

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2012.00596

## 国家芝麻区域试验新品种(系)的 DNA 指纹分析

刘红艳 吴 坤 杨敏敏 左 阳 赵应忠\*

中国农业科学院油料作物研究所 / 农业部油料作物生物学与遗传育种重点实验室, 湖北武汉 430062

**摘 要:** 以我国近年参加国家芝麻区域试验的 43 个品种(系)为材料, 利用 12 对 SSR 核心引物开展 DNA 指纹分析, 初步构建参试品种的 DNA 指纹图谱, 并根据指纹图谱分析了参试品种的特异性和一致性。聚类分析结果表明, 12 对引物检测到 30 个标记, 可将 43 个品种完全区分开, 以遗传相似系数 0.90 为划分标准, 95% 的供试品种具备特异性; 以引物位点的一致性为指标, 80% 的品种具有一致性; 分配试验中, 86% 的单株都能正确地分配回到原来的品种, 这些品种的一致性较好, 个别品种的单株正确分配率较低, 品种一致性差。表明大部分参加国家区试的品种都具有很好的特异性和一致性。

**关键词:** 芝麻品种; SSR; 特异性; 一致性

## DNA Fingerprinting of Sesame (*Sesamum indicum* L.) Varieties (Lines) from Recent National Regional Trials in China

LIU Hong-Yan, WU Kun, YANG Min-Min, ZUO Yang, and ZHAO Ying-Zhong\*

Key Laboratory of Oil Crops Biology and Genetic Breeding of the Ministry of Agriculture, Oil Crops Research Institute of Chinese Academy of Agricultural Science, Wuhan 430062, China

**Abstract:** DNA fingerprinting is an important technique for plant variety identification and protection. In this study, 43 sesame (*Sesamum indicum* L.) varieties (lines) from recent National Regional Trails were amplified with 12 pairs of SSR primers, and a total of 30 polymorphic bands were obtained. These molecular markers were further used for variety (lines) distinction and uniformity analysis. Clustering analysis showed that 43 varieties (lines) were completely differed from each other with 30 markers. With a genetic similarity coefficient threshold of 0.90, 90% of varieties (lines) were distinctive, and 80% of tested varieties (lines) were classified into high uniformity group in consistence with marker loci uniformity. Furthermore, in assignment test, 86% of derivative individuals were correctly corresponding to their original varieties (lines), it indicated that most varieties (lines) have a good uniformity. Overall, the results showed that most of the tested sesame varieties (lines) have good distinction and uniformity, and SSR marker is suitable for variety identification and protection.

**Keywords:** Sesame variety; SSR; Distinctness; Uniformity

芝麻在优化种植业结构、促进农民增收方面具有重要作用。芝麻油富含亚油酸和维生素 E, 营养价值很高, 市场需求大, 因此大力培育芝麻新品种, 提高芝麻生产水平, 保障我国油料产品供给安全, 是育种家当前的一个重要任务<sup>[1]</sup>。近来, 参加国家区试的芝麻新品种数目逐年增多, 一方面促进了品种的更新换代, 另一方面也给芝麻新品种的审定和市

场监管带来了较大困难。我国制定的《芝麻新品种 DUS 测试指南》以形态性状为主, 鉴定周期长, 鉴定结果容易受环境条件的影响, 因此在芝麻品种鉴定和保护上存在一定的局限性。另外, 芝麻育成品种的遗传基础相对狭窄<sup>[2]</sup>, 形态特征相似, 单纯依靠形态性状难以有效区分和鉴定不同品种。为了解决上述问题, 部分研究者开展了利用生理特性、同

本研究由国家自然科学基金项目(31101180), 中国农业科学院油料作物研究所所长基金项目(1610172011007)和国家现代农业产业技术体系项目(CARS-15)资助。

\* 通讯作者(Corresponding author): 赵应忠, E-mail: yingzhzh@public.wh.hb.cn

第一作者联系方式: E-mail: liuhy@oilcrops.cn

Received(收稿日期): 2011-08-17; Accepted(接受日期): 2011-12-19; Published online(网络出版日期): 2012-02-13.

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20120213.1104.005.html>

工酶、种子贮藏蛋白等方法检验种子真伪和纯度的尝试<sup>[3-5]</sup>, 其效果仍然不够理想。

SSR 分子标记是一种适合品种鉴定的新技术, 它具有数量丰富、共显性遗传、信息含量高、分析方法简单快速、结果重现性好等优点<sup>[6]</sup>。该标记的高分辨率及共显性遗传方式使其成为品种 DNA 指纹分析的理想技术, 已经成功应用于玉米<sup>[7]</sup>、水稻<sup>[8]</sup>、小麦<sup>[9]</sup>、油菜<sup>[10]</sup>、番茄<sup>[11]</sup>、大豆<sup>[12]</sup>等作物的 DNA 指纹分析和品种鉴定。在芝麻中, Dixit 等<sup>[13]</sup>从一个富含重复序列的芝麻基因组文库中分离到 50 条微卫星序列, 并且将其中的 10 个多态性标记应用于 16 份资源的多样性分析。魏利斌等<sup>[14]</sup>利用芝麻 EST 数据信息, 开发了 50 对 EST-SSR 引物并应用于 36 份芝麻材料的遗传多样性研究, 效果良好。由于芝麻中可供利用的 SSR 标记较少, 目前尚未见到关于 SSR 标记在芝麻品种鉴定方面的研究报道。

本文利用 SSR 标记对近 10 年来参加国家区域试验的芝麻品种进行 DNA 指纹图谱分析, 构建了我国芝麻新品种的 DNA 指纹图谱, 并为芝麻新品种的鉴别、管理和保护提供技术支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

43 份 2000—2008 年度参加国家芝麻区域试验的新品种(系), 由中国农业科学院油料作物研究所提供(表 1)。

### 1.2 DNA 提取

在人工气候箱内用专门的培养皿进行暗萌发, 4 d 后采集幼苗组织提取总 DNA, 每份材料混合取样 5~10 个单株。部分品种(系)分单株提取 DNA。按照改进的 SDS 快速提取法提取 DNA<sup>[15]</sup>。取芝麻幼苗 5~10 株, 在碾钵中加入 1.0 mL 提取液迅速将其磨为匀浆, 然后 65℃ 水浴保温 30 min 左右, 15 000×g 离心收集上清液, 加入异丙醇沉淀 DNA, ddH<sub>2</sub>O 重新溶解, 氯仿纯化 1~2 次, 再用无水乙醇沉淀 DNA, 晾干, 加适量 ddH<sub>2</sub>O 溶解备用, 取 2 μL 以电泳检测其质量和浓度, 并将 DNA 浓度统一到 50 ng mL<sup>-1</sup>。

### 1.3 SSR 分析

31 对 SSR 引物序列来源于已发表文章<sup>[13,16]</sup>, 引物由上海生工生物工程有限公司合成, 部分序列见表 2。采用本实验室建立的体系检测 SSR, 反应总体积为 12 μL, 其中 50 ng μL<sup>-1</sup> DNA 模板 4 μL, 10×PCR buffer 1.0 μL, 10 mmol L<sup>-1</sup> dNTPs 0.2 μL, 25

mmol L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub> 0.8 μL, 5 U *Taq* 酶 0.1 μL, 正、反向引物各 50 ng, 10 μL 矿物油。PCR 热循环参数为 94℃ 60 s, 57℃ 30 s, 72℃ 45 s, 40 个循环。PCR 产物经 6% 变性 PAGE 胶电泳分离, 银染显带, 用数码相机照相, 编号存档, 以便查询。

### 1.4 统计分析

以 0 和 1 统计 SSR 扩增产物, 建立 DNA 指纹数据库。在相同迁移率位置上, 有带记为 1, 无带记为 0。为保证数据准确、可靠, 每块胶板均由 2 人独立记录(仅记录主带), 然后比对确认。

引物的多态性位点百分率  $P=k/n \times 100\%$ , 其中  $k$  是多态位点数目;  $n$  为所测位点总数。引物的鉴定能力可用多态性信息量 PIC 值(polymorphic information content)和鉴别力 DP 值(discrimination power)表示。  $PIC=1-\sum f_i^2$ , 其中  $f_i$  为  $i$  位点的基因频率<sup>[13]</sup>。DP 是指一对引物所能区分的最大品种数目<sup>[17]</sup>。

用 NTSYS-pc 2.11 软件计算 Dice 遗传相似性系数, 用 SAHN 程序和 UPGMA 方法进行聚类分析。在软件 GeneClass<sup>[18]</sup>上进行品种的分配试验(assignment test)。

## 2 结果与分析

### 2.1 SSR 引物筛选及扩增

选择 2 个形态性状差异较大的芝麻品种(中芝 14 和豫芝 8 号), 对 31 对芝麻 SSR 引物初步筛选, 发现均能扩增出条带。在此基础上, 利用这些引物进一步分析 43 份芝麻材料, 共检测到 72 条 SSR 带纹, 其中多态性带 70 条, 多态性比率高达 96.8%, 扩增片段大小在 80~580 bp 之间。每对引物扩增的 SSR 条带数在 1~4 条之间, 平均 2.3 条, 其中引物 ZHY23 最多扩增出 4 条多态性条带, 而 ZHY03 和 ZHY05 仅扩增出 1 条多态性条带。引物的 PIC 值变幅为 0.24~0.89, 平均值为 0.618。引物 Sa08 的 PIC 值最高, ZHY17 最低。DP 值较高的引物有 Sa184、Sa173 和 ZHY23 等, 采用这种高鉴别力的引物有可能用最少的引物将所有的品种区分开。根据上述结果, 初步确定 Sa08、Sa33、Sa72、Sa108、Sa173、Sa182、Sa184、ZHY21、ZHY22、ZHY23、ZHY24、ZHY25 等 12 对 SSR 引物为芝麻区试品种(系)DNA 指纹分析的核心引物, 并将其用到品种的一致性分析中。用这些引物共检测到 30 个标记, 全部具有多态性, 平均 PIC 值为 0.754 (表 3)。

表 1 国家芝麻区试品种(系)的名称及育种单位  
Table 1 Name and breeding institute of sesame varieties (lines) used in this study

代号 Code	品种 Variety	选育单位 Breeding institute
1	驻芝 14 Zhuzhi 14	驻马店市农业科学研究所 Zhumadian, ARI
2	6120	襄阳市农业科学院 Xiangyang, AAS
3	01-2658	中国农业科学院油料作物研究所 OCRI, CAAS
4	51019	中国农业科学院油料作物研究所 OCRI, CAAS
5	02-2496	中国农业科学院油料作物研究所 OCRI, CAAS
6	03-4067	襄阳市农业科学院 Xiangyang, AAS
7	03-41008	中国农业科学院油料作物研究所 OCRI, CAAS
8	03H02	中国农业科学院油料作物研究所 OCRI, CAAS
9	04-41014	中国农业科学院油料作物研究所 OCRI, CAAS
10	01-4088	襄阳市农业科学院 Xiangyang, AAS
11	05-4082	襄阳市农业科学院 Xiangyang, AAS
12	05-479	中国农业科学院油料作物研究所 OCRI, CAAS
13	05-51018	中国农业科学院油料作物研究所 OCRI, CAAS
14	06-AA7	中国农业科学院油料作物研究所 OCRI, CAAS
15	06H04	中国农业科学院油料作物研究所 OCRI, CAAS
16	06XF5	中国农业科学院油料作物研究所 OCRI, CAAS
17	07A5	中国农业科学院油料作物研究所 OCRI, CAAS
18	国芝 235 Guozhi 235	合肥大国生物所 Hefei Daguo Biology Institute
19	漯芝 03-7 Luozhi 03-7	漯河市农业科学院 Luohe, AAS
20	漯芝 18 Luozhi 18	漯河市农业科学院 Luohe, AAS
21	驻 122 Zhu 122	驻马店市农业科学研究所 Zhumadian, ARI
22	豫芝 4 号 Yuzhi 4	驻马店市农业科学研究所 Zhumadian, ARI
23	郑芝 2010 Zhengzhi 2010	河南省农作物新品种重点实验室 Henan, KLCI
24	郑芝 95Y09 Zhengzhi 95Y09	河南省农作物新品种重点实验室 Henan, KLCI
25	郑芝 9730 Zhengzhi 9730	河南省农作物新品种重点实验室 Henan, KLCI
26	郑芝 97S56 Zhengzhi 97S56	河南省农作物新品种重点实验室 Henan, KLCI
27	郑芝 9925 Zhengzhi 9925	河南省农作物新品种重点实验室 Henan, KLCI
28	驻 03J-3 Zhu 03J-3	驻马店市农业科学研究所 Zhumadian, ARI
29	中芝 0403 Zhongzhi 0403	中国农业科学院油料作物研究所 OCRI, CAAS
30	中芝 9 号 Zhongzhi 9	中国农业科学院油料作物研究所 OCRI, CAAS
31	99-2188	中国农业科学院油料作物研究所 OCRI, CAAS
32	郑 98N09 Zheng 98N09	河南省农作物新品种重点实验室 Henan, KLCI
33	驻 86-207 Zhu 86-207	驻马店市农业科学研究所 Zhumadian, ARI
34	中芝 11 Zhongzhi 11	中国农业科学院油料作物研究所 OCRI, CAAS
35	中芝 12 Zhongzhi 12	中国农业科学院油料作物研究所 OCRI, CAAS
36	漯芝 12 Luozhi 12	漯河市农业科学院 Luohe, AAS
37	驻芝 4 号 Zhuzhi 4	驻马店市农业科学研究所 Zhumadian, ARI
38	豫芝 8 号 Yuzhi 8	河南省农业科学院 Henan, AAS
39	豫芝 11 Yuzhi 11	河南省农业科学院 Henan, AAS
40	驻芝 11 Zhuzhi 11	驻马店市农业科学研究所 Zhumadian, ARI
41	冀 9014 Ji 9014	河北省农林科学院 Hebei, AAFS
42	06AA8	中国农业科学院油料作物研究所 OCRI, CAAS
43	中芝 14 Zhongzhi 14	中国农业科学院油料作物研究所 OCRI, CAAS

OCRI, CAAS: Oil Crops Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences; AAS: Academy of Agricultural Sciences; KLCI: Key Laboratory of Crop Improvement; ARI: Agricultural Research Institute; AAFS: Academy of Agriculture and Forestry Sciences.

## 2.2 品种(系)的特异性分析

利用 12 对 SSR 核心引物扩增获得的 30 个多态性标记, 初步构建 43 个芝麻品种(系)的 DNA 指纹图

谱(表 4)。DNA 指纹比对结果显示, 43 个品种中没有指纹完全相同的品种, 说明所构建的 DNA 指纹图谱是有效的。聚类结果表明: (1)在遗传相似系数为

表 2 SSR 引物名称及其序列  
Table 2 SSR primers sequences

引物名称 Primer	正向引物 Forward sequence (5'→3')	反向引物 Reverse sequence (5'→3')
sa08	GGAGAAATTTTCAGAGAGAA	ATTGCTCTGCCTACAAATAA
sa33	TTTTCCTGAATGGCATAGTT	GCCCAATTGTCTATCTCCT
sa72	GCAGCAGTTCGGTTCTTG	AGTGCTGAATTTAGTCTGCATAG
sa108	CCACTCAAAATTTTCACTAAGAA	TCGTCTTCCTCTCTCCCC
sa173	TTTCTTCCTCGTTGCTCG	CCTAACCAACCACCCTCC
sa182	CCATTGAAAAGTGCACACAA	TCCACACACAGAGAGCCC
sa184	TCTTGCAATGGGGATCAG	CGAACTATAGATAATCACTTGGAA
ZHY21	AATTCGGGCTCTTGAAGACA	AGGAGCCTTTGGTTGAGGAT
ZHY22	CAGGAAATCAGTACACTGGAA	AAACGATCGACGACTGTTCA
ZHY23	ATGGGCGTATCAGTTTCGAC	TTTCTGCCAACCTTTTCTGG
ZHY24	GGGGCACAGAGTGGATGTAG	GGACCATGTAATCCCAGCAC
ZHY25	CAGCCCCTTCTTCTCTCTTC	CAGCTGGCAGATCAGTATGG

表 3 SSR 核心引物的扩增情况  
Table 3 Amplification results of core SSR primers

引物 Primer	总带数 No. of amplified bands	多态性带数 No. of polymorphic bands	多态性比率 Polymorphic rate (%)	鉴别力 Discrimination power	多态性信息量 PIC
Sa08	2	2	100	4	0.89
Sa33	2	2	100	2	0.78
Sa72	2	2	100	3	0.73
Sa108	2	2	100	4	0.64
Sa173	3	3	100	5	0.85
Sa182	2	2	100	4	0.67
Sa184	3	3	100	5	0.83
ZHY21	2	2	100	4	0.59
ZHY22	3	3	100	4	0.79
ZHY23	4	4	100	7	0.84
ZHY24	2	2	100	3	0.68
ZHY25	3	3	100	3	0.76
平均 Mean	2.5	2.5	100	4	0.754

0.914处, 这些品种可被分为 43 类, 即所有品种被完全区分开, 与 DNA 指纹比对结果一致; (2)同一育种单位提供的部分品种(系)其遗传基础相近, 优先聚类在一起, 比如中国农业科学院油料所提供的中芝 11 和 06-AA7、03H02 和 06H04 等; (3)不同单位选育的品种其遗传背景差异较大, 往往被分配到不同的类群中(图 1); (4)聚类结果与品种的地域来源并不完全对应, 不同育种单位提供的部分品种也经常聚类在一起, 比如豫芝11 (河南省农业科学院)与中芝 12 (中国农业科学院油料作物研究所), 表明这些品种的遗传基础比较相似, 可能是采用了共同的育种亲本的缘故。

计算了 43 个品种相互间的遗传相似系数, 并将任意一个品种(视为待测品种)与其余 42个品种(视为

已知品种)的最小值、最大值和平均值归纳整理, 结果列于表5。待测品种与已知品种的遗传相似系数越高, 说明待测品种派生于已知品种(或与已知品种具有共同祖先)的可能性就越大, 待测品种的特异性就越低。从表 5 可以看出, 品种间遗传相似系数平均值的变幅为 0.475~0.728, 最小值的变幅为 0.200~0.538, 说明区试品种总体上具有较好的特异性, 部分品种具有较高的特异性。再从最大值(即特异性最差的情况)看, 如果分别以遗传相似系数阈值  $T = 0.90$ 、 $0.85$ 、 $0.80$ 、 $0.75$  和  $0.70$  为确定品种具有特异性的标准, 那么具有特异性品种的比例分别为 95%、70%、37%、12%和 5%。由此可见, 随着  $T$  值的降低, 符合特异性标准的品种比例迅速降低。

表 4 利用 12 对 SSR 核心引物构建的芝麻品种(系) DNA 指纹图谱  
Table 4 DNA fingerprint of sesame varieties (lines) using 12 SSR core primers

Code	指纹图谱 Fingerprint																													
1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	
2	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0
3	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0
4	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0
5	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0
6	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0
7	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0
8	1	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
9	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0
10	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0
11	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0
12	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0
13	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0
14	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0
15	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0
16	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
17	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0
18	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0
19	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1
20	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0
21	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0
22	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0
23	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
24	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0
25	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0
26	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1
27	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1
28	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0
29	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0
30	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
31	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0
32	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0
33	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0
34	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0
35	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
36	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0
37	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0
38	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0
39	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
40	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0
41	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0
42	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0
43	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0

参照前人的研究结果<sup>[10,19]</sup>, 本研究初步将  $T = 0.90$  作为划分标准, 在此标准下 41 个品种(95%)具备特异性。若将标准提高( $T = 0.85$ ), 则有 13 个品种(30%)被划分为无特异性, 这些品种大多数来源于同一育种单位或省份, 如襄阳市农业科学院提供的 01-4088

与中国农业科学院油料作物研究所提供的 05-479 (遗传相似系数为 0.914)。

2.3 品种的一致性

从 43 个国家区试品种中随机选出 10 个品种, 每个品种分析 30 个单株, 用 12 对 SSR 核心引物检

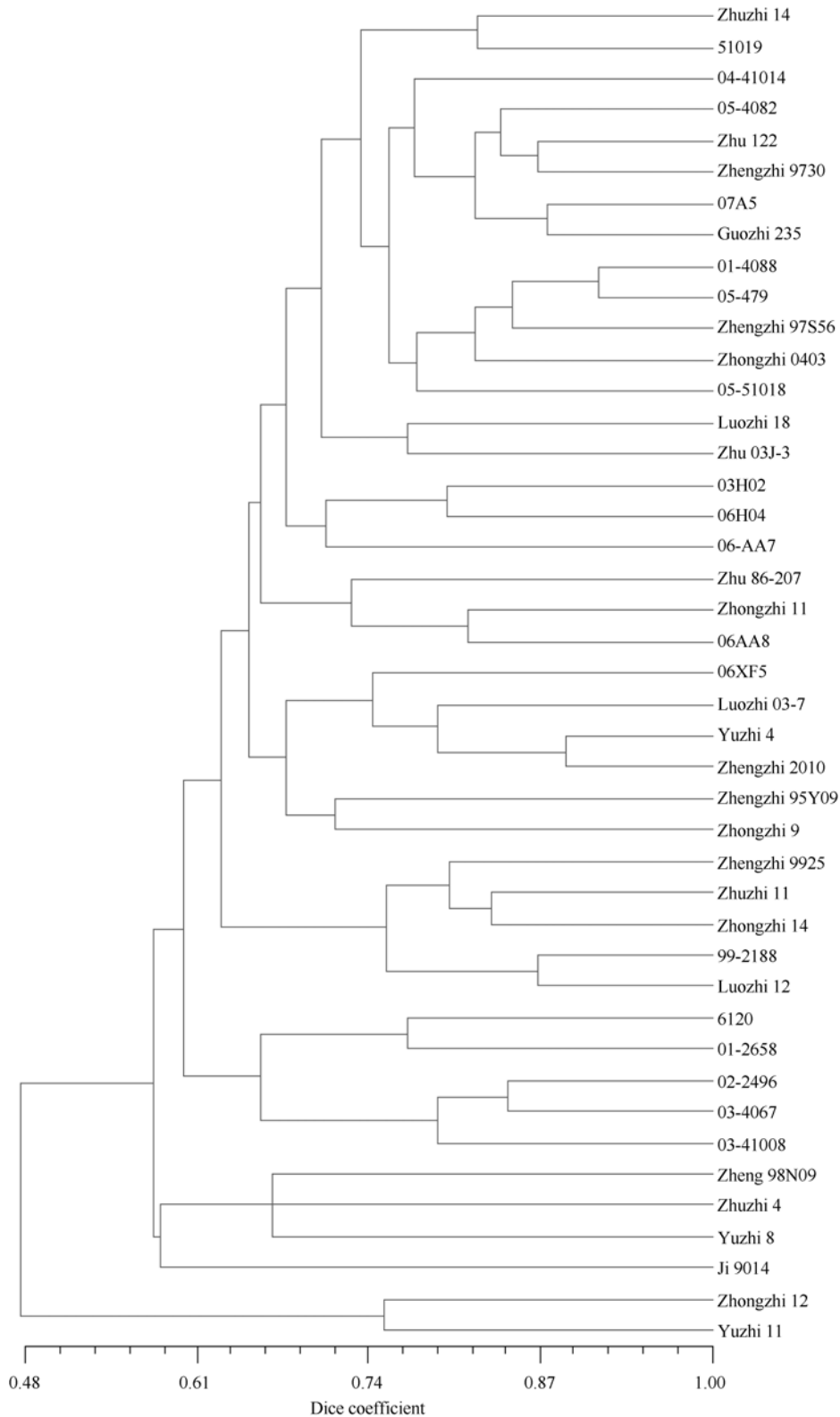


图 1 芝麻品种(系)的 UPGMA 聚类分析  
Fig. 1 UPGMA clustering of 43 sesame varieties (lines)

测品种的一致性。以多数个体具有的谱带(即主带)作为该品种的特征谱带,分别计算单个引物位点的一致性  $r$  ( $r$  为具有主带的个体所占的比率)和所有引物位点的平均一致性  $R$  ( $R$  为所有位点一致性  $r$  的平均值)。参照玉米的评价标准,将品种一致性级别分为 5 级<sup>[20]</sup>。从表 6 可以看出,一致性较好(1 级和 2

表 5 品种(系)间的最大、最小及平均遗传相似系数  
Table 5 Genetic similarity coefficient among varieties (lines) by pairwise comparison

品种 Variety	遗传相似系数 Genetic similarity			品种 Variety	遗传相似系数 Genetic similarity		
	最小值 Min	最大值 Max	平均值 Mean		最小值 Min	最大值 Max	平均值 Mean
驻芝 14 Zhuzhi 14	0.400	0.857	0.670	郑芝 2010 Zhengzhi 2010	0.462	0.889	0.631
6120	0.400	0.769	0.626	郑芝 95Y09 Zhengzhi 95Y09	0.500	0.800	0.645
01-2658	0.381	0.769	0.586	郑芝 9730 Zhengzhi 9730	0.435	0.867	0.666
51019	0.400	0.824	0.631	郑芝 97S56 Zhengzhi 97S56	0.429	0.865	0.682
02-2496	0.333	0.846	0.613	郑芝 9925 Zhengzhi 9925	0.381	0.833	0.628
03-4067	0.385	0.846	0.602	驻 03J-3 Zhu 03J-3	0.364	0.867	0.653
03-41008	0.261	0.800	0.550	中芝 0403 Zhongzhi 0403	0.357	0.833	0.647
03H02	0.444	0.800	0.610	中芝 9 号 Zhongzhi 9	0.435	0.759	0.618
04-41014	0.400	0.813	0.666	J18	0.364	0.870	0.603
01-4088	0.400	0.914	0.670	郑 98N09 Zheng 98N09	0.353	0.696	0.569
05-4082	0.500	0.839	0.696	驻 86-207 Zhu 86-207	0.444	0.774	0.620
05-479	0.538	0.914	0.728	中芝 11 Zhongzhi 11	0.455	0.828	0.677
05-51018	0.400	0.800	0.674	中芝 12 Zhongzhi 12	0.200	0.750	0.475
06-AA7	0.381	0.828	0.641	漯芝 12 Luozhi 12	0.462	0.870	0.650
06H04	0.400	0.824	0.674	驻芝 4 号 Zhuzhi 4	0.300	0.800	0.583
06XF5	0.444	0.800	0.597	豫芝 8 号 Yuzhi 8	0.200	0.690	0.551
07A5	0.333	0.875	0.655	豫芝 11 Yuzhi 11	0.286	0.750	0.491
国芝 235 Guozhi 235	0.417	0.875	0.687	驻芝 11 Zhuzhi 11	0.364	0.833	0.613
漯芝 03-7 Luozhi 03-7	0.381	0.815	0.629	冀 9014 Ji 9014	0.286	0.733	0.568
漯芝 18 Luozhi 18	0.261	0.786	0.577	06AA8	0.417	0.815	0.615
驻 122 Zhu 122	0.348	0.867	0.686	中芝 14 Zhongzhi 14	0.333	0.833	0.628
豫芝 4 号 Yuzhi 4	0.462	0.889	0.692				

表 6 国家区试品种(系)的一致性划分  
Table 6 Uniformity of tested varieties (lines)

分级 Grade	表现 Performance	品种 Variety	百分比 Percentage (%)
I	很好 Excellent	中芝 14 Zhongzhi 14, 驻 122 Zhu 122	20
II	好 Good	驻 03J-3 Zhu 03J-3, 郑芝 2010 Zhongzhi 2010, 01-2658	30
III	中等 Medium	03H02, 漯芝 03-7 Luozhi 03-7, 6120 03H02	30
IV	差 Poor	冀 9014 Ji 9014, 国芝 235 Guozhi 235	20
V	很差 Very poor		0

级)的品种占 50%, 中等(3 级)的占 30%, 因此参试组合的一致性总体表现较好。对于一致性差的品种(如国芝 235), 区试记录也反映该品种的田间整齐度较差, 异型株多, 说明 SSR 标记的一致性检测结果是可信的。

另外, 还采用分配试验进一步评价上面 10 个品种的一致性。分配试验是一种十分有用的评价品种一致性的统计方法, 其原理是将品种分为待测品种和目标品种(在本文中待测品种与目标品种相同), 首先计算待测品种每个单株相对于 10 个目标品种的

期望基因型频率, 然后将这些单株一一分配到期望基因型频率最高的目标品种中去(基因型频率低于 0.5 的单株不分配, 放入“其他”类)。分配试验结果表明, 在 300 个单株(30×10)中, 86%的单株(258 株)被正确分配回到原来的品种中。单株正确分配率最高的品种是中芝 14、驻 122 和驻 03J-3, 达 100%; 其次是 03H02、01-2658、漯芝 03-7 和郑芝 2010, 在 83%以上; 冀 9014 和国芝 235 较低, 仅有 63%~73% (表 7)。以上结果也说明中芝 14、驻 122 和驻 03J-3 的一致性最好, 03H02 和郑芝 2010 的一致性次之, 冀

表 7 品种单株分配试验结果  
Table 7 Results of assignment test

目标品种代号 Source variety code	待分配品种代号 Assigned variety code									
	2	3	43	8	18	19	21	23	28	41
6120	24	0	0	0	0	0	0	0	0	0
01-2658	0	26	0	0	0	0	0	3	0	0
中芝 14 Zhongzhi 14	0	0	30	3	0	0	0	0	0	0
03H02	0	0	0	27	0	0	0	0	0	0
国芝 235 Guozhi 235	0	0	0	0	19	0	0	0	0	0
漯芝 03-7 Luozhi 03-7	0	0	0	0	0	25	0	0	0	0
驻 122 Zhu 122	4	0	0	0	0	0	30	0	0	4
郑芝 2010 Zhengzhi 2010	0	4	0	0	0	0	0	25	0	0
驻 03J-3 Zhu 03J-3	0	0	0	0	10	0	0	0	30	4
冀 9014 Ji 9014	0	0	0	0	0	0	0	0	0	22
其他品种 Other variety	2	0	0	0	1	5	0	2	0	0
正确分配百分比 Correctly assigned (%)	80	87	100	90	63	83	100	83	100	73

表中数据为分配到各品种中的单株数。  
Number of plants from tested variety assigned to source variety were listed.

9014 和国芝 235 的一致性最差。

3 讨论

在品种鉴定中，最理想的鉴定技术应该是具有较好的可操作性、精确性、可靠性和高度的自动化，有研究者认为 SSR 标记就是最接近于理想化的品种鉴定技术<sup>[21]</sup>。SSR 作为第二代分子遗传标记，由于它广泛分布于植物基因组，近几年已应用于芝麻种质资源多样性分析中<sup>[14,16]</sup>。本研究在构建 SSR 指纹图谱的过程中，筛选出多态性好、鉴别力强、重复性高的 SSR 引物 12 对，暂时作为芝麻 DNA 指纹分析的核心引物。随着更多 SSR 引物的开发和利用，相信会有更多更理想的核心引物被选用，对于提高建库效率及鉴定结果的可靠性具有重要意义。

在本研究中，品种间的遗传系数最大为 0.914，最小为 0.200，平均为 0.627，而且遗传聚类结果较分散，表明我国新育成品种的遗传基础较丰富。上述结果与孙建等<sup>[2]</sup>的结果存在一定差异。他们用 SRAP 标记分析了 32 个 1990—2007 年间育成品种，发现遗传相似系数最大为 0.975，最小为 0.857，平均为 0.912，因此认为主栽品种间的亲缘关系十分相近，亲本遗传基础较窄。上述研究结果的差异可能与选用的研究材料及分子标记类型(SSR 与 SRAP)不同有关。不过，虽然芝麻品种利用和交流的频率较大，但各单位在杂交育种中选用的亲本仍有限，比如大部分育成品种都携带有宜阳白、豫芝 4 号等少数骨干亲本的血缘。骨干亲本的高频利用降低了

品种间的遗传多样性，使遗传基础变窄。今后应该加强国外野生芝麻等优异种质的引进和利用，有效拓宽品种的遗传基础。

在芝麻品种的特异性鉴定中，核心的问题是特异性划分标准。在以表型为基础的 DUS 测试体系中，品种间只要有一个明显不同的性状即视为具备特异性。在以分子标记为基础的品种鉴定中，有 2 种特异性划分方法，一种是根据遗传距离(或遗传相似系数)的大小来划分，另外一种是根据差异的 SSR 位点数目来划分。国际上，通常是将分子标记数据转换为遗传距离(或相似系数)，然后根据遗传距离的大小来判断品种是否具有特异性，已经提出的用于划分品种特异性的遗传距离临界值有 0.25<sup>[22]</sup>、0.20<sup>[23]</sup>和 0.10<sup>[19]</sup>等，目前尚无法统一。在近几年的国家油菜区试品种 DNA 指纹分析中采用的遗传相似系数标准是 0.90 (相当于遗传距离 0.10)<sup>[10]</sup>。经综合比较分析，本研究认为采用遗传相似系数阈值 T=0.90 作为芝麻品种特异性的划分标准较为合适。采用此标准，95%的品种均具备特异性。若将标准提高到 0.85，则有 13 个品种的特异性较低，它们大多数来源于相同的省份或育种单位，具有较为相似的遗传背景，可能是育种者使用了相同或相近的核心亲本的缘故。在国内，通常采用的品种特异性划分方法是比较具有差异的 SSR 位点数，比如农业行业标准《玉米品种鉴定-DNA 指纹方法》(NY/T 1432-2007)规定，在品种(系)间分析检测 20 对 SSR 核心引物，差异位点数 2 个则判定为不同品种(具备特异



性), 差异位点数为 1 则判断为近似品种, 差异位点数为 0 则判定为仿冒品种。水稻品种鉴定的行业标准(NY/T 1433-2007)与此类似。本研究中, 01-4088 与 05-479 是最为相似的一对品种之一(遗传相似系数为 0.914), 在检测的 12 对核心引物中有 3 对存在差异, 折算为在 20 对引物中有 5 对存在差异, 若参照玉米的品种鉴定标准, 则这 2 个品种具备特异性, 进而推断 43 个芝麻品种全部具有特异性。由此可见, 采用两种特异性划分方法的鉴定结果基本相同, 但两种方法各有侧重点, 第一种方法(遗传距离法)适合于品种的大规模筛查比对, 第二种方法(差异位点法)适合于特定品种间的两两比对。今后, 应该尽快确定一套适合于芝麻品种鉴定的标准引物, 制定和完善芝麻品种鉴定的行业标准, 切实保护育种家的权益, 促进新品种的选育。

## 4 结论

利用 12 对 SSR 核心引物可以将所有的品种区分开, 表明 SSR 标记用于芝麻品种 DUS 测试是可靠的。在 43 个区试品种中, 大部分(80%)品种都具有较好的特异性和一致性。

## References

- [1] Ashri A. Sesame breeding. *Plant Breed Rev*, 1998, 16: 179–228
- [2] Sun J(孙建), Zhang X-R(张秀荣), Zhang Y-X(张艳欣), Che Z(车卓), Huang B(黄波). Analysis on genetic diversity and genetic basis of main sesame cultivars released in China. *Sci Agric Sin* (中国农业科学), 2009, 42(10): 3421–3431 (in Chinese with English abstract)
- [3] Ma S-W(马双武). Research and application progress of seedling marker character in crop breeding and seed purity identification in China. *J Plant Genet Resour* (植物遗传资源学报), 2011, 12(2): 297–300 (in Chinese with English abstract)
- [4] Mei D-S(梅德圣), Li Y-C(李云昌), Chen Y-F(陈玉峰), Li Y-D(李英德), Xu Y-S(徐育松), Hu Q(胡琼). Seed purity identification of Zhongyouza 12 by peroxidase isozyme and SSR markers in *Brassica napus*. *Chin J Agric Biotechnol* (农业生物技术学报), 2010, 18(4): 815–821 (in Chinese with English abstract)
- [5] Fang Y-C(方玉春), Zhang X-H(张兴和), Feng D-J(冯德举), Liu J-P(刘俊平), Zhuang B-C(庄炳昌), Liang X-K(梁晓葵). The identification of corn seed purity by using PAGE patterns of salt soluble protein. *J Jilin Agric Univ* (吉林农业大学学报), 2001, 23(4): 6–10 (in Chinese with English abstract)
- [6] Smith J S C, Chin E C L, Shu H, Smith O S. An evaluation of the utility of SSR loci as molecular markers in maize (*Zea mays* L.): Comparison with data from RFLPs and pedigree. *Theor Appl Genet*, 1997, 95: 163–173
- [7] Wang F-G(王凤格), Zhao J-R(赵久然), Guo J-L(郭景伦), She H-D(余花娣), Chen G(陈刚). Comparison of three DNA fingerprint analyzing methods for maize cultivars' identification. *Mol Plant Breed* (分子植物育种), 2003, 1(5): 655–661 (in Chinese with English abstract)
- [8] Li L(李莉), Yang J-B(杨剑波), Machill D J, Colowit P M. Comparison of different detection methods for rice SSR analysis. *Chin J Rice Sci* (中国水稻科学), 2000, 14(3): 185–188 (in Chinese with English abstract)
- [9] Li W(李伟), Zheng Y-L(郑有良), Wei Y-M(魏育明), Yan Z-H(颜泽洪), Lan X-J(兰秀锦). Molecular identification of new wheat cultivar Chuannong 16. *J Triticeae Crops* (麦类作物学报), 2004, 24(1): 6–10 (in Chinese with English abstract)
- [10] Lu G-Y(陆光远), Wu X-M(伍晓明), Zhang D-X(张冬晓), Liu F-L(刘凤兰), Chen B-Y(陈碧云), Gao G-Z(高桂珍), Xu K(许鲲). SSR-based evaluation of distinctness and uniformity of rapeseed (*Brassica napus* L.) varieties under Chinese National Official Field Tests. *Sci Agric Sin* (中国农业科学), 2008, 41(1): 32–42 (in Chinese with English abstract)
- [11] Luan Y-S(栾雨时), An L-J(安利佳), Wang B-Q(黄百渠), Zhang W-J(张文俊), He M-Y(何孟元). Using simple sequence repeat probe for DNA fingerprints in tomato cultivars. *Acta Hort Sin* (园艺学报), 1999, 26(1): 51–53 (in Chinese with English abstract)
- [12] Cui Y-H(崔艳华), Qiu L-J(邱丽娟), Chang R-Z(常汝镇), Lü W-H(吕文河). Examination of representiveness of the primary core collection in Huanghuai summer sowing soybean (*Glycine max*) using SSR. *J Plant Genet Resour* (植物遗传资源学报), 2003, 4(1): 9–15 (in Chinese with English abstract)
- [13] Dixit A, Jin M H, Chung J W, Yu J W, Chung H K, Ma K H, Park Y J, Cho E G. Development of polymorphic microsatellite markers in sesame (*Sesamum indicum* L.). *Mol Ecol Notes*, 2005, 5: 736–738
- [14] Wei L-B(魏利斌), Zhang H-Y(张海洋), Zheng Y-Z(郑永战), Guo W-Z(郭旺珍), Zhang T-Z(张天真). Development and utilization of EST-derived microsatellites in sesame (*Sesamum indicum* L.). *Acta Agron Sin* (作物学报), 2008, 34(12): 2077–2084 (in Chinese with English abstract)
- [15] Lu G-Y(陆光远), Yang G-S(杨光圣), Fu T-D(傅廷栋). An effective assay of detecting SSR marker in rapeseed. *Chin J Oil Crops Sci* (中国油料作物学报), 2003, 25: 79–81 (in Chinese with English abstract)
- [16] Zhang B(张鹏), Zhang H-Y(张海洋), Guo W-Z(郭旺珍), Zheng Y-Z(郑永战), Wei L-B(魏利斌), Zhang T-Z(张天真). Genetic diversity analysis of *Sesamum indicum* L. germplasms using SRAP and EST-SSR markers. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2007, 33(10): 1696–1702 (in Chinese with English abstract)
- [17] Lombard V, Baril C P, Dubreuil P, Blouet F, Zhang D. Genetic relationships and fingerprinting of rapeseed cultivars by AFLP: consequences for varietal registration. *Crop Sci*, 2000, 40: 1417–1425
- [18] Piry S, Alapetite A, Cornuet J M, Paetkau D, Baudouin L, Estoup A. GeneClass2: a software for genetic assignment and first-gene-

- ration migrant detection. *J Heredity*, 2004, 95: 536–539
- [19] Troyer A F, Rocheford T R. Germplasm ownership: related corn inbreds. *Crop Sci*, 2002, 42: 3–10
- [20] Li J-F(李俊芳), Zhang X-Y(张雪原), Sun S-X(孙世贤), Wang S-C(王守才). Analysis of maize variety in national maize main production area using SSR technique: I. Evaluation of distinctness and uniformity of maize variety. *J Maize Sci* (玉米科学), 2006, 14(6): 38–42 (in Chinese with English abstract)
- [21] Heckenberger M, van der Voort J R, Melchinger A E, Peleman J, Bohn M. Variation of DNA fingerprints among accessions within maize inbred lines and implications for identification of essentially derived varieties: II. Genetic and technical sources of variation in AFLP data and comparison with SSR data. *Mol Breed*, 2003, 12: 97–106
- [22] Smith J S C, Smith O S. The description and assessment of distances between inbred lines of maize: II. The utility of morphological, biochemical, and genetic descriptors and a scheme for testing of distinctiveness between inbred lines. *Maydica*, 1989, 34: 151–161
- [23] ASSINSEL. 2000. DUS testing: Phenotype vs. genotype [online]. ASSINSEL, Position Paper adopted at the Rome Congress in May 2000. [http://www.worldseed.org/Position\\_papers/PhenotypeGenotype.htm](http://www.worldseed.org/Position_papers/PhenotypeGenotype.htm) [verified 30 Nov. 2004]. International Association of Plant Breeders for the Protection of Plant Varieties (ASSINSEL), Nyon, Switzerland

## 科学出版社生物分社新书推介

### 《理解生物信息学》

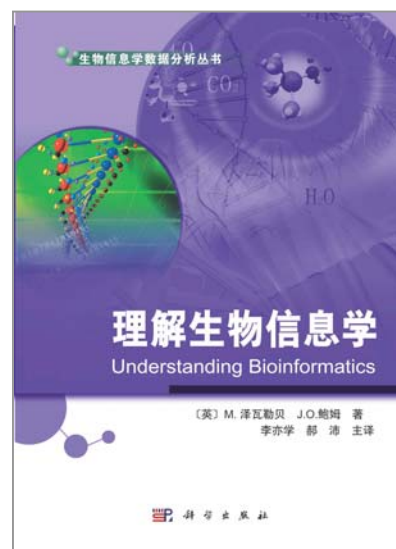
M. 泽瓦勒贝 J.O. 鲍姆 著

定价: 168 元

出版时间: 2012 年 2 月

书号: 978-7-03-032832-8

本书是一本集生物信息学专业参考书和教材于一体的书, 共分为 7 部分: 基础知识、序列联配、进化过程、基因组特征、二级结构、蛋白质三级结构、细胞和组织, 以及附录和字符表等。每部分由不同章节构成, 大多数章节可以被归为应用章节或理论章节。因此在每部分开始时, 都有应用章节, 描述了特定研究领域较实用的方面。理论章节则紧随其后, 解释了其科学、理论基础以及在已有应用中所使用的技术。本书还提供了思维导图、流程图、扩展阅读等其他书不常见的内容, 以供读者能够在每一章、每一节开始时对整体内容有所把握, 并能够了解更多扩展知识、发展技能的参考文献。本书适合分子生物学、生物信息学专业及生物医学领域的师生和研究者参考使用。



获取更多图书信息请您关注: <http://www.lifescience.com.cn/>

欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书

联系人: 科学出版社科学销售中心 周文宇 E-mail: [zhouwenyu@mail.sciencep.com](mailto:zhouwenyu@mail.sciencep.com)

联系电话: 010-64022646 010-64017321

网上订购: <http://shop.sciencepress.cn> 卓越网 当当网 京东图书 学士书店

更多精彩图书请登陆网站, 欢迎致电索要书目