

(19) 中华人民共和国国家知识产权局



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103642913 A

(43) 申请公布日 2014. 03. 19

(21) 申请号 201310636792. 7

(22) 申请日 2013. 12. 02

(71) 申请人 中国农业科学院麻类研究所

地址 410205 湖南省长沙市岳麓区咸嘉湖西路 348 号

(72) 发明人 栾明宝 陈建华 王晓飞 许英
孙志民 邹自征

(74) 专利代理机构 长沙市融智专利事务所
43114

代理人 袁靖

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68 (2006. 01)

C12N 15/11 (2006. 01)

权利要求书3页 说明书10页

(54) 发明名称

一种利用 EST-SSR 分子标记构建苧麻核心种质的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种利用 EST-SSR 分子标记构建苧麻核心种质的方法。首先提取苧麻种质资源的 DNA, 然后通过 EST-SSR 引物进行 PCR 扩增, 根据扩增条带记录每份种质资源的带型。对获得的带型进行分析, 利用启发式搜索和种质资源 DNA 扩增带型最大化原则构建苧麻核心种质。本发明方法中, EST-SSR 引物形成和实验操作过程简单, 易操作, 扩增带型清晰稳定, 重复性好。基于分子标记构建苧麻核心种质, 相对于田间性状构建核心种质, 具有省时省力、稳定性好等特点。基于分子标记构建的核心种质, 保证了 DNA 扩增带型种类的最大化, 有很好的代表性, 对苧麻种质的保存、评价、利用均具有重要意义。

1. 一种利用 EST-SSR 分子标记构建苧麻核心种质的方法,其特征在于,包括以下步骤:

- (1) 提取各样品苧麻种质 DNA;
 - (2) 利用设计的 21 对苧麻 EST-SSR 引物,扩增苧麻的基因组 DNA;
 - (3) 记录每个样品每对引物的 DNA 扩增带型;
 - (4) 根据 DNA 扩增带型构建苧麻核心种质;
- 所述的 21 对苧麻 EST-SSR 引物序列如下:

21 对 SSR 引物序列

引物名

称	正向引物	反向引物
b50	F: AACAAATCCAGGAGTGGCAATC	R: ACAAGCGAAGATCGTCTCATC
b35	F: CGTTCAGTCACCAGCAAGG	R: GAGGGAAGCAGGGAGAGC
b38	F: TAATCCCTCAATGGCTCTTTTC	R: GAGAAGGATACGAATTGACAGG
b40	F: TGTATAGAACTGAGTAAATGATTG	R: CAACCTTCTTAAACCACTTTTCG
b43	F: CGAGCCTTCTTCTTCTTCTGG	R: GCAAGCAATACGGACAGTAGG
c03	F: CGTGAAAATAGTGATATGTGTG	R: ACTGTAACAATCAAGAAGAAACC
c07	F: GCCACAGCCGAGGAAGAG	R: TCTCATCACCACCACCTTAGG
b27	F: AGCCAGGTTCCAGAAGTCC	R: CATAATCACAAAGTCTCGGTTCC
b28	F: TCCCACCACGGACTACTG	R: AACCACCATCATCATCATCATC
b11	F: GCGGAGGCTTAATTTGCTTTG	R: ACTCAATACATACACGGCACTAG
b16	F: ACCTCTACGGACCTCTTCTTC	R: CATAACATAACATGACACACAAGC
b24	F: GAGCCAGAGCCAGGTTCC	R: ACAAAGTCTCGGTTCCCTTACAC
b34	F: AATAGAATGTGGAGGCGATAGAG	R: AAACCATAAATCAACTACCGAACC
b64	F: CTTGAGATACAGCCTTCCATTAG	R: CACACCTCGCTTCCCTTG
c17	F: GAAACTATTTCACCAACAAAG	R: ACACACATTCTTACACACC
b57	F: CGGATATGGTGGAGGTTATGC	R: CAGAACGACGACGACGAC
b65	F: ACGAACCACAACACAGAGAG	R: ACGAGGGAACACCAGAGAG
c18	F: AAGCCGAGCGTGAAGAAG	R: ACACACAGAAAGAACAAGAC
b53	F: GGCTCAAGTTTGCTCATAGATTC	R: CGGCTTCGCTTTAGGATTTG
b56	F: CGGTCTGTGGATACGAATGG	R: GACGACGACGACGATGATG
c10	F: AGTGCGGAGATAACTGTTC	R: GGCTACTTTATTCTAAACCAAAC

。

2. 根据权利要求 1 所述的利用 EST-SSR 分子标记构建苧麻核心种质的方法,其特征在于,

PCR 反应体系:20 μ L,

体系组成

Mg^{2+}

终浓度

2.0mmol/L

Taq Buffer	1×
dNTP Mix	200 μmol/L
Taq Enzyme	1U
Primers	0.25 μmol/L
DNA	90ng

体系中余量为水。

3. 根据权利要求1或2所述的利用 EST-SSR 分子标记构建苧麻核心种质的方法,其特征在于,

PCR 扩增程序:95℃预变性 5min,94℃变性 1min,55℃复性 50sec,72℃延伸 1min,29 次循环后 72℃延伸 10min。

4. 根据权利要求1所述的利用 EST-SSR 分子标记构建苧麻核心种质的方法,其特征在于,

步骤(4)是对每个带型进行赋值编号,然后根据启发式搜索和带型最大化原则,构建苧麻核心种质。

5. 根据权利要求1所述的利用 EST-SSR 分子标记构建苧麻核心种质的方法,其特征在于,

所述的方法能够构建 108 个苧麻品种的核心种质。

6. 利用 EST-SSR 分子标记构建苧麻核心种质所用的引物,其特征在于,

21 对 SSR 引物序列

引物名

称	正向引物	反向引物
b50	F: AACAATCCAGGAGTGGCAATC	R: ACAAGCGAAGATCGTCTCATC
b35	F: CGTTCAGTCACCAGCAAGG	R: GAGGGAAGCAGGGAGAGC
b38	F: TAATCCCTCAATGGCTCTTTTC	R: GAGAAGGATACGAATTGACAGG
b40	F: TGTATAGAACTGAGTAAATGATTG	R: CAACTTCTTAAACCACTTTTCG
b43	F: CGAGCCTTCTTCTTCTTCTGG	R: GCAAGCAATACGGACAGTAGG
c03	F: CGTGAAAATAGTGATATGTGTG	R: ACTGTAAACAATCAAGAAGAAACC
c07	F: GCCACAGCCGAGGAAGAG	R: TCTCATCACCACCCTTAGG
b27	F: AGCCAGGTTCCAGAAGTCC	R: CATAATCACAAAGTCTCGGTTCC
b28	F: TCCCACCACGGACTACTG	R: AACCACCATCATCATCATCATC
b11	F: GCGGAGGCTTAATTTGCTTTG	R: ACTCAATACATACCGGCACTAG
b16	F: ACCTCTACGGACCTCTTCTTC	R: CATAACATAACATGACACACAAGC
b24	F: GAGCCAGAGCCAGGTTCC	R: ACAAAGTCTCGGTTCTTACAC
b34	F: AATAGAATGTGGAGGCGATAGAG	R: AAACCATAAATCAACTACCGAACC
b64	F: CTTGAGATACAGCCTTCCATTAG	R: CACACCTCGCTTCCCTTG
c17	F: GAAACTATTTCACCAACAAAG	R: ACACACATTCTTACACACC
b57	F: CGGATATGGTGGAGGTTATGC	R: CAGAACGACGACGACGAC

b65	F: ACGAACCACAACACAGAGAG	R: ACGAGGGAACACCAGAGAG
c18	F: AAGCCGAGCGTGAAGAAG	R: ACACACAGAAAGAACAAGAC
b53	F: GGCTCAAGTTTGCTCATAGATTC	R: CGGCTTCGCTTTAGGATTG
b56	F: CGGTCTGTGGATACGAATGG	R: GACGACGACGACGATGATG
c10	F: AGTGCGGAGATAACTGTTC	R: GGCTACTTTATTCTAAACCAAAC

④

一种利用 EST-SSR 分子标记构建苧麻核心种质的方法

技术领域

[0001] 本发明属于植物种质资源评价技术领域,具体涉及一种利用 EST-SSR 分子标记构建苧麻核心种质的方法。

背景技术

[0002] 苧麻 (*Boehmeria nivea* L. Gaud), 又叫“中国草”, 起源于中国, 为荨麻科苧麻属的多年生宿根性草本植物, 是中国特色的天然纺织原料 [1]。除传统的纤维价值外, 苧麻的药用价值、饲料用途、水土保持、工业原料、生物能源等多功能用途已开始受到关注 [2-5]。迄今为止, 我国是收集、保存苧麻属种质资源最多的国家, 仅国家种质长沙苧麻圃就拥有 2000 多份材料, 其中的栽培资源已广泛为育种和生产所利用 [6]。植物遗传资源是新品种选育的基础, 种质资源的收集、保存、评价和利用非常重要, 然而庞大的种质资源不利于优良种质的保存和利用。为解决这一难题, Frankel 等 [7] 和 Brown [8] 提出了核心种质的概念。核心种质是指以一定的方法选择整个种质资源的一部分, 以最小的资源数量和遗传重复最大程度地代表整个种质资源的多样性。目前, 核心种质的构建不仅成功的运用在小麦 [9]、玉米 [10]、水稻 [11] 等一年生作物上, 在梅花 [12]、咖啡 [13]、桃 [14]、茶树 [15]、白桦 [16] 等多年生作物上也获得了成功。本课题组对苧麻核心种质构建方法进行了多年研究, 并于 2010 年发表了国际第一篇关于苧麻核心种质构建方面的报道 [17]。但是, 我们发表的构建苧麻核心种质的方法, 主要基于田间农艺性状。采用田间调查品种农艺性状的方法, 时间长, 费用高; 且苧麻为宿根性多年生植物, 生命周期长, 种质资源间的形态差异性状少。因此, 利用田间农艺性状构建苧麻核心种质有很多不足。

[0003] 分子标记是直接在 DNA 水平上对基因组进行多态性检测, DNA 水平的多态性主要表现为核苷酸序列的差异, 对于任何类型的核苷酸序列的差异都可用分子标记技术对其进行检测。简单重复序列 (Simple Sequence Repeat, SSR), 又称微卫星序列 (Microsatellite), 是目前应用比较广泛、发展迅速的, 基于 PCR 技术上的分子标记。SSR 标记呈现出以下优点 [18]: (1) SSR 在真核生物基因组中分布广、多态性丰富; (2) 其产物进行测序胶电泳分离时单碱基分辨率高、共显性标记遗传信息量大; (3) 呈孟德尔式遗传, 具有很好的稳定性, DNA 用量少, 技术要求低, 成本低廉, PCR 扩增的可重复性高。因此, 利用 SSR 标记构建苧麻核心种质可弥补田间农艺性状多态性低和易受环境影响的不足。

[0004] 目前, 尚未有利用 SSR 分子标记构建苧麻核心种质的方法。

发明内容

[0005] 本发明旨在创立一种利用 EST-SSR 分子标记构建苧麻核心种质的方法, 该方法能够高效、可靠的建立 108 个苧麻品种的核心种质, 对苧麻种质的保存、评价、利用均具有重要意义。

[0006] 一种利用 EST-SSR 分子标记构建苧麻核心种质的方法, 包括以下步骤:

[0007] (1) 提取各样品苧麻种质 DNA;

- [0008] (2) 设计苧麻 EST-SSR 引物, 进行苧麻的基因组 PCR 扩增;
- [0009] (3) 记录每个样品每对引物的 DNA 扩增带型;
- [0010] (4) 根据 DNA 扩增带型构建苧麻核心种质;
- [0011] 所述的 21 对苧麻 EST-SSR 引物序列如下:
- [0012]

21 对 SSR 引物序列		
引物名称	正向引物	反向引物
b50	F: AACAAATCCAGGAGTGGCAATC	R: ACAAGCGAAGATCGTCTCATC
b35	F: CGTTCAGTCACCAGCAAGG	R: GAGGGAAGCAGGGAGAGC
b38	F: TAATCCCTCAATGGCTCTTTTC	R: GAGAAGGATACGAATTGACAGG
b40	F: TGTATAGAACTGAGTAAATGATTG	R: CAACTTTCTTAAACCACTTTTCG
b43	F: CGAGCCTTCTTCTTCTTCTGG	R: GCAAGCAATACGGACAGTAGG
c03	F: CGTGAAAATAGTGATATGTGTG	R: ACTGTAACAATCAAGAAGAAACC
c07	F: GCCACAGCCGAGGAAGAG	R: TCTCATCACCACCACCTTAGG
b27	F: AGCCAGGTTCCAGAAGTCC	R: CATAATCACAAAGTCTCGGTTCC
b28	F: TCCCACCACGGACTACTG	R: AACCACCATCATCATCATCATC
b11	F: GCGGAGGCTTAATTTGCTTTG	R: ACTCAATACATACACGGCACTAG
b16	F: ACCTCTACGGACCTCTTCTTC	R: CATAACATAACATGACACACAAGC
b24	F: GAGCCAGAGCCAGGTTCC	R: ACAAAGTCTCGGTTCCCTTACAC
b34	F: AATAGAATGTGGAGGCGATAGAG	R: AAACCATAAATCAACTACCGAACC
b64	F: CTTGAGATACAGCCTTCCATTAG	R: CACACCTCGCTTCCCTTG
c17	F: GAAACTATTTCCACCAACAAAG	R: ACACACATTCTACACACC
b57	F: CGGATATGGTGGAGGTTATGC	R: CAGAACGACGACGACGAC
b65	F: ACGAACCACAACACAGAGAG	R: ACGAGGGAACACCAGAGAG
c18	F: AAGCCGAGCGTGAAGAAG	R: ACACACAGAAAGAACACAAGAC
b53	F: GGCTCAAGTTTGCTCATAGATTC	R: CGGCTTCGCTTTAGGATTTG
b56	F: CGGTCTGTGGATACGAATGG	R: GACGACGACGACGATGATG
c10	F: AGTGCGGAGATAACTGTTC	R: GGCTACTTTATTCTAAACCAAAC

[0013] PCR 反应体系 : 20 μ L,

[0014]

体系组成	终浓度
Mg ²⁺	2.0 mmol/L
Taq Buffer	1 $\times$
dNTP Mix	200 μ mol/L
Taq Enzyme	1U
Primers	0.25 μ mol/L
DNA	90ng

[0015] 体系中余量为水。

[0016] PCR 扩增程序 : 95 $^{\circ}$ C 预变性 5min, 94 $^{\circ}$ C 变性 1min, 55 $^{\circ}$ C 复性 50sec, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1min, 29 次循环后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。

[0017] 步骤(4)是对每个带型进行赋值编号, 然后根据启发式搜索和带型最大化原则, 构建苧麻核心种质。

[0018] 所述的方法能够构建 108 个苧麻品种的核心种质。

[0019] 现有技术采用田间调查品种性状的方法,时间长,费用高;且苧麻为宿根性多年生植物,生命周期长,种质资源间的形态差异性状少;因此,利用田间性状构建苧麻核心种质有很多不足。本发明利用 EST-SSR 标记构建苧麻核心种质可弥补田间性状多态性低和易受环境影响的不足,耗时短、费用低、克服了以往利用田间农艺性状构建的苧麻核心种质的方法的种种缺点,而且构建的核心种质也更可靠。

具体实施方式

[0020] 以下结合实施例旨在进一步说明本发明,而非限制本发明。

[0021] 实施例 1

[0022] 1 材料与方法

[0023] 1.1 材料

[0024] 108 份苧麻种质资源。以上材料均种植于国家长沙苧麻种质圃。

[0025]

表 1 108 份品种资源			
品种	来源地	品种	来源地
瓦窑苧麻	广西防城县	宁都大白麻	江西宁都县
赣杂 2 号	江西宜春	湘苧 1 号	湖南沅江市
庙坝苧麻	四川	新民青麻	贵州道真县
思茅红苧麻	云南普洱县	油漆麻	湖南大庸县
水箐青麻	重庆	白叶麻	江西吉安县
宜春铜皮青	江西宜春市	黎川厚皮苧麻	江西黎川县
鸭池白麻	贵州清镇县	波阳黄叶麻	江西波阳县
荣昌苧麻	重庆	小青杆	四川省渠县

[0026]

广东黄皮苧 2 号	广东	宜黄家麻	江西资溪县
青叶苧麻		咸宁大叶绿	湖南咸宁县
贺县家麻	广西贺县	野苑子	江西永丰县
广皮麻 1 号	江西瑞昌县	天台铁麻	浙江天台县
卷洞土麻	重庆	大叶红蚱蜢	江西永丰县
栗木青麻	贵州罗甸县	江口青皮苧麻	贵州
大刀麻	贵州平塘县	龙塘白麻	重庆
黎平青麻	贵州黎平县	武昌山坡苧麻 1 号	湖北
里达苧麻	云南富宁县	锦屏青麻	贵州锦屏县
革步青麻	广西隆林县	青皮秆	江西上高县
桐木青麻	广西象州县	分宜黄庄苧	江西分宜县
青皮大麻 1 号	重庆	黄九麻	湖南湘乡县
高安麻	江西高安县	广皮麻	江西瑞昌县
余江麻	江西余江县	黔苧 1 号	贵州麻科所
福利丝麻	重庆	娄山黄皮麻	贵州遵义市
务川白麻	贵州务川县	安龙苧麻 2 号	四川安龙县
宣汉丛麻	四川	岭巩青皮麻	贵州岭巩县
南充苧麻	四川南充县	日本苧麻 7 号	日本
西宁线麻	重庆巫溪县	协力青麻	重庆
蒲圻大叶绿 1 号	湖北	苦瓜青	湖南宁远县
武隆红秆	重庆武隆县	隆回白麻 1 号	湖南隆回县
小骨白	江西武宁县	永善苧麻	云南永善县
榕江白麻 1 号	贵州榕江县	红骨筋	湖北广济县
牛蹄麻	湖南加禾县	玉山麻	江西玉山县
南城厚皮苧麻	江西南城县	印尼 1 号	印尼
黄青苑	江西吉水县	四川高堤白麻	重庆
资溪麻	江西宜黄县	印尼 2 号	印尼
大田黄秆苧麻	云南富宁县	山青白麻	重庆
宁都野麻	江西宁都县	恩施青麻 2 号	湖北恩施县
黑皮麻	广西荔蒲县	新宁青麻	湖南新宁县
天宝麻 1 号	江西宜丰县	洗马土麻	广西
长沙青叶麻	湖南长沙县	印尼 3 号	印尼
川苧 2 号	四川达县	遵义串根麻	贵州遵义县
南城薄皮苧麻	江西南城县	大浴见刀白	湖北大冶县
宁都青苧麻	江西宁都县	小叶芦秆	江西永丰县
满娘苧麻	湖北恩施县	平昌家麻	四川平昌县
绿竹白	江西萍乡市	耒阳黄壳麻	湖南耒阳市
大浴见刀白	湖北大冶县	高堤青麻	重庆
衢县苧麻	浙江衢县	定业苧麻	广西
竹子鞭	江西永丰县	勐拉苧麻	缅甸

[0027]

阳朔鸡骨白	广西阳朔县	盛坝线麻	湖北恩施县
虎皮麻	江西南丰县	新铺青麻	贵州遵义市
阳新细叶绿	湖北阳新县	天排山野麻	广西
湘兰 6 号	湖南沅江市	黄金莞	湖北建始县
天宝麻	江西宜丰县	崇仁苧麻	湖南农大
黄平黄籽麻	贵州黄平县	葛根麻	湖南永顺县

[0028] 1.2 方法

[0029] 1.2.1 基因组 DNA 的提取

[0030] 在国家种质长沙苧麻圃取 108 份苧麻种质(表 1)植株的新发出的嫩芽,利用天根试剂盒提取 DNA。提取后的 DNA 通过电泳检测浓度后,计算样品 DNA 浓度,并稀释到所需浓度。

[0031] 1.2.2 引物设计与合成

[0032] 利用 SSRhunter 结合人工搜索寻找含有 SSR 的苧麻 EST 序列,搜索的标准为:单核苷酸的重复次数 ≥ 16 ,二核苷酸的重复次数 ≥ 6 ,三核苷酸的重复次数 ≥ 4 ,四核苷酸的重复次数 ≥ 3 ,五核苷酸的重复次数 ≥ 3 。六核苷酸的重复次数 ≥ 2 。为进一步利用苧麻 EST 建立 SSR 标记,在剔除 SSR 旁邻序列小于 20bp 的 EST 后,对余下的 EST-SSR 用软件 Primer5 设计苧麻 SSR 引物。设计好的 SSR 引物在南京金斯特公司合成。

[0033] 1.2.3 SSR-PCR 分析

[0034] PCR 反应体系:20 μ L 反应体系组成见表 2

[0035] 表 2 PCR 反应体系组成

[0036]

体系组成	终浓度
Mg ²⁺	2.0mmol/L
Taq Buffer	1 $\times$
dNTP Mix	200 μ mol/L each
Taq Enzyme	1U
Primers	0.25 μ mol/L each
DNA	90ng

[0037] PCR 扩增程序:95 $^{\circ}$ C 预变性 5min,94 $^{\circ}$ C 变性 1min,55 $^{\circ}$ C 复性 50sec,72 $^{\circ}$ C 延伸 1min,29 次循环后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。PCR 扩增在 PTC-200 扩增仪上进行(MJ Research, Inc.)。

[0038] 1.2.4 PCR 扩增产物检测

[0039] 扩增产物进行 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳,采用张军 [19] 的方法进行银染。记录带型。

[0040] 1.2.5 SSR 位点的遗传多样性

[0041] 利用 popgene32 软件计算 SSR 位点的遗传多样性。

[0042] 1.2.6 核心种质构建

[0043] 用筛选出多态性好的 SSR 引物,对各种质资源的苧麻基因组总 DNA 样品进行 PCR 扩增。

[0044] 对每个引物不同带型进行赋值。

[0045] 采用启发式搜索和种质资源带型最大化原则构建苧麻核心种质。

[0046] 2 结果与分析

[0047] 2.1 苧麻 EST-SSR 引物的特点

[0048] 从 NCBI 下载的 320 条 EST 序列中,共有 70 条含有 SSR 序列,其中 6 条含有 2 条以上的 SSR 序列。苧麻的 EST-SSR 种类丰富,单核苷酸至六核苷酸重复都能检出。但各类型的 EST-SSR 出现的频率大不相同。共设计了 76 对 SSR 引物,所设计的苧麻 EST-SSR 引物的优势重复单元为三核苷酸、单核苷酸和二核苷酸。其中三核苷酸基元所占的比例最高,为 46.1%;单碱基基元所占比例次之,为 19.7%;双碱基基元所占比例达到 15.8%。四碱基、五碱基和六碱基所占的比例较低,为 3.9%-7.9% 之间。

[0049] 2.2 苧麻 EST-SSR 引物的筛选

[0050] 利用 76 对 EST-SSR 引物,首先对 12 份苧麻种质 DNA 进行扩增,筛选出 21 对条带清晰的引物用于 108 份种质的 DNA 扩增。

[0051] 2.3 21 对 EST-SSR 引物的特征

[0052] 表 3 SSR 引物的遗传多样性

[0053]

Locus	NA	Obs_Het	Exp_Het
b50	2	0.23	0.40
b35	3	0.72	0.53
b38	2	0.48	0.39
b40	3	0.37	0.45
b43	2	0.40	0.32
c03	2	0.46	0.50
c07	2	0.93	0.50
b27	2	0.35	0.45
b28	2	0.29	0.41
b11	2	0.34	0.50
b16	2	0.46	0.46
b24	2	0.34	0.47
b34	2	0.28	0.40
b64	2	0.24	0.21
b65	3	0.37	0.42
c17	2	0.58	0.41
c18	3	0.67	0.64
b53	3	0.65	0.60
b56	3	0.59	0.61
c10	3	0.51	0.64
b57	2	0.59	0.50

[0054] 利用 popgene32 软件,考察了 21 对引物的遗传多样性。结果表明(表 3),21 对 SSR 引物中,每对引物扩增的位点数在 2-3 之间,其中 14 对引物扩增出 2 个位点,7 对引物扩增出 3 个位点。21 对引物的观察杂合度(H_o) 在 0.23 到 0.93 之间,期望杂合度(H_e) 在 0.21 到 0.64 之间。

[0055] 2.4 核心种质的构建

[0056] 采用启发式搜索和种质资源带型最大化原则,构建了 22 份苧麻种质组成的核心种质。

[0057]

表 4 22 份苧麻核心种质	
编号	种质名称
1	赣杂 2 号
2	水箐青麻
3	贺县家麻
4	大刀麻
5	黎平青麻
6	福利丝麻
7	务川白麻
8	大田黄秆苧麻
9	天宝麻
10	川苧 2 号
11	绿竹白
12	竹子鞭
13	新民青麻
14	黎川厚皮苧麻
15	江口青皮苧麻
16	黔苧 1 号
17	四川高堤白麻
18	山青白麻
19	洗马土麻
20	盛坝线麻
21	天宝麻
22	黄平黄秆麻

[0058] 2.5 核心种质遗传多样性评价

[0059] 21 对 SSR 引物在核心种质和原种质中的 DNA 扩增带型数目、shanon 指数和 Nei 指数见下表。结果表明,构建的核心种质 DNA 扩增带型保留率 100%,即核心种质保留了原种质的所有带型。

[0060] 分别计算了核心种质与原始种质的 shanon 指数和 nei 指数的比值,结果表明,21 对 SSR 引物中,3 对 SSR 引物核心种质的香农指数低于原始种质,占总引物的 14%,但差异均未达到显著水平($p < 0.05$)。4 对 SSR 引物核心种质的 nei 指数低于原始种质,占总引物的 19%,差异也均未达到显著水平($p < 0.05$)。表明构建的核心种质很好地代表了原始种质的遗传多样性。

[0061] 表 5 核心种质与原种质的遗传多样性

[0062]

	核心种质			原种质			核心种质/原种质		
Character	shanon.	Nei	带型	shanon.	Nei	带型	shanon.	Nei	带型
b50	1.151	0.64	9	1.078	0.582	9	1.07	1.10	1.00
b35	1.491	0.756	5	1.41	0.73	5	1.06	1.04	1.00
b38	1.123	0.628	4	0.908	0.552	4	1.24	1.14	1.00
b40	1.728	0.793	7	1.35	0.67	7	1.28	1.18	1.00
b43	0.837	0.533	3	0.716	0.486	3	1.17	1.10	1.00
c03	1.448	0.731	5	1.378	0.714	5	1.05	1.02	1.00
c07	0.663	0.318	4	0.422	0.188	4	1.57	1.69	1.00
b27	1.024	0.566	4	1.087	0.628	4	0.94	0.90	1.00
b28	1.503	0.736	6	1.336	0.682	6	1.13	1.08	1.00
b11	1.227	0.69	4	1.167	0.676	4	1.05	1.02	1.00
b16	1.207	0.678	4	1.145	0.642	4	1.05	1.06	1.00
b24	1.123	0.628	4	1.102	0.648	4	1.02	0.97	1.00
b34	1.184	0.616	5	1.167	0.615	5	1.01	1.00	1.00
b64	0.586	0.397	2	0.541	0.356	2	1.08	1.12	1.00
c17	0.625	0.434	2	0.679	0.486	2	0.92	0.89	1.00
b57	1.19	0.665	4	1.25	0.672	4	0.95	0.99	1.00
b65	1.54	0.719	7	1.243	0.624	7	1.24	1.15	1.00
c18	1.934	0.839	8	1.778	0.776	8	1.09	1.08	1.00
b53	1.772	0.81	7	1.568	0.728	7	1.13	1.11	1.00
b56	1.918	0.835	8	1.795	0.811	8	1.07	1.03	1.00
c10	1.811	0.818	7	1.815	0.821	7	1.00	1.00	1.00

[0063] 3 讨论

[0064] 苧麻种质资源是育种、科研、教学及生产的重要物质基础,历年来采用田间种植集中保存,这种保存方式难以切断各种质间病害的传播,不能有效地抵御自然灾害。如国家种质苧麻圃 1963 年的苧麻青枯病害,资源全部感染,最后焚烧重新建圃;1996 年的沅江洪水灾害,圃中 1000 多份种质丢失^[20]。因此,对种质进行备份,可以把种质保存的风险降到最低。但是由于苧麻资源数量大,且不能种子繁殖保存,只能采用无性繁殖保存,备份将会大大加大保存成本。核心种质是以最少的重复最大程度地代表整个种质资源的多样性,对核心种质进行备份,可以把种质保存的风险降到最低,且降低了保存成本。因此,构建苧麻核心种质具有重要意义。

[0065] 作为我国的特色作物,苧麻一直扮演着重要纤维作物的角色。近年来,苧麻的用途得到不断扩展,苧麻的药用价值、饲料用途、水土保持、工业原料、生物能源等多功能用途已开始受到关注。例如,水利部把苧麻确立为南方丘陵地区水土保持作物^[5];苧麻叶作为动物饲料已进入中试阶段^[4];苧麻叶提取物的药用价值研究已经获得了重要成果^[2]。对于这些新用途苧麻的遗传改良和基因定位,作为科研基础的种质资源的作用不可或缺。但是苧麻种质数量大,对特定用途的筛选工作量大。核心种质可以代表整个种质资源的遗传多样性,可以提高鉴定效率。例如,Holbrook^[21]对花生核心种质的叶斑病抗性进行了鉴定,比用全部种质鉴定,效率提高了一倍。姜慧芳等^[22]建立花生核心种质后,对其黄曲霉侵染和产毒

抗性进行了分析,从中发掘出抗黄曲霉侵染和产毒种质各 8 份,与分析所有花生资源相比,提高了效率。因此,构建苧麻核心种质,可以为苧麻新用途的研究打下坚实基础。

[0066] 2010 年,我们课题组利用 18 个田间性状进行了 790 份苧麻的核心种质构建。但是由于田间农艺性状的获得费时费力,且多态性性状少,因此,利用田间农艺性状具有很大的局限性。本研究利用 EST-SSR 分子标记进行构建苧麻核心种质具有较多优势。首先,SSR 分子标记多态性高,每对 SSR 引物可以产生 2-9 种带型;其次,SSR 标记技术试验操作简单,且获得数据不受季节限制;最后,SSR 标记技术扩增的条带统计容易,重复性高。因此,利用 EST-SSR 标记技术构建苧麻核心种质省时省力,结果可靠。

[0067] 在本发明中,我们采用了启发式搜索进行了苧麻核心种质的构建。启发式搜索是对状态空间搜索的一个方法。状态空间搜索是将问题求解过程表现为从初始状态到目标状态寻找这个路径的过程。问题的求解实际上就是找到一条路径可以从开始到结果。启发式搜索就是在状态空间中的搜索对每一个搜索的位置进行评估,得到最好的位置,再从这个位置进行搜索直到目标。因此,利用启发搜索得到的核心种质是唯一的。

[0068] 对得到的 22 份苧麻核心种质进行评价后表明,该核心种质保留了 108 份苧麻种质资源的所有带型;分别计算核心种质与原始种质的香农指数和 nei 指数的比值也发现,在核心种质中,仅有 14% 和 19% 的 SSR 引物的香农指数和 nei 指数低于原始种质,但差异均未达到显著水平($p < 0.05$)。表明核心种质很好地代表了原始种质的遗传多样性。

[0069] 5. 结论

[0070] 本发明首次把 EST-SSR 分子标记技术用于苧麻核心种质的构建。结果表明,EST-SSR 引物形成和实验操作过程简单,易操作,扩增带型清晰稳定,重复性好。基于分子标记构建核心种质,相对于田间农艺性状构建核心种质,具有省时省力、稳定性好等特点。基于分子标记构建的核心种质,保证了 DNA 扩增带型的最大化,能很好地代表原始种质的遗传多样性,代表性强。对苧麻种质资源的保存、评价与利用都具有重要意义。

[0071] 参考文献

[0072] 1. 卢浩然. 中国麻类作物栽培学. 北京:农业出版社,1992

[0073] 2 藏巩固,赵立宁,陈建华,李育君. 苧麻药用保健价值及其前景开发浅析. 中国麻业,2002, 24 :27-29.

[0074] 3. 喻春明,陈建荣,王延周. 苧麻分子育种与饲料用苧麻研究进展. 中国麻业科学,2007, 29 :389-392.

[0075] 4. 熊和平. 我国麻类生产的现状与政策建议. 中国麻业科学,2010, 32:301-304.

[0076] 5. 土小宁,陈书春. 南方坡耕地的有效水土保持植物-苧麻. 国际沙棘研究与开发,2007, 5:45-48.

[0077] 6. 熊和平. 麻类作物育种学. 北京:中国农业科技出版社,2008. pp46 - 50.

[0078] 7. Frankel O H, Brown A H D. Current Plant Genetic Resources-a critical appraisal In:genetics:New Frontiers Vol IV. New Delhi, India:Oxford and IBH Publishing, 1984. pp1 - 11.

[0079] 8. Brown A H D. Core collection:a practical approach to genetic resources management. Genome, 1989, 31:818 - 824.

[0080] 9. Hao C Y, Zhang X Y, Wang L F, Dong Y S, Shang X W, Jia J Z. _Genetic

diversity and core collection evaluations in common wheat germplasm from the northwestern spring wheat region in china. *Mol Breed*, 2006, 17:69 - 77.

[0081] 10. 姚启伦, 方平, 潘光堂. 基于 SSR 标记构建西南玉米地方品种核心种质的方法. *湖南农业大学学报·自然科学版*, 2009, 35:225 - 228

[0082] 11. 张洪亮, 李自超, 曹永生, 裘宗恩, 余萍, 王象坤. 表型水平上检验水稻核心种质的参数比较. *作物学报*, 2003, 29:252 - 257.

[0083] 12. 明军, 张启翔, 兰彦平. 梅花品种资源核心种质构建. *北京林业大学学报*, 2005, 27:65 - 69.

[0084] 13Prakash N S, Combes M C, Dussert S, Naveen S, Lashermes P. Analysis of genetic diversity in Indian robusta coffee genepool (*Coffea canephora*) in comparison with a representative core collection using SSRs and AFLPs. *Genet Resour Crop Evol*, 2005, 52:333 - 343.

[0085] 14. 李银霞, 安丽君, 姜全. 桃品种核心种质的构建与评价. *中国农业大学学报*, 2007, 12 (5):22 - 28.

[0086] 15. 王新超, 刘振, 姚明哲. 中国茶树初级核心种质取样策略研究. *茶叶科学*, 2009, 29 (2):159 - 167.

[0087] 16. 魏志刚, 高玉池, 杨传平. 白桦核心种质构建的抽样方法. *东北林业大学学报*, 2009, 37 (7):1 - 4.

[0088] 17. 栾明宝, 陈建华, 许英, 王晓飞, 孙志民. 苧麻核心种质构建方法. *作物学报*, 2010, 36:2099-2106.

[0089] 18. 方宣钧, 吴为人, 唐纪良. 作物 DNA 标记辅助育种 [M]. 北京:科学出版社, 2001, 1-9.

[0090] 19. 张军, 武耀廷, 郭旺珍. 棉花微卫星标记的 PAGE/ 银染快速检测 [J]. *棉花学报*, 2000, 12 (5):267-269. 20. 中国农业科学院麻类研究所. 中国农业科学院麻类研究所志 (1958-1997). 北京:中国农业科学技术出版社, 2008:97-98.

[0091] 21. Holbrook C C, Anderson W F. Evaluation of a core collection to identify resistance to late leafspot in peanut. *Crop Science*, 1995, 35:1700-1702.

[0092] 22. 姜慧芳, 任小平, 王圣玉. 利用核心种质发掘及评价花生抗黄曲霉资源. *作物学报*, 2010, 36:428-434.