

基于农艺性状和 ISSR 标记分析 亚麻种源的变异及遗传关系

杜光辉^{1,2}, 吴丽艳³, 段继强¹, 李建永¹, 梁雪妮¹, 刘飞虎^{1,①}

(1 云南大学生命科学学院, 云南 昆明 650091; 2 中国科学院西双版纳热带植物园昆明分部, 云南 昆明 650223;

3 云南省农业科学院园艺作物研究所, 云南 昆明 650205)

摘要: 根据农艺性状的测定结果及 ISSR 标记分析结果, 采用聚类分析方法对引种至云南昆明的 73 份亚麻 (*Linum usitatissimum* L.) 种源的变异及遗传关系进行了研究。结果表明, 73 份亚麻种源的 10 个农艺性状 (包括株高、工艺长度、茎粗、单株分枝数、单株蒴果数、单株茎干质量、单株种子产量、单株纤维产量、种子千粒重和出麻率) 均有一定的差异, 但总体上生长状况均较好; 根据农艺性状可将 73 份亚麻种源分成 2 类, 每一类又可分为 2 组, 其中, 第 I 类包括 36 份种源, 第 II 类包括 37 份种源。从 40 个 ISSR 引物中筛选出 9 个引物用于 ISSR 扩增, 共扩增出 54 条带, 其中多态性条带 33 条, 多态性条带百分率为 61.1%; 基于 ISSR 扩增结果进行聚类分析, 在相似系数 0.80 处可将供试的亚麻种源分成 3 大类: 第 1 类包括 67 份种源, 第 2 类包括 4 份种源, 第 3 类仅有 2 份种源, 在相似系数为 0.82 处第 1 类种源又可分成 3 个亚类。结果显示, 根据农艺性状和 ISSR 标记进行的聚类分析结果有一定差异, 但对二者进行综合分析, 结合亚麻不同种源的适应性及育种目的, 可培育出适于本地栽培的优良杂交后代。

关键词: 亚麻; 农艺性状; ISSR 标记; 聚类分析; 遗传变异; 遗传关系

中图分类号: S563.2.03 文献标志码: A 文章编号: 1004-0978(2009)03-0011-09

Analysis of variation and genetic relationship of *Linum usitatissimum* germplasm s based on agronomic characters and ISSR markers

DU Guang-hui^{1,2}, WU Li-yan³, DUAN Ji-qiang¹, LI Jian-yong¹, LIANG Xue-ni¹, LIU Fei-hu^{1,①} (1 School of Life Sciences, Yunnan University, Kunming 650091, China; 2 Kunming Section of Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, the Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223, China; 3 Horticultural Crop Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650205, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2009, 18(3): 11-19

Abstract According to the determination result of agronomic characters and the amplification result of ISSR markers, the variation and genetic relationship of seventy-three germplasm s of *Linum usitatissimum* L. induced to Kunming of Yunnan Province were analyzed by the cluster analysis method. The results show that there are some differences in ten agronomic characters (including plant height, technical length, stem diameter, individual branch number, capsule number, caudex dry weight, seed yield, fiber yield, 1 000-seed weight and fiber percentage) among seventy-three germplasm s, but these germplasm s grow better generally in Kunming. Based on agronomic characters, seventy-three germplasm s are divided into two categories and each of the two categories can be further divided into two groups, and category I and category II contains thirty-six and thirty-seven germplasm s, respectively. In ISSR marker analysis, nine primers selected from forty primers are used to the amplified reaction and fifty-four bands are amplified, in which there are thirty-three polymorphic bands with a percentage of 61.1%. Based on ISSR amplification result, the seventy-three germplasm s are divided into three groups in where the similarity coefficient equals to 0.80. The Group 1, Group 2 and Group 3 contains sixty-seven, four and two germplasm s, respectively. Meanwhile, the Group 1 can be further divided into three sub-groups in where

收稿日期: 2009-01-19

基金项目: 云南省科技攻关项目 (2002NG06)

作者简介: 杜光辉 (1982-), 男, 山东烟台人, 硕士研究生, 主要从事植物遗传育种方面的研究。

①通信作者, E-mail: plantbreed2004@yahoo.com.cn

the similarity coefficient equals to 0.82. It is suggested that the cluster analysis results based on agronomic characters and ISSR marker are different, but the comprehensive analysis between them can be carried on. Combining with the adaptability of different genotypes and the breeding purpose, the dominant hybrid progeny adapting to local planting may be obtained.

Key words *Linum usitatissimum* L.; agronomic character; ISSR marker; cluster analysis; genetic variation; genetic relationship

亚麻 (*Linum usitatissimum* L.) 种质资源是亚麻育种的物质基础, 全面系统地开展中国亚麻种质资源的特征、特性鉴定和亚麻纤维品质分析的研究, 对提高国内亚麻育种水平, 加快选育高产、优质、抗病亚麻新品种具有重要的现实意义。然而, 国内目前亚麻新品种选育普遍处于“爬坡”阶段, 获得的理想品种并不多, 主要原因包括种质资源贫乏、遗传基础狭窄及亲缘关系近等, 因而急需补充、扩大现有的亚麻种质资源, 丰富亚麻基因库。

在云南省的很多地区都有引种的亚麻, 品种多而杂。由于云南省商品亚麻生产历时短, 相关科技力量不强且育种工作尚处于起步阶段, 各个亚麻品种的性状记录大多不全, 可分析程度很低。近年来, 何学芹等^[1]通过 2 年的实验测定了纤维用亚麻品种的产量、经济性状、生育期、抗病性和品质等多项指标, 筛选出最适合在云南省保山地区推广种植的纤维用亚麻品种‘华星 001’和‘地安那’; 罗正明等^[2]根据原茎产量、主要农艺性状和生育期等指标对 8 个纤维用亚麻品种进行了评价, 认为品种‘云亚 1 号’、‘云亚 2 号’、‘Aurore’和‘华星 6 号’最适宜在云南省勐海县推广种植。目前国内对引进的亚麻种质资源遗传关系的研究较少, 只有邓欣等^[3]利用 25 个随机引物对来自不同国家和地区的 10 个亚麻品种的遗传多样性进行了 RAPD 分析, 采用 UPGMA 法进行分组并建立了 10 个亚麻品种的亲缘关系树状图。

DNA 分子标记是 DNA 序列信息的间接反映, 能够对现存的分类结果进行验证^[4]。分子标记的选择合适与否对于实验的成败至关重要。ISSR 分子标记是一种研究种质资源遗传多样性及亲缘关系的有效分子标记, 具有操作简单、成本低、快速灵敏、多态性高、模板 DNA 用量少以及无需预知研究对象的基因组序列等优点^[5], 已广泛应用于多种植物的亲缘关系分析中^[6-8]。

作者对引自国内外的 73 份重要亚麻种源在昆

明生长的田间农艺性状进行了系统观测评价和聚类分析, 并采用 ISSR 分子标记技术对这些种源进行了遗传变异分析, 以期揭示这些亚麻种源的遗传多样性及亲缘关系, 为亚麻的遗传改良和分子标记辅助育种提供基础研究资料, 也为进一步的遗传研究和育种实践提供基因资源。

1 材料和方法

1.1 材料

实验以近年来先后从国内外引入的 73 份亚麻种源为研究对象, 这些亚麻种源是 Argentina 2195, Natasja Pergamino Napun 52, Antares C 16, Regina Luidenburg 49/170 H. I 31-13-3-5-1, M 25-341, Opaline Fortex Hemes, Repetible 117, Saskia Wada Arian, Ras 491, Longstem, Elykache, Aurore Ibna No 2 of Franch, Agathe Fany, Czech Ganxian 74-5, Moryhin, Bulanka Diane, Angos V king, Jika Mikael Golden, 3901 D, Bayer Alpen, Texala 1841-1A, Mathis Edel, Keten i Kayseri 182/3, Malabriga M 25-41Q, Altai 1, Liral Monarch, Liral Prince, 566 H, Caxias, Japonais, Liral Sussex, Querandi MA, 1288/12, D 83, La Plata “C” selectie, Roland Danish 4Q, Laura La Plata “B” selectie, India Type 28, Walsh, Sanca Ban, Memilliod M 25-245, Pure Line N. D. R. CI 847, Landsberger Stamm 2299, Royal Ottawa 1750-12A2, Poltawa 24 Ne, Bush, Landsberger Svetoc 及 Amazon, 从 1 号至 73 号按顺序依次编号, 均保存在云南大学植物遗传育种与改良实验室。

实验用 MgCl₂、10×PCR buffer 和 Taq DNA 聚合酶均为 Promega 公司产品, 购自上海生物工程公司; dNTPs, Tris-HCl, EDTA-Na₂, PVP 和 β-巯基乙醇均为 Beibco 分装产品, 购自杰辉生物技术有限公司; ISSR 引物由上海博亚公司合成; 其他试剂均为国产分析纯。

实验用仪器有: Eppendorf 高速冷冻离心机、电泳槽 (北京六一仪器厂)、Bio-Rad 电泳仪、Eppendorf PCR 仪、WD-9403F 型紫外分析仪和 UV-1600 型紫外分光光度计等。

1.2 方法

1.2.1 田间农艺性状观测 于 2005 年 10 月下旬将各亚麻种源的种子播种于云南大学实验基地内。播种地土壤肥力基本一致, 每个种源播种 1 行, 有效种子 300 粒, 按编号顺序排列, 每行长度 1.8 m, 行间距 0.2 m。在起始行和最末行分别增播保护行以消除边行效应, 田间管理与大田生产类似。

工艺成熟期时采样, 对各农艺性状进行测定。观测指标包括株高、工艺长度、茎粗、单株分枝数、单株茎干质量、单株蒴果数、单株种子产量、种子千粒重、出麻率和单株纤维产量等 10 个农艺性状, 观测标准如下:

株高是指从子叶痕到植株顶端的长度; 工艺长度是指从子叶痕到第 1 分枝处的长度; 茎粗是指主茎中部的直径; 单株分枝数是指调查的主茎上部的一级分枝数; 单株茎干质量是指单株的茎干质量; 单株蒴果数是指全株的蒴果总数。这些指标每个品种均随机取 20 株进行观测, 结果取平均值。单株种子产量则根据一定株数的种子总质量与株数的比值计算得出; 测定种子千粒重时每个种源取样 2 次, 每次取种子 500 粒进行测定, 结果取平均值, 2 次重复间的差异不得超过 5%。

各种源均取全部麻茎, 经沤制后晒干获得干茎, 再将干茎制麻, 然后按公式 [出麻率 = (纤维质量 / 干茎质量) × 100%] 计算出麻率; 沤麻后取一定数量的有效株制麻, 然后称取纤维质量, 根据株数计算平均值即得到单株纤维产量 (打成麻的质量)。

1.2.2 ISSR 分子标记分析

1.2.2.1 总 DNA 的提取和鉴定 将种子置于培养皿中, 25 °C 条件下暗培养 3~5 d 采集黄化苗并保存于 -70 °C 冰箱中备用。

参照侯思名等^[9]的方法, 每个品种选取 3~5 株黄化苗进行总 DNA 的提取; 用质量体积分数 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测获得的总 DNA 的纯度, 电泳时 DNA 上样量为 10 μL, 电泳结束后采用 gold-view 法染色; 用紫外分光光度计测定 DNA 样品的 OD 值, 据此确定获得的总 DNA 浓度。

1.2.2.2 ISSR-PCR 反应 从 40 个 ISSR 引物中

选出扩增条带清晰、反应稳定且多态性较好的 9 个引物对 73 份亚麻种源的 DNA 样品进行扩增。

PCR 反应体系的总体积为 20 μL, 包括 1 × PCR buffer, 0.50 μmol·L⁻¹ 引物, 0.10 mmol·L⁻¹ dNTPs, 2.5 mmol·L⁻¹ Mg²⁺、1.5 U Taq DNA 聚合酶和 40 ng 模板 DNA。

PCR 扩增反应程序为: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 30 s, 50 °C~58 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 80 s, 共 35 个循环; 最后于 72 °C 完全延伸 10 min, 扩增产物于 4 °C 条件下保存。

扩增产物用质量体积分数 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 采用 gold-view 法染色后, 用紫外分析仪观察并记录扩增结果。

1.3 数据处理与分析

运用 DPS 软件对数据进行标准化处理, 并用欧氏距离和离差平方和法对 73 份供试亚麻种源的农艺性状进行系统聚类分析。

ISSR 扩增产物的分析则根据同一引物、同一位点扩增条带的有 (1)、无 (0) 得到二元数据资料, 形成 0.1 矩阵, 并采用 NTSYS-pc 软件计算种源间的遗传相似系数, 根据遗传相似系数用 UPGMA 法进行聚类分析, 并构建系统树。

2 结果和分析

2.1 亚麻种源的农艺性状分析

2.1.1 农艺性状的特点 73 份亚麻种源的 10 个农艺性状的测定结果见表 1。

由表 1 的各农艺性状数据可见, 引种的 73 份亚麻种源在昆明的长势均较为良好, 株高都在 75 cm 以上, 其中株高在 85 cm 以上的种源有 46 份, 工艺长度在 75 cm 以上的种源有 38 份; 茎粗相对较粗, 均在 1.5~2.4 mm, 单株茎干质量 0.40~2.10 g, 单株分枝数 3.1~5.8, 单株蒴果数变化较大, 为 3.9~24.0, 单株纤维产量为 0.06~0.28 g, 千粒重 2.9~6.9 g, 单株种子产量 0.07~0.73 g, 其中单株种子产量在 0.4 g 以上的有 8 份种源; 出麻率在 20.0% 以上的有 18 份种源。

2.1.2 基于农艺性状的遗传关系分析 基于上述 10 个农艺性状, 对 73 份种源进行聚类分析, 结果见图 1。在遗传距离为 31.72 处, 73 份亚麻种源分为 2 大类, 每一类还可以进一步分组。

表 1 73 份亚麻种源各农艺性状的平均值
Table 1 Average of agronomic character indexes of seventy-three gemp lasm s of *Linum usitatissimum* L.

编号 No	种源 Gemp lasm	株高 /cm Plant height	工艺长 度 /cm Techni cal length	茎粗 /mm Stem diam eter	单株农艺性状 Agronom ic character of individual					千粒重 /g 1 000-seed weight	出麻率 % Fiber percentage
					分枝数 Bran ch number	蒴果数 Capsule number	茎干质 量 /g Caudex dry weight	种子产 量 /g Seed yield	纤维产 量 /g Fiber yield		
1	Argent in 2195	93. 3	76. 1	2. 39	4. 9	18. 0	1. 85	0. 33	0. 20	4. 46	11. 3
2	Natasja	100. 8	89. 4	1. 95	3. 8	7. 4	1. 10	0. 15	0. 18	4. 10	17. 6
3	Pergam ino Napun 52	97. 6	79. 8	1. 81	4. 5	10. 0	1. 05	0. 16	0. 16	3. 36	16. 9
4	Antares	97. 1	87. 0	2. 37	4. 0	12. 7	2. 05	0. 34	0. 21	5. 72	13. 1
5	C 16	96. 8	84. 5	1. 95	4. 0	9. 8	1. 00	0. 22	0. 19	3. 66	23. 7
6	Regina	96. 9	86. 8	1. 74	4. 0	6. 3	0. 65	0. 18	0. 19	3. 56	19. 4
7	Lu idlenburg 49/170	102. 7	91. 5	1. 78	3. 5	7. 7	1. 00	0. 20	0. 16	3. 47	16. 1
8	H. I 3-13-3-5-1	97. 7	85. 4	1. 85	4. 0	8. 2	1. 10	0. 20	0. 15	4. 29	13. 9
9	M 25-341	90. 9	80. 1	1. 98	4. 1	10. 6	1. 15	0. 34	0. 11	5. 60	12. 5
10	Opaline	96. 6	80. 5	1. 87	4. 0	7. 7	1. 15	0. 17	0. 28	3. 35	31. 1
11	Fortex	95. 6	78. 6	1. 93	4. 5	11. 0	1. 20	0. 26	0. 18	3. 64	16. 6
12	Hemes	95. 2	77. 3	1. 88	4. 3	6. 5	0. 75	0. 18	0. 24	4. 17	26. 4
13	Repetble 117	90. 2	76. 6	2. 10	5. 1	11. 0	1. 30	0. 30	0. 15	5. 26	11. 4
14	Saskia	99. 8	87. 7	1. 81	3. 7	6. 2	1. 05	0. 13	0. 20	4. 14	22. 2
15	Wada	94. 6	82. 6	1. 70	3. 5	3. 9	0. 80	0. 07	0. 11	3. 71	18. 5
16	Ariane	93. 8	79. 1	1. 97	3. 7	7. 2	1. 15	0. 15	0. 20	3. 66	22. 2
17	Ras 491	94. 9	82. 8	2. 01	3. 8	8. 3	1. 30	0. 20	0. 14	4. 13	14. 8
18	Longstem	92. 9	77. 8	1. 80	4. 6	11. 0	1. 05	0. 28	0. 14	4. 18	19. 1
19	Elykache	89. 0	78. 0	1. 85	3. 6	6. 5	0. 95	0. 12	0. 18	3. 74	21. 9
20	Aurore	96. 6	85. 6	1. 89	4. 2	6. 7	0. 90	0. 22	0. 20	4. 92	25. 2
21	Ibona	80. 4	72. 2	1. 53	3. 1	4. 3	0. 55	0. 11	0. 13	3. 94	24. 4
22	No 2 of Franch	95. 8	85. 5	1. 87	4. 1	6. 5	1. 05	0. 35	0. 14	4. 02	21. 9
23	Agathe	88. 7	78. 1	1. 67	3. 6	8. 3	1. 00	0. 22	0. 18	4. 28	25. 6
24	Fany	87. 2	73. 9	1. 81	3. 7	7. 2	0. 85	0. 20	0. 18	3. 97	24. 1
25	Czech	90. 9	80. 2	1. 76	4. 0	8. 2	0. 90	0. 25	0. 19	3. 77	22. 8
26	Gauxian 74-5	91. 6	77. 7	1. 94	4. 7	12. 6	1. 05	0. 37	0. 14	4. 03	17. 0
27	Moryhin	81. 6	69. 6	1. 63	3. 7	6. 2	0. 45	0. 15	0. 17	3. 50	28. 2
28	Bulanka	89. 5	79. 6	1. 54	3. 7	5. 5	0. 40	0. 15	0. 15	4. 18	25. 2
29	Diane	100. 2	91. 0	1. 67	3. 6	6. 4	0. 95	0. 15	0. 16	4. 06	22. 8
30	Argos	85. 2	74. 4	1. 69	3. 8	6. 6	0. 85	0. 19	0. 16	4. 20	25. 8
31	Viking	86. 9	76. 8	1. 66	3. 9	5. 5	0. 70	0. 15	0. 17	5. 68	30. 1
32	Jika	85. 2	72. 7	1. 99	4. 7	8. 9	0. 95	0. 23	0. 20	3. 66	24. 9
33	Mikael	80. 3	62. 6	2. 18	4. 2	13. 9	1. 30	0. 44	0. 15	6. 14	12. 9
34	Golden	80. 7	69. 8	1. 74	3. 9	6. 0	0. 70	0. 14	0. 08	5. 17	17. 5
35	3901 D	87. 1	74. 9	1. 95	4. 1	8. 0	1. 05	0. 21	0. 13	5. 59	12. 0
36	BayerAlpen	81. 6	72. 0	2. 00	4. 7	11. 7	1. 05	0. 25	0. 11	3. 63	13. 3
37	Texala	80. 1	67. 5	1. 91	4. 2	10. 7	0. 95	0. 28	0. 09	4. 17	15. 2
38	1841-1A	90. 1	77. 4	2. 19	5. 3	12. 9	1. 25	0. 38	0. 16	3. 93	15. 5
39	Mathis Edel	85. 8	75. 6	1. 92	4. 2	8. 5	0. 85	0. 19	0. 11	3. 20	15. 4
40	Ketenikayseri 182/3	84. 2	72. 6	2. 09	4. 1	9. 9	1. 25	0. 25	0. 12	5. 45	12. 9
41	Malabrigo	87. 3	74. 3	1. 83	4. 5	7. 2	0. 95	0. 11	0. 13	3. 88	18. 8
42	M 25-410	90. 5	78. 5	1. 83	4. 8	7. 7	0. 85	0. 18	0. 12	3. 74	14. 0
43	Altai I	95. 2	81. 8	2. 09	4. 1	7. 5	1. 50	0. 19	0. 14	5. 10	12. 7
44	LinalMonarch	93. 1	83. 2	1. 79	3. 8	5. 3	0. 80	0. 12	0. 12	4. 16	14. 4
45	LinalPrince	82. 3	71. 3	1. 75	4. 5	5. 1	0. 70	0. 08	0. 09	2. 99	—
46	566Hi	93. 7	83. 3	1. 96	4. 8	8. 5	1. 05	0. 21	0. 13	4. 95	—
47	Caxias	86. 6	76. 5	1. 72	4. 0	6. 1	0. 85	0. 17	0. 11	5. 04	—

续表 1 Table 1 (Continued)

编号 No	种源 Genoplasm	株高 /cm Plant height	工艺长度 /cm Technical length	茎粗 /mm Stem diameter	单株农艺性状 Agronomic character of individual					千粒重 /g 1 000-seed weight	出麻率 % Fiber percentage
					分枝数 Branch number	蒴果数 Capsule number	茎干质量 /g Caudex dry weight	种子产量 /g Seed yield	纤维产量 /g Fiber yield		
48	Japonais	92.9	77.5	1.81	4.9	11.0	0.85	0.25	0.12	4.03	—
49	Liral Sussex	89.0	76.1	1.85	5.0	11.0	0.90	0.27	0.14	3.74	17.7
50	QuerandíMA	85.7	74.7	1.99	4.9	6.9	0.90	0.20	0.10	5.73	—
51	1288/12	79.2	68.4	1.88	5.4	11.7	0.80	0.26	0.10	3.42	—
52	D 83	84.7	69.6	2.02	5.1	12.1	1.35	0.23	0.21	4.34	13.4
53	La Plata“C” selectie	82.0	71.8	1.85	5.0	6.1	0.80	0.08	0.09	5.14	—
54	Roland	84.3	72.2	1.85	4.4	7.8	0.95	0.18	0.12	4.82	—
55	Danish 40	91.9	80.6	1.99	4.8	9.0	1.00	0.21	0.15	4.38	—
56	Laura	91.5	80.9	1.85	4.2	8.4	1.05	0.18	0.17	3.88	—
57	La Plata“B” selectie	84.7	73.4	1.94	5.5	10.1	0.95	0.22	0.10	5.49	—
58	India Type 28	76.9	63.8	2.02	4.9	13.3	0.55	0.23	0.06	6.38	—
59	Walsh	79.9	68.7	2.09	4.6	14.2	1.45	0.56	0.14	6.83	—
60	Sanca Ban	81.9	68.1	2.24	5.8	14.2	1.20	0.39	0.09	5.32	—
61	Memillid	82.5	68.4	2.09	5.6	14.5	1.05	0.42	0.15	4.46	—
62	M 25-245	78.0	65.8	2.02	4.7	11.4	0.50	0.14	0.07	4.08	—
63	Pure Line	83.0	67.7	2.05	5.0	17.5	1.15	0.51	0.14	4.13	—
64	N. D. R. CI 847	82.7	68.7	1.92	5.1	13.9	1.05	0.37	0.15	4.51	—
65	Landsberger Stamm 2299	78.0	64.3	1.78	4.9	13.8	0.85	0.35	0.12	3.72	19.6
66	Royal	86.8	71.3	1.99	4.8	12.6	1.40	0.37	0.13	4.96	—
67	Ottawa 1750-12A2	79.6	66.5	1.95	4.8	15.1	1.00	0.39	0.12	4.63	—
68	Poltawa	85.0	70.8	1.93	5.1	13.3	1.10	0.33	0.14	4.55	—
69	24 Ne	79.9	60.3	2.14	4.6	23.2	1.30	0.59	0.12	4.00	—
70	Bush	82.2	67.0	1.96	4.9	14.8	1.15	0.48	0.12	4.56	—
71	Landsberger	84.2	67.2	1.82	4.1	11.8	0.95	0.32	0.11	4.30	—
72	Svetoc	82.0	62.0	2.22	5.1	20.1	1.80	0.73	0.12	5.97	—
73	Amazon	75.0	59.5	2.02	5.2	13.6	0.95	0.53	0.12	5.96	—

第 I 类有 36 份种源, 包括 Argentina 2195, Antares, Repetible 117, Royal 1841-1A, Jitka D 83, Memillid, N. D. R. CI 847, Poltawa, Pure Line, Ottawa 1750-12A2, Bush, Mikael, Walsh, India Type 28, Sanca Ban, Amazon, 24 Ne, Svetoc, M 25-341, 3901 D, Keteni Kayseri 182/3, Golden, Caxias, Roland, QuerandíMA, La Plata “B” selectie, La Plata “C” selectie, Bayer Alpen, Texala, Landsberger, Landsberger Stamm 2299, Liral Prince, 1288/12 及 M 25-245 等种源, 在遗传距离为 21.00 处又可进一步划分为 2 组, 其中前 20 个种源为第 1 组; 后 16 个种源为第 2 组。

第 II 类有 37 份种源, 包括 Natasja, Saskia, Luilenburg 49/17Q, Diane, Regina, Opaline, Hemes, Aurore, Ariane, Elykache, Agathe, Czech, Fany, Argos, Ilona, Moryhin, Bulanka, V king, Pergamino Napun 52, Fortex, C 16, Longstem, Ganxian 74-5, Liral Sussex,

H. I 31-13-3-5-1, Ras 491, No 2 of Franch, Altai 1566 H, Danish 40, Japonais, Laura, Wada, Liral, Monarch, Mathis, Edel, Malabrigo 及 M 25-410 等种源, 在遗传距离为 14.00 处又可进一步划分为 2 组, 其中前 18 份种源为第 1 组, 后 19 份种源为第 2 组。

对各种源的农艺性状观测数据进行综合分析后可见, 第 I 类种源的株高变幅为 75.0~97.1 cm, 工艺长度变幅为 59.5~87.0 cm, 茎较粗, 多数种源的单株分枝数、单株蒴果数、单株茎干质量和单株种子产量都大于第 II 类种源, 尤其是单株种子产量, 比第 II 类种源高约 1 倍, 单株纤维产量和出麻率较低, 千粒重较大, 可以归为油纤兼用类亚麻资源。第 II 类种源的株高变幅为 80.4~102.7 cm, 工艺长度变幅为 72.2~91.5 cm, 茎较细, 单株纤维产量和出麻率都较高, 单株分枝数、单株蒴果数、单株茎干质量、单株千粒重和单株种子产量都相对较低, 具有典型的

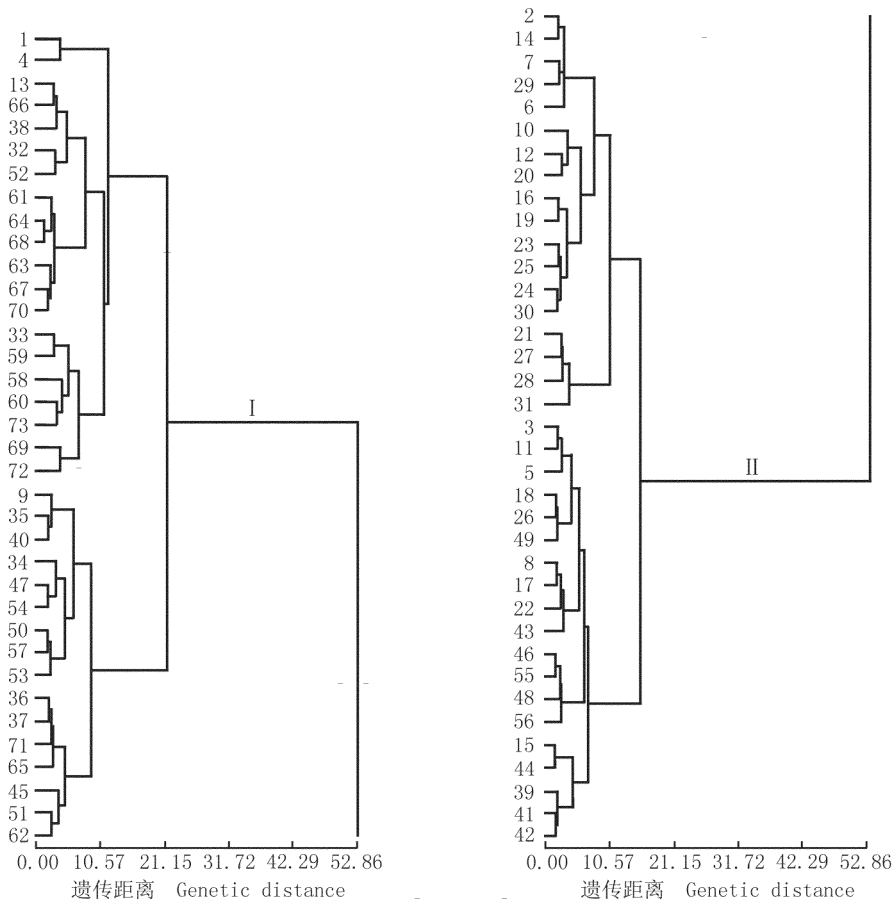


图 1 基于 73 份亚麻种源农艺性状的聚类图
Fig 1 Cluster dendrogram of seventy-three germplasms of *Linum usitatissimum* L. based on agronomic characters

纤用亚麻的特点。

通过以上分析可见,供试的 73 份亚麻种源可以明显的分成 2 大类 4 组,各类间的亲缘关系较远,杂交后代可能有较强的优势;而归为同一类的种源由于性状表现差异不大,不宜作为杂交育种的亲本。根据各亚麻种源的农艺性状特点,可将 73 份亚麻种源划分成油用和纤用 2 种类型,并分别加以利用;另外,还可以筛选出农艺性状表现优良的亚麻种源,直接用于大田种植生产或作为杂交育种的材料。

2 2 亚麻种源的 ISSR 分子标记分析

2 2 1 ISSR 标记的多态性分析

从 40 条 ISSR 引物中筛选出 9 条扩增条带清晰、重复性好且多态性丰富的引物用于 73 份亚麻种源的 ISSR 扩增分析,扩增结果见表 2。

由表 2 可以看出,9 条 ISSR 引物共扩增出 54 条条带,其中多态性条带 33 条,多态性条带百分率为 61.1%,每个引物扩增的条带数为 4~8 条,平均每个引物扩增条带数为 6 条,且扩增出的条带长度主要集中在 300~2 000 bp。

2 2 2 基于 ISSR 标记的遗传关系分析 利用 NTSYS-pc 软件对 73 份亚麻种源的 ISSR 扩增结果进行聚类分析,并构建聚类图,结果见图 2。

表 2 用于 73 份亚麻种源 ISSR 分析的引物序列及扩增结果
Table 2 Primer sequence and amplification result of ISSR analysis of seventy-three gemplams of *Linum usitatissimum* L.

引物 Primer	引物序列 (5'→3') Primer sequence (5'→3')	条带总数 Total number of band	多态性条带数 Number of polymorphic band	多态性条带百分率 % Percentage of polymorphic band
ISSR 5	CTCTCTCTCTCTCTAGG	5	4	80.0
ISSR 16	ACTGACTGACTGACTG	5	3	60.0
ISSR 19	GGGTGGGGTGGGGTG	7	5	71.4
ISSR 21	CACACACACACACAAGT	4	3	75.0
ISSR 25	AGAGAGAGAGAGAGCG	7	2	28.6
ISSR 30	TGTGTGTGTGTGTGAGG	5	5	100.0
ISSR 37	GGATGGATGATGGAT	5	4	80.0
ISSR 39	GGGGTGGGGTGGGGT	8	3	37.5
ISSR 40	GGAGAGGAGAGGAGA	8	4	50.0
合计 Total		54	33	61.1

由图 2 可见,在相似系数为 0.80 处可将 73 份亚麻种源分成 3 大类:第 1 类包含 67 份种源,种源数量最多;在相似系数为 0.82 处又可进一步细分成 3 个亚类,第 1 亚类包括 Argentin 2195、Natasja Pergamino Napun 52 及 Antares 等 10 份种源,第 2 亚类包括 Opaline Fany, Fortex 及 Hemes 等 16 份种源,第 3 亚类包括 Golden 3901 D. H. I 31-13-3-5-1 及 Liral Prince 等 41 份种源;第 2 类包含 Keten i Kayseri 182/3、D 83、Poltawa 和 24 Ne 等 4 份种源,与前述种源间的遗传距离相对较远;第 3 类仅包含种源 Repetible 117 和 Querandima,种源数量最少,与第 1 类和第 2 类种源间的遗传距离最远。聚类分析结果显示,通过 ISSR 标记分析可以揭示亚麻不同种源间的某些遗传差异。

2.3 亚麻种源农艺性状和 ISSR 分子标记的综合分析

上述研究结果表明,分别基于 73 份亚麻种源的农艺性状分析和 ISSR 标记分析所做的聚类分析结果有一定差异。在基于农艺性状所做的聚类图中,73 份亚麻种源被分为 2 类,每一类又可划分为 2 组;而在基于 ISSR 标记分析所做的聚类图中,73 份亚麻种源被分为 3 类,其中第 1 类又可细分为 3 个亚类,表明利用农艺性状划分的几个类型与根据 ISSR 标记在分子水平上划分的类型有显著差异。

根据农艺性状被划分为同组的亚麻种源并不一定具有较近的遗传关系。例如,在基于农艺性状划分的第 I 类第 1 组中,遗传关系较近的种源组合有:

Antares 和 Sanca Ban; Bush Jitka Walsh India Type

28、Svetoc 和 M kaej D 83、Poltawa 和 24 Ne、Royal Mem illod N. D. R. CI 847、Pure Line Ottawa 1750-12A2、1841-1A 和 Amazon 而 Repetible 117 与该组中的其他种源遗传关系最远。据此,在实际育种工作中,根据亚麻种源的分子遗传关系对亲本进行选择,可以避免在遗传关系较近的种源间进行杂交育种,而可以选择同组中遗传关系较远的种源组合(如 Argentin 2195 和 Repetible 117)作为亲本进行杂交育种,有可能在杂交后代中出现杂种优势,培育出新的具有优势特征的亚麻品种。

有些种源虽然在农艺性状上相差较远,但其遗传关系反而较近。如 Argentin 2195、Antares、Natasja C 16 和 Regina 的遗传关系较近,但 Argentin 2195 和 Antares 被归为油纤兼用型亚麻种源,而 Natasja C 16 和 Regina 被归为纤用型亚麻种源;虽然 Pergamino Napun 52、Lu idenburg 49/170 和 Argos 为纤用型亚麻种源, Sanca Ban 和 M 25-245 为油纤兼用型亚麻种源,但它们之间的遗传关系却较近。可见,在利用农艺性状不同的亚麻种源进行杂交育种时,也要考虑其遗传关系的远近。

综上所述,在亚麻的杂交育种过程中,应首先筛选出适合在本地生长的表现优良的种源,根据其农艺性状进行综合分析,划分出不同类型,并分析这些种源的分子遗传关系;然后根据育种目标,挑选出遗传关系较远的种源,按照优缺点互补原则选择合理的杂交组合,以缩短育种时间,提高亚麻新品种的育种成功率。

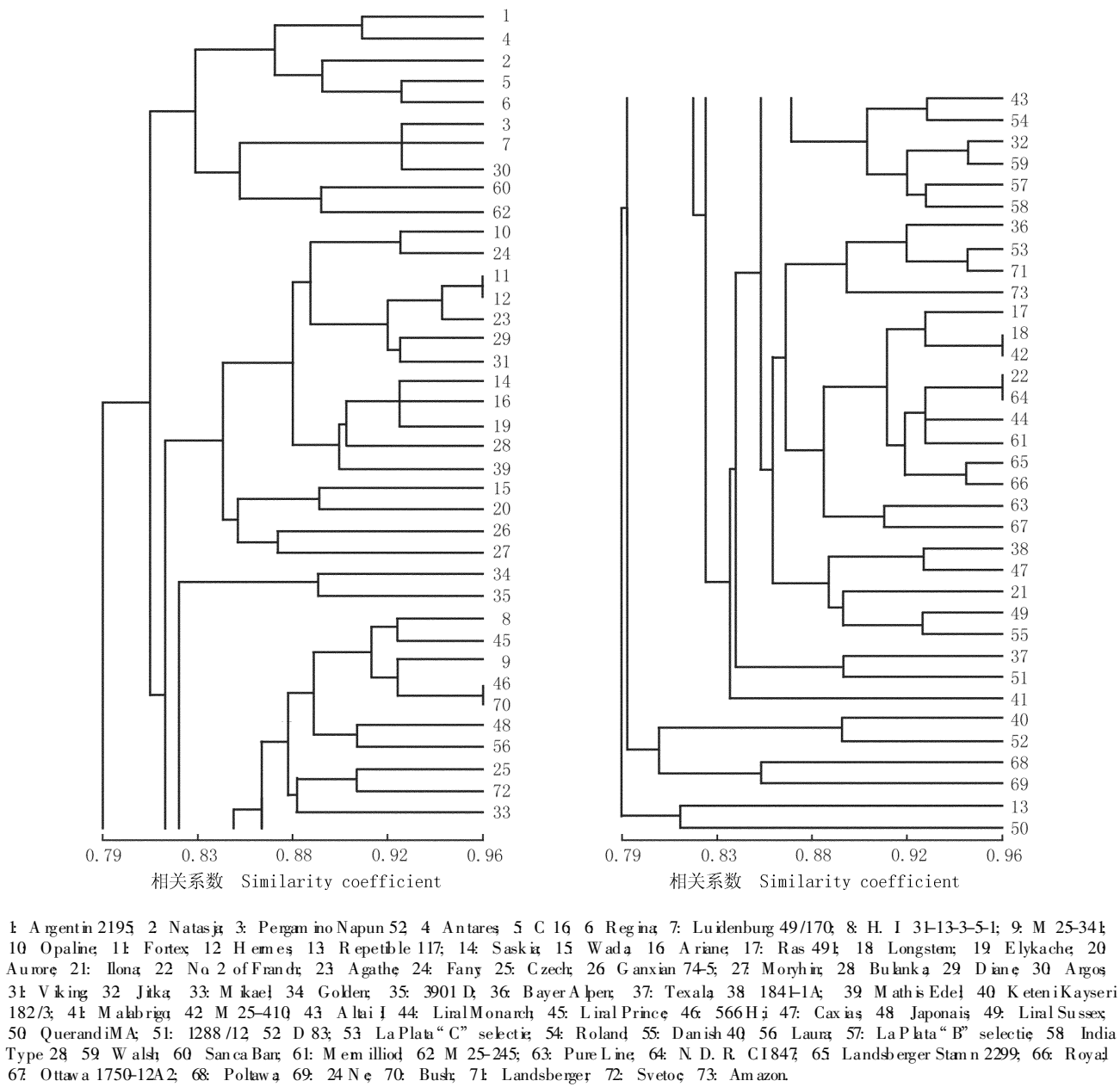


图 2 基于 73 份亚麻种源 ISSR 标记分析的聚类图
Fig 2 Cluster dendrogram of seventy-three gemplasm s of *Linum usitatissimum* L. based on ISSR marker analysis

3 结论和讨论

本实验在农艺性状调查的基础上,对 73 份亚麻种源进行了系统聚类分析,将这些亚麻种源分为 2 类 4 组,该聚类结果可以帮助育种工作者在实际工作中确定亲本的遗传距离,选择遗传距离较远的亲本进行杂交,有望在杂交后代中出现优势杂种,提高

亚麻新品种的育种成功率。

利用 ISSR 分子标记对亚麻种源的分子遗传关系进行分析,并采用 UPGMA 法进行聚类分析后建立系统树,可将 73 份亚麻种源分成 3 大类,与基于农艺性状所获得的聚类结果有较大区别。可能的原因是:用 ISSR 标记进行亚麻种源遗传变异分析,体现的是亚麻分子水平上的差异,是遗传因素的体现,而且这种分子水平的差异并不都与所研究的农艺性状

相关联, 而农艺性状的差异是亚麻表型性状差异的体现, 是遗传与环境综合作用的结果。

鉴于农艺性状和 ISSR 分子标记 2 种分析方法所获得的结果有一定的差异, 为了更合理地说明亚麻种源间的遗传关系, 作者对农艺性状分析和 ISSR 分子标记分析结果进行了综合分析。迄今为止, 国内外关于亚麻种质资源的评价研究主要集中在筛选适合当地生长的优良品种方面^[10-15], 未见基于农艺性状的聚类分析方面的研究报道, 同时亚麻的遗传关系分析也只建立在分子标记基础上^[16-18], 而对农艺性状和 ISSR 标记进行综合分析可以克服 2 种分析方法的不足, 为亚麻的育种提供更可靠的实验数据。综合分析结果表明, 在亚麻的杂交育种过程中, 应首先筛选出适合在本地生长的表现优良的种源, 根据农艺性状划分成不同类型, 再分析杂交亲本的分子遗传关系, 根据育种目标选择合理的杂交组合, 有望获得具有杂种优势的后代, 进而培育出新品种。

本实验中 2 种分析方法的结果差异较大, 给实际应用带来困难。为了解决这一问题, 应该从以下方面进行改进: ① 扩大各种源的播种面积, 同时增加采样数, 设立相应的重复, 采用更科学的采样方法, 使样品的性状能更准确地反映各种源的总体特征; ② 使用多种分子标记方法, ISSR 为显性标记, 若能结合共显性标记或进行 DNA 序列的比较分析, 则能更准确地反映出不同亚麻种源间的遗传关系; ③ 对亚麻品种内变异程度或纯度进行分析, 以确保性状的稳定和分子水平的一致; ④ 由于分子标记揭示的只是局部序列差异, 而田间性状则体现出各种源的综合表型, 因而, 应以各种源的田间性状为主、分子标记为辅进行亚麻不同种源的综合分析。

参考文献:

- [1] 何学芹, 宋云飞, 张朝钟, 等. 纤维亚麻品种筛选试验研究 [J]. 中国麻业科学, 2006, 28(6): 297-300
- [2] 罗正明, 高贵林, 李宏, 等. 8 个纤用亚麻新品种在渤海的表现 [J]. 云南农业科技, 2007(4): 23-25
- [3] 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): 184-188 238.

- [4] 邹喻苹, 葛颂, 王晓东. 系统与进化植物学中的分子标记 [M]. 北京: 科学出版社, 2001
- [5] 何予卿, 张宇, 孙梅, 等. 利用 ISSR 分子标记研究栽培稻和野生稻亲缘关系 [J]. 农业生物技术学报, 2001, 9(2): 123-127
- [6] 吕琳, 秦民坚, 贺丹霞, 等. 不同种源药用菊花、野菊和菊花脑的 ISSR 分子标记及遗传关系分析 [J]. 植物资源与环境学报, 2008, 17(1): 7-12
- [7] Reddy M P, Sarla N, Sidiq E A. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding [J]. Euphytica, 2002, 128(1): 9-17.
- [8] 钱剑林, 俞文生, 王化坤, 等. 江浙地区杨梅主要品种的 ISSR 分析 [J]. 植物资源与环境学报, 2006, 15(3): 17-20
- [9] 侯思名, 段继强, 梁雪妮, 等. 苜蓿总 DNA 提取的 CTAB 法优化方案 [J]. 西北植物学报, 2005, 25(11): 2193-2197.
- [10] 乔广军, 颜志峰, 路颖, 等. 纤维亚麻品种资源的研究 [J]. 黑龙江农业科学, 1992(4): 24-27
- [11] 钱合顺, 米君, 杨素梅. 国外亚麻品种资源研究初报 [J]. 河北农业科学, 1995(3): 20-21.
- [12] 何正伟, 白玉生. 纤维型亚麻品种 (系) 筛选简报 [J]. 甘肃农业科技, 1996(6): 12-13
- [13] 路颖, 关凤芝, 王玉富, 等. 国内外亚麻种质资源的综合评价 [J]. 中国麻业, 2002, 24(4): 5-7, 25
- [14] 邹长明, 邹海明, 樊林超, 等. 纤维亚麻在皖北地区的引种栽培试验 [J]. 安徽农学通报, 2006, 12(2): 35-36
- [15] Booth I, Harwood R J, Wyatt J L, et al. A comparative study of the characteristics of fibre-flax (*Linum usitatissimum*) [J]. Industrial Crops and Products, 2004, 20(1): 89-95.
- [16] Van Treuren R, van Soest L J M, van Hultum T J L. Marker-assisted rationalization of genetic resource collections: a case study in flax using AFLPs [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2001, 103(1): 144-152
- [17] Fu Y B, Peterson G, Diederichsen A, et al. RAPD analysis of genetic relationships of seven flax species in the genus *Linum* L. [J]. Genetic Resources and Crop Evolution, 2002, 49(3): 253-259
- [18] Wiesner I, Wiesner D. Effect of resolving medium and staining procedure on inter-simple-sequence-repeat (ISSR) patterns in cultivated flax germplasm [J]. Genetic Resources and Crop Evolution, 2003, 50(8): 849-853.