

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2008.00115

# 利用 SRAP 标记研究四川高原青稞育成品种的遗传多样性

杨平<sup>1,2</sup>, 刘仙俊<sup>1</sup>, 刘新春<sup>1</sup>, 李俊<sup>2</sup>, 王希文<sup>1</sup>, 何守朴<sup>1</sup>, 李刚<sup>1</sup>, 杨武云<sup>2</sup>, 冯宗云<sup>1</sup>

1. 四川农业大学农学院, 西南作物基因资源与遗传改良教育部重点实验室, 雅安 625014;
2. 四川省农业科学院作物研究所, 成都 610066

**摘要:** 利用 SRAP(Sequence-related Amplified Polymorphism)分子标记技术, 对 25 份来自四川高原的青稞育成品种进行了遗传多样性研究。结果表明: 64 对引物组合共检测出 999 条清晰条带, 62 对可以获得多态性条带, 多态性引物组合占 96.9%, 共产生 225 条多态性条带, 占总条带数的 22.5%。64 对引物组合共扩增出 333 种等位变异, 平均每个引物组合检测到 5.20 种等位变异。遗传多样性在 0(me9/em14, me9/em15)~0.8928(me6/em18)之间, 平均为 0.5126。聚类分析结果表明, 25 份材料可分成 A、B、C 3 大类, 材料聚类与其来源地有明显的相关性。25 份材料间的平均遗传距离较小(0.3240), 平均遗传多样性较低(0.5126), 遗传基础较为狭窄。

**关键词:** 大麦; 青稞; SRAP; 遗传多样性; 育成品种

## Genetic diversity analysis of the developed qingke (hulless barley) varieties from the plateau regions of Sichuan Province in China revealed by SRAP markers

YANG Ping<sup>1,2</sup>, LIU Xian-Jun<sup>1</sup>, LIU Xin-Chun<sup>1</sup>, LI Jun<sup>2</sup>, WANG Xi-Wen<sup>1</sup>, HE Shou-Pu<sup>1</sup>, LI Gang<sup>1</sup>, YANG Wu-Yun<sup>2</sup>, FENG Zong-Yun<sup>1</sup>

1. College of Agronomy, Key Laboratory of Southwestern Crop Genetic Resource and Improvement, Ministry of Education, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China
2. Crop Research Institute, Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Chengdu 610066, China

**Abstract:** Genetic diversity of 25 accessions of Qingke (hulless barley) varieties from the plateau regions of Sichuan Province, China, was analyzed by using SRAP (Sequence-related Amplified Polymorphism) markers. The results showed that 64 pairs of primer combinations produced 999 clear bands, of which 62 primer pairs (96.9%) amplified 225 polymorphic bands (22.5%). Three hundred and thirty three allelic phenotypes were amplified with an average of 5.20 alleles/primer pair. The genetic diversity ranged from 0 (me9/em14, me9/em15) to 0.8928 (me6/em18) with an average of 0.5126. The 25 accessions were classified into three major groups: A, B, and C by cluster analysis using UPGMA, which showed significant

收稿日期: 2007-09-19; 修回日期: 2007-10-15

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 30471061)、国家高技术研究发展计划项目(863 计划)(编号: 2006AA10Z1C6)、长江学者与创新团队发展计划(编号: IRT0453)、四川省科技厅应用基础项目(编号: 2006J13-042)资助[Supported by the National Natural Sciences Foundation of China (No. 30471061), Hi-Tech Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2006AA10Z1C6), the Program for Changjiang Scholars and Innovative Research Team in University of China (No. IRT0453), the Program for Applied Foundation Research of Science and Technology Department of Sichuan Province (No. 2006J13-042)]

作者简介: 杨平(1984-), 男, 重庆南川人, 2007 级在读硕士, 研究方向: 大麦分子生物学。E-mail: fans1984yp@yahoo.com.cn

通讯作者: 杨武云(1965-), 男, 四川南充人, 博士, 研究员, 研究方向: 小麦遗传育种。Tel: 028-84504657; E-mail: yangwuyun@yahoo.com.cn

冯宗云(1963-), 男, 四川广安人, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 大麦遗传育种与分子生物学。Tel: 0835-2882164;

E-mail: zfyfeng49@yahoo.com.cn

relationship with the origin regions of accessions. Thus, it was suggested that the Sichuan hulless barleys could be used as elite germplasms to enhance the genetic background for super-hulless barley breeding.

**Keywords:** barley; qingke(hulless barley); SRAP; genetic diversity; developed varieties

大麦是世界上最古老的栽培作物之一，也是遗传学、分子生物学研究的模式植物之一。青稞(*Hordeum vulgare* L. var. *nudum* Hook. F)也叫裸大麦、元麦、米麦，是我国藏族人民对裸大麦的爱称。六棱裸大麦(*H. vulgare* ssp. *hexastichon* var. *nudum* Hsü)是在我国栽培最早的大麦<sup>[1]</sup>。青稞是藏族人民至今仍用之制作“糌粑”的主要食粮，也是主饮“青稞酒”的原料，还可以用于生产啤酒和保健食品等。近年来，青稞的育种与利用备受大麦育种者的青睐。开展青稞种质资源的遗传多样性研究，对于保护青稞资源，选育青稞新品种，提高藏区人民的生活水平，维护藏区稳定，大有裨益。

分子标记技术是评价种质资源遗传多样性的有效手段。前人利用分子标记研究大麦遗传多样性的报道较多，所用标记涉及RFLP<sup>[2]</sup>、RAPD<sup>[3~6]</sup>、ISSR<sup>[5]</sup>、SSR<sup>[7~10]</sup>、AFLP<sup>[3]</sup>等，所用材料局限于皮大麦、野生大麦上，很少涉及青稞地方品种<sup>[9]</sup>、育成品种<sup>[6,10]</sup>。最近，周洪金等<sup>[11]</sup>、潘志芬等<sup>[10,12]</sup>应用醇溶蛋白、SSR标记研究了青藏高原青稞育成品种的遗传多样性。SRAP (Sequence-related Amplified Polymorphism)即相关序列扩增多态性，是Li和Quiros<sup>[13]</sup>发展的一种基于PCR的新型分子标记技术。该标记通过独特的引物设计对ORFs (Open Reading Frames)进行扩增。上游引物长 17 bp, 5' 端的前 10 bp 是一段填充序列，紧接着是 C C G G 组成

核心序列及 3' 端 3 个选择碱基，对外显子进行特异扩增。下游引物长 18 bp, 5' 端的前 11 bp 是一段填充序列，紧接着是 AATT' 组成核心序列及 3' 端 3 个选择碱基，对内含子区域、启动子区域进行特异扩增。因不同个体、物种的内含子、启动子及间隔区长度不同而产生多态性。该标记具有多态性丰富、简便、稳定、快速、成本低等特点<sup>[14,15]</sup>，已被广泛应用于小麦、棉花、烟草、油菜、牧草等多种农作物以及甘蓝、黄瓜、番茄、西瓜等多种蔬菜植物的品种鉴定<sup>[16,17]</sup>、图谱构建<sup>[13,18]</sup>、比较基因组学<sup>[19]</sup>、遗传多样性检测<sup>[17,20,21]</sup>、基因定位<sup>[22,23]</sup>等研究。遗憾的是，此标记技术应用于大麦研究还未见报导。

本研究应用 SRAP 标记技术首次对来自四川省甘孜藏族自治州和阿坝藏族羌族自治州的 25 个青稞育成品种进行了遗传多样性分析，目的在于了解四川青稞育成品种的遗传基础，为保护和有效利用遗传资源以及青稞新品种选育提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

25 份青稞育成品种来自四川省甘孜州农业科学研究所(SGZ01~SGZ23)、四川阿坝州农业科学研究所(SAB24, SAB25)，由李健同志馈赠。其编号、名称见表 1。

表 1 四川青稞育成品种的编号及名称  
Table 1 Code and names of the hulless barley varieties from Sichuan Province

编号 Code	品种名称 Variety	编号 Code	品种名称 Variety	编号 Code	品种名称 Variety
SGZ01	康青 1 号 Kangqing 1	SGZ10	丹巴黑青稞 Danbaheiqingke	SGZ19	甘孜黑马尾 Ganzheimawei
SGZ02	康青 2 号 Kangqing 2	SGZ11	乾宁绿青稞 Qianninglüqingke	SGZ20	603
SGZ03	康青 6 号 Kangqing 6	SGZ12	岷县青稞 Mingxianqingke	SGZ21	七盘沟
SGZ04	康青 7 号 Kangqing 7	SGZ13	98172-2		Qipangou
SGZ05	白六棱 Bailiuleng	SGZ14	813	SGZ22	春青稞 Chunqingke
SGZ06	俄母 1 号 Emu 1	SGZ15	紫青稞 Ziqingke	SGZ23	康青 5 号 Kangqing 5
SGZ07	岗托青稞 Gangtuoqingke	SGZ16	乾宁青稞 Qianningqingke	SAB24	阿青 4 号 Aqing 4
SGZ08	黑青稞 Heiqingke	SGZ17	白玉青稞 Baiyuqingke	SAB25	阿青 5 号 Aqing 5
SGZ09	东升黑 Dongshenghei	SGZ18	33-2-1-1		

## 1.2 方法

### 1.2.1 DNA 提取

DNA提取参考Sharp等<sup>[24]</sup>的方法。幼苗培养在暗室中进行, 取其周龄叶片液氮研磨后转至 1.5 mL的离心管中, 加入 2×CTAB, 65℃水浴中温育 1 h, 其间每 20 min取出颠倒 1 次。氯仿/异戊醇 (24:1)抽提, 充分摇匀后离心。取其上清液加入异丙醇沉淀DNA, 分别用 70%酒精、无水乙醇洗涤DNA, 无菌水溶解。1%琼脂糖凝胶电泳检测DNA质量。

表 2 SRAP 引物名称及核苷酸序列

Table 2 Sequences of SRAP primers used in this study

引物名称	Name of primer	正向引物	Forward primer(5' 3')	引物名称	Name of primer	反向引物	Reverse primer(5' 3')
me5		T GAG TCC AAA CCGG AAG		em12		GA CTG CGT ACG AATT GTC	
me6		T GAG TCC AAA CCGG TAA		em13		GA CTG CGT ACG AATT GGT	
me7		T GAG TCC AAA CCGG TCC		em14		GA CTG CGT ACG AATT CAG	
me8		T GAG TCC AAA CCGG TGC		em15		GA CTG CGT ACG AATT CTG	
me9		T TCA GGG TGG CCGG ATG		em16		GA CTG CGT ACG AATT CGG	
me10		T GGG GAC AAC CCGG CTT		em17		GA CTG CGT ACG AATT CCA	
me11		C TGG CGA ACT CCGG ATG		em18		GA CTG CGT ACG AATT GGT	
me12		G GTG AAC GCT CCGG AAG		em19		GA CTG CGT ACG AATT CCG	

### 1.2.3 电泳及银染

用 6%的变性聚丙烯酰胺凝胶电泳。上样量为 9 μL, 220 V恒压预电泳 20 min, 然后 450 V恒压条件下电泳 1.5~2.0 h至指示剂离胶板底部 1/3 处。所用 DYY-6C型电泳仪和DYY-III型电泳槽由北京六一仪器厂生产。用 100 bp DNA梯度 marker[由宝生物工程(大连)有限公司生产]作标准。银染参见Lu等<sup>[25]</sup>的方法。用Sony DSC T9 相机拍照。

### 1.2.4 数据处理

每个样品电泳条带按有或无记录, 电泳条带存在时赋值为 1, 否则赋值为 0。遗传多样性按Nei<sup>[26]</sup>的公式 $H=1-\sum p_i^2$ 计算,  $p_i$ 为某引物组合第*i*个等位变异的频率。按Nei和Li<sup>[27]</sup>的方法计算材料间的遗传相似系数(GS)。计算公式为 $GS_{ij}=2N_{ij}/(N_i+N_j)$ , 其中 $N_{ij}$ 为材料*i*和*j*共有的扩增片段数目,  $N_i$ 、 $N_j$ 分别为材料*i*、*j*中出现的扩增片段数目。GS值按不加权成对群算数平均法(unweighted pair group method with arithmetic means, 简称UPGMA)进行聚类分析。聚类分析在NTSYS-PC(version 2.10s)软件系统下完成。

### 1.2.2 PCR 反应

PCR扩增参见Li等<sup>[13]</sup>的方法, 略有改动。反应体系为: 总体积 15 μL, 包括 10×buffer(Mg<sup>2+</sup>), 0.2 mmol/L dNTP, 250 nmol/L随机引物, 50 ng模板DNA, 1 U *Taq*酶和无菌水。在PTC-100™ PCR扩增仪上完成。反应程序为: 95℃ 1 min; 94℃ 1 min, 35℃ 1 min, 72℃ 1 min, 共 5 个循环; 94℃ 1 min, 50℃ 1 min, 72℃ 1 min, 共 35 个循环; 72℃延伸 10 min, 4℃保存。实验所用引物(表 2)由宝生物工程(大连)有限公司合成。

## 2 结果与分析

### 2.1 SRAP 标记多态性

用 8 个正向引物与 8 个反向引物组成的 64 个引物组合对供试材料 DNA 进行了扩增。图 1 为

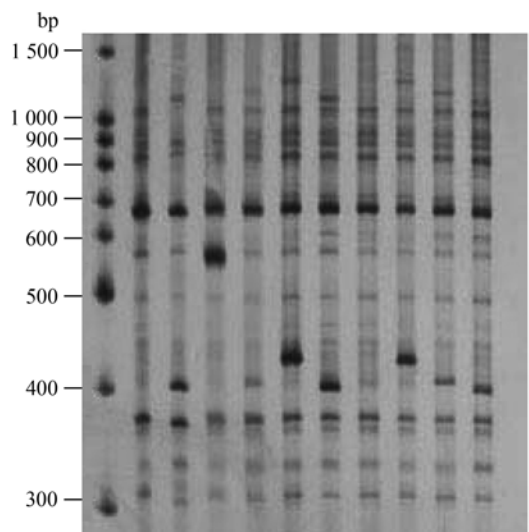


图 1 me8/em12 引物组合的部分群体电泳结果  
Fig. 1 Amplification results of the primer combination “me8/em12” in parts of the accessions

me8/em12 引物组合对部分材料 DNA 扩增的结果。不同引物组合在四川青稞品种间扩增的结果差异较大。从表 3 看出, 共扩增出 999 条带, 平均每个引物组合扩增出 15.61 条。总条带数从引物组合

me10/em13 的 4 条到 me12/em16 的 26 条, me9/em14、me9/em15 虽分别扩增出 11、12 条带, 但这些条带均无多态性, 62 个引物组合具有多态性, 多态性组合占 96.9%。多态性条带数从 1 条(me5/em14、

表3 四川青稞育成品种的多态性、等位变异和遗传多样性

Table 3 Polymorphism, allelic variation, and genetic diversity of the developed hulless barley varieties from Sichuan, China

引物组合 Primer pair	多态性条带数/ 总条带数 No. of polymorphic bands/No. of total bands	等位变异数 No. of alleles	遗传多样性 Genetic diversity	引物组合 Primer pair	多态性条带数/ 总条带数 No. of poly- morphic bands/No. of total bands	等位变异数 No. of alleles	遗传多样性 Genetic diversity
me5/em12	4/18	6	0.5888	Me9/em12	1/6	2	0.4352
me5/em13	3/17	6	0.5888	Me9/em13	2/17	3	0.2176
me5/em14	1/8	2	0.4032	Me9/em14	0/11	1	0.0000
me5/em15	6/20	11	0.8672	Me9/em15	0/12	1	0.0000
me5/em16	3/16	4	0.5536	Me9/em16	4/16	6	0.6560
me5/em17	7/17	13	0.8928	Me9/em17	2/17	3	0.2784
me5/em18	3/11	3	0.2784	Me9/em18	8/19	10	0.8544
me5/em19	4/12	5	0.7008	Me9/em19	1/12	2	0.2688
me6/em12	5/18	8	0.7968	me10/em12	5/19	5	0.5584
me6/em13	6/19	14	0.8736	me10/em13	3/4	7	0.6080
me6/em14	2/10	3	0.3328	me10/em14	10/23	11	0.8544
me6/em15	1/7	2	0.2112	me10/em15	8/15	7	0.6784
me6/em16	4/15	6	0.3488	me10/em16	3/16	7	0.8032
me6/em17	5/19	6	0.6880	me10/em17	1/11	2	0.0768
me6/em18	11/16	15	0.8928	me10/em18	1/15	3	0.4224
me6/em19	2/10	3	0.1504	me10/em19	7/18	9	0.7904
me7/em12	1/13	2	0.1472	me11/em12	4/15	5	0.7520
me7/em13	4/18	10	0.8576	me11/em13	1/18	2	0.0768
me7/em14	6/17	8	0.6368	me11/em14	3/18	5	0.6464
me7/em15	1/8	2	0.2112	me11/em15	2/23	4	0.4000
me7/em16	2/14	4	0.6560	me11/em16	4/20	8	0.7520
me7/em17	5/15	8	0.6976	me11/em17	4/22	9	0.8416
me7/em18	1/10	2	0.2688	me11/em18	3/18	3	0.5344
me7/em19	3/16	4	0.4768	me11/em19	2/10	3	0.5504
me8/em12	6/20	7	0.5664	me12/em12	6/19	5	0.6080
me8/em13	2/11	5	0.7456	me12/em13	1/18	2	0.3648
me8/em14	2/15	3	0.2784	me12/em14	3/22	3	0.2176
me8/em15	4/11	2	0.0768	me12/em15	4/25	5	0.5056
me8/em16	2/11	3	0.3808	me12/em16	4/26	4	0.4768
me8/em17	4/17	6	0.7488	me12/em17	3/15	6	0.5888
me8/em18	4/13	5	0.4064	me12/em18	1/25	2	0.4352
me8/em19	3/16	3	0.4576	me12/em19	7/16	7	0.7712
平均值 Mean	3.63/15.61	5.20	0.5126				
范围 Range	0~11/4~26	1~15	0~0.8928				

me6/em15、me7/em12、me7/em18、me9/em12、me9/em19、me10/em17、me10/em18、me11/em13、me12/em13、me12/em18)~11 条(me6/em18), 总多态性条带数为 225 条, 平均 3.63 条(me9/em14、me9/em15 未纳入计算)。多态性条带频率从 4%(me12/em8)~68.8%(me6/em18)。除 me9/em14、me9/em15 外, 62 个引物组合共扩增出 976 条带, 多态性条带 225 条, 多态性为 23.1%。

表 4 表明, 不同正向引物与所有反向引物组合扩增的总条带数以 me12 最高(166 条), 其次是 me11 (144 条)、me10(121 条)、me5(119 条), 其余差异不大(从 110~114 条), 但以 me9 最少(110 条); 多态性条带数以 me10 最高(38 条), 其次是 me6(36 条)、me5(31 条)、me12(29 条), me9 最少(18 条), 多态性频率以 me9(16.4%)、me11(16.0%)为低, 而 me6(31.6%)、me10(31.4%)较高。同样, 我们也统计了不同反向引物与所有正向引物组合扩增的情况(表 3)。总条带数以 em16 最高(134 条), 其次 em17(133 条), em19 最少(110 条)。多态性频率以 em13(18.0%)最低, 而 em19(26.4%)最高。

2.2 等位变异及遗传多样性

从表 3 看出, 不同引物组合检测到的 SRAP 标记的等位变异数不同, me9/em14、me9/em15 在供试材料间仅检测到 1 种等位变异, 而 me6/em18 检测到的等位变异数最多(15 条), 平均每个引物组合检测到 5.20 种等位变异。表 4 也表明, 不同正向引物与所有反向引物组合检测到的等位变异数从总数 28(me9)~57(me6)种, 平均从 3.5(me9)~7.1(me6)种。不同反向引物与所有正向引物组合检测到的等位变异也不一样, 总等位变异数以 em15 最低(34 种), em17 最高(53 种), 平均从 4.3(em15)~6.6(em17)种。由表 3 可知, 不同引物组合的遗传多样性值各不相同, 64 个引物组合中除 me9/em14、me9/em15 的遗传多样性值为 0 外, 其余引物组合的遗传多样性值在 0.0768(me11/em13)~0.8928(me5/em17、me6/em18)间, 平均  $0.5219 \pm 0.2362$  (未包括 me9/em14、me9/em15)。不同正向引物与所有反向引物组合遗传多样性平均值也各不相同(表 4), 以 me9 最低( $0.3388 \pm 0.2997$ ), me5 最高( $0.6092 \pm 0.2108$ )。同样, 不同反向引物与所有正向引物组合遗传多样性平均值也不尽相同, 以

表 4 不同正向(反向)引物与所有反向(正向)引物组合的 SRAP 多态性、等位变异及遗传多样性  
Table 4 SRAP polymorphism, allelic variation, and genetic diversity of the combinations among different forward (reverse) primers and all reverse (forward) primers

引物 Primer	总条带数 No. of total bands	多态性条带数 No. of polymorphic bands		等位变异数 No. of alleles		遗传多样性 Genetic diversity
	总数/平均值 Total/Average	总数/平均值 Total/Average	多态性频率 (%) Frequency of polymorphism (%)	总数 Total	平均值 Average	平均值 Average
me5	119/14.9	31/3.9	26.1	50	6.3	0.6092
me6	114/14.3	36/4.5	31.6	57	7.1	0.5368
me7	111/13.9	23/2.9	20.7	40	5.0	0.4940
me8	114/14.3	27/3.4	23.7	34	4.3	0.4576
me9	110/13.8	18/2.3	16.4	28	3.5	0.3388
me10	121/15.1	38/4.8	31.4	51	6.4	0.5990
me11	144/18.0	23/2.9	16.0	39	4.9	0.5692
me12	166/20.8	29/3.6	17.5	34	4.3	0.4960
em12	128/16.0	32/4.0	25.0	40	5.0	0.5566
em13	122/15.3	22/2.8	18.0	49	6.1	0.5416
em14	124/15.5	27/3.4	21.8	36	4.5	0.4212
em15	121/15.1	26/3.3	21.5	34	4.3	0.3688
em16	134/16.8	26/3.3	19.4	42	5.3	0.5784
em17	133/16.6	31/3.9	23.3	53	6.6	0.6016
em18	127/15.9	32/4.0	25.2	43	5.4	0.5116
em19	110/13.8	29/3.6	26.4	36	4.5	0.5208

em15 最低(0.3688±0.3012), em17 最高(0.6016±0.2830)。

### 2.3 聚类分析

利用 SRAP 标记数据计算了供试青稞品种的遗传相似系数矩阵, 采用 UPGMA 法构建了 25 份青稞品种间的遗传关系聚类图(图 2)。从图 2 看出, 除材料 SGZ06 单独聚在 C 类外, 所有来自四川省甘孜州的青稞品种归入了 A 类, 而来自四川省阿坝州的 SAB24、SAB25 2 份材料聚在 B 类。结果表明, 材料聚类与材料来源具有明显的相关性。SGZ03 与 SGZ04 之间的遗传相似系数最大, 即其遗传差异最小。

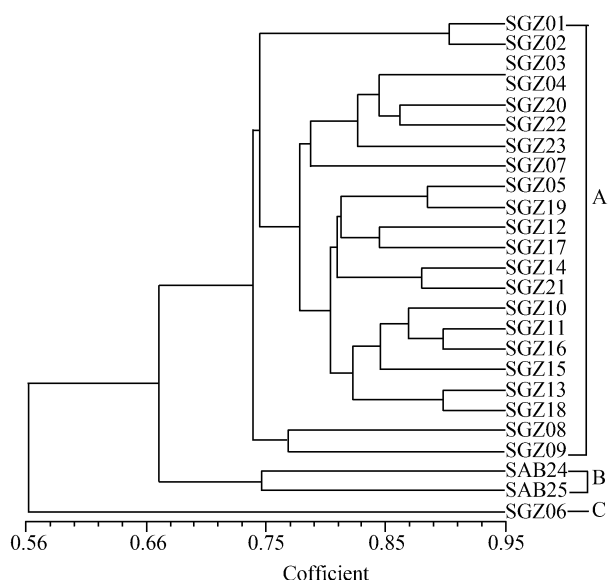


图 2 25 份四川青稞育成品种的 SRAP 遗传聚类图  
Fig. 2 A dendrogram of 25 accessions of hulless barley varieties from Sichuan generated from SRAP markers

## 3 讨论

### 3.1 SRAP 标记的可靠性与引物选择

前人关于 SRAP 标记用于植物研究的报道较多。Li 和 Quiros<sup>[13]</sup>最先在水稻、马铃薯、油菜、生菜、花椰菜、大蒜、芹菜、樱桃、苹果、柑橘上试用, 发现 SRAP 能够扩增出很好的多态性。之后, 许多学者将 SRAP 标记应用于植物遗传多样性<sup>[20,21]</sup>、品种鉴定<sup>[28]</sup>上, 并将 SRAP 与 RAPD、ISSR、SSR、AFLP 进行了比较, 发现 SRAP 有最丰富的多态性和最强的区分能力, 聚类分析也与其它标记和传统的系谱分类一致<sup>[20,21,30]</sup>。林忠旭等<sup>[14]</sup>利用 SRAP 标记成功地区分开 11 份陆地棉材料。这些研究均证明 SRAP 标记是一种经济、有效的分子标记技术。在大麦上, 迄今

尚未见应用 SRAP 标记进行研究的报导。本研究中, 应用 SRAP 的 8 个正向引物与 8 个反向引物组成的 64 个引物组合对 25 份四川高原地区青稞育成品种进行了多态性分析, 有 62 个引物组合扩增出多态性条带, 多态性组合占 96.9%, 62 个引物组合共扩增出 976 条带, 其中多态性条带 225 条, 多态性达 23.1%, 平均每个引物组合扩增多态性条带 3.63 条, 与林忠旭等<sup>[18]</sup>在棉花上的研究一致, 但远低于在黄瓜<sup>[17]</sup>、莲藕<sup>[31]</sup>等的结果。其原因可能与供试青稞品种遗传基础较狭窄有关。聚类分析(图 2)表明, 材料聚类与材料来源之间有明显的相关性, 这与前人利用 SRAP 标记在其它植物上取得的结果一致<sup>[20,21,30]</sup>。从表 3 看出, 64 个引物组合在 25 份青稞品种中共检测到 333 种等位变异, 平均每个引物组合 5.20 种等位变异, 高于 Feng 等<sup>[9]</sup>用 SSR 标记研究四川青稞地方品种的结果。本研究仅用 3 个引物组合就可区分开 25 份青稞品种。将本 SRAP 研究结果与前人<sup>[10]</sup>用 SSR 标记研究四川、西藏栽培青稞所得的结果比较可看出, 前者的平均遗传多样性值较后者低, 可能原因在于 SRAP 标记扩增产物为基因区域, 不能揭示非基因区域的遗传多样性, 而 SSR 标记可扩增大麦基因区和非基因区, 所揭示的是青稞基因组整体的遗传多样性水平。上述结果说明, SRAP 标记应用于大麦遗传多样性、品种鉴定上是十分有效的, 也是很有用的。

但要指出的是, 不同正向(反向)引物与所有反向(正向)引物组合扩增结果差异较大(表 4), 以正向引物 me9 与所有反向引物组合所扩增的多态性条带数最少(平均 2.3 条), 等位变异数最小(平均 3.5 种)。而反向引物 em13 与所有正向引物组合所扩增的多态性条带数最少(平均 2.8 条), 多态性频率最低(18.0%), 但其等位变异数最高(平均 6.1 种), 而 em15 与所有正向引物组合所扩增的多态性条带数比 em13 平均多 0.5 条, 但其等位变异数最少(平均 4.3 种)。本研究中, me9/em14、me9/em15 未扩增出多态性条带(表 3)也就不难理解了。因此, 建议今后少用或不用 me9 和 em15 所组成的各种引物组合进行大麦遗传多样性和品种鉴定研究。从表 4 看出, 用不同正向引物与所有反向引物组合所产生的多态性条带数、等位变异数及遗传多样性的变异均大于用不同反向引物与所有正向引物组合所产生的变异。这说明正向引物在研究大麦遗传多样性和品种鉴定时较反向引物更重要。钱文成等<sup>[32]</sup>在用 SRAP 检测黄瓜基因组



多态性时发现“不同反向引物在与正向引物组合时在亲本多态性检测上差异十分明显”。由此看出, 利用SRAP进行类似研究时, 若要增加合成新的SRAP引物时, 以选择合成正向引物为宜。

### 3.2 供试材料间的遗传关系与青稞新品种选育

本研究聚类分析结果, 将来自四川省阿坝州的 2 个青稞品种“阿青 4 号”(SAB24)、“阿青 5 号”(SAB25)独自聚为B类, 而将来自四川省甘孜州的 23 份材料除SGZ06(俄母 1 号)独自成C类外, 其余 22 份材料归入A大类(95.7%)。从棱型看, SAB24、SAB25 为四棱裸大麦, 其余材料为六棱裸大麦。如SGZ01、SGZ02 归入A大类中的 1 个亚类, 它们均为同一杂交组合的姊妹系, 组合名称为(813/青海 69 号) $F_3$ //昆仑 1 号。上述结果表明, 供试青稞品种的聚类与青稞育成品种长期生长的地理环境及育种单位青稞育成品种遗传基础有明显的相关性。这与周洪金等<sup>[11]</sup>用醇溶蛋白分析这些材料所得结论基本一致。

本研究聚类结果为青稞育种者选配杂交亲本提供了重要依据。但要指出的是, 这些材料间的遗传距离较低, 平均 0.3240, 遗传距离的变异较小(标准差为 0.0956), 平均遗传多样性较低(0.5126), 说明这些青稞育成品种的遗传基础较为狭窄。因此, 在进行超级青稞新品种选育时, 应发掘和利用新的优异青稞资源, 扩大青稞的遗传基础。

### 参考文献(References):

- [1] XU Ting-Wen, FENG Zong-Yun. On the origin of cultivated barley in China with reference to the explanations of the Chinese classical words Lai Mu. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2001, 14(1): 102–104.  
徐廷文, 冯宗云. 从来牟的释义谈中国栽培大麦的起源问题. *西南农业学报*, 2001, 14(1): 102–104.
- [2] Petersen L, Qstergard H, Giese H. Genetic diversity among wild and cultivated barley as revealed by RFLP. *Theor Appl Genet*, 1994, 89(6): 676–681. [\[DOI\]](#)
- [3] Powell W, Morgante M, Andre C, Hanafey M, Vogel J, Tingey S, Rafalski A. The utility of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) makers for germplasm analysis. *Mol Breed*, 1996, 2(3): 225–328. [\[DOI\]](#)
- [4] Baum BP, Nevo E, Johnson DA, Beiles A. Genetic diversity in wild barley (*Hordeum vulgare* C. Koch) in the neareast: a molecular analysis using random amplified polymorphic DNA (RAPD) makers. *Genet Resour Crop Evol*, 1997, 44(2): 147–157 [\[DOI\]](#)
- [5] Fernandez ME, Figueiras AM, Benito C. The use of ISSR and RAPD markers for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity among barley cultivars with known origin. *Theor Appl Genet*, 2002, 104(5): 845–851. [\[DOI\]](#)
- [6] HONG Qi-Bin, HOU Lei, LUO Xiao-Ying, LI De-Mou, XIAO Yue-Hua, PEI Yan, YANG Kai-Jun, JIA Cuo. Using RAPD for evaluating genetic background among naked barley varieties in Sichuan Northwestern Region. *Scientia Agricultura Sinica*, 2001, 34(2): 133–138.  
洪棋斌, 侯磊, 罗小英, 李德谋, 肖月华, 裴炎, 杨开俊, 甲错. 应用 RAPD 分析川西北高原青稞的遗传背景. *中国农业科学*, 2001, 34(2): 133–138.
- [7] Struss D, Plieske J. The use of microsatellite markers for detection of genetic diversity in barley populations. *Theor Appl Genet*, 1998, 97(2): 308–315. [\[DOI\]](#)
- [8] Feng Zong-Yun, Liu Xian-Jun, Zhang Yi-Zheng, Ling Hong-Qing. Genetic diversity analysis of Tibetan wild barley using SSR markers. *Acta Genetica Sinica*, 2006, 33(10): 917–928. [\[DOI\]](#)
- [9] Feng Zong-Yun, Zhang Li-Li, Zhang Yi-Zheng, Ling Hong-Qing. Genetic diversity and geographical differentiation of cultivated six-rowed naked barley landraces from the Qinghai-Tibet plateau of China detected by SSR analysis. *Genet Mol Biol*, 2006, 29(2): 330–338. [\[DOI\]](#)
- [10] PAN Zhi-Fen, ZHOU Yi-Xing, DENG Guang-Bing, ZHAI Xu-Guang, WU Fang, YU Mao-Qun. Genetic diversity of SSR markers in cultivated hulless barley from Qinghai-Tibet Plateau in China. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 2007, 46(2): 81–87.  
潘志芬, 邹弈星, 邓光兵, 翟旭光, 吴芳, 余懋群. 青藏高原栽培青稞SSR标记遗传多样性研究. *中山大学学报(自然科学版)*, 2007, 46(2): 81–87.
- [11] ZHOU Hong-Jin, LIU Xin-Chun, LIU Xian-Jun, WANG Xi-Wen, HE Shou-Pu, LI Gang, YAN Min, HE Gang-De, FENG Zong-Yun. Comparative assessment of genetic diversity at hordein loci in developed hulless barley varieties from the plateau regions of Sichuan and Tibet, China. *Barley and Cereal Sciences*, 2007, (4): 1–5.  
周洪金, 刘新春, 刘仙俊, 王希文, 何守朴, 李刚, 阎敏, 贺刚德, 冯宗云. 川、藏高原地区青稞育成品种醇溶蛋白的遗传多样性的比较分析. *大麦与谷类科学*, 2007, (4): 1–5.
- [12] PAN Zhi-Fen, TANG Ya-Wei, WU Fang, HAN Zhao-Xue, DENG Guang-Bing, YU Mao-Qun. Genetic diversity of B-hordein in hulless barley (*Hordeum vulgare* L.) from the Qinghai-Tibet Plateau in China. *Chinese Journal of Applied Environmental Biology*, 2006, 12(5): 601–604.  
潘志芬, 唐亚伟, 吴芳, 韩兆雪, 邓光兵, 余懋群. 青藏高原青稞 B 组醇溶蛋白遗传多样性研究[J]. *应用与环境生物学报*, 2006, 12(5): 601–604.
- [13] Li G, Quiros CF. Sequence-related amplified polymorphism

- (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in *Brassica*. *Theor Appl Genet*, 2001, 103(3): 455–461. [\[DOI\]](#)
- [14] LIN Zhong-Xu, ZHANG Xian-Long, NIE Yi-Chun. Evaluation of application of a new molecular marker SRAP on Analysis of  $F_2$  segregation population and genetic diversity in China. *Acta Genetica Sinica*, 2004, 31(6): 622–626.  
林忠旭, 张献龙, 聂以春. 新型标记SRAP在棉花 $F_2$ 分离群体及遗传多样性评价中的适用性分析. *遗传学报*, 2004, 31(6): 622–626.
- [15] LIU Li-Wang, GONG Yi-Qin, HUANG Hao, ZHU Xian-Wen. Novel molecular marker systems—SRAP and TRAP and their application. *Hereditas(Beijing)*, 2004, 26(5): 777–781.  
柳李旺, 龚义勤, 黄浩, 朱献文. 新型分子标记—SRAP与TRAP及其应用. *遗传*, 2004, 26(5): 777–781.
- [16] WANG Yan, GONG Yi-Qing, ZHAO Tong-Min, LIU Guang. Optimization of SRAP-PCR system and cultivar identification in tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2007, 30(1): 23–29.  
王燕, 龚义勤, 赵统敏, 刘广. 番茄 SRAP-PCR 体系优化与品种分子鉴定. *南京农业大学学报*, 2007, 30(1): 23–29.
- [17] LI Li, ZHENG Xiao-Ying, LIU Li-Wang. Analysis of genetic diversity and identification of cucumber varieties by SRAP. *Mol Plant Breed*, 2006, 4(5): 702–708.  
李丽, 郑晓鹰, 柳李旺. 用 SRAP 标记分析黄瓜品种遗传多样性及鉴定品种. *分子植物育种*, 2006, 4(5): 702–708.
- [18] LIN Zhong-Xu, ZHANG Xian-Long, NIE Yi-Chun, HE Dao-Hua, WU Mao-Qing. Construction of a genetic linkage map for cotton based on SRAP. *Chinese Science Bulletin*, 2003, 48(19): 2063–2067. [\[DOI\]](#)
- [19] Li G, Gao M, Yang B, Quiros CF. Gene for gene alignment between the *Brassica* and *Arabidopsis* genomes by direct transcriptome mapping. *Theor Appl Genet*, 2003, 107(1): 168–180.
- [20] Ferriol M, Picó B, Nuez F. Genetic diversity of a germplasm collection of *Cucurbita pepo* using SRAP and AFLP markers. *Theor Appl Genet*, 2003, 107(2): 271–282. [\[DOI\]](#)
- [21] Ferriol M, Picó B, Nuez F. Genetic diversity of some accessions of *Cucurbita maxima* from Spain using RAPD and SRAP markers. *Genet Resour Crop Evol*, 2003, 50(3): 227–238. [\[DOI\]](#)
- [22] CHEN Bi-Yun, WU Xiao-Ming, LU Guang-Yuan, GAO Gui-Zhen, XU Kun, LI Xiang-Zhi. Molecular mapping of the gene(s) controlling Petal-loss trait in *Brassica napus* L. *Hereditas(Beijing)*, 2006, 28(6): 707–712.  
陈碧云, 伍晓明, 陆光远, 高桂珍, 许醞, 李响枝. 甘蓝型油菜花瓣缺失基因的图谱定位. *遗传*, 2006, 28(6): 707–712.
- [23] WANG Gang, PAN Jun-Song, LI Xiao-Zun, HE Huan-Le, WU Ai-Zhong, Cai Run. Construction of a cucumber genetic linkage map with SRAP markers and location of the genes for lateral branch traits. *Science in China Ser C (Life Science)*, 2004, 34(6): 510–516.  
王刚, 潘俊松, 李效尊, 何欢乐, 吴爱忠, 蔡润. 黄瓜 SRAP 遗产连锁图的构建及侧枝基因定位. *中国科学 C 辑(生命科学版)*, 2004, 34(6): 510–516.
- [24] Sharp PJ, Kreis M, Shewry PR, Gale MD. Location of  $\beta$ -amylase sequences in wheat and its relatives. *Theor Appl Genet*, 1988, 75(2): 286–290. [\[DOI\]](#)
- [25] Lu CM, Yang WY, Zhang WJ, Lu BR. Development of allelic specific PCR markers for the high molecular weight glutenin subunit Dx\*1.5 from *Aegilops tauschii* through sequence characterization. *J Cereal Sci*, 2005, 41(1): 13–18. [\[DOI\]](#)
- [26] Nei M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc Nat Acad Sci USA*, 1973, 70(12): 3321–3323. [\[DOI\]](#)
- [27] Nei M. Genetic distance between populations. *Am Naturalist*, 1972, 106(3): 283–292. [\[DOI\]](#)
- [28] Budak H, Shearman RC, Parmakesiz I, Gaussion RE, Riordan I, Dweikat TP. Molecular characterization of *Buffalograss ermplasm* using sequence-related amplified polymorphism markers. *Theor Appl Genet*, 2004, 108(2): 328–334. [\[DOI\]](#)
- [29] Budak H, Shearman RC, Parmakesiz I, Dweikat I. Comparative analysis of seeded and vegetative biotype buffalograsses based on phylogenetic relationship using ISSRs, SSRs, RAPDs, and SRAPs. *Theor Appl Genet*, 2004, 109(2): 280–288. [\[DOI\]](#)
- [30] Riaz A, Li G, Quresh Z, Swati MS, Quiros CF. Genetic diversity of oilseed *Brassica napus* inbred lines based on sequence-related amplified polymorphism and its relation to hybrid performance. *Plant Breed*, 2001, 120(5): 411–415. [\[DOI\]](#)
- [31] LIU Yue-Guang, TENG Yong-Yong, PAN Chen, HAN Yan-Chuang, ZHOU Ming-Quan, HU Zhong-Li. Cluster analysis of nelumbo based on SRAP makers. *Amino Acids & Biotic Resources*, 2006, 28(1): 29–32.  
刘月光, 滕永勇, 潘辰, 韩延闯, 周明全, 胡中立. 应用 SRAP 标记对莲藕资源的聚类分析. *氨基酸和生物资源*, 2006, 28(1): 29–32.
- [32] QIAN Wen-Cheng, ZHANG Gui-Hua, CHEN Fei-Xue, HAN Yi-Ke, CHEN De-Fu, DU Sheng-Li, CHEN Xi-Wen. Characteristics of SRAP marker in detecting polymorphism of cucumber genome. *Hereditas(Beijing)*, 2006, 28(11): 1435–1439.  
钱文成, 张桂华, 陈飞雪, 韩毅科, 陈德富, 杜胜利, 陈喜文. SRAP 在检测黄瓜基因组多态性中的特征. *遗传*, 2006, 28(11): 1435–1439.