

湖南农业大学

硕士学位论文

亚麻 RAPD 和微卫星标记开发
与遗传多样性分析

二〇〇九年四月

分类号_____

U D C_____

密 级_____

单位代码 10537_____

湖南农业大学

硕士学位论文

亚麻 RAPD 和微卫星标记开发与遗传多样性分析 Flax RAPD and Microsatellite Marker Development and Genetic Diversity Analysis

研究生姓名 何东锋

指导教师 陈信波

学科专业 生化与分子生物学

研究方向 植物分子生物学

提交论文日期 2009 年 4 月 22 日 论文答辩日期 2009 年 5 月 31 日

答辩委员会主席 罗泽民 论文评阅人 梁满中 周畅 杨跃生

学位授予日期 _____

二 00 九 六 月

独创性声明

本人声明所提交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得湖南农业大学或其它教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了谢意。

研究生签名：

时间： 年 月 日

关于论文使用授权的说明

本人完全了解湖南农业大学有关保留、使用学位论文的规定，即：学校有权保留送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。同意湖南农业大学可以用不同方式在不同媒体上发表、传播学位论文的全部或部分内容。

(保密的学位论文在解密后应遵守此协议)

研究生签名：

时间： 年 月 日

导师签名：

时间： 年 月 日

摘 要

亚麻 (*Linum usitatissimum*) 是我国麻类重要的纤维原料作物和特色经济作物之一。分子标记技术应用于亚麻的研究, 对亚麻亲缘关系与遗传多样性分子遗传育种、种质鉴定、基因定位、及遗传图谱构建及资源保护利用等研究提供了极大的便利。本研究开发了 RAPD 标记和微卫星标记, 并对不同亚麻品种进行了遗传多样性分析。

1. 从 600 个随机引物筛选出 28 个扩增稳定性较好的多态性 RAPD 标记, 并利用这些标记对 18 份来自不同国家和地区的亚麻资源遗传多态性进行 RAPD 分析。结果表明: 28 对 RAPD 引物共扩增出条带 529, 其中多态性条带 201, 总的多态性百分率 (PPB) 为 38.0%。用 NTSYSpc (2.10) 软件进行 UPGMA 聚类分析, 18 个亚麻品种遗传距离为 0.0469~0.1332 之间, 可分 3 大类, 其中红木 5 号与匈牙利 5 号亲缘关系最近, ABYSSINIA (BROWN) 和匈牙利 5 号遗传距离相差最显著, 达到 0.1332。

2. 应用 DynaI 磁珠-生物素标记的 (TTC)₁₀ 和 (ATC)₁₀ 与亚麻基因组 DNA 酶切片段杂交, 捕获含有微卫星序列的 300~1500 bp DNA 片段, 连接到 pMD18-T 载体中, 构建富集微卫星的小片段插入文库。利用接头引物和根据微卫星核心序列设计的引物 VRV (TTC)₁₀ 和 VRV (ATC)₁₀ 使用 PCR 对文库筛选, 从 1979 个转化子中得到 447 个可能含有微卫星序列的阳性克隆。对这些阳性克隆的测序结果证实其中的 274 个含有微卫星序列。微卫星序列的富集效率为 22.6%, PCR 扩增筛选效率 96.7%。共设计 92 对 SSR 引物, 对白花、山西大同、NDR714、WINONA SEL、K-1195、BETHVE、SOMME、WATSON 共 8 个国内外亚麻品种材料, 进行多态性 SSR 引物筛选。有 90 对引物扩增出产物, 获得了 35 对多态性丰富的有效 SSR 引物。

关键词: 亚麻 (*Linum usitatissimum*); 分子标记; 遗传多样性; RAPD 标记; 微卫星标记

Abstract

Flax(*Linum usitatissimum*) is one of the most important fiber crops and special economic crops in china. Molecular markers can be used in flax research on genetic relationships and genetic diversities, genetic linkage map construction and conservation and utilization of the genetic resources. In this paper, flax RAPD and SSR markers were devoleped and used to analyze the genetic diversity in different flax cultivars.

1. Twenty eight effective polymorphic RAPD primers were selected from six hundred primers for the genetic diversity analysis of 18 different flax varieties from different countries and regions. A total number of 528 loci were amplified, among which 201 are polymorphic and the percentage of polymorphic loci(PPB) is 38.0%. The dendrogram constructed according to UPGMA by NTSYSpc, ver.2.10 showed that 18 flax varieties could be divided into three groups with genetic distance from 0.0469 to 0.1308. This experiment demonstrated that the 18 Flax varieties were clustered into 3 main groups. Redwood 5 and Hungary 5 have the closest genetic relationship.The genetic distance beteen ABYSSINIA and Hungary 5 is 0.1332, which is the most diversified among the 18 varieties.

2. The 300 –1500 bp flax DNA fractions containing microsatellite sequences were captured by hybridizing the digested genomic DNA fragments with the oligonucleotideprobes (TTC)₁₀ and (ATC)₁₀ attached to streptavidin coated magnetic beads (Dynal). The enriched DNA fragments were ligated into pMD18-Tvector and then transformed into *E. coli* Top10 competent cells to form an enriched microsatellite sequence library. PCR screening using adaptor primer and VRV (TTC)₁₀ as primers identified 477 microsatellite clones from 1979 transformants in the libraries. Sequence analysis of these positive clones confirmed 274 microsatellite sequences, with a high enrichment efficiency of 22.6% and PCR screening efficiency of 96.7%. Ninety two pairs of SSR primers were designed to amplified for polymorphism in the eight varieties Baihua, Shanxi Datong, NDR714, WINONA SEL, K-1195, BETHVE, SOMME and WATSON. Ninety pairs of primers had amplified products ,and 35 pairs

of primers had effective polymorphisms.

Keywords: Flax (*Linum usitatissimum*) ; Genetic diversity; Molecular marker; Microsatellite; RAPD

目 录

第一章 绪论.....	1
1 DNA 分子标记技术及其原理.....	1
1.1 RAPD 标记.....	1
1.2 RFLP 标记.....	2
1.3 AFLP 标记.....	3
1.4 微卫星标记.....	3
1.5 EST-SSR 标记.....	4
1.6 ISSR 标记.....	4
1.7 SCAR 标记.....	5
1.8 SRAP 标记.....	5
2 亚麻分子标记应用研究进展.....	6
2.1 应用分子标记研究亚麻种质资源遗传多态性与亲缘关系.....	6
2.2 分子标记用于亚麻基因定位与辅助育种.....	6
2.3 应用分子标记进行亚麻品种鉴定和系谱分析.....	7
2.4 亚麻分子标记遗传图谱的构建.....	8
2.5 分子标记在亚麻上的应用前景和尚需解决的问题.....	8
3.0 本研究的的目的及意义.....	9
第二章 亚麻遗传多样性的 RAPD 分析.....	10
1 材料与方法.....	10
1.1 材料.....	10
1.1.1 亚麻品种和实验样品.....	10
1.1.2 试剂.....	10
1.2 方法.....	11
1.2.1 基因组 DNA 的提取和浓度测定.....	11
1.2.2 RAPD 反应体系.....	11
1.2.3 PCR 产物的检测.....	12
1.2.4 数据处理与统计分析.....	12

2 结果分析.....	13
2.1 RAPD扩增结果.....	13
2.2 RAPD扩增产物的琼脂糖凝胶电泳筛选结果分析.....	14
2.3 RAPD 扩增产物的聚丙烯酰胺凝胶电泳分析.....	14
2.4 18 个亚麻品种的聚类分析.....	16
3 讨论.....	17
第三章 亚麻微卫星标记开发.....	19
1 材料与方法.....	19
1.1 材料.....	19
1.1.1 亚麻品种白花培养.....	19
1.1.2 药品的配制.....	19
1.2 方法.....	19
1.2.1 DNA 提取.....	19
1.2.2 DNA 纯化.....	19
1.2.3 亚麻基因组 DNA 的酶切和回收.....	20
1.2.4 单链寡核苷酸接头制备.....	20
1.2.5 DNA 片段与接头连接.....	20
1.2.6 接头连接片段的 PCR 扩增.....	20
1.2.7 亚麻微卫星文库的构建.....	21
1.2.8 PCR 扩增含有微卫星序列的 DNA 片段.....	22
1.2.9 DNA 片段纯化.....	22
1.2.10 DNA 片段浓缩.....	22
1.2.11 DNA 片段的连接、转化、抗性筛选.....	23
1.2.12 菌落检测.....	24
1.2.13 DNA测序及序列分析.....	24
1.2.14 SSR引物设计.....	24
1.2.15 多态性SSR引物筛选.....	24
2 结果分析.....	26
2.1 基因组DNA提取.....	26

2.2 酶切、连接结果分析.....	26
2.3 磁珠富集微卫星文库.....	27
2.3.1 双链DNA目的片段的检测.....	27
2.3.2 筛选含微卫星的阳性克隆的结果.....	28
2.4 亚麻微卫星序列分析.....	28
2.5 亚麻微卫星特异引物设计.....	33
2.6 SSR多态性分析.....	36
2.6.1 SSR-PCR体系的优化.....	36
2.6.2 亚麻微卫星引物检测.....	36
3 讨论.....	40
第四章 总结.....	42
1 亚麻品种种质遗传多样性的RAPD分析.....	42
2 运用磁珠富集法开发亚麻微卫星标记.....	42
3 今后的研究设想.....	42
参考文献.....	49
附录A.....	48
附录B.....	49

第一章 绪论

分子标记是以生物大分子的多态性为基础的遗传标记,分子标记技术的出现提高了遗传分析的准确性和有效性。对科学快速地鉴定种质资源及遗传多态性、遗传图谱构建、目标性状连锁标记等相关研究具有重要意义^[1]。亚麻是重要的油料作物和纤维作物^[2],亚麻纤维是天然的束纤维,因此被称为“纤维皇后”,随着人们生活水平的提高,培育出优质、高纤、高抗等亚麻品种已是当务之急。同时,亚麻还是我国北方地区重要的油料作物,亚麻油中富含的 α -亚麻酸,作为保健、药用功能而得到不断开发。我国亚麻生物技术的研究^[3]发展迅速,花药的培养、转基因技术、基因克隆、分子标记等方面开展深入研究,获得显著成果。近年来,运用分子标记技术对亚麻种质资源遗传多样性、分子标记辅助育种、特异基因标记、染色体连锁图谱构建等研究具有重要的意义。目前,亚麻微卫星标记的开发,为以后国内构建亚麻遗传图谱和特异基因标记提供技术支持。

1 主要 DNA 分子标记技术及其原理

遗传标记(主要包括形态标记、细胞学标记、生化标记和DNA分子标记)的应用,极大地促进了生物分类学、育种学、遗传学和物种起源与进化等研究的进程^[4]。但形态标记、细胞学标记、生化标记这三种标记数量非常有限,且受发育时期、生长环境等因素的影响,严重制约了遗传标记的应用和发展。分子标记是以生物的大分子,尤其是生物体的遗传物质核酸的多态性为基础的遗传标记,其数量丰富、遗传稳定、不受基因表达与否的限制以及操作简便等独特的优越性,被广泛应用于植物学研究的各个领域。目前,应用亚麻种质资源和育种研究常用的分子标记技术有RFLP、RAPD、AFLP、SCAR、ISSR等^[5]。

从1980年人类遗传学家J.GK.Botstein等首次提出DNA限制性片段长度多态性作为遗传标记的思想及1985年PCR技术的诞生至今,已经发展了十多种基于DNA多态性的分子标记技术,这些DNA标记技术综合起来可分为以DNA杂交为基础的和以PCR为基础的以及PCR技术和限制性酶切技术相结合的几种类型。

1.1 RAPD 标记

1990年,美国杜邦公司的williams^[6]和加利福尼亚生物研究所的welsh^[7]研究

小组几乎同时发现了一种新的分子标记，随机扩增多态性DNA(Random Amplified Polymorphic DNA)，简称RAPD。

在基因组DNA中有丰富的反向重复序列，在真核生物中，几乎每200bp有1-10个反向重复序列。由于随机引物较短，且在较低温度条件下退火，因而引物与基因组中反向重复序列结合机率大为提高。一般认为，RAPD的多态性是两个反向重复序列之间的序列差异。RAPD技术源于PCR技术，但又不同于PCR技术，差别主要体现在随机扩增引物上。首先，随机扩增引物是单个加入，而不是成对(正、反引物)加入；其次，随机引物短，一般RAPD技术采用的引物含10个碱基，由于随机引物较短，与常规PCR相比，RAPD退火温度较低，一般为35-45℃。RAPD技术以一系列随机引物对基因组进行检测，因而能检测多个基因位点，覆盖率比较大，引物越多，覆盖面越广，遗传信息也随之增加；另外，RAPD指纹呈孟德尔式显性遗传。RAPD所用的一系列引物DNA序列各不相同，但对于某一特定的引物，它同基因组DNA序列有其特定的结合位点。这些特定的结合位点在基因组某些区域内的分布如符合PCR扩增反应的条件，即引物在模板的两条链上有互补位置，且引物3'端相距在一定的长度范围之内，就可扩增出DNA片段。因此如果基因组在这些区域发生DNA片段插入、缺失或碱基突变就可能引起这些特定结合位点分布发生相应的变化，而使PCR产物增加，缺少或分子量的改变。通过对PCR产物的检测即可测出基因组DNA在这些区域的多态性。RAPD技术继承了PCR效率高、样品用量少、灵敏度高、特异性强和检测较为容易的优点。但RAPD标记也有自身的缺点，其主要的缺点就是稳定性、重复性较差；无法区分纯合显性和杂合显性。

1.2 RFLP 标记

RFLP(Restriction Fragment Length polymorphism)，即限制性片段长度多态性。首先由美国Botstein D^[8]等人提出作为标记构建遗传连锁图谱的，基本原理是用限制性内切酶把DNA分子切割成大量的长短不等的小片段，这些小片段的数目及长度反映了限制性内切酶酶切位点在DNA分子上的分布。不同来源的DNA具有不同的限制酶酶切位点的分布，每一种DNA限制酶组合所产生的片段是特异的，从而产生多态性。RFLP的优点是所有生物的检测程序一致，标记数量大，呈简单的孟德尔式共显性遗传。缺点是需要制备大量高质量的DNA，需要仪器

设备多，技术也较复杂，且需要同位素标记，花费也较高。

1.3 AFLP标记

AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), 即扩增片段长度多态性是1993年由荷兰Keygene公司科学家Zabeau和Vos等^[9]人发明的一种新的DNA分子标记技术。AFLP有共显性和显隐性遗传，兼具RAPD与RFLP优点，有较高的稳定性，用少量的选择性引物能在较短时间内检测到大量位点，并且每对引物所检测到的多个位点都或多或少地随机分布在多条染色体上，各染色体上AFLP标记的数目与染色体长度呈正相关，而一对引物获得的标记涉及的染色体数与标记数呈正相关。因此通过少量效率高的引物组合，可获得覆盖整个基因组的AFLP标记。该技术设计了对某种限制性内切酶的通用接头以及可与接头序列的限制性酶切位点的序列配对的专用引物，对基因组DNA酶切片段进行选择性的扩增，扩增片段在高分辨力的顺序分析胶上电泳，产生扩一增片段长度不同的多态性带型。在AFLP中经过2种或2种以上的酶同时切割，如果DNA片段遗传特性发生改变，酶切片段被选择性扩增，酶切片段种类、数目、顺序决定了PCR特殊性，该技术被认为是迄今为止最有效的分子标记，具有较高可靠性和高效性，多态性水平高，检测位点最多，分子识别率高，速度快，T_m值高，DNA用量少。但对模板反应迟钝，弱带可能发生错配与缺失，成本较高，技术要求苛刻。

1.4 微卫星标记

SSR(Simple Sequence Repeat)即简单序列重复，或称为微卫星标记(Microsatellites)^[10]。Wyman等认为在人体基因组中含有高变区，并证明这些高变区是一些串联重复序列^[11]，Jeffreys等发现重复序列中重复单位的核心序列是相似的^[12]。串联重复序列由两种类型组成，即微卫星DNA(SSR)。微卫星DNA是以1~6bp的短核苷酸序列为核心单位，长度小于100bp的小片段，它广泛随机地分布于真核生物基因组中，同一类微卫星DNA可分布在基因组的不同部位，由于SSR两侧一般是相对保守的单拷贝序列，因此，可根据两侧序列设计一对特异引物来进行PCR扩增。与其他分子标记：如RAPD、RFLP等相比，SSR标记具有以下优点：(1)在植物基因组中大量地、随机地分布，具有广泛的位点变异，揭示比RAPD、RFLP更多的多态性^[13]。(2)SSR标记揭示的是单个位点上复等位

基因的信息,为共显性标记,能够区分纯合型和杂合型,提供完整的遗传信息。(3)微卫星序列多态性可以用PCR方法检测,不需要过多的分子克隆手段,对DNA模板的要求不高,重复性好^[14].因此成为在植物中目前运用最广泛的分子标记之一,广泛地运用于植物种质鉴定^[15-16]、分子标记连锁图的构建^[17]和群体遗传学^[18]等诸多领域.但是,微卫星标记存在一个重要的局限性就是微卫星序列两侧区域在种间保守性往往较低.种间扩增微卫星标记仅仅局限于同一个属或相近的属的不同物种间的扩增^[19],这大大限制了SSR标记在其他物种中的运用^[20]。

1.5 EST-SSR标记

EST-SSR标记^[21-22]及原理:首先构建cDNA文库进行EST测序或从公共基因数据库(如EMBL,GenBank和DDBJ等)下载EST数据,在经过前处理后,对序列进行组装,去除冗余序列和延长转录片段的长度,然后利用相应软件寻找含有SSR的序列,最后根据其两端的保守性序列设计SSR引物并进行扩增验证.与通过构建小片段基因组文库开发SSR标记相比,EST-SSR标记的开发过程简单成本低;具有很高的可转移性和通用性;EST-SSR标记通常都代表着某种功能,这种功能可以通过序列同源性比对获得.但是EST序列一般位于基因的功能区域,EST-SSR多态性水平低于基因组SSR。

1.6 ISSR标记

ISSR(Inter-simple sequence Repeat)^[23]即简单序列重复区间扩增多态性分子标记.1994年Ziet kiewicz等对SSR技术进行了发展,建立了加锚微卫星寡核苷酸(Anchored microsatellite Oligonucleoides)技术.ISSR是用加锚定的微卫星寡核苷酸作引物,即在内部简单重复序列的5'端或3'端加上2~4个随机选择的核苷酸,这可引起特定位点退火,从而导致与锚定引物互补的间隔不太大的重复序列间的基因组节段进行PCR扩增.ISSR-PCR扩增的引物通常为人工合成16~18个碱基序列,由1~4个碱基组成的串联重复和几个非重复的锚定碱基组成,从而保证了引物与基因组DNA中SSR的5'或3'末端结合,导致位于反向排列,间隔不太大的重复序列间的基因组节段进行PCR扩增.ISSR标记的生物学基础^[24]仍然是基因组中存在的SSR(Simple Sequence Repeat).SSR在真核生物中的分布是非常普遍的,并且进化变异速度非常快,因而锚定引物的ISSR-PCR可以检测基因组许多位点的

差异。ISSR主要为显性标记，呈孟德尔式遗传。ISSR标记具有稳定可靠、操作简单，成本低、快速、灵敏、检测多态性能力强、所需DNA模板的量少等特点。ISSR标记缺陷是ISSR扩增优化之前必须确定引物的退火温度^[25]。一般ISSR标记退火温度较高50~60℃。

1.7 SCAR标记

SCAR标记 (Sequence Characterized Amplified Region) 即序列特异扩增区。由Paran和Michelmore^[26]提出的一种基于PCR技术的单基因位点多态性遗传标记。SCAR标记是通过将已有的多基因位点DNA标记进行改良后开发出来的。SCAR标记通常是由RAPD标记转化而来的^[27]。SCAR标记是在序列未知的DNA标记基础上^[28]，对其特异PCR扩增产物进行回收，克隆和测序，根据测序得到扩增产物的碱基序列重新设计特异引物，并以此为引物对基因组DNA进行PCR 扩增获得。SCAR引物在原来的引物上添加8-10个碱基，加强了与模板的特异性结合，从而提高了退火温度，提高扩增的专一性。

1.8 SRAP标记

SRAP标记 (Sequence—Related Amplified Polymorphism, SRAP) 即相关序列扩增多态性。美国加州大学蔬菜作物系Li与Quims^[29]于2001年提出，主要检测基因的开放读码框 (ORFs) 区域。SRAP标记利用一对独特的引物对开放读码框 (ORFs) 进行扩增，正向引物(F—primer)含17个碱基，反向引物(R—primer)为18个碱基。正向引物5'端为14个碱基的核心序列，前10个无任何特异组成，为填充序列，后接CCGG序列与位于富含GC区域的开放读码框(ORFs)中的外显子进行特异结合，3'端的3个选择性碱基与核心序列组成一套正向引物。外显子序列在个体中通常是保守的，因而这种低水平多态性被反向引物的组合扩增所弥补。反向引物5'端前11个碱基为填充序列，接着为A椰序列，随后也是3'端3个选择碱基。其AATT序列可以对富含AT的内含子区域和启动子区域进行扩增。由于内含子、启动子和间隔序列在不同物种甚至不同个体间变异很大，从而与正向引物搭配扩增出基于内含子和外显子的SRAP多态性标记。SRAP标记具有简单、高效、高共显性、重复性高、易测序等优点，适合于基因的定位与克隆等分子生物学的研究^[30]。缺陷是对基因相对较少的着丝粒附近以及端粒的扩增会较少。

2 亚麻分子标记应用研究进展

2.1 应用分子标记研究亚麻种质资源遗传多态性与亲缘关系

遗传多样性是生物多样性的重要组成部分,广义的遗传多样性是指地球上生物所携带的各种遗传信息的总和。这些遗传信息储存在生物个体的基因之中,因此,遗传多样性也就是生物的遗传基因的多样性。任何一个物种或一个生物个体都保存着大量的遗传基因,因此,可被看作是一个基因库(Gene pool)。一个物种所包含的基因越丰富,它对环境的适应能力越强。基因的多样性是生命进化和物种分化的基础,遗传多样性也就是生物的遗传基因的多样性。分子标记产物的多态性反映了被测材料的多样性^[31]。分子标记技术可以有效地检测种质资源的遗传多样性^[32]。在亚麻作物的系统演化、物种与品种的亲缘关系和分类方面应用分子标记技术,可以提供分子水平上的客观依据,并且比传统的方法更能反映其物种间的遗传多样性。在建立品种 DNA 指纹图谱建立的基础上对其进行聚类分析,可据此进行品种分类的探讨。Yong-Bi Fu 等对亚麻属植物的 7 个种 12 份材料进行 RAPD 亲缘关系分析,选用 29 个随机 RAPD 引物,共得到 527 条带^[33]。Yong-Bi Fu 也利用 RAPD 技术对北美 54 个亚麻栽培品种进行聚类分析^[34]。邓欣等采用 RAPD 技术利用 25 个随机引物对 10 个不同国家和地区的亚麻品种 DNA 进行聚类分析,且用聚丙烯酰胺电泳检测,共扩增出 852 条带,其中 206 条多态性带,多态率为 24.18%^[35]。结果比单独的琼脂糖电泳效果好。何东锋等从 600 个随机引物筛选出 28 个扩增稳定性较好的引物,对 18 份来自不同国家和地区的亚麻资源遗传多态性进行 RAPD 分析^[36]。结果表明:总的多态性百分率(PPB)为 38.0%,为亚麻栽培品种的优势杂交提供依据。但与其他麻类作物相比较,李建军等对 21 份不同木质含量的苧麻的 RAPD 聚类分析,多态率高达 80%^[37]。郭安平等利用 RAPD 技术分析了 25 份 6 个近缘中红麻品种,多态率为 77.6%^[38]。结论显示亚麻品种间差异性与其他麻类品种相比较低。证实了 Fu 等研究认为亚麻中 RAPD 多态性通常表现低^[39]。可能与亚麻品种较容易适应环境的改变,基因组变异不是很大,或者品种之间的杂交不是很频繁有关。

2.2 分子标记用于亚麻基因定位与辅助育种

基因定位就是筛选与目的基因紧密连锁或共分离的遗传标记,它是分子标记

辅助选择育种和基因克隆的前提。基因定位包括对数量性状和质量性状的标记。品种的改良往往只是希望个别性状的导入,去寻找与目的基因紧密连锁的标记即可。当然,如能找到控制单一性状的基因,其意义将会更大。目前,已有一批控制亚麻重要性状(数量性状和质量性状)的基因被标记并得到广泛应用。

薄天岳等对含有亚麻抗锈病基因M4的近等基因系材料NM4及其轮回亲本Bison进行RAPD分析,其中OPA18引物在NM4材料中稳定地扩增出特异的DNA片段。并将OPA18片段回收、克隆和测序,成功地将其转化为SCAR标记^[40]。同时,薄天岳运用AFLP标记Fuj7(t)的抗枯萎病基因,且成功的转化为SCAR标记^[41]。Spielmeyer等构建了AFLP遗传连锁图谱^[42],根据图谱发现了两个抗亚麻枯萎病的主效遗传图谱。张晓平等利用RAPD-BSA法^[43],通过F2代个体验证,耐渍型个体均能扩增出此差异条带而非耐渍型个体中不能扩增出此差异条带,证明S1377-800是与亚麻耐渍基因紧密连锁的RAPD标记^[44]。高风云等应用RAPD技术对遗传背景相似的可育株和不可育株亚麻进行标记,分别得到1个与显性核不育的雄性基因有关的RAPD分子标记为S62-500和S135-350^[45]。亚麻的抗锈病基因、抗枯萎病基因、耐渍基因、不育的雄性基因等关键基因的不断发现并标记,对亚麻品种的改良和辅助育种具有重要的意义。

2.3 应用分子标记进行亚麻品种鉴定和系谱分析

亚麻栽培历史悠久,生长繁殖容易,个体差异不明显,同名异种现象普遍。用传统的形态和同工酶分析,误差较大,效率低,难以鉴定性状相似的品种,分类标准也难以统一。分子标记对亚麻品种基因型的鉴定,使品种鉴定和分类直接从DNA分子水平上进行,准确度高,效率高且信息量大。荷兰遗传资源中心的Treuren等利用AFLP技术去除基因库中的冗余种质,种质的分子特性成为区分重复收集的重要依据,去除重复收集种质能够提高遗传资源管理效率。Treuren等利用AFLP技术对征集的29个亚麻品种,以12个栽培品种做对照。分成“R25”、“Ru”、“Rm”三大系列^[46]。Chen等利用一个ISSR引物和2个RAPD引物,对16株亚麻花药培养再生植株进行了鉴定,证实了其中12株来源于小孢子^[47]。Axel Diederichsen等利用RAPD技术鉴别4个相同种的群体亚麻栽培品种^[48]。

2.4 亚麻分子标记遗传图谱的构建

遗传图谱 (Genetic map) 又称遗传连锁图谱 (Genetic linkage map), 是指以染色体重组交换率为相对长度单位, 以遗传标记为主体的染色体线状连锁图谱^[49,50]。Oh等最先应用RFLP与RAPD标记构建了亚麻的第一张分子遗传图谱。图谱包括15个连锁群, 共94个标记, 大约覆盖1000cM。通过4品系配制的两个杂交组合的F₂分离群体, 一个组合“Leona”X “Koto Leona”和另一个组合 “CI1303”X “Stormont Cirus”, 每个组合F₂代分离群体至少选50个单株做为作图群体。

“CI1303”与 “Cirus” 的杂交组合后代, 产生了20个RFLP和96个RAPD标记。13个RFLP标记、80个RAPD标记以及1个序列标签位点组成15个连锁群^[51]。Wiesner I等通过对亚麻栽培微卫星PCR的引物和退火温度等进行了筛选和优化, 获得了较高多态性引物3PCT1和3PCT2^[52], 可用于大规模亚麻栽培品种指纹图谱检测。Wiesner, Wiesnerová等利用9对ISSR引物, 对53个亚麻品种进行指纹图谱构建, 共扩增62条带, 其中45条多态性带, 多态率为72%。并将53个亚麻品种分为4个大类和8个亚类^[53]。

2.5 分子标记在亚麻上的应用前景和尚需解决的问题

目前分子标记在亚麻遗传多样性分析、基因定位、品种鉴定和系谱分析等研究方面得到了应用, 对亚麻品种的改良和辅助育种起到了推动作用。随着分子生物学的快速发展, 为分子标记与功能基因组学、比较基因组学、和后基因组学等学科的结合提供条件。分子标记在亚麻品种改良、优势杂交、系谱分析、辅助选择育种等方面的应用具有广阔的发展前景, 将大大缩短育种周期和加速育种进程。

目前国外已经使用RFLP标记和RAPD标记构建了亚麻遗传图谱, 但是其饱和程度仍然不是很高, 不能满足育种工作者的需求, 需要在原来的连锁图谱的基础上加大密度和长度, 使连锁图谱趋于饱和, 才较容易找到与许多重要目标基因紧密连锁的分子标记, 从而早期能对目标基因的植株进行选择, 从而提高育种效率, 缩短育种周期。目前国内整个麻类作物遗传图谱的构建报导的不多, 构建密度高的连锁图谱需要花费大量的人力和物力。陈美霞等利用SRAP标记和ISSR标记构建国内红麻首张遗传连锁图谱^[54]。

目前亚麻分子标记应用方面存在的主要问题是快速、稳定和多样性好的分子标记太少, 需要开发出大量的亚麻标记。在不同分子标记得开发方面, RAPD标

记、ISSR标记和SRAP标记开发较快，但是RAPD扩增不够稳定，ISSR标记和SRAP标记只具有显性标记。RFLP标记和AFLP标记具有共显性和稳定性高等特点，但是开发成本过高，操作繁琐。SSR标记具有扩增稳定，特异性高，共显性，开发成本相对低等优点，开发微卫星标记是目前较好的选择。邓欣等^[55]利用磁珠富集法分离亚麻基因组微卫星分子标记。蒋彦波等同样利用磁珠富集法成功的分离鉴定苧麻微卫星^[56]。新一代分子标记—单核苷酸多态性（SNP）标记也将在亚麻研究方面发挥重要重要。SNP标记为第三代遗传标记，具有检测位点丰富、突变频率低、二等位基因型、易于自动化分析等优点。同时，SNP做为遗传标记也存在不足：它改变基因原来的结构和连锁率，表现为生物对外界反应的不适应，增加SNP，会相应导致致命性疾病的增加。

3 本研究目的及意义

亚麻具有纤维用、油用及保健等多用途，纤维品质好、植株小、生育期短、种子繁殖、自花授粉、二倍体基因组较小等特点。亚麻的生长过程中，由于受到环境和气候条件的影响，植物的外部形态和内部结构甚至基因组成方面都会发生变化。特别是亚麻已经有六七千年的栽培历史，经过漫长的人工选育，以及育种时常用栽培亚麻品种和亚麻属的不同植物、亚麻变种进行杂交，从而使亚麻属内种、亚种和品种之间的亲缘关系十分混乱。传统的从形态特征对植物进行分类的方法，面对这样复杂的关系根本无能为力。而分子标记直接从遗传物质DNA水平上去揭示它们之间的亲缘关系，就可以很容易的解决这个问题。同时目前存在的主要问题是缺少快速、稳定和多样性好的亚麻分子标记，因此，需要开发大量的亚麻分子标记。

本研究主要开发RAPD和SSR标记，利用RAPD技术测定亚麻资源的遗传多样性及检测SSR引物的多态性。为亚麻优异种质资源的科学利用和分子标记辅助育种、遗传图谱的构建等提供依据。

第二章 亚麻遗传多样性的 RAPD 分析

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 亚麻品种和实验样品

18份亚麻种质资源分别来自中国、美国、日本、法国、瑞士和埃塞俄比亚等国家,生长区域和环境相差较大。将18个亚麻品种的种子表面灭菌,无菌操作接种于B5固体培养上,在人工气候箱中培养。温度25℃,湿度50度左右,无光培养两周,取出幼苗-80℃冻存。亚麻幼苗不含色素便于提取基因组DNA。其样品编号、名称及来源见表2-1。

表 2-1 试验亚麻品种清单
Table 2-1 Flax varieties with code, source and type

编号	品种名	产地
1	日本三号	日本
2	白花	法国
3	瑞士红	瑞士
4	法国胡麻	法国
5	范尼 Fany	法国
6	红木 5 号 Redwood5	加拿大
7	纺织工人	苏联
8	匈牙利 5 号	匈牙利
9	83078	甘肃
10	山西大同	山西
11	PSKOVSKIY	俄罗斯
12	Dakota 达克他	美国
13	K-180	俄罗斯
14	K-1195	埃塞俄比亚
15	NDR714	美国
16	WINONA SEL	美国
17	花德大 Huadeda	内蒙古
18	ABYSSINIA (BROWN)	埃塞俄比亚

1.1.2 试剂

酶类:普通的 Taq 酶购自北京天根生化科技有限公司。引物:从上海生工生物工程股份有限公司订购 RAPD 引物 600 条。其他药品试剂:琼脂糖为 BIOWEST AGAROSE、Tris、SDS、丙烯酰胺、二氮亚甲双丙烯胺、过硫酸胺、硼酸、TMED、硝酸银、甲醛、硼砂、氢阳化钠。TIANGEN 新型植物基因组 DNA 提取试剂盒。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取和浓度测定

冻存暗培养的亚麻幼苗经 TIANGEN 新型植物基因组 DNA 提取试剂盒提取并通过分光光度计测定，得到亚麻 DNA 的浓度和纯度。

按 TIANGEN 新型 DNA 提取试剂盒说明书操作，提取 DNA。

具体方法如下：

- 1) 取冻存的亚麻幼苗 100mg，加入液氮充分研磨。加入 400 μ L 缓冲液 LP1 和 4 μ LRNase A (10mg/ml), 漩涡振荡 1min，室温放置 10min。
- 2) 加入 130 μ L 缓冲液 LP2，充分混匀，漩涡振荡 1min。
- 3) 12000rpm 离心 2min，将上清移至过滤柱 CS 中（过滤柱放入收集管中）。
- 4) 12000rpm 离心 2min，收集滤液。
- 5) 向滤液中加入 1.5 倍体积的缓冲液 LP3（加入无水乙醇），立即充分振荡混匀 15s，此时可能会出现絮状沉淀。
- 6) 将上步所得溶液和絮状沉淀都加入一个吸附柱 CB3 中（吸附柱放入收集管中），立即 12000rpm 离心 30s 倒掉废液，吸附柱 CB3 放回收集管中。
- 7) 向吸附柱 CB3 中加入 700 μ L 漂洗液 PW，12000rpm 离心 30s 倒掉废液，吸附柱 CB3 放回收集管中。
- 8) 向吸附柱 CB3 中加入 500 μ L 漂洗液 PW，12000rpm 离心 30s 倒掉废液，吸附柱 CB3 放回收集管中。
- 9) 将吸附柱 CB3 放回废液收集管中，12000rpm 离心 2min，目的是将吸附柱中残留的漂洗液去除。将吸附柱 CB3 置于室温或 50 $^{\circ}$ C 温箱放置 10min，以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液。
- 10) 向吸附柱 CB3 转入一个干净的离心管中，向吸附膜的中间部位悬空加 50-200 μ L 洗脱缓冲液 TE，室温放置 5min，12000rpm 离心 2min。

1.2.2 RAPD反应体系

在 25 μ L 反应体系中，含有 10 \times Buffer(含 Mg²⁺)(TianGen) 2.5 μ L，10 mmol.L⁻¹ dNTP (IBM) 0.5 μ L，10 μ mol.L⁻¹ 引物各 2 μ L，模板 DNA 20ng，Taq DNA polymerase (TianGen) 1U，ddH₂O 补足。PCR 扩增条件 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min，94 $^{\circ}$ C 45 s，37 $^{\circ}$ C 1 min，72 $^{\circ}$ C 1.5 min，40 个循环；72 $^{\circ}$ C 补平 10 min，4 $^{\circ}$ C 保温。

1.2.3 PCR 产物的检测

1.2.3.1 琼脂糖凝胶电泳分析PCR产物

- 1) 用胶布封好制胶槽的两端，放置水平，插入梳子。
- 2) 按所需浓度(2.5%)，称取适量琼脂糖与TAE一起放入三角瓶中，摇匀，置于微波炉中加热1-3min，至胶体透亮后，移出摇匀。待胶冷却至60℃左右，加EB至终浓度为0.5μg/mL。
- 3) 将凝胶倒入制胶槽中，厚度约3mm左右。室温放置40min左右，到胶表面泛白，完全凝固后，小心移去梳子和胶布。
- 4) 将胶板放入电泳槽中，胶孔朝向负极，加电泳缓冲液(TAE)至刚淹没胶面约2mm。加入5μL DNA扩增样品和1μL上样缓冲液(溴酚蓝和蔗糖)，混匀后点入胶孔，标准分子量为稀释的200ngDNA。
- 5) 输出电压120V，恒压电泳120min。
- 6) 结果记录:电泳完毕后，将凝胶从电泳槽中取出，凝胶成像系统观察拍照。

1.2.3.2 丙稀酰胺凝胶电泳分析 PCR 产物

- 1) 取 100μL 非变性胶，加入 600μL 过硫酸胺，再加入 50μL TEMED。混匀后用注射器注入竖版电泳槽，聚合 2h，槽内加入 TBE 缓冲液。
- 2) 输出功率 9W，恒功率电泳 4h。
- 3) 采用银染色法^[57]。首先，在托盘里加入500mL染色液(0.05% AgNO₃)，把凝胶置于托盘中，轻摇托盘30min。然后将凝胶拿出用蒸馏水洗一次，10秒左右将凝胶转入含显色剂的托盘中(0.01g硼砂；7.5g氢阳化钠；2mL无水甲醛；500mL蒸馏水)染色10分钟左右。最后，将凝胶用蒸馏水洗一次，相机拍照、保存。

1.2.4 数据处理与统计分析

将电泳图谱上清晰且可重复出现的条带记为“1”，同一位置没有条带的记为“0”，由此生成“0”和“1”原始矩阵。统计每个引物扩增出的总带数和多态性带数。将数据输入计算机采用 NTSYSpc (2.10) 软件进行分析，运用 Dice 系数计算出亚麻各样品的遗传距离, UPGAM 方法绘制聚类分析树状图。

2 结果与分析

2.1 RAPD扩增结果

从上海生物公司购买600条随机引物，从中筛选出对试验亚麻材料能扩增出清晰的谱带，且重复性稳定的28条引物，其引物编号和序列见表2-2。

表 2-2 用于 RAPD 分析的 28 个有效引物序列和扩增结果

Table 2-2 The sequence of 28 RAPD primers and amplification results

引物编号	序列(5'-3')	扩增带总数/条	多态性带数/条	多态率/%
S16	TTTGCCCGGA	29	9	31.0
S19	ACCCCGAAG	7	3	42.9
S32	TCGGCGATAG	11	9	81.8
S33	CAGCACCCAC	19	8	42.1
S45	TGAGCGGACA	28	9	32.1
S67	GTCCCGACGA	51	13	25.5
S75	GACGGATCAG	15	6	40.0
S81	CTACGGAGGA	12	2	16.7
S85	CTGAGACGGA	12	5	41.7
S141	CCCAAGGTCC	9	5	55.6
S149	CTTCACCCGA	10	3	30.0
S165	TGTTCCACGG	12	3	25.0
S275	ACACCGGAAC	8	6	75.0
S300	AGCCGTGGAA	14	8	57.1
S304	CCGCTACCGA	17	6	35.3
S323	CAGCACCGCA	39	12	30.8
S353	CCCACTACC	32	13	40.6
S372	TGGCCCTCAC	19	9	47.4
S375	CTCCTGCCAA	15	7	46.7
S394	GTGACAGGCT	12	8	75.0
S439	GTCCGTACTG	10	5	50.0
S453	GTCAGAGTCC	10	3	30.0
S1052	CAGTTCCCGT	16	11	68.8
S1078	TCTGCTACGG	11	6	54.5
S1083	CCCACCCTTG	14	7	50.0
S1094	TCGCTCCGTT	35	10	28.6
S1099	TCTGCCAGTG	28	8	28.6
S1100	AGGAGTCGGA	44	10	22.7
合计		529	201	38.0

28条引物对18种亚麻RAPD扩增，共产生条带529，其中差异条带201，平均每个引物扩增出8.24条多态性条带，多态性比率为38.0%。

2.2 RAPD扩增产物的琼脂糖凝胶电泳筛选结果分析

在2.0%琼脂糖凝胶电泳上扩增出大小不同的DNA片段。筛选条带清晰，稳定可靠再用聚丙烯酰胺凝胶电泳分析（图2-1，图2-2）。

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18

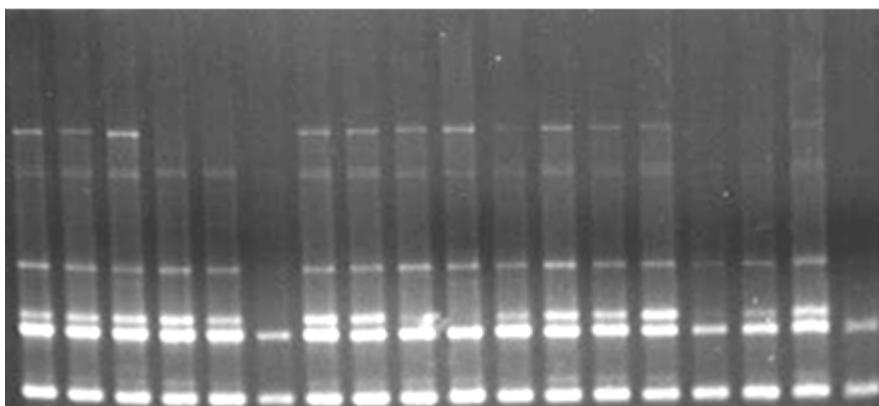


图2-1 S19为引物的18个亚麻品种RAPD扩增琼脂糖凝胶电泳图

Fig 2-1. Agarose gel electrophoresis of the RAPD amplification of 18 flax varieties using primer S19

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18

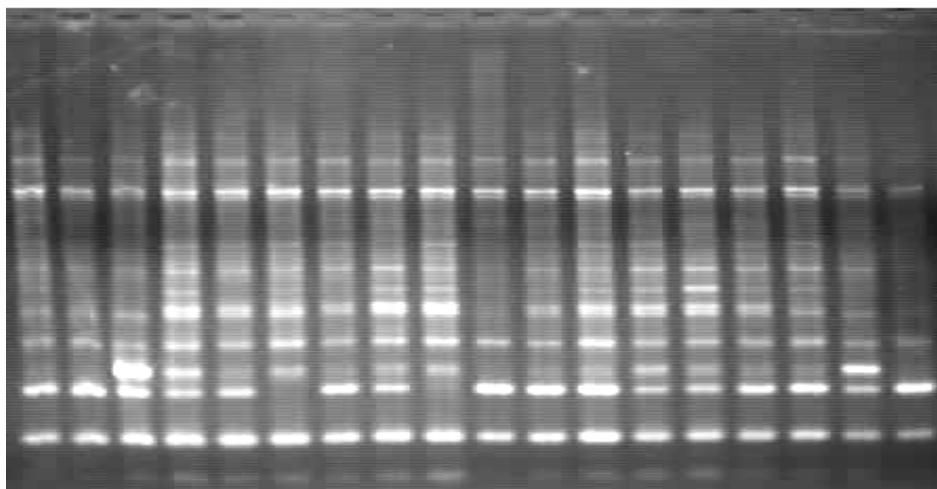


图2-2 S75为引物的18个亚麻品种RAPD扩增琼脂糖凝胶电泳图

Fig.2-2 Agarose gel electrophoresis of the RAPD amplification of 18 flax varieties using primer S75

2.3 RAPD扩增产物的聚丙烯酰胺凝胶电泳分析

由于聚丙烯酰胺凝胶电泳的敏感性较琼脂糖凝胶电泳高,其敏感性相差10倍

以上.采用6%非变性聚丙烯酰胺凝胶进行了扩增产物检测验证。确认了扩增的多态性条带清晰、稳定（图2-3, 图2-4）。

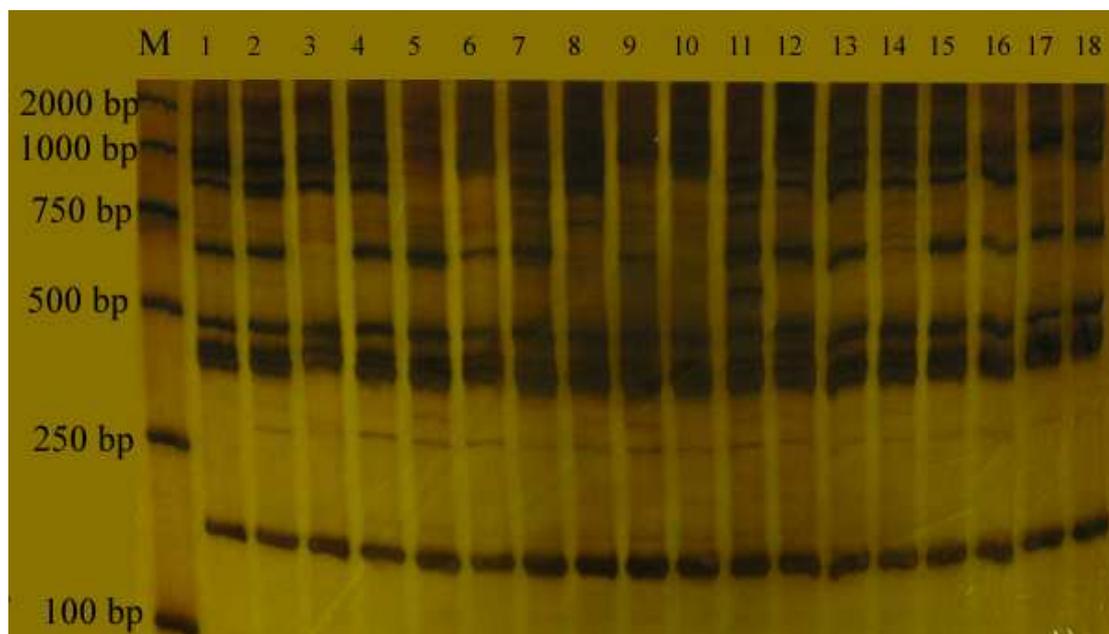


图2-3引物S353 的18个亚麻品种RAPD扩增非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳结果

Fig.2-3 Primer S353 RAPD amplification results of 18 flax varieties separated by non-denaturing polyacrylamide gel

M1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18

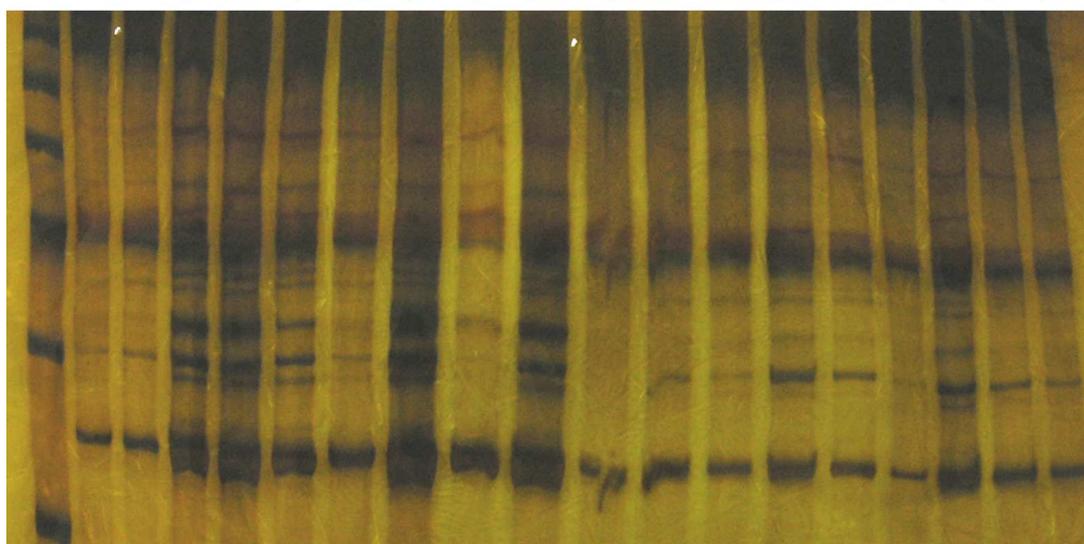


图2-4引物S489的18个亚麻品种RAPD扩增非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳结果

Fig.2-4 Primer S489 RAPD amplification results of 18 flax varieties separated by non-denaturing polyacrylamide gel

2.4 18 个亚麻品种的聚类分析

在聚类分析中，以遗传距离0.082为阈值可将18个亚麻品种分为三大类，第一类包括3个品种：日本三号，NDR714，WINONASEL。第二类包括14个品种：百花，瑞士红，法国胡麻，范尼Fany，PSKOVVSKIV，达克他，红木5号，匈牙利5号，83078，K-180，K-1195，花德大，纺织工人，山西大同。第三类只有一个品种ABYSSINIA。第一类中NDR714与WINONASEL遗传距离最近，且均是美国品种，地域跨度小，遗传距离相近，具有一定的同源性。第二类中加拿大红木5号与匈牙利5号，PSKOVVSKIV与达克他，K-1195与花德大三类遗传距离较近。第二类中来自中国的山西大同和法国品种白花的遗传差异性最大。品种ABYSSINIA为单独的一大类，与其它品种遗传距离较远，和匈牙利5号的亲缘关系最远。

表 2-3 18 个亚麻品种的 Nei 遗传距离

Table 2-3 Matrix of Nei genetic distance of 18 flax varieties

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1	0.000																	
2	0.062	0.000																
3	0.088	0.054	0.000															
4	0.052	0.052	0.057	0.000														
5	0.086	0.064	0.072	0.042	0.000													
6	0.088	0.059	0.070	0.054	0.052	0.000												
7	0.072	0.066	0.081	0.058	0.063	0.066	0.000											
8	0.097	0.065	0.060	0.057	0.058	0.049	0.076	0.000										
9	0.084	0.061	0.079	0.055	0.060	0.058	0.077	0.050	0.000									
10	0.098	0.078	0.079	0.074	0.085	0.063	0.077	0.067	0.063	0.000								
11	0.078	0.059	0.076	0.053	0.060	0.058	0.067	0.060	0.064	0.070	0.000							
12	0.074	0.061	0.070	0.049	0.056	0.054	0.054	0.060	0.062	0.075	0.046	0.000						
13	0.071	0.067	0.080	0.054	0.076	0.076	0.066	0.070	0.073	0.076	0.061	0.050	0.000					
14	0.093	0.070	0.071	0.066	0.058	0.067	0.086	0.061	0.055	0.084	0.060	0.006	0.065	0.000				
15	0.077	0.091	0.098	0.072	0.091	0.093	0.093	0.099	0.098	0.103	0.085	0.081	0.067	0.083	0.000			
16	0.075	0.076	0.094	0.060	0.068	0.073	0.073	0.081	0.075	0.091	0.060	0.073	0.067	0.077	0.055	0.000		
17	0.072	0.061	0.075	0.063	0.075	0.070	0.085	0.065	0.072	0.078	0.072	0.056	0.057	0.053	0.086	0.078	0.000	
18	0.095	0.103	0.126	0.110	0.111	0.108	0.109	0.133	0.117	0.130	0.118	0.119	0.098	0.120	0.080	0.803	0.107	0.000

① 1-18: 品种序号，见表2-1。No. of cultivars, see Tab. 2-1

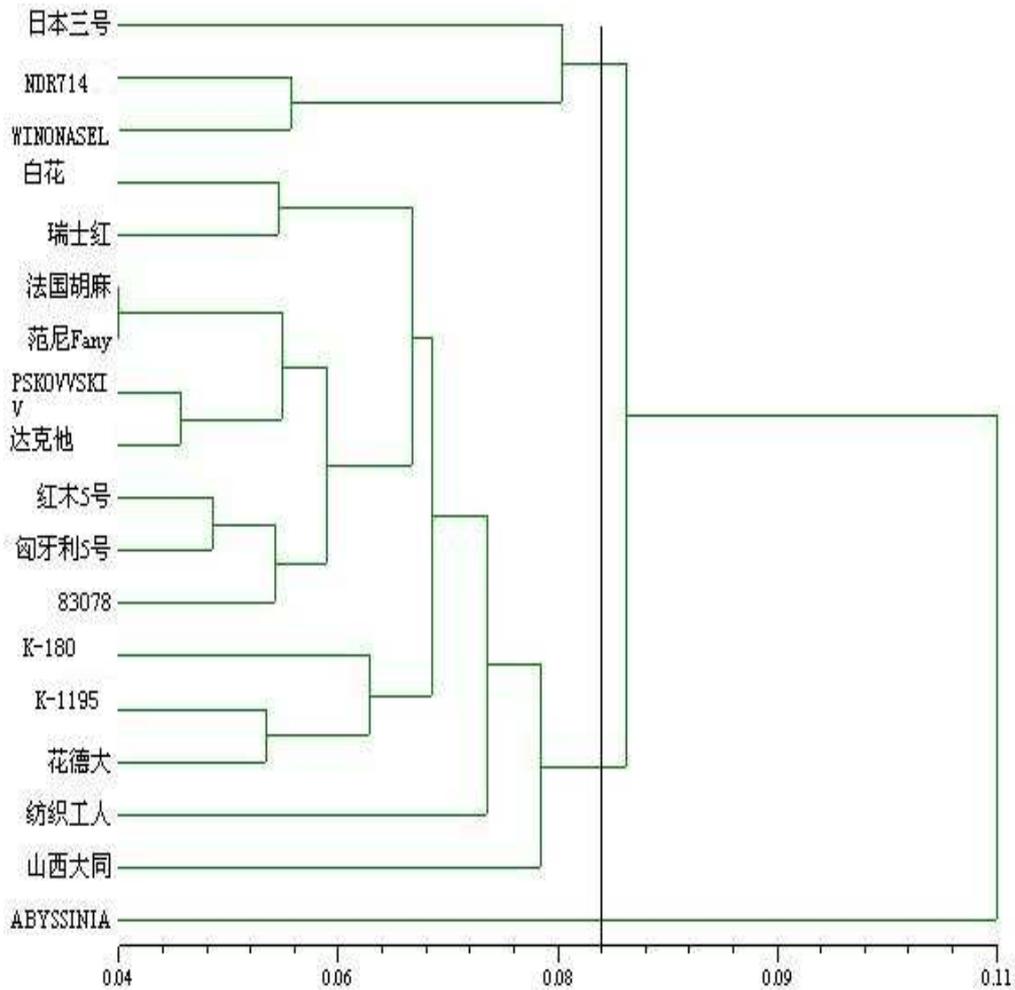


图 2-5 基于遗传距离用 UPGMA 法构建的 18 个亚麻品种亲缘关系的聚类分析树状图

Fig 2-5 UPGMA Dendrogram of genetic relationships of 18 flax varieties based on the genetic distance

3. 讨论

本研究用筛选出较好的28个引物，可以将18个品种区分开来。Fu等研究认为亚麻以RAPD检测遗传多态性较低，本研究中RAPD多态性带的比率为38.0%，亚麻遗传距离为0.0469~0.1308之间。邓欣等此前报道的10个亚麻品种聚类分析遗传距离仅为0.0273-0.0724，可能与所选的亚麻品种分布的区域、气候差异有关。根据UPGMA法构建18个亚麻品种亲缘关系的聚类分析树状图，将18亚麻品种分成三大类：第一大类NDR714与WINONASEL亲缘关系相近。第二大类中加拿大红木5号与匈牙利5号，PSKOVSKI V和达克他主要分布的环境气候偏冷，K-1195与花德大可能跟气候干燥相关。第三大类只有一种品种来自非洲埃塞俄比亚ABYSSINIA，且遗传距离与其他试供亚麻品种相差较大，说明亲缘关系较远。

RAPD技术应用非常成熟，且操作简单，成本低。运用RAPD技术检测亚麻

的遗传多样性是目前适用的分子标记技术之一。ISSR标记和SRAP标记虽然比RAPD标记检测多态性稳定可靠，但目前国内外尚未发现大量稳定可靠的ISSR和SRAP引物可以区分亚麻的遗传多态性。RAPD技术缺陷是PCR反应扩增的多态性不够稳定，因此对反应的环境要求严格，保证操作和反应条件的一致性。RAPD检测亚麻遗传多态性，关键在于筛选RAPD引物，能扩增出稳定差异带。本实验从600条随机引物筛选得到28条重复性稳定的引物。先用琼脂糖凝胶分离RAPD的扩增产物,得到稳定结果，再用非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测最终结果。实验结果显示差异条带增多，便于观察亚麻的差异带。本研究以RAPD技术成功的将18种亚麻品种区分开来，得到它们不同的遗传距离大小。本实验结论有利于亚麻新品种选育策略的制定。在实际运用中可以根据聚类分析的结果指导亲本杂交，选择遗传距离较远的材料，增强后代的遗传变异，选育出杂种优势强，综合性状好，适合我国气候条件的优良亚麻品种。

第三章 亚麻微卫星标记开发

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 亚麻品种白花培养

按照第二章的方法培养获得亚麻白花幼苗。

1.1.2 药品的配制

聚丙烯酰胺凝胶制备:

1) 45%的丙烯酰胺混合液: 称取丙烯酰胺 86.6g、二氮亚甲双丙烯酰胺 3.2g, 加水 120mL, 37℃促溶, 再用蒸馏水定容 200mL, 最后用硝酸纤维膜 (0.45μm) 过滤。

2) 10%过硫酸铵: 称取 0.4g 过硫酸铵, 用灭菌水 4mL 定容, 4℃保存。

3) 10xTBE 溶液: 称取 Tris 碱 108g, 硼砂 55g, 40ml 0.5mol/EDTA PH8.0 加灭菌水定容 1L。

4) 8%非变性胶配制: 量取已经配制的 45%的丙烯酰胺混合液 76ml 和 66ml 10xTBE 溶液, 用灭菌水定容 500ml。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取

按 TIANGEN 新型 DNA 提取试剂盒说明书操作提取 DNA。见第二章

1.2.2 DNA 的纯化

1) 上面提取的DNA中加入2.5倍体积冰冷的10%乙醇。-20℃过夜。

2) 4℃, 10000rpm离心10min后, 小心倒掉上清液, 室温风干5min。

3) 加入0.1xTE和3μL RNase, 在37℃中保温1 h。

4) 加入等体积氯仿-异戊醇抽提一次。12000rpm离心10min, 吸取上清液转入另外一个 Eppendorf 管中, 加入1/5体积的乙酸铵和2倍体积冰冷的95%乙醇, -20℃放置 1 h。

5) 12000rpm离心10min, 小心倒掉上清液。

6) 加入70%的乙醇1ml, 10000rpm离心10min后, 自然风干管底的沉淀。

7) 加入适量的蒸馏水, 溶解沉淀。放于-20℃冰箱中保存。

1.2.3 亚麻基因组 DNA 的酶切和回收

用限制性内切酶 *Mse* I 酶切 10 μg 亚麻基因组 DNA, 100 μL 的酶切反应体系中包含 30 U 的 *Mse* I (Fermentas)、10 μL 的 10 \times buffer M 及 10 μg 基因组 DNA。

根据 Zhou Y-H^[58] 的方法进行。

将酶切好的 DNA 在 1.5% 的琼脂糖上电泳, 电泳液为新鲜的 TAE Buffer, 然后尽量在 30S 内, 于紫外灯下切取 300~1500bp 片段。用天根生化科技的琼脂糖凝胶回收试剂盒回收和纯化 300~1500bp 的 DNA 片段。其具体步骤为:

1) 将凝胶薄片装在 1.5ml 离心管中称其重量, 加入缓冲液, 把混合物放在 60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中温育 7min, 至凝胶完全融化。水浴期间将离心管振荡或涡旋混匀 2~3min。

2) 把 700 μL 的 DNA-琼脂糖溶液加到一个 DNA 回收纯化柱上, 并把柱子装在一个干净的 2 μL 收集试管内, 室温下 12000rpm 离心 1min, 弃去流出液。对于体积大于 700 μL 的样品, 则分别加到不同的柱子上, 每次 750 μL 。

3) 用 700 μL 无水乙醇稀释的洗涤缓冲液洗涤柱子, 加入柱中后静置 2min。

4) 弃去流出液, 把空柱 12000rpm 离心 1min 以甩干柱基质残余的液体。

5) 把柱子装在一个灭菌干净的 1.5ml 离心管上, 加入 20 μL 无菌去离子水到柱基质上, 10000rpm 1min 以洗脱出 DNA。

1.2.4 单链寡核苷酸接头制备

将浓度均为 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 的单链寡核苷酸 primer A 和 primer B 等比例混合, 使其终浓度为 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 h, 形成具有黏性末端的接头。单链寡核苷酸 primer A 为 5'-AGATGGAATTCGTACACTCGT-3', primer B 为 5'-TAACGAGTGTACGAATTCCATCT-3'。

1.2.5 DNA 片段与接头连接

建立 20 μL 的连接体系 (10 \times buffer 2 μL , 酶切 DNA 片段 2 μL , 接头 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 10 μL , T_4 DNA 连接酶 6U, 无菌去离子水补足至 20 μL), 16 $^{\circ}\text{C}$ 过夜连接 12~14 h。连接产物加无菌去离子水至 500 μL , 用等体积的酚/氯仿/异戊醇 (25:24:1) 抽提, 用冰乙醇纯化沉淀 DNA, 加入 15 μL 去离子水溶解。

1.2.6 接头连接片段的 PCR 扩增

连接产物以 primer A 为引物进行 PCR 扩增。25 μL 反应体系中含连接产物 1 μL , 10 mmol L^{-1} 引物 2 μL , 2.5 mmol L^{-1} d NTP 2 μL , 10 \times PCR buffer 2.5 μL , *Taq* DNA 聚合酶 1 U (天根生化科技)。PCR 程序为 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2min; 随后 36 个循环, 每个循

环94℃变性45s, 60℃退火45s, 72℃延伸1min;最后72℃延伸10min。用试剂盒纯化PCR产物(天根), 并将其浓缩至15μL。

1.2.7 亚麻微卫星文库的构建

1.2.7.1 连接产物与生物素探针杂交

用生物素标记的探针(TTC)₁₀、(ATC)₁₀与纯化的接头连接DNA片段杂交。分别建立50μL杂交混合液。反应体系含7μL 探针(10 μmol L⁻¹), 15 μL 20×SSC, 10% SDS 0.5 μL 及7.5μL ddH₂O, 58℃预热。再将20μL连接产物DNA 片段于95℃变性8 min, 再加预热的杂交混合液, 于58℃杂交1 h。杂交混合时混匀。杂交过程中平衡磁珠。

1.2.7.2 磁珠平衡

1) 将磁珠(Promega)轻轻摇匀, 吸出50μL到1.5ml的离心管中, 将离心管放到磁力架上1~2min。

2) 用移液器小心将溶液吸尽, 尽量避免将磁珠吸出。

3) 将离心管从磁力架上移开, 沿着磁珠所在的一侧加入200μL B&W洗液(10 mmol L⁻¹ Tris-HCl, 1 mmol L⁻¹ EDTA, 2 mol L⁻¹ NaCl) 用移液器小心的混匀。洗涤2次。

4) 再将离心管放在磁力架上1~2min, 并将溶液小心吸干。洗涤2次。

5) 如3), 4) 操作, 200μL洗液I (6×SSC, 0.1%SDS)反复洗涤平衡, 直到磁珠表面变得顺滑易洗脱, 重复5次左右。

6) 加入200μL洗液I, 室温放置备用。最好在0.5h内使用。

1.2.7.3 磁珠吸附富集

磁珠上包被的链霉亲和素可与探针上的生物素结合, 从而通过磁力将探针连同所需的微卫星序列一同分离出来。将杂交混合物和处理好的磁珠混匀, 并在室温轻柔晃动。

1) 于25℃温育20min, 并轻轻摇动, 使生物素和链霉亲和素充分结合。

2) 温育后将离心管置磁力架上使磁珠被吸附到管壁, 去除溶液。

3) 用200μL洗液I洗涤2次, 每次洗涤后静置10 min。

4) 用200μL洗液II (3×SSC, 0.1% SDS)洗涤2次, 每次洗涤后静置15min。

5) 用200μL洗液III (6×SSC)快速洗涤2次, 去除不含微卫星的序列。

1.2.7.4 捕获含有微卫星序列的单链DNA

1) 将离心管中的洗液III吸出, 用0.1×TE 200μL在室温快速洗2次。

2) 加0.1×TE 100μL, 95℃变性10min。释放出含有微卫星序列的单链DNA。

3) 放在磁力架上, 将磁珠吸附到管壁, 吸出含微卫星序列的单链DNA溶液备用。

1.2.8 PCR扩增含有微卫星序列的DNA 片段

以primer A为引物进行PCR扩增。25μL反应体系中包括含微卫星序列的单链DNA溶液1μL, 10nmol L⁻¹引物2 μL, 2.5 mmol L⁻¹ dNTP 2 μL, 10×PCR buffer 2.5 μL, *Taq* DNA 聚合酶1U(天根生化科技)。PCR程序为94℃预变性2min; 随后36个循环, 每个循环94℃变性45 s, 58℃退火45 s, 72℃延伸1 min;

最后72℃延伸10min。4℃保温。

1.2.9 DNA片段纯化

按 TIANGEN 普通 DNA 产物纯化试剂盒说明书操作, 纯化 DNA。

1) 柱平衡步骤: 向吸附柱CB2加入500μL, 12000rpm离心1min, 倒掉收集管中的废液, 向吸附柱CB2重新放回收集管中。

2) 估计PCR反应液或酶切反应液的体积, 向其中加入5倍体积的结合液PB, 充分混匀。

3) 将上一步所得溶液加入一个吸附柱CB2中, 室温放置2min, 12000rpm离心1 min, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱CB2放入收集管中。

4) 向吸附柱CB2中加入700μL漂洗液PW, 12000rpm离心30s倒掉废液, 吸附柱CB3放回收集管中。

5) 向吸附柱CB2中加入500μL漂洗液PW, 12000rpm离心30s倒掉废液, 吸附柱CB3放回收集管中。

6) 将吸附柱CB2放回废液收集管中, 12000rpm离心2 min, 目的是将吸附柱中残留的漂洗液去除。将吸附柱CB3置于室温或50℃温箱放置10min, 以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液。

7) 向吸附柱CB3转入一个干净的离心管中, 向吸附膜的中间部位悬空加50-100μL洗脱缓冲液TE, 室温放置5min, 12000rpm离心2min。

1.2.10 DNA片段浓缩

1) 在100μL DNA纯化好的离心管中加入10μL醋酸钠, 400μL冰乙醇, 混匀。

2) 置于-20℃的冰箱中, 置冷30min。

3) 取出, 4℃离心, 13000rpm, 20min。倒掉上清液, 动作轻缓。

- 4) 用100 μ L 70%乙醇洗涤2次，动作轻缓。
- 5) 小心吸出乙醇，DNA沉淀在管壁上，显乳白色的斑，室温风干。
- 6) 根据DNA量大小加入ddH₂O, 连接反应时充分混匀。

1.2.11 DNA片段的连接、转化、抗性筛选

1.2.11.1 DNA片段的连接

将纯化的DNA片段连接到pMD18-T Vector (Takara)上，各组分混匀后置于PCR仪中恒16 $^{\circ}$ C, 4h。

表 3-1 连接反应体系

Table3-1 The mixture of link reaction

名称	体积
pMD18-T Vector	1 μ L
Solution I	9 μ L
DNA+ddH ₂ O	10 μ L
总体积	20 μ L

1.2.11.2 转化

大肠杆菌的转化步骤如下：

- 1) 取一管含100 μ L感受态细胞 (TianGen Top10 大肠杆菌)，置冰中5min, 溶解后吸出50 μ L菌液放入另一个离心管中。
- 2) 每管加入质粒DNA (用不超过10 μ L的体积，其中的DNA小于50ng)，轻轻混匀，在冰中放置30min。
- 3) 将管放于预加温至42 $^{\circ}$ C的循环水浴中，恰恰放置90s，不要摇动管。快速将管转移到冰浴中，使细胞冷却2min。
- 4) 每管加入500 μ L SOC培养基，然后将管转移到37 $^{\circ}$ C恒温摇床上振荡培养45min，使细菌复苏并表达质粒编码的抗生素抗性标记基因。

1.2.11.3 抗性筛选

筛选含有微卫星序列的阳性克隆

- 1) 将适当体积 (一般为100~200 μ L) 已经转化的感受态细胞转移到含Amp (100mg/L) 的LB固体培养基上，进行X-gal/IPTG蓝白斑筛选，用无菌玻璃棒将菌液均匀地涂在平板上。

2) 将平板置于室温下至液体被吸收。

3) 倒置平皿，于 37℃ 恒温培养箱中培养过夜，12~16h 后可出现菌落。（注意在含有 Amp 抗生素的平板上培养的菌落不可以超过 20h，原因是时间太长容易长卫星菌落。

1.2.12 菌落检测

用PIMA法^[59]筛选含微卫星的阳性克隆，挑取白色单菌落接种到400μL LB培养液中，于37℃培养9h，用菌液做模板，用primer A及微卫星特异序列primer D [VRV(TTC)₁₀]或E [VRV(ATC)₁₀]筛选阳性克隆。20μL反应体系中含有菌液1μL，10 nmol L⁻¹ 引物各1μL，2.5 mmol L⁻¹ dNTP 1 μL，10×PCR buffer 2μL，1 U *Taq* DNA 聚合酶(天根生化科技)。PCR程序为94℃预变性2 min；94℃变性45 s，58℃退火45 s，72℃延伸1 min；36个循环，最后72℃延伸10 min，4℃保温^[60]。

1.2.13 DNA测序及序列分析

将检测出来的阳性克隆送到北京华大基因科技股份有限公司进行测序。测序结果用vecscree软件进行质量控制，针对pMD-18载体类型除质粒碱基。所得到的去质粒序列用软件BioEdit进行重叠群分析，去除重复的冗余序列，用SSRHunter对微卫星种类进行统计分析，找出微卫星序列。

1.2.14 SSR引物设计

获得的微卫星序列用在线Premier3.0设计引物 (<http://frodo.wi.mit.edu/>) 或采用软件Premier5.0合成引物。引物设计完成后，由北京华大基因科技股份有限公司合成。本实验设计引物的主要参数设置为：a) 引物长度一般在18~24碱基之间，避免重复碱基，尤其是G；b) T_m=58~65度；c) GC=30~80%；d) 3'端最后5个碱基内不能有多于2个的G或C；e) 正向引物与探针离得越近越好，但不能重叠；f) PCR扩增产物长度在100~250bp之间；g) 引物的退火温度要高，一般要在60度左右。

1.2.15 多态性SSR引物筛选

1.2.15.1 DNA提取

亚麻白花、山西大同、NDR714、WINONA SEL、K-1195、BETHVE、SOMME、WATSON 共 8 个国内外亚麻品种材料按 TIANGEN 新型 DNA 提取试剂盒说明书操作，提取 DNA，见第二章 1.1.1。

1.2.15.2 SSR 反应体系

PCR-SSR反应体系中包括含微卫星序列的DNA 溶液1 μ L, 10nmol L⁻¹ 引物各1 μ L, 2.5 mmol L⁻¹ dNTP 2 μ L, 10 \times PCRbuffer 2.5 μ L, *Taq* DNA 聚合酶1U(天根生化科技)共25 μ L。PCR程序为94 $^{\circ}$ C预变性4min; 随后36个循环, 每个循环94 $^{\circ}$ C变性45s, 60 $^{\circ}$ C退火45s, 72 $^{\circ}$ C延伸1 min;最后72 $^{\circ}$ C延伸10min。4 $^{\circ}$ C保温。

2.0%琼脂糖凝胶电泳检测:

- 1) 用胶布封好制胶槽的两端, 放置水平, 插入梳子。
- 2) 按所需浓度(2.0%), 称取适量琼脂糖与TAE一起放入三角瓶中, 摇匀, 置于微波炉中加热1-3min, 至胶体透亮后, 移出摇匀。待胶冷却至60 $^{\circ}$ C左右, 加EB至终浓度为0.5 μ g/mL。
- 3) 将凝胶倒入制胶槽中, 厚度约3mm左右。室温放置40min左右, 到胶表面泛白, 完全凝固后, 小心移去梳子和胶布。
- 4) 将胶板放入电泳槽中, 胶孔朝向负极, 加电泳缓冲液(TAE)至刚淹没胶面约2mm。加入5 μ L DNA扩增样品和1 μ L上样缓冲液(溴酚蓝和蔗糖), 混匀后点入胶孔, 标准分子量为稀释的200ngDNA。
- 5) 输出电压120V, 恒压电泳120min。
- 6) 结果记录:电泳完毕后, 将凝胶从电泳槽中取出, 凝胶成像系统观察拍照。

8.0%丙稀酰胺凝胶电泳检测:

- 1) 配制 100 μ L 非变性胶, 加入 600 μ L 过硫酸胺, 50 μ L TEMED, 用 45%的丙烯酰胺混合溶液定容。混匀后用注射器注入竖版电泳槽, 聚合 2h, 槽内加入 TBE 缓冲液。
- 2) 输出功率 12W, 恒功率电泳 4h。
- 3) 采用银染色法^[58]。操作步骤: 首先, 在托盘里加入500mL染色液(0.05% AgNO₃), 把凝胶置于托盘中, 轻摇托盘25min。然后将凝胶用蒸馏水洗10s左右后凝胶转入含显色剂的托盘中(0.01g硼砂; 7.5g氢阳化钠; 2mL无水甲醛; 500mL蒸馏水)染色10min左右。最后, 将凝胶用蒸馏水洗一次, 相机拍照、保存。

2 结果分析

2.1 基因组DNA提取

亚麻幼苗无菌暗培养，25℃恒温，湿度为55°，培养12天左右。提基因组DNA时，无色素干扰，相对比较纯。如图3-1。

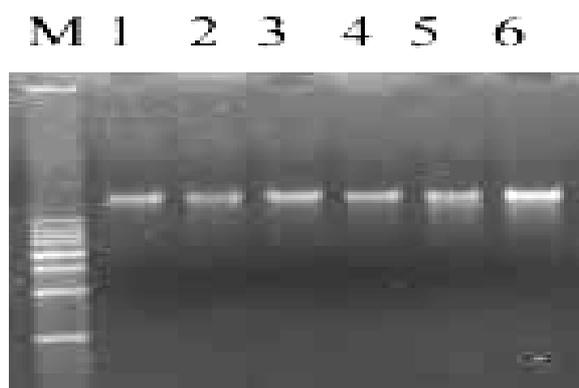


图3-1 DNA样品在1%琼脂胶上的结果。

Fig3-1 DNA samples check on 1% agarose gel

2.2 酶切、连接结果分析

选用*Mse*I 限制性内切酶酶切亚麻基因组DNA，获得了较为理想的效果(图1)。连接人工接头后进行PCR 扩增，产物片段多集中在300~1 500bp范围内(图2)，满足实验要求。

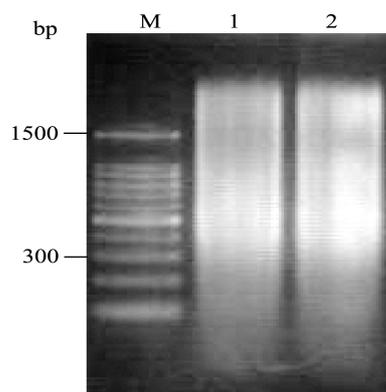


图 3-2 限制性内切酶 *Mse* I 酶切亚麻基因组 DNA

Fig. 3-2 Flax genomic DNA digestion by restriction endonuclease *Mse* I

M: marker (100 bp DNA ladder); 1-2: 酶切产物。

M: marker (100 bp DNA ladder); 1-2: *Mse* I digested produ

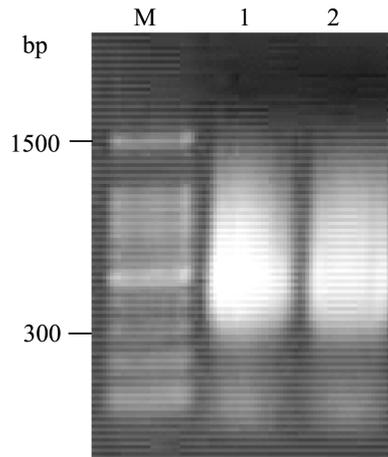


图 3-3 连接产物 PCR 扩增

Fig. 3-3 PCR products of ligated DNA

M: marker (100 bp DNA ladder); 1~2: 扩增产物。

M: marker (100 bp DNA ladder); 1-2: PCR products.

在构建基因组文库时，通常要对总的基因组DNA酶切后作选择回收，本实验用天根生化科技的琼脂糖凝胶回收试剂盒回收大小为300-1500bp的片段。为了保证酶切高效，采用酶切与连接分步进行的方式。在试验中所用的限制性内切酶和T4连接酶分别来自不同的公司，采用分步方式收到了较好的效果。

2.3 磁珠富集微卫星文库

2.3.1 双链DNA目的片段的检测

以primer A接头引物对通过带有T4 (TTC) 10和T5 (ATC) 10探针的磁珠亲和捕捉所获得的单链DNA片段为模板进行PCR扩增，获得双链目的片段的1.5%琼脂糖凝胶电泳检测结果显示：PCR扩增产物在泳道上呈弥散状，其分布范围，主要在300~750bp左右（图3-4）

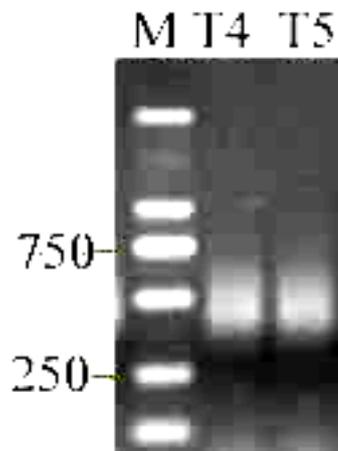


图3-4 亲和捕捉产物PCR扩增结果

Fig3-4 Single stranded DNA amplified by primer

2.3.2 筛选含微卫星的阳性克隆的结果

引物primer A和分别与引物primer D PCT-4, 引物primer E PCT-5, 以菌液为模板筛选重组克隆 (Skinner and Denoya^[60])。筛选了 (TTC)₁₀、(ATC)₁₀ 富集文库中的1979个转化子, 得到447个阳性克隆。即有447个克隆产生两条或两条以上的扩增带。表明可能含微卫星序列, 富集效率达到22.5%。用PCR法筛选亚麻卫星序列的部分克隆的电泳图见3-5 (TTC), 3-6 (ATC)。图中两条带或三条带的扩增菌落内可能含有微卫星序列。

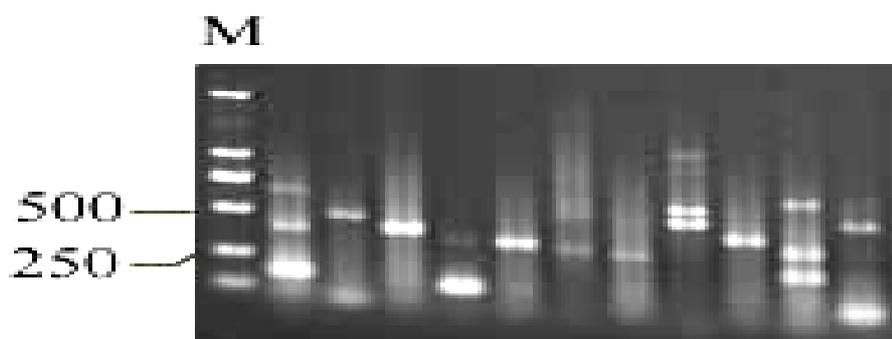


图3-5 引物A 及特异引物D PCR扩增筛选微卫星阳性克隆

Fig. 3-5 PCR screening of positive microsatellite clones with primer A and specific primer D

M: marker (2000 bp DNA ladder); 1~15: 有插入片段克隆PCR 扩增。

M: marker (2000 bp DNA ladder); 1-15: PCR results of clones with insert fragments.

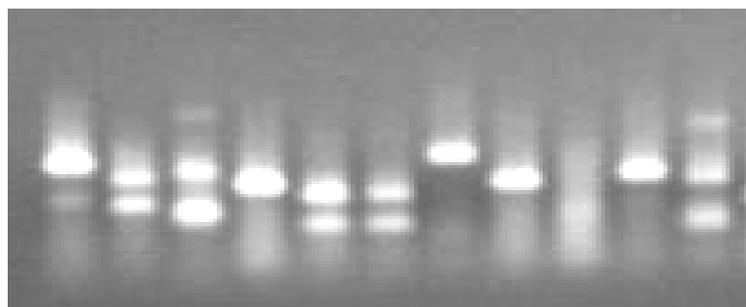


图3-6 引物A 及特异引物E PCR扩增筛选微卫星阳性克隆

Fig. 3-6 PCR screening of positive microsatellite clones with primer A and specific primer E

2.4 亚麻微卫星序列分析

447个阳性克隆测序共获得274有效序列。经去除载体序列和排除一些相似高的序列, 共获得92可设计引物的微卫星序列。SSRHunter对微卫星种类进行统计分析, 找出微卫星序列。根据Weber^[61]提出的测序标准为: perfect指没有中

表3-2 亚麻微卫星序列特性

Tab3-2 Character of microsatellite sequences in flax

克隆 Clone number	重复序列 (5' -3') Repeat sequence	微卫星序列分类 Microsatellite type
1	(CTT)34	Compound
2	(GAA)11	Compound
3	(GAA)33(AAG)11	Compound
4	(GAA)11	Compound
5	(GAA)10	Compound
6	(GAA)12	Compound
7	(GAA)7	Compound
8	(AAG)10(AGA)9	Compound
9	(GAA)11	Compound
10	(GAA)7	Compound
11	(GAA)10	Compound
12	(GAA)12(GCA)5	Compound
13	(AGA)11(GCA)5	Compound
14	(TCT)12	Compound
15	(GAA)14	Compound
16	(GAA)19	Compound
17	(AGA)8(AAG)22(AAG)12	Compound
18	(AGA)11(AAG)20(AAG)12	Compound
19	(TCT)17	Compound
20	(TCT)10	Compound
21	(CTT)12	Compound
22	(AGA)8(AAG)22(AAG)11	Compound
23	(CTT)8	Compound
24	(CTT)10	Compound
25	(AAG)21	Perfect
26	(GAA)8	Compound
27	(TTC)5	Perfect
28	(GAA)12	Compound
29	(GAA)6	Compound
30	(GAT)6(TGA)5	Compound
31	(AGA)8(AAG)18	Compound
32	(GAA)11	Compound
33	(GAA)12	Compound
34	(GAA)14	Compound
35	(TCT)11	Compound
36	(TTC)6(TCT)5	Compound
37	(AGA)14	Compound
38	(CTT)12	Compound
39	(TCT)13	Compound
40	(AGA)10(AAG)9	Compound
41	(TCT)14	Compound
42	(AGA)15	Compound
43	(TTC)19	Perfect
44	(TGT)6	Compound
45	(AAG)7	Perfect

46	(TTC)8	Perfect
47	(TC)17(TCT)7	Compound
48	(TCT)17	Compound
49	(TTC)6	Perfect
50	(TTC)22	Perfect
51	(AAG)13	Perfect
52	(AAG)11	Perfect
53	(AGC)5(AGC)5	Compound
54	(AGA)10	Compound
55	(TCT)22(TTC)8	Compound
56	(GAA)11	Compound
57	(TTC)18	Perfect
58	(GAA)10	Compound
59	(TCT)7	Compound
60	(TTC)5(TTC)9	Perfect
61	(GAA)6	Compound
62	(GAT)5	Compound
63	(GAT)5	Compound
64	(CAT)5(TCA)6	Compound
65	(TGA)5	Compound
66	(CAT)10(TCA)5	Compound
67	(GAT)6	Compound
68	(GAT)7	Compound
69	(GAT)5	Compound
70	(CCA)5	Compound
71	(TCA)5	Compound
72	(TGA)10	Compound
73	(GAT)12	Compound
74	(TGA)12	Compound
75	(CAT)5(TTG)8(TGA)5	Compound
76	(TCA)7	Compound
77	(ACA)6(TCA)5	Compound
78	(GAA)5	Compound
79	(CAT)5	Compound
80	(ATC)5	Perfect
81	(ATG)15	Compound
82	(ATC)11	Perfect
83	(GAT)5	Compound
84	(ATG)6	Compound
85	(CAT)10	Compound
86	(ATC)6	Perfect
87	(GA)7(GAT)9	Compound
88	(ATC)5	Perfect
89	(CA)9	Compound
90	(ATC)5	Perfect
91	(ATG)9	Compound
92	(ATG)8	Compound

断的或附近无其他重复序列的重复序列；imperfect指两个或两个以上的同种序列

被三个碱基以下的非重复序列间隔: compound指一种重复序列与其它种类的重复序列被三个碱基以下的非重复序列所间隔。将所获得的92个微卫星序列进行归类(表3-2), 其中重复碱基数以双核苷酸重复最为常见; 复合的微卫星共76个占了82.6%, 完全的16个占了17.4%。在这些微卫星克隆中, 除了TTC、ATC重复单位外, 还观察到了GAA、TCT、GCA、CTT、AC、GAT、CCA等重复单位用Chromas软件分析序列中含不同的重复序列所表示不同的峰值。

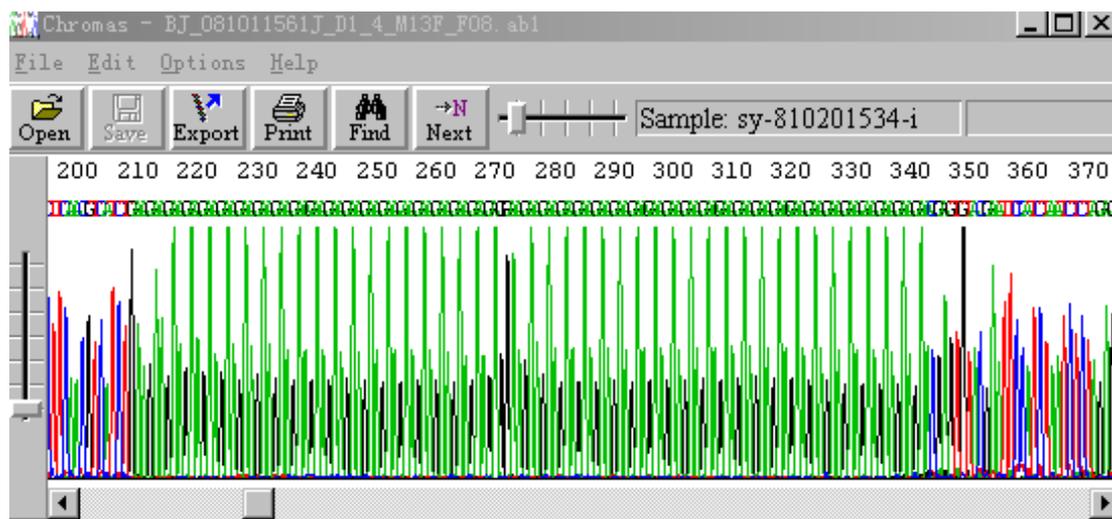


图3-7 微卫星核心序列排列方式:复合型
Fig. 3-7 Types of repeat motif: Compound

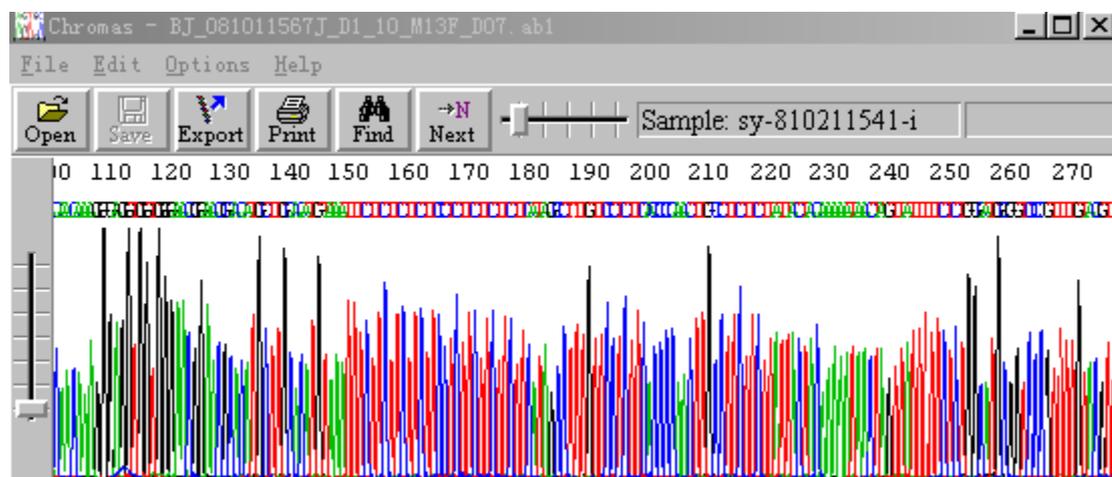


图3-8 微卫星核心序列排列方式:完美型
Fig3-8 Types of repeat motif: Perfect

造成冗余序列的原因主要有两种可能:一是PCR扩增使许多插入片段相同;二是可能由于操作过程中人为造成的重复,如接菌时同一个菌接两次。后者可以通过加强操作的准确性加以避免。Jemej和 Branka^[62]在构建蛇麻草微卫星文库时发现,减少PCR的循环次数,可以有效避免产生过多的冗余序列。因此,在建库的

2.5 亚麻微卫星特异引物设计

本实验设计引物要求:

引物设计主要参数为:引物长度20bp, 产物的长度为100-300bp; 单个引物少于3个核苷酸的互补; 通过延长Tm低的引物, 保证两个引物的Tm相差不超过4℃; 两个引物之间少于连续3个核苷酸的配对, (G+C)%含量近似(45%-55%)。表3-3

表3-3 亚麻微卫星引物

Table3-3 The primer sequence of Flax microsatellites

NUMBER	SEQUENCE (5' -3')	
TTC1	L: TCCACTCATTTCTTCATCTCA	R: ATGGGTTCTAATGGGGGATT
TTC2	L: TTACGTTCTGCTCCCTGTCC	R: AAGAAAGCTTGGTGGTGGTG
TTC3	L: AGCTGACGCAGGTTAGCTGT	R: GCATGAAGAACACCAACGAC
TTC4	L: TCGAACAACGAAACACTGATG	R: GCTCGTGATCTCCTTCATCC
TTC5	L: AA ACTACCGCCGGTGATGAT	R: TTATTTCCGGACCCTTTCAA
TTC6	L: GACGGAAGTGGGAGATGAAA	R: TTGTCCACCGCTACATTCCT
TTC7	L: AGCAGAAGAAGATGGCGAAA	R: GTCACTGGGTGTGTGTTTGC
TTC8	L: TTCACATTGCACATCATCCA	R: TTCATTCCACACCCAATGTC
TTC9	L: TTATTGGACGCCATTCAAGAG	R: TTCTCTGCCAACTGCAACAC
TTC10	L: CAACAGCGGAACTGATGAAA	R: CCCCATTCTACCATCTCCTT
TTC11	L: GCAACAATGGTGTCAATTTGG	R: ATCCCTCCTTCTCCTTCTCC
TTC12	L: GACAGTGCGTAGGGGAGAAA	R: ATGGCAGTCAGGCAAAGATT
TTC13	L: GCTGGACCTTACAAGCCTCA	R: ATGGCAGTCAGGCAAAGATT
TTC14	L: ATGGCAGTCAGGCAAAGATT	R: GACAGTGCGTAGGGGAGAAA
TTC15	L: ATGTCCGCCAAACGGTACT	R: GCCAAACTGTTCCGGTTCAA
TTC16	L: GGAACAAAGGGTAGCCATGA	R: CATCCAACAAAGGGTGGTG
TTC17	L: TGAGTTGGACCTTACAAGACTCA	R: TCCCGTAATATTCTATGTTCTTCC
TTC18	L: GTTGGACCTTACAAGACTCACTG	R: TCCCGTAATATTCTATGTTCTTCC
TTC19	L: TTGCGTGATTATCTGCTTCG	R: ATGGCAGGTTCTGCTGTTTC
TTC20	L: GCCTAAAGCTGATGCGTTTC	R: TGTCAGGCTCCTTCTTTTGC
TTC21	L: CGAATGACCTGCCTCTAGGA	R: TAGGAAGCACCACCAGGAAC
TTC22	L: ACGCCTGAGTTGGACCTTAC	R: TCCCGTAATATTCTATGTTCTTCC
TTC23	L: TCCACTCATTTCTTCATCTCA	R: ATGGGTTCTAATGGGGGATT
TTC24	L: TTACGTTCTGCTCCCTGTCC	R: AAGAAAGCTTGGTGGTGGTG
TTC25	L: ATGGCAGGTTCTGCTGTTTC	R: TTGCGTGATTATCTGCTTCG
TTC26	L: ATGATGAGCTGGAGGAGGAG	R: CAACTTCCTCATATTCCTCGAC
TTC27	L: GGGATTGAGAAGAGGGCATA	R: GTTGGGGTGAAGAGGAACAA
TTC28	L: AAGATGACGTCCGGTGGTGAT	R: CGGAACCTTCCATTTTCTC
TTC29	L: GCTTGCGAGAAGAAGGAGAA	R: TCACCAAAGGCATTACAAA
TTC30	L: GAGGCACAGGGAAACTAACG	R: TCTTGACCATCAGCATCACC
TTC31	L: GCCTGAGTTGGACCTTACAA	R: AACAAAGCGAGAGCACTCTACA
TTC32	L: GGGGAGAAATAAATGACAAGG	R: CTGGCGGCTACTGCTGCT
TTC33	L: CAATGCTTGCTGAGAAGGTG	R: CCAACAGCAACCCGTAGATT
TTC34	L: TGGACGACGATGAAGATGAA	R: CCGCCGGGTACTACTACTACT
TTC35	L: TTATTCTTGCTGCCAATCG	R: TCCAGCTCTTGCTCGTTCTT
TTC36	L: TTCTTCTTAGTCGCCGTCGT	R: AGGAAGAGTTCTGCGACGAG
TTC37	L: GCTGGACCTTACAAGCCTCA	R: TTGGTGGGAGAACAACAAGA
TTC38	L: GTTCCAGCGACAAGGAGAAG	R: TGGATCACTAACGCTGCAAT
TTC39	L: TGAGTCAGCTGGAGTTGCTG	R: TGCAAAAACCAAGAAAACC
TTC40	L: AGAGGCGGAGGGCATTAC	R: TTGGAGAGTTGGAATCGAGA

TTC41	L: GCTCCCTTTTATTTACCCAGAAA	R: GCAGTCTCGAGTGCTGAGTG
TTC42	L: TTCAACCAGGCAAATTTCAA	R: CAAGAAGAGGCCCAAGAATTG
TTC43	L: AAGGGTGGTGGTGGGAAC	R: GTTGGGGTGAAGAGGAACAA
TTC44	L: GATGGGGTTGAAGCCAGTAG	R: CCCACCCCATCTATCATTTG
TTC45	L: ATTCTTGCTGCCACGTTTCT	R: GAGGGACCCGCTCTTCTTC
TTC46	L: GAGAATCGAAGCCAAAACCA	R: CGCAGAGGAGAGAAGAGGAA
TTC47	L: TCCATCTCTGCTGGACTCAA	R: GGAGGAGAAAAGAGGGAATGG
TTC48	L: TTGCGTGATTATCTGCTTCG	R: ATGGCAGGTTCTGCTGTTTC
TTC49	L: TCGGTAATCGAGACTTGGAGA	R: GCGCGTAGGAGAAGAAGAGA
TTC50	L: CATCAGCAGGTTCTCTCTTCA	R: GCTTTACTGCTTTACACGACACA
TTC51	L: ATGGCAGGTTCTGCTGTTTC	R: TTGCGTGATTATCTGCTTCG
TTC52	L: TTTGGTTGCGTTGGTGATAA	R: CACCCCTTATCGCTCTGTA
TTC53	L: AAAGGGACCACGATGATGAG	R: TCCATATCGCACCCAATACA
TTC54	L: TGTATTGGGTGCGATATGGA	R: ACGTCCCCCATTGAATCAT
TTC55	L: TCTACAGAGTTCAATTCCTGTA	R: GTTGGACCTTACAAGACTCACTG
TTC56	L: CCTGCAGGAAAAAGTGAAGC	R: CTGCAAACAGCACAACTTCC
TTC57	L: GTTTGAGAAGAGGGCATCCA	R: GTTGGGGTGAAGAGGAACAA
TTC58	L: GCTGTTAGCACTCAGCAGCA	R: CACGTTGACCAACAAAACCA
TTC59	L: ACTGCACCTCGTCTTCTGCT	R: CGGTGATGATCTAGCTGCTG
TTC60	L: CTGCAAGCTTTCCTGCTTCT	R: CATCGACTACATCCATCACACC
TTC61	L: TCACCGGAGTTTTGATGATG	R: AGAGCAGCGGCAGTAGTAGC
ATC1	L: GGGCAGTGATTGATTGGTTT	R: GGC GGCAATTGCTACATT
ATC2	L: GCCATGGTGATTGAAAGGAG	R: TTATTGGTTCAATGCCAACG
ATC3	L: TCTTGACCATCAGCATCACC	R: GAGGCACAGGGAAACTAACG
ATC4	L: TGCTAAGGATGATGGCTTCC	R: CAGCATTGCTTCAAGGACAC
ATC5	L: CTTGCGTTACCACTCGTTT	R: GACGATGAGGATGACGGTCT
ATC6	L: CTAGAGTGCTCGCCATGGTT	R: CGAGCCCATCATTATCATCC
ATC7	L: AAAGCTCAACGATGACTCGAA	R: AGCATTCCCAACAGATCCAA
ATC8	L: GCGGTACTTGTGAGCAGGAG	R: TATGCTCCCATCAACATCA
ATC9	L: GCGGTGGAGGAGATAGGATA	R: GGTATCCATTGAAGGATGAAGC
ATC10	L: CCAGATTCTCTGCAGCATCC	R: CTTTTCATGCGACCTGGAGT
ATC11	L: TTTGGGCAGTGATTGATTGA	R: GGC GGCAATTGCTACATT
ATC12	L: TTCATGATCTCACCTAACCTGA	R: TCTTTGTTTGGTGCCAAAGTT
ATC13	L: ACGCGTAAACTTTCCGTTTC	R: ATAATGTGCGGTGCTTCTGC
ATC14	L: CCAAATCAGAATGTGCGTGT	R: TTCTCCATCATCTCACATCCA
ATC15	L: TTATTGGTTCAGTGCCAACG	R: TTGAAAGGAGGATGGGGAAT
ATC16	L: CCTCTGCTCCACATTTTCAT	R: TGAAGGACGAAGGAGATTCCG
ATC17	L: GGAAGAATTGGAAGAGGAAGG	R: CCTTCTCCCATGATCAAACAA
ATC18	L: ACCTCTTCGGGTCTCTCGTT	R: AAGGACTGGGAGCAAAGTGA
ATC19	L: CTCAGTGTATCCCTCCAG	R: GGACAGAAAGGGGAAAGGAA
ATC20	L: GATGAAGTTCGTGGGAGGAG	R: CCACATGAACCGCTGTAGAA
ATC21	L: CCAGCTTCTTCCACATCTT	R: AACAAACGAAAAGCATAGGG
ATC22	L: TAAACCAATTCTGGAACCTCACT	R: CACTGACTCCGCAGCAAATA
ATC23	L: TATTTGCTGCGGAGTCAGTG	R: TCCACCTCCGACAATTCCTC
ATC24	L: AGTACCCAACGCCAGATTT	R: AACAGCAGTCCTGGCAGTCT
TTC25	L: TACCCTCTCCGCTAGGGTTT	R: TGTGTTGATGGTGCAGATGA
ATC26	L: AGAAAGCTATGTGCGGTGGT	R: CCGAAATCTCACTCCCTTCA
ATC27	L: TCCTCAAGAGGCTAATGCAA	R: TCCTGAAATCGTGGCCTATC
ATC28	L: ACAATGGGAGTGCCAACAAT	R: CAATGCTTACCTCCTCTCTCG
ATC29	L: CGTCAGGACGAGCACTCAG	R: TTGATTCATGGGAAGAAGG
ATC30	L: GATCTTGTGCTGGGAAAG	R: TTCGTTTGCAATACGTCAGC
ATC31	L: CTTTGTGGCCTTCACCAGTT	R: TTCATGGACAAGCTCCCTCT

2.6 SSR多态性分析

2.6.1 SSR-PCR体系的优化

实验主要从退火温度、退火时间、延伸时间、反应时间、反应体系进行优化。

1)退火温度:常规PCR一般只由一个退火温度,而TD-PCR则含有几个相近的退火温度,因此在多种退火温度下对各对引物并非总是得到最有效的特异性扩增。为了使每对引物得到最有效扩增和节约实验成本,建立的体系中只选用那些退火温度相近的引物送行组合,这样可以使每个位点都能进行特异性扩增,而且可以减少非特异性扩增。

2)退火时间和延伸时间:用15、30、45、60s做了对比实验,经过反复调整,最后将位点循环时的退火时间确定为45s。由于*TaqDNA*聚合酶具有不依赖模板的延伸酶活性。*TaqDNA*聚合酶倾向于将一个A残基加到DNA模板的3'端,将循环外延时间延长,可以使扩增产物加尾整齐,以防止加尾不齐造成的多态假象。经过实验,发现延伸时间为10min最佳。

3)反应体积:考虑到PCR反应时挥发一些液体,和足够两次电泳的量采取25 μ L体系。

2.6.2 亚麻SSR引物扩增多态性分析

利用磁珠富集法开发92对引物进一步对白花、山西大同、NDR714、WINONA SEL、K-1195、BETHVE、SOMME、WATSON共8个国内外亚麻品种材料(依次以数字1到8表示)。对亚麻品种进行SSR扩增,其中90对引物均能扩增出条带,35对引物扩增具有多态性。

2.6.2.1 亚麻SSR引物扩增多态性的琼脂糖电泳结果

SSR引物扩增产物先进行琼脂糖电泳分析结果:2.0%琼脂糖凝胶电泳分析。



图3-10 TTC2为引物的8个亚麻品种SSR扩增琼脂糖凝胶电泳图

Fig.3-10 Agarose gel electrophoresis of the SSR amplification of 8 flax varieties using primer CTT2

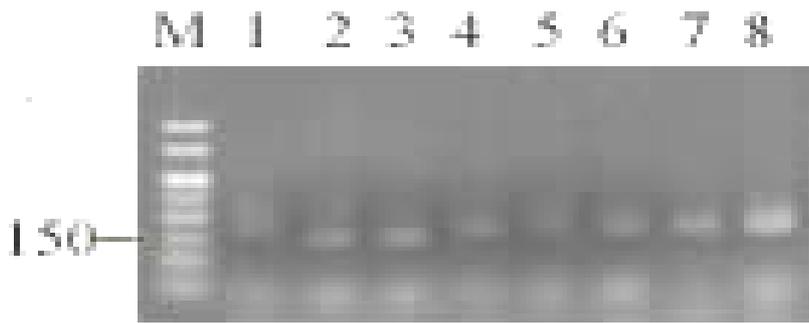


图3-11 ATC14为引物的8个亚麻品种SSR扩增琼脂糖凝胶电泳图

Fig3-11 Agarose gel electrophoresis of the SSR amplification of 8 flax varieties using primer ATC14

琼脂糖电泳结果表明，电泳图虽然没有聚丙烯酰胺电泳清晰，但一般只产生一条主带，无其它杂带干扰，较容易判断。同时根据琼脂糖电泳可以判断是否能够扩增出产物，琼脂糖电泳时间短，操作简单，为聚丙烯酰胺电泳做前期准备。图3-10说明：引物CTT2在琼脂糖电泳中可以看出具有多态性，品种4号WINONA SEL比其它品种的条带靠前，扩增片段略小。从图3-11中分析，扩增条带较弱，不利于观察分析是否具有多态性。因此，需要进一步琼脂糖电泳分析。

2.6.2.2 亚麻SSR引物扩增多态性的聚丙烯酰胺凝胶电泳分析

用聚丙烯酰胺凝胶电泳对用磁珠富集发开发的亚麻微卫星引物进行检测。其初步筛选结果为：设计的92对引物中（表3-3），90对在合适的反应体系中可以扩增出目的条带（除CTT3和CTT13没有扩增出产物）。其中35对引物并在8个亚麻品种模板中表现多态性。如以下图能体现出引物的多态性。

从微卫星位点组成看，重复次数越高的位点多态性越好。但和微卫星的种类并无多大的联系。实验中设计出来的引物与其它类型微卫星设计出来的引物效果相似。多态性和种间通用性与所检测的核苷酸种类之间没有直接联系。

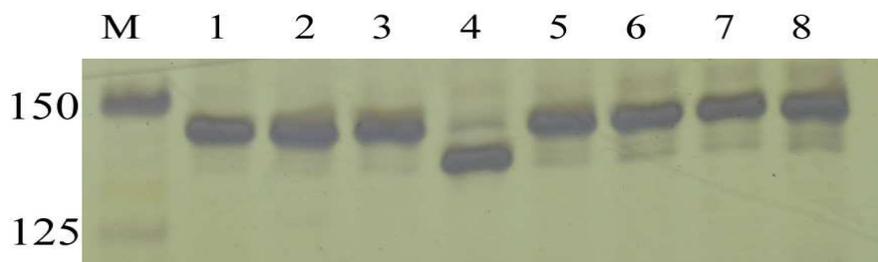


图3-12 引物TTC2的8个亚麻品种SSR扩增非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳结果

Fig. 3-12 Primer TTC2 SSR amplification results of 8 flax varieties separated by non-denaturing polyacrylamide gel

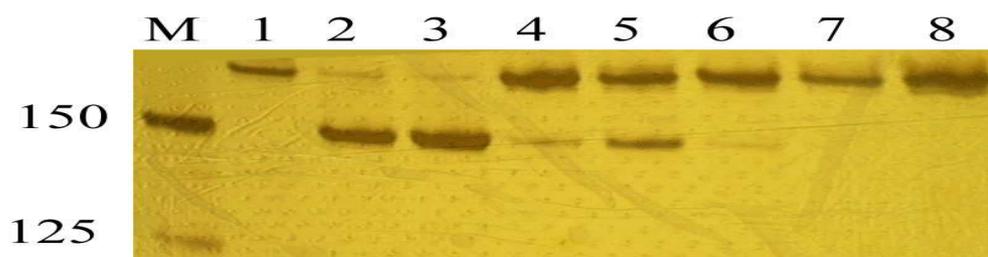


图3-13 引物ATC14的8个亚麻品种SSR扩增非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳结果

Fig. 3-13 Primer ATC14 SSR amplification results of 8 flax varieties separated by non-denaturing polyacrylamide gel

非变性聚丙烯酰胺电泳图说明, SSR-PCR扩增电泳结果的条带范围与引物设计时片段大小一致, 根据引物设计TTC2所扩增片段大小为145bp。同时由图3-10分析, 聚丙烯酰胺电泳证实了琼脂糖电泳品种4号WINONA SEL在利用引物TTC2进行SSR-PCR扩增结果比其它品种序列片段小, 容易观察具有差异性。图3-13分析, 在聚丙烯酰胺图中能清晰分辨出引物ATC14扩增结果, 2号和3号品种与其它6个品种扩增条带不一致, 较小。而在琼脂糖电泳时, 1号和5号品种不能确实得出是否扩增出产物。

92对引物进一步对白花、山西大同、NDR714、WINONA SEL、K-1195、BETHVE、SOMME、WATSON共8个国内外亚麻品种材料进行筛选。对亚麻品种进行SSR扩增, 其中90对引物能扩增出条带, 35对引物扩增具有多态性标记。

表3-4 35对多态性丰富的有效SSR引物
Table3-4 35 pairs of primers had effective polymorphisms

NUMBER	Tm	Predicted Amplicon Length (bp)
TTC1	60	179
TTC2	59	145
TTC4	60	162
TTC5	58	148
TTC7	60	142
TTC10	60	137
TTC16	60	146
TTC17	59	198
TTC19	59	132
TTC20	61	150
TTC27	60	127
TTC28	61	111
TTC29	60	141
TTC37	60	150
TTC40	60	142
TTC41	61	147
TTC42	60	123
TTC43	61	147
TTC44	60	138
TTC46	60	133
TTC50	59	150
TTC55	58	180
TTC56	60	135
TTC57	60	167
TTC61	60	103
ATC1	60	118
ATC3	60	168
ATC12	59	112
ATC13	60	147
ATC14	60	168
ATC17	60	128
ATC19	61	130
ATC20	60	130
ATC24	61	125
ATC30	60	104

3 讨论

Squirrell等在Molecular Ecology发表文章对1997年到2003年开发微卫星标记的情况作了统计，开发多态性微卫星标记比例最高的是手参(*Gymnadenia conopsea*)，在检测的12对引物中有58.3%是多态性引物，在所有开发微卫星标记的研究中，平均有24.1%的引物是多态性的引物，但17.7%的引物无多态性带，1.9-5%引物根本无法扩增^[63]。所以必须对所设计的引物通过优化反应条件，充分挖掘多态性微卫星标记。

Don等提出了降落(touchdown, TD)PCR技术^[64]，通常TD-PCR从理论或估计的退火温度10℃以上开始每进行一轮PCR循环后，退火温度降低1℃，直到达到复性温度，然后将退火温度固定在60℃进行30个循环反应。本实验对其进行了优化：第一步确定单个PCR的条件。首先利用Eppendorf梯度PCR仪对每对引物设置不同的退火温度，然后选择有特异性产物的条件，如果出现几个条件都产生特异性条带则选择温度较高的条件，因为温度高，可以减少非特异性扩增。对于出现非特异性产物的引物，仍选用这6个不同的退火温度，将退火时间与延伸时间均缩短，选择有特异性产物出现的条件，如果在该条件下仍出现非特异性产物，则说明该引物特异性可能较差。确定单个PCR反应条件后，即可选择条件相同的引物在一起进行PCR扩增。

PCR扩增产物的结果显示时，会出现其它杂带，可能Mg²⁺过高、酶效果差、酶量过多、退火温度较低等对扩增产物产生影响。通过优化，本实验PCR扩增结果较理想，电泳主带范围为设计的目的带。本实验筛选出90对引物，35对引物具有多态性，主带明显，其中标记更适于做遗传标记^[65]。但邓玉营等发现，重复次数少的微卫星也能设计引物有效扩增，多态性表现较高^[66]。本实验选择三碱基重复的微卫星，3个碱基重复次数5以上都可以设计引物，但发现3个碱基重复次数在10以上，扩增的多态性较高。

Miboume等在马铃薯中研究发现，选用核心序列排列方式为完全型的微卫星是获得多态性微卫星标记的最佳选择^[67]。但本实验发现选取复合型和不完整性微卫星进行了扩增，结果说明，序列中碱基重复次数高的多态性较好。

影响微卫星筛选还有几方面，如丙烯酰胺电泳，银染过程，点样量的多少等。非变性聚丙烯酰胺凝胶制备过程混合充分，配制胶要干净过滤除杂质，10%过流

酸铵4℃保存，10天左右换液。在制胶过程要操作柔和，避免出现气泡，气泡致使条带变形。染色过程中，把握AgNO₃加的量及染色时间不能过长，银颗粒需要溶解完全，不能有颗粒在胶中，造成背景杂乱影响结果。加入甲醛，NaOH，硼砂显色时，注意反应时间，不能过长造成胶面太黑影响照相结果。点样量尽量少，2μL左右，点样过多产生的杂带太明显，影响观察主带。

第四章 总结

1. 亚麻品种种质遗传多样性的RAPD分析

对600多条随机引物进行筛选出28个扩增稳定性较好的引物,对18份来自不同国家和地区的亚麻资源遗传多态性进行RAPD分析。结果表明:共扩增出条带529,其中多态性条带201,总的多态性百分率(PPB)为38.0%。用NTSYSpc(2.10)软件进行UPGMA聚类分析,18个亚麻品种遗传距离为0.0469~0.1332之间,可分3大类,其中红木5号与匈牙利5号亲缘关系最近,ABYSSINIA(BROWN)和匈牙利5号遗传距离相差最显著,达到0.1332。本实验结论有利于亚麻新品种选育策略的制定。在实际运用中可以根据聚类分析的结果指导亲本杂交,选择遗传距离较远的材料,增强后代的遗传变异,选育出杂种优势强,综合性状好,适合我国气候条件的优良亚麻品种。

2. 运用磁珠富集法开发亚麻微卫星标记

利用磁珠富集法筛选亚麻微卫星分子标记,应用 Dynal 磁珠-生物素标记的(TTC)10和(ATC)10与亚麻基因组DNA酶切片段杂交,捕获300~1500bp含有微卫星序列的DNA片段,连接到PMD18-T载体中,构建富集微卫星的小片段插入文库。利用接头引物和根据微卫星核心序列设计的引物VRV(TTC)10和VRV(ATC)10使用PCR直接对文库筛选。目前从1979个转化子,得到447个阳性克隆。用特异引物对这些阳性克隆进行检测筛选含有微卫星序列的克隆后对447个阳性克隆进行了测序,测序结果证实其中的274个含有微卫星序列。微卫星序列的富集效率为22.6%,PCR扩增筛选效率97.8%。共设计92对SSR引物,对白花、山西大同、NDR714、WINONA SEL、K-1195、BETHVE、SOMME、WATSON共8个国内外亚麻品种材料,进行SSR引物筛选。90对引物扩增出产物,获得了35对多态性丰富的有效引物。

3. 今后的研究设想

- 1) 进一步筛选获得微卫星标记,或构建其它三碱基或四碱基磁珠文库。
- 2), 已获得的亚麻SSR序列的基础上,通过引物扩增,利用PCR方法鉴定多态性分子标记,并利用F2分离群体定位获得的SSR标记,构建亚麻遗传连锁图谱。

参考文献

- 1 王从彦, 胡颖, 郭二辉等. 分子标记在裸子植物应用中的研究进展[J]. 分子植物育种, 2008, 6 (5) : 971-980.
- 2 高凤云, 张辉, 斯钦巴特尔. 亚麻分子标记技术研究进展[J]. 内蒙古农业科. 2006, (2) :30-31.
- 3 王玉富. 我国亚麻生物技术的现状及发展[J]. 中国麻业, 2005, 27 (2) : 60-65.
- 4 陈东明. 遗传标记及其在园艺植物研究中的应用[J]. 中国农学通报, 2005, 7(21) :66-70.
- 5 王劲松, 张剑侠, 万怡震. 分子标记及其在葡萄属植物研究上的应用[J]. 河北职业技术师范学院学报, 2001, 15(4) :54-57.
- 6 Willjams J C K, Kubelik A R, Livak K J. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful genetic markers[J]. Nucleic Acids Res, 1990, 11 (8) : 6531-6537.
- 7 Welsh J, Mcleuand M. Finger printing genomes using PCR with arbitray primers[J]. NucleicAcid Res, 1990, (18) : 7213-7218.
- 8 Botstein D. Construction of a genetic linkage map in man using restriction Fragment lengthPolymorphisms[J]. .Hum Genet, 1980, 3 (2) : 314-318.
- 9 Zabeau M, Vos P. Selective restriction fragment amplification:a general method forDNA finger prigrting[J]. European Patent Application, 1993, (9) : 240-262.
- 10 Tautz D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. Nucleic Acids Research, 1989, (17) : 6463-6471.
- 11 Wyman A,White R.highy Polymor Pmtlocusin human DNA[J]. Natl Acad Sci, 1980, (77): 90-94.
- 12 Jeffrey A J. HyPer Variable minisatellite regions in human DNA[J]. Nature, 1985, 3 (14): 114-116.
- 13 Wu K S, Tanksly S D. Abundance polymorphism and genetic mapping of microsattellite in rice[J]. Molecular General Genetics, 1993, 24 (1) : 225-235.

- 14 Morgan M, Olivieri A M. PCR—amplified microsatellite as markers in plant genetic[J]. *Plant Journal*, 1993, 3: 175-182.
- 15 Caiford P, Prakash S, Zhu J M, et al. Microsatellite in Malus domestica (apple): abundance, polymorphism and cultivar identification[J]. *Theory Applied Genetics*, 1997, 9 (4) : 249-254.
- 16 Akagi H. Highly polymorphic microsatellite of consist of AT repeat and a classification of closely related cultivar with these microsatellite loci[J]. *Theory Applied Genetics*, 1997, 9 (4) : 61-67.
- 17 Bell C J, Ecker J H. Assignment of 30 microsatellite loci to the linkage map of Arabidopsis[J]. *Genomics*, 1994, (19) : 137-144.
- 18 Saghai M A, Biyashev R M, Yang G Y, et al. Extraordinarily polymorphism microsatellite DNA in barley species diversity, chromosomal location and population dynamics[J]. *Proceeding of the national academy of science of USA*, 1994, 91: 5466-5470.
- 19 Huang W G, Cipriani G, Morgante M, et al. Microsatellite DNA in Actinidia chinensis: isolation, characterisation and homology in related species[J]. *Theory applied genetics*, 1990, 97: 1269-1278.
- 20 Hamilton M B, Pincus E L, Fiore A, et al. Universal linker and ligation procedures for construction of genomic DNA libraries enriched for microsatellite[J]. *BioTechnique*, 1999, 27: 500-507.
- 21 李孟军, 肖寒, 卢金东. 花生微卫星标记的研究进展[J]. *植物学通报*, 2008, 25 (3): 373-380.
- 22 陈全求, 詹先进, 蓝家祥等. EST分子标记开发研究进展[J]. *中国农学通报*, 2008, 24 (9) : 376-384.
- 23 Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D, et al. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification[J]. *Genomics*, 1994, 20(2): 176-183.
- 24 Bomet, Branchard M. Nonanchored inter simple sequence repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting[J]. *Plant Mol Bio*

- Rep, 2001, 19: 209-215.
- 25 Tian Y K, Wang C H, Dai H. Screening of a RAPD marker tightly linked to Co gene in apple and the SCAR marker conversion[J]. Acta Genetica Sinica , September 2004 , 31(9): 919-925.
 - 26 Paran I, Michelmore R W. Development of reliable PCR based -markers link to downy mildew resistance genes in lettuce[J]. Theor Appl Genet, 1993. 85: 985-993.
 - 27 施江, 辛莉. 卡瓦胡椒SCAR分子标记的研究[J]. 生物技术, 2007, 17(1): 98-107.
 - 28 任卫波, 张蕴薇, 韩建国等. SCAR 标记在作物和牧草上的应用现状及前景[J]. 草原与草坪, 2006, 4 (117) : 326-332.
 - 29 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]. The or Appl Genet, 2001, (103): 455-461.
 - 30 邱文武, 孙伟生, 窦美安. 基于PCR的新型分子标记SRAP研究进展[J]. 江西农业学报, 2007, 19(8): 26-28.
 - 31 李达, 于晓英, 吴莉英等. 观赏植物分子标记研究进展[J]. 生物技术通讯, 2007, 18 (6) : 137-142.
 - 32 李运贤, 李玉英等. 植物多样性的分子生物学研究方法[J]. 南阳师范学院学报, 2005, 9(4) :53-57.
 - 33 Yong B F. Genetic diversity with in a range of cultivars and landraces of flax (*linum usitatissimum*) as revealed by RAPDs[J]. Genetic Resources and Crops Evolution, 2002, 49 (2): 167-174.
 - 34 Yong B F, Gordon G, Scott D, et al. RAPD analysis of 54 North American flax cultivars[J]. *Crop Science*, Jul/Aug 2003, 43-47.
 - 35 邓欣, 陈信波, 龙松华等. 10 个亚麻品种亲缘关系的 RAPD 分析[J]. 中国麻业科学, 2007, 29 (4) : 184-188.
 - 36 何东锋, 陈信波, 邓欣等. 亚麻遗传多样性的RAPD分析[J]. 生物技术通报, 2008, (5) : 125-129.
 - 37 李建军, 郭清泉, 陈建荣等. 21 份不同木质素含量的苧麻的 RAPD 聚类分

- 析[J].中国麻业, 2006, 28(3): 120-122.
- 38 郭安平, 周鹏, 栗建光等. 红麻及其近缘种的 RAPD 分析热带亚热带植物学报 [J]. 2002, 10(4): 306-312.
- 39 Fu Y B. Geographic Patterns of RAPD Variation in Cultivated Flax[J]. Crop Science, 2005, (45): 1084-1091.
- 40 薄天岳, 叶华智, 王世全等. 亚麻抗锈病基因M4的特异分子标记遗传学报 [J]. 2002, 29(10): 922-927.
- 41 薄天岳, 叶华智, 李晓兵等. 亚麻抗枯萎病基因 FuJ7(t)的分子标记[J]. 中国农业科学, 2003, 36(3): 287-291.
- 42 Spielmeier W, Green A G, Bittisnich D, et al. Identification of quantitative trait loci contributing to Fusarium wiltresistance on an AFLP linkage map of flax (*Linum usitatissimum*) [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1998, 97: 633-641.
- 43 Michelmore R W, Paran I, Kessli R V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88: 9823-9832.
- 44 张晓平, 薛召东, 邱财生等. 利用 RAPD-BSA 法筛选亚麻耐渍基因的分子标记 [J]. 中国麻业科学, 2007, 29(5): 290-294.
- 45 高风云, 张辉, 斯钦巴特尔. 亚麻显性雄性核不育基因的 RAPD 标记[J]. 华北农业学报. 2007, 22(1): 129-131.
- 46 Treuren R L, Soest J M. Marker-assisted rationalisation of genetic resource collections a case study in flax using AFLPs[J]. *Theor Appl Genet*, 2001, 103: 144-152.
- 47 Chen Y, Hausner G, Kenaschuk E, et al. Identification of microspore-derived plants in anther culture of flax (*Linum usitatissimum*) using molecular markers[J]. *Plant Cell Reports*, 1998, 18(1-2): 44-48.
- 48 Diederichsen A, Yong B F. Phenotypic and molecular (RAPD) differentiation of four infraspecific groups of cultivated flax (*Linum usitatissimum* *L.subsp.usitatissimum*) [J]. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 2005, 100:

- 1-14.
- 49 Staub J E, Serquen F C, Gupta M. Genetic markers map construction and their application in plant breeding [J]. Hort Sciences, 1996, 31(5): 729-741.
- 50 杨业华. 普通遗传学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000, 23: 202-230.
- 51 Oh T J, Gorman M. RFLP and RAPD mapping in flax(*linum usitatissimum*) TAG [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2000, 101(4): 590-593.
- 52 Wiesner I, Wiesnerová D. Insertion of a reamplification round into the ISSR-PCR protocol gives new flax fingerprinting patterns[J]. [Cell Mol Biol Lett](#), 2003, 8(3): 743-748.
- 53 Wiesner I, Wiesnerová D. ISSR-based clustering of cultivated flax germplasm is statistically correlated to thousand seed mass[J]. Mol biotechnol 2004, 26(3): 207-214.
- 54 陈美霞, 张广庆, 祁建民等. 红麻 SRAP、ISSR 遗传连锁图构建的初步研究[J]. 中国麻业科学, 2008, 30 (3): 121-127.
- 55 邓欣, 陈信波, 龙松华等. 用磁珠富集法分离亚麻基因组微卫星分子标记 [J]. 作物学报, 2008, 34 (12): 2099-2105.
- 56 蒋彦波, 揭雨成, 周建林等. 苧麻基因组微卫星的分离与鉴定[J]. 作物学报, 2007, 33 (1) : 158-162.
- 57 石锐, 郭长虹. 聚丙烯酰胺凝胶中 DNA 的银染方法[J]. 生物技术, 1998, 541-548.
- 58 Zhou Y H, Dang B Y, Hu Z H, et al. Microdis section and PCR amplification of single soybean chromosome[J]. Acta Bot sin, 1998, 40: 144-150.
- 59 Lunt D H, Hutchinson W F, Carvalho G R. An efficient method for PCR-based isolation of microsatellite arrays (PIMA)[J]. Mol Ecol, 1999, 8: 891-894.
- 60 Stanlat K, Blackie S, Brown j, et al. A set of polymorphic SSR loci for subarctic willow (*Salix lanata*, *lapponum* and *Sherbacea*)[J]. Ecol Notes, 2003, 2: 280-282.
- 61 Weber L. Informativeness of human (dC-DA)_n、(dG-dT)_n polymorphisms[J]. Genomics, 1990, 7: 524-530.

- 62 Jerne J, Branka J. high through put isolation of microsatellites in Hop(*humulus lupulus* L)[J]. Plant Mol Biol Rep, 2001, 19: 217-226.
- 63 Squirrell J, Hpllingsworth P M, woodhead M. How much effort is required to isolate nuclear microsatellites from plants[J]. Molecular Ecology, 2003, 12: 1229-1348.
- 64 Don R H, Cox P T, Wainwright B J. Touch down PCR to circumvent spurious priming during gene amplification[J]. Nucleic Acids Res, 1991, 19(14): 4-8. .
- 65 Weber J L. inforativeness of human (dC-dA)_n, (dC-dT)_n polymorphisms[J]. Genomics, 1990, 7: 524-530.
- 66 邓玉营. 黄花柳微卫星富集文库的构建和筛选. 南京林业大学硕士学位论文, 2005.
- 67 Milbume D, Meyer J, Bradshaw J E. Comparison of PCR-Based marker systems for the analysis of genetic relationship in cultivated patato[J]. Mol Breeding, 1997, 127-136.

附录 A、缩写词

缩写词 (Abbreviation)

缩写词	英文名	中文名
EB	Ethidium Bromide	溴化乙锭
EDTA	Disodium ethylenediamine tetraacetate	乙二胺四乙酸钠盐
mRNA	Messenger RNA	信使 RNA
Tris	hydroxymethyl aminonethane	三羟甲基氨基甲烷
rpm	revolutions per minute	转每分钟
Amp	Ampicillin Sodium salt	氨苄青霉素
μg	microgram	微克
μl	microlitre	微升
OD	Optical Density	光密度
LB	Luria-Bertani Medium	细菌培养基
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
dNTP	Deoxyribonucleotide triphosphates	脱氧腺苷三磷酸
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside	5-溴-4-氯-3-异丙基-β-D-半乳糖苷
IPTG	Isopropyl β-D-Thiogalactopyranoside	异丙基-β-D-硫代半乳糖苷
SDS	Sodium dodecyl sulfate	十二烷基硫酸钠
ml	millilitre	毫升
mmol	millimole	毫摩尔
hr	hour	小时
NCBI	National Center for Biotechnology	美国国家信息中心
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine	四甲基二乙胺
ddH ₂ O	Double Distilled Water	双重蒸馏水

AACAGAAAGGGATAGCCGTTCAACAAGAATTGACCATTTTTTCGCCTCAATAACAACA
GCGGAACTGATGAACTACCGCCGGTGATGATGGTGGCGTCGGTGGGGGCGGCGGCG
GAAAT**GAAGAAGAAGAAGAAGAAGAA**GGAGAAGAAGAAGCAGGAGGTAAGAATGA
AGGAGATGGTAGAAATGGGGTTATGGTGATATTGAAAGGGTCCGGAAATAAGTCATAA
CTAACGGCGGTATTGACGTTGCAAATCAAGAGAAGAAGAAGGAGAAGGGTAACGT

>D148

AGAGTGGCAACCTACAAAAGAAAATAACTTGTGATTTTTTTTGTAGTAGTAATAAGAA
GGAGCCAAGTTGGGGTGAAGAGGAACAAAGGGTAGCCATGAG[**GAAGAAGAAGAAG
AAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGA
AGAA**]AGTGTACATGTGCGAGCATGTGCGTTCCGTTCCCACCACCACCCTTTGTTGGAT
GCCCTCCTCTCAAACCCAACGGCACTACCTTTCTCCTCCGCCACCACCACCCTCCAAT

>D191

AGATAGATTCGTCCTCTCCATGAAGCATCTATCTCTAAGGATACAATGATAGGAACAGC
ACGTCGTGCTGCCAAACTCAAATTACGCCTGAGTTGGACCTTACAAGACTCACTG**AGA
AGAAGAAGAAGAAGAAGA**AAA**AGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAG
AAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAG**AAAAAGAAGAAGAAGAA
GAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGATAGAGACCAAGACTTGGGAAGAACATAGAATATT
ACGGGAATTGAACTCTGTAGAGTGCTCTCGCTTGTGTCTTCCACAAAATGAAAAC
ACCACAATATATAGAGACTATAGAGAAACAGACAACCTATT

>D200

AGATAGATTCGTCCTCTCCATGAAGCATCTATCTCTAAGGATACAATGATAGGAACAGC
ACGTCGTGCTGCCAAACTCAAATTACGCCTGAGTTGGACCTTACAAGACTCACTG**AGA
AGAAGAAGAAGAAGAAGA**AAA**AGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAG
AAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAG**AGGAAGAAGAAA**AGAAGAAGAA
GAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAG**ATAGAGACCAAGACTTGGGAAGAACATAGA
ATATTACGGGAATTGAACTCTGTAGAGTGCTCTCGCTTGTGTCTTCCACTAAATGAA
AACTACCACAATATATAGAGACTATAGAGAAACAGACAACCTATT

AGTGGGTTTAGGAGAAAGTGGAAGTGTCTTTTTATAGGCCAAAACAAAGTAAGTATT

>D1-36

AGATAGATTCGTCTCTCCACGAAGCGTCTACCTCCCAGGATAACAACGACAGGAACAA
CACGTCTGTGCTGCCGAACCTCGAATTACGCCTGAGCTGGACCTTACAAGCCTCACTGAT
C[AGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGA]TGGAGACTAGG
ACTTGAGAAGAACAGAGAATAGTAGGGAATTGGATTCTATAGAGTGCTCTCTCTTGTG
TTCTCCCACCAAATGAAAACCTACCACGATATATAGAGGCGATAGAGTGGCAGACAACCT
ATT

>D1-48

AATGTGAAATATAAATATCGCAGCCCCCTCCCCTTATCCACATAATCGCAATTCTGGGTAC
AACCAGAAACAGAAACAGAGGCGGAGGGCATTACGAAGG[AGAAGAAGAAGAAGAA
GAAGAAGAAGAACAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAG]AGGAAGAGGAA
GAAGATTCAGTTTCCAATCGTCTCTAAGTCTCGATTCCAACCTCCAATCTCAATCTCA
ATCTCCAACCTCCAATCCAGGTATTTGAATGATTTAGAATTTGTTAGAAATTTGAATTTAT
ACCCAATAGTTTCATGATTGTGCTTCAAATGCATATTTTCGAGTTGTTTAGTGACTIONTAGT
AATTGTTATTGT

>D1-49

ATTTCTCAGCTCCCTTTTATTTACCCAGAAATA[TCTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTC
TTCTTCTTCTTCTTCT]GCTTCGGTGTCTTCCCAAGACTTTTCAGCAGTTGGCAGCATT
GCGTGAATGACACTCAGCACTCGAGACTGCTTAGTACCTGCTGGCGTGCTTGTGTTC
CCAGCAGCAATCAGGATCATTTCCTGACTCACCAGGTAATCTCGATACGTTCTTGTGTAT
ACTTTTTCTCTAAGTTATATTCCATTCTTGTGTTGTGAGTTTTCAATTTCAATATGGTGGC
TTGAGTGGTCAAGGGTTGTGAAATTGTTGTATGATCAAGTTAGTTCATGTTGTATGATG
AACATAGTTTTTCTCTAATCAGCTCTGCTTGT

>D1-52

ATAATAAATCTGTTCAAAAATACTTCAACCAGGCAAATTTCAAATCAAATGGTAGC[AG
AGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGA]ATCCTTACATCC
ATATACTTCTGAACAATTCTGGGCCTCTTCTTGGGTCTCCTGGGGGGTCTCATCCTAGTA
ATCTCCATAAAATCTTCTTCAATCTCATCCCTGGTCAGCGGAACACACAGCTTCATGTT

TTGGTAGCCAACACTTTTCCTGTAATTGTTAGGTTTCGGGGCGATCTTGATGCTGCTGCTG
ATGATCATCACGATCGTATTGCCTTCGCATGGAAGATGAGACGATCAAGTGTGTGTTGT
GGTGAACGTTGGTCTTGAAGCCGTACAGCTCATGGAAGATGATGAAGAGGAAGGAGA
TCCAGAGGAGGACAATGAGGAAGACTAGAGCTTGTACTTTCAAGGCC
ATGGAGGAATAAGAGCAAGAGGAGAAGTGATGTTAT

>E30

AAGACGCGTAAACTTTCCGTTTCAGTGCCGTTGGCCGCTGGTGAAGAAGAAGGGATAT
ACCGTGAATTGAATTGAATTGAAATGAAATGGCGG[**TGATGATGATGATGATGATGATGA
TGATGATGATGA**]TGCAGAAGCAGCCGACATTATTTCAAATTATTTCCCACATATATTC
TGACTIONTGTGAAAGAAAGCAAGTCAGTGACTIONCGGAAACTCAGTGAGTCGTGACACCCG
TGTGACGCTATCTTTCCCTTTTTGGTTTTTCAGACTCAGTCAAGATCAACTCGCGCTGGG
TACAGATGGTTGAATCATCCGTACGTACACGTGCGGGAATCGGACGGTTGGAAAAGAC
CAAATAAGATCTGACGTTTGGAGGAAAATGCACAGAAAATTCAAGAGTGGGGAAAGA
GAGAGTAATATTTTGATTTTAGAATCACCTCATT

>E35

AAACCAACGGAGACCAAATCAGAATGTGCGTGTGTATAATTATACACGTAAATAAATA
CCTTGAGTAGTATTTTCTGGAACATAGGGAA[**GTTGTTGTTGTTGTTATTGTTGTTGTTGT
TGTGTTGTTGATGATGATGATGAGTA**]GTGACGGCGCCGCATGGATGTGAGATGATG
GAGAAGAAGAGTTAGTAGCAATGACTTGAGAGAGAGCAGAGACCATAACGTCCAGGT
CTCTCTGAGATCTAGCTGAGTAGACTGGGAACCCATCATCATCAGGCGGATCCATCCTA
TTAT

>E44

AGAGGGAGAGGAAGGGGAAGAAGAAGGACGATGAGGAGGATGAAGATGAAGATGAT
GAGACATTGGGAGGGTTTATTGTTGATGAGGAAGAATTGGAAGAGGAAGGAGAG[**GA
AGAAGAAGAAGAA**]GAGGAGTTGATGGATGATGATGAAGAAGATGATGACGTTTGAGT
AAGGGTTCAGTAGATGGTCTTGTGTTTGTATCATGGGAGAAGGAAGTCGAAGGATGG
ACGTGTGAAATACGTGACGAGATGAAAGCAGGGT

>E72

AACCTTCACCAAATTCAGTAGCCAATCAAAGCTATTTCTCCAATGAACCTACCTTGAA
ATTGAAATCAAGCGTCACTGTCATCACTATCATCATCGATCATAGGCTCATTAGGGATGT
AGGAGCCAGGTTGCACCCACGCCTTCGCGTCCTCGACGGCAGAATGTTGTCCAAATC
AACCTCCGCCAACGGATCATCCTCTAGCTCACTGTCATCCCCTCCAGCGTTTTCACTCC
CATCTTCATCATCACTGGAGTCGTCATCACT[ATCATCATCATCATC]TTCATCATCCTCCT
CATCCTCCTCTATCATTATTCCTTTCCCCTTTCTGTCCACCACCACCGCTTCTTCATCCTC
CTCTTCGTCTTCGTCT

>E77

ACGTAGCAATTCATCTCTCTGCCTGCTCATTATATGTATATTTAGCACCTAAAAGTACTG
CAAGCTTACTTTATATTCCAGAATCACATTCCAAACTCTTTTTTCAGTATAATATCTAAAG
ATATTATTGAGGATGATGAAGTTCGTGGGAGGAGTTGTC[ATGATGATGATGATGATGAT
GATGATGATGATGATGATGATGATG]TTCGTTATAGTGCATCATAGAATGTCAACTTCAAG
TTGGATTCTACAGCGGTTTCATGTGGGTTAGCTGAGTTCGTGTCAAAGCTGCTGGCCTT
CTCCAAATGCACTTCCACGACTGCTTCGTCCGAGTAAGTTAGTTATTGTCTCTCGATTTT
TGTGATTTTCGGCATGAGTAT

>E1-27

AGGACGAAGACGAAGAGGAGGATGAAGAAGCGGTGGTGGTGGACAGAAAGGGGAA
AGGAATAATGATAGAGGAGGATGAGGAGGATGATGAAGATGAGGATGATGATGATAGT
GATGACGACTCCAGTGATGATGAAGATGGGAGTGAAAACGCAGGAGGGGATGACAGT
GAGCTAGAGGATGATCCGTTGGCGGAGGTTGATTTGGATGGAATTCGTACACTCGTTAA
AAAGAGTACCCAACGCCAGATTTTACCTCCTCTTCACTTCTTTCCAAGTACCTTCC
CACCACCAC[CATCATCATCATCATCATCATCATCATCAT]GTCGTCTCTTGAGACTGCCA
GGACTGCTGTTGGCGTCATGGGTAACCTATTGATCTCTTCTCTTCAAACACTGTACTC
TGAGTTCTGTTTCGATGTAGTAACTTGATCGACTGTTTTTCTTTCTCAGGCAACGTCATC
TCCCTCTGCTTGTTCCTCTCGCCGGTGTAAGTCCT

>E1-61

AGGAATTCTGTATAAGTTTTGTTTATCAATTTCCATCTGCGAGAGAGACGACAATTAGC
GGAACGATGTTTTGCAAAATGATGTTGCCGAATAAGAAGAAGAAGGCGGGTACGGTGC
CGGTTTACTTGAATGTTTATGATTTGACTCCCATGAATGGCTACGCTTACTGGGTCGGCC
TTGGAATCTACCACTCTGGCGTCCAAGGTTTGAATCGCCATTCCCCATTTCTCATTTC
TTTATCGACTAAAGCTTTGTAGGTTAGATCTGCATTTTCATTGATCTTGTTGCCTGGGAA
AGGATGAATTTTGTGGCTTTTGTGATGT[ATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT]AT
TTATCCAGCTGACGTATTGCAAACGAATCGTAGATTGCTAATT

致谢

本学位论文是在我的导师陈信波教授的悉心指导下完成的，从论文的选题、构思、到最后定稿都凝聚着导师巨大的心血。感谢我的导师陈信波教授三年来的谆谆教诲，您的博学、严谨、不辞辛劳和精益求精不仅让我学到了硕士三年应该学到的知识，更给了我今后一生为人处事的准则。除了学习上的严格要求，您对我们生活上的关心也常常让我们心生感动。在此论文完成之际，谨向导师的辛勤劳动和无微不至的关怀表示衷心的感谢。

感谢课题组的周小云老师、刘爱玲老师、张先文老师、龙松华老师，感谢你们在学术科研上的帮助和生活上的关心，是你们让我感受到大家庭的温暖。感谢邓欣在论文上给予的帮助，也感谢张志扬、高原、高国赋、王进、王文芳、李尉、王育华、许发喜，王镇，钟超生，王景晨，粟挺，李翔，刘翠芳谢谢你们的帮助，也感觉同校的好友李维，曹明锋，喻晓亮，徐建华等对我学业支持帮助。

感谢湖南农业大学生科院罗泽民教授、卢向阳教授、饶力群教授、张学文教授、谢达平教授、周冀衡教授、王征副教授、杨红琦教授、曾富华教授、吴永尧教授、刘树玲老师、王韬老师，感谢你们三年来给予我无价的知识 and 真诚的关爱。

感谢 2006 级硕士三班的所有同学，感谢我的朋友们，我将永远记得你们伴我走过的每一个有欢笑的日子，谢谢你们的支持和关心。

感谢我的父母，感谢我的好朋友，我所迈出的每一步，都凝聚着你们的心血和汗水。你们始终如一的支持和关爱，是我一直勇敢向前的动力。

感谢中国农科院麻类研究所农业部麻类遗传改良与工程微生物重点实验室和湖南农业大学作物基因工程重点实验室为我提供的优越实验条件。

最后也祝愿我敬爱的母校事业蒸蒸日上，永远焕发青春魅力！借次感谢辛勤培育我们的老师们，也祝愿在校的师弟、师妹和朋友们学业有成，身体健康，生活愉快！

2009年4月

作者简介

个人简介

姓名：何东锋

性别：男

籍贯：湖南邵阳

民族：汉族

出生年月：1981.4

教育背景

2002年9月-2006年6月，湖南农业大学生物科学技术学院，获工学学士学位

2007年9月-2009年6月，湖南农业大学生物科学技术学院，硕士研究生

在读期间发表的论文

1. **何东锋**，陈信波，邓欣等. 亚麻遗传多样性的 RAPD 分析. 生物技术通报，2008 年 5 期
2. **何东锋**，陈信波，高国赋. 亚麻分子标记应用研究进展. 湖南农业科学，2009 年，第 5 期
3. 邓欣，陈信波，**何东锋**等. 用磁珠富集法分离亚麻基因组微卫星分子标记 [J]. 作物学报，2008，34（12）：2099-2105.