅助育种奠定了基础。但本研究选取的标记数目还不够,研究所关联到的变异位点只是粗略的定位。更高精度的关联分析还需要加大标记的数量和密度,增大群体规模,并通过重测序技术进行 SNP 的关联分析,从而为高效发掘红花优良基因奠定基础。

参考文献

- [1] Duan J L, Wang J W, Guan Y, Yin Y, Wei G, Cui J, Zhou D, Zhu Y R, Quan W, Xi M M, Wen A D. Safflower yellow a protects neonatal rat cardiomyocytes against anoxia/reoxygenation injury in vitro. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2013, 34 (4): 487-495
- [2] Han S Y, Li H X, Ma X, Zhang K, Ma Z Z, Tu P F. Protective effects of purified safflower extract on myocardial ischemia in vivo and in vitro. *Phytomedicine International Journal of Phytotherapy & Phytopharmacology*, 2009, 16 (8): 694-702
- [3] Gecgel U, Demirci M, Esendal E, Tasan M. Fatty acid composition of the oil from developing seeds of different varieties of safflower (*Carthamus tinctorius* L.). *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 2007, 84 (1): 47-54
- [4] Kim S, Cha J, Jeong S. Properties of the chemical composition of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) sprout. *Korean Journal of Life Science*, 2000, 10 (2): 68-73
- [5] 王书云, 李国玉, 黄健, 王航宇, 张珂, 王金辉. GC 法测定维吾尔药红花籽和红花籽油中亚油酸的含量. *中国药师*, 2013, 16 (1): 13-16
Wang S Y, Li G Y, Huang J, Wang H Y, Zhang K, Wang J H. Determination of linoleic acid in Uyghur medicine safflower seed and safflower seed oil by GC. *China Pharmacist*, 2013, 16 (01): 13-16
- [6] 曹世江. 红花 *FAD2* 基因家族的克隆及高油酸红花分子机制研究. 长春: 东北师范大学, 2013
Cao S J. The cloning and molecular characterization of safflower *FAD2* gene family with particular reference on high oleic genotype. Changchun: Northeast Normal University, 2013

- [7] Ohlrogge J, Browse J. Lipid biosynthesis. *Plant Cell*, 1995, 7: 957-970
- [8] Ohlrogge J. Regulation of fatty acid synthesis. *Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 1997, 48: 109-136
- [9] 鲁中爽, 刘思言, 李广隆, 王蕊, 刘明明, 么梦凡, 关淑艳, 姚丹. 大豆油脂的合成途径及关键酶 *GPAT* 基因的研究进展. *广东农业科学*, 2018, 45(11): 7-13
Lu Z S, Liu S Y, Li G L, Wang R, Liu M M, Yao M F, Guan S Y, Yao D. The synthetic pathway of soybean oil and the research progress of its key enzyme *GPAT* gene. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2018, 45(11): 7-13
- [10] 周丹, 赵江哲, 柏杨, 张群, 井文, 章文华. 植物油脂合成代谢及调控的研究进展. *南京农业大学学报*, 2012, 35(5): 77-86
Zhou D, Zhao J Z, Bai Y, Zhang Q, Jing W, Zhang W H. Research advance in triacylglycerol synthesis, metabolism, and regulation in plants. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2012, 35(5): 77-86
- [11] 赵新燕. 野生花生含油量与 SSR 标记的关联分析. 北京: 中国农业科学院, 2011
Zhao X Y. Association analysis of SSR markers with oil content in wild arachis accessions. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2011
- [12] 宫慧慧, 张玉娟, 宋华东, 赵逢涛, 孟庆华. 芝麻产量相关性状与 SSR 标记的关联分析. *中国油料作物学报*, 2018, 40(2): 181-190
Gong H H, Zhang Y J, Song H D, Zhao F T, Meng Q H. Genetic diversity and association mapping between SSR markers and yield traits in sesame. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 2018, 40(2): 181-190
- [13] 王佩佩. 油用牡丹主要相关性状与 SSR 标记的关联分析. 郑州: 河南农业大学, 2018
Wang P P. Correlation analysis of main correlation traits and SSR markers in oil peony. Zhengzhou: Henan Agricultural University, 2018
- [14] 李培江, 米瑶, 余竟, 李碧娟, 廖芳, 李关荣. 美国引进向日葵种子含油量和脂肪酸组成比较分析. *中国油脂*, 2015, 40(11): 104-106
Li P J, Mi Y, Yu J, Li B J, Liao F, Li G R. Comparison of oil contents and fatty acid compositions of sunflower seeds introduced from the US. *China Oils and Fats*, 2015, 40(11): 104-106
- [15] 孟亚雄, 孟祎林, 汪军成, 司二静, 张海娟, 任盼荣, 马小乐, 李葆春, 杨轲, 王化俊. 青稞遗传多样性及其农艺性状与 SSR 标记的关联分析. *作物学报*, 2016, 42(2): 180-189
Meng Y X, Meng Y L, Wang J C, Si E J, Zhang H J, Ren P R, Ma X L, Li B C, Yang K, Wang H J. Genetic diversity and association analysis of agronomic characteristics with SSR markers in hulless barley. *Acta Agronomica Sinica*, 2016, 42(2): 180-189
- [16] 郭丽芬, 徐宁生, 张跃, 张锡顺, 刘旭云, 胡尊红, 胡学礼, 杨谨. 云南红花种质资源主要农艺性状的遗传多样性分析. *植物遗传资源学报*, 2012, 13(2): 219-225
Guo L F, Xu N S, Zhang Y, Zhang X S, Liu X Y, Hu Z H, Hu X L, Yang J. Genetic diversity analysis of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) germplasm resources from Yunnan province. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2012, 13(2): 219-225
- [17] Chapman M A, Hvala J, Strever J, Matvienko M, Kozik A, Michelmore R W, Tang S X, Knapp S J, Burke J M. Development, polymorphism, and cross-taxon utility of EST-SSR markers from safflower (*Carthamus tinctorius* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 2009, 120(1): 85-91
- [18] Naresh V, Yamini K N, Rajendrakumar P, Kumar V D. EST-SSR marker-based assay for the genetic purity assessment of safflower hybrids. *Euphytica*, 2009, 170(3): 347-353
- [19] Hamdan Y A S, Garcia-Moreno M J, Redondo-Nevado J, Velasco L, Pérez-Vich B. Development and characterization of genomic microsatellite markers in safflower (*Carthamus tinctorius* L.). *Plant Breeding*, 2011, 130(2): 237-241
- [20] Barati M, Arzani A. Genetic diversity revealed by EST-SSR markers in cultivated and wild safflower. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2012, 44: 117-123
- [21] 江磊, 李刚, 岳帅, 刘虹, 严兴初, 覃瑞. 11 个红花品种遗传多样性与亲缘关系的 SRAP 分析. *中国油料作物学报*, 2013, 35(5): 546-550
Jiang L, Li G, Yue S, Liu H, Yan X C, Qin R. Analysis of genetic diversity and relationship of 11 *Carthamus tinctorius* L. varieties by SRAP. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 2013, 35(5): 546-550
- [22] 唐小慧, 任超翔, 陈江, 吴沂芸, 吴清华, 裴瑾. 利用 SSR 分子标记分析我国红花主要栽培品种遗传多样性. *中药材*, 2017, 40(12): 2800-2804
Tang X H, Ren C X, Chen J, Wu Y Y, Wu Q H, Pei J. Genetic diversity analysis of safflower mainly cultivated in China using SSR molecular markers. *Journal of Chinese Medicinal Materials*, 2017, 40(12): 2800-2804
- [23] 闫诚, 高武军, 刘林, 邓传良, 孙富丛, 卢龙斗. 基于 RAPD 技术的红花品种遗传多样性分析. *河南师范大学学报: 自然科学版*, 2012, 40(1): 133-137
Yan C, Gao W J, Liu L, Deng C L, Sun F C, Lu L D. Genetic diversity analysis in safflowers based on RAPD. *Journal of Henan Normal University: Natural Science*, 2012, 40(1): 133-137
- [24] Zhang L, Huang B B, Kai G Y, Guo M L. Analysis of intraspecific variation of Chinese *Carthamus tinctorius* L. using AFLP markers. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2006(1): 91-96
- [25] 王娟, 董承光, 刘丽, 孔宪辉, 王旭文, 余渝. 陆地棉主要产量相关性状的 SSR 标记关联分析. *植物遗传资源学报*, 2017, 18(4): 720-727
Wang J, Dong C G, Liu L, Kong X H, Wang X W, Yu Y. Association analysis of yield-related traits with SSR markers in upland cotton (*Gossypium hirsutum*). *Journal of Plant Genetic Resources*, 2017, 18(4): 720-727
- [26] 顾竟, 李玲, 宗绪晓, 王海飞, 关建平, 杨涛. 豌豆种质表型性状 SSR 标记关联分析. *植物遗传资源学报*, 2011, 12(6): 833-839
Gu J, Li L, Zong X X, Wang H F, Guan J P, Yang T. Association analysis between morphological traits of pea and its polymorphic SSR markers. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2011, 12(6): 833-839
- [27] Ebrahimi F, Majidi M M, Arzani A, Mohammadi-Nejad G. Association analysis of molecular markers with traits under drought stress in safflower. *Crop and Pasture Science*, 2017, 68(2): 167
- [28] Ambreen H, Kumar S, Kumar A, Agarwal M, Jagannath A, Goel S. Association mapping for important agronomic traits in safflower (*Carthamus tinctorius* L.) core collection using microsatellite markers. *Frontiers in Plant Science*, 2018, 9: 402