

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2012.00840

## 应用 RSAP、SRAP 和 SSR 分析苧麻种质亲缘关系

邹自征<sup>1,2</sup> 陈建华<sup>1,\*</sup> 栾明宝<sup>1,\*</sup> 郭劲霞<sup>2</sup> 王超<sup>3</sup> 王晓飞<sup>1</sup> 许英<sup>1</sup>  
孙志民<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 中国农业科学院麻类研究所 / 农业部茎纤维生物质与工程微生物重点开放实验室, 湖南长沙 410205; <sup>2</sup> 益阳医学高等专科学校, 湖南益阳 413000; <sup>3</sup> 中南大学生物科学与技术学院, 湖南长沙 410205

**摘要:** 分别采用 RSAP、SRAP 和 SSR 3 种分子标记和田间性状对 16 份苧麻种质进行亲缘关系聚类, 结果表明, 每对引物扩增出的多态性位点, SRAP 标记最多, RSAP 次之, SSR 较少; 根据 SRAP 标记和 RSAP 标记分类的结果都与 RSAP+SRAP+SSR 联合分类的结果基本一致, 相关达到了极显著水平, 而与 SSR 标记分类结果差异较大; 分子标记聚类结果与田间性状的聚类结果接近程度, 依次为 SRAP+RSAP+SSR>SRAP>RSAP>>SSR。在检测苧麻种质亲缘关系中, SRAP 标记效果最优, RSAP 标记稍逊, SSR 标记最差。RSAP 标记能较好地显示苧麻种属间的多态性和亲缘关系。以 RSAP、SRAP、SSR 标记联合分析, 能更好地揭示种质之间的亲缘关系。

**关键词:** 苧麻; RSAP; SRAP; SSR; 亲缘关系

## Genetic Relationship of Ramie Germplasm Revealed by RSAP, SRAP, and SSR Markers

ZOU Zi-Zheng<sup>1,2</sup>, CHEN Jian-Hua<sup>1,\*</sup>, LUAN Ming-Bao<sup>1,\*</sup>, GUO Jin-Xia<sup>2</sup>, WANG Chao<sup>3</sup>, WANG Xiao-Fei<sup>1</sup>, XU Ying<sup>1</sup>, and SUN Zhi-Min<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Bast Fiber Crops, Chinese Academy of Agricultural Sciences / Key Laboratory of Stem Fiber Biomass and Engineering Microbiology, Ministry of Agriculture, Changsha 420105, China; <sup>2</sup> Yiyang Medical School, Yiyang 413000, China; <sup>3</sup> School of Biological Science and Technology, Central South University, Changsha 410205, China

**Abstract:** The research on molecular biology in ramie [*Boehmeria nivea* (L.) Gaud.] is not as advanced as that in major crops due to the lagged development of molecular markers. We compared the effectiveness of restriction site amplified polymorphism (RSAP), sequence-related amplified polymorphism (SRAP), and simple sequence repeat (SSR) markers in revealing genetic relationship of 16 entries of ramie germplasm. The SRAP marker detected the most polymorphic loci, followed by the RSAP marker, and SSR marker had the lowest polymorphism. The dendrogram based on SRAP or RSAP data showed high consistency with that based on combined data of SRAP+RSAP+SSR, and their genetic distances were significantly correlated. In contrast, the SSR data constructed a dendrogram with different clusters of the 16 entries. The similarity of clusters between phenotypic traits and molecular markers was sequenced as SRAP+RSAP+SSR > RSAP > SRAP > SSR. The SPAR marker had the highest efficiency to disclose the genetic relationship among ramie germplasm, which was slightly higher than that of the RSAP marker, whereas the SSR showed the lowest efficiency. Thus, RSAP marker was applicable in diversity analysis in ramie, and the joint use of RSAP, SRAP, and SSR markers may enhance the reliability of genetic relationship.

**Keywords:** Ramie; RSAP; SRAP; SSR; Relationship

苧麻 [*Boehmeria nivea* (L.) Gaud.] 为荨麻科苧麻属的多年生宿根性草本植物<sup>[1]</sup>, 其纤维是纺织工业的重要原料。相对于水稻、小麦、棉花等农作物, 对

苧麻的分子水平研究较为落后, 在苧麻上应用的分子标记较少。因此, 挖掘、评价可以利用在苧麻研究上的分子标记技术十分必要。目前, 苧麻上可利

本研究由国家自然科学基金项目(30900913), 国家科技支撑计划项目(2006BAD13B04-2)和中国农业科学院科技经费项目资助。

\*通讯作者(Corresponding authors): 陈建华, E-mail: cjhb@sinac.com, Tel: 13908494958; 栾明宝, E-mail: luanmingbao2002@126.com, Tel: 0731-88998518

第一作者联系方式: E-mail: zouzizheng@hotmail.com

Received(收稿日期): 2011-10-13; Accepted(接受日期): 2012-01-19; Published online(网络出版日期): 2012-03-05.

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20120305.1041.020.html>

用的分子标记主要是 RAPD<sup>[2-3]</sup>、SSR<sup>[4-7]</sup>、ISSR<sup>[8]</sup>、SRAP<sup>[9]</sup>, 其中 SRAP 的应用虽然操作简单, 结果稳定, 且具有成本优势, 但主要针对基因的 ORF 扩增, 对基因相对较少的着丝粒附近以及端粒的扩增较少<sup>[10]</sup>; SSR 标记随机、均匀、广泛分布于整个基因组, 是一种共显性标记, 具有操作简单、快速, 结果稳定等特点, 但是, 开发 SSR 引物需建立 DNA 文库, 筛选鉴定微卫星 DNA 克隆, 测定这些克隆的两侧序列, 整个过程繁杂、费时, 且需要较高的成本<sup>[11]</sup>, 限制了 SSR 进一步的开发应用。到目前为止, 仅开发了 90 对苧麻 SSR 引物<sup>[4-6]</sup>。限制性位点扩增多态性 (restriction site amplified polymorphism, RSAP) 是一种新型的分子标记技术, 由杜晓华等<sup>[12]</sup>于 2006 年提出并在辣椒上应用, 其原理是采用 2 条长度分别为 18 nt 的引物, 其结构组成为 12~14 nt 随机序列加上 4~6 nt 的某限制性内切酶识别位点, 通过该引物对整个基因组扩增, 因个体酶切位点差异而产生多态性。该标记具有操作简便、多态性丰富、产率中等、结果稳定可靠, 成本低廉, 不需限制酶切即可知道

酶切位点多态性等优点, 已在辣椒<sup>[13]</sup>、紫菜<sup>[14]</sup>等多种作物中利用。但至今尚无在苧麻上利用的报道。RSAP 标记在苧麻上是否可以利用, 相比其他标记效果如何? 相对 SRAP、SSR 这两种常用的标记哪种标记更能反映种质之间的亲缘关系? 本文分别采用 RSAP、SRAP 和 SSR 3 种分子标记和田间性状对 16 份苧麻种质进行亲缘关系鉴定, 通过相互比较, 探讨 3 种分子标记在苧麻分子水平研究的应用潜力, 为新型分子标记技术在苧麻上的利用提供借鉴。

1 材料与方法

1.1 试验材料

16 份苧麻种质资源(阳朔鸡骨白、虎皮麻、阳新细叶绿、湘芒 6 号、宁都大白麻、湘芒 1 号、新民青麻、油漆麻、宜黄家麻、咸宁大叶绿、野菟子、天台铁麻、大叶红蚌蚶、江口青皮苧麻、龙塘白麻、武昌山坡苧麻 1 号)保存于中国农业科学院麻类研究所国家种质长沙苧麻圃(表 1)。RSAP 引物组合、SRAP 引物组合、SSR 引物见表 2。

表 1 16 份苧麻种质  
Table 1 Ramie germplasm used in the study

代码 Code	品种名称 Cultivar	产地或来源 Origin	代码 Code	品种名称 Cultivar	产地或来源 Origin
1	油漆麻 Youqima	湖南 Hunan	9	武昌山坡苧麻 1 号 Wuchangshapozhuma 1	湖北 Hubei
2	新民青麻 Xinminqingma	贵州 Guizhou	10	龙塘白麻 Longtangbaima	重庆 Chongqing
3	湘芒 1 号 Xiangzhu 1	杂交品种 Hybrid	11	江口青皮苧麻 Jiangkouqingpizhuma	贵州 Guizhou
4	宁都大白麻 Ningdudabaima	江西 Jiangxi	12	大叶红蚌蚶 Dayehongzhameng	江西 Jiangxi
5	湘芒 6 号 Xiangzhu 6	杂交品种 Hybrid	13	天台铁麻 Tiantaitiema	浙江 Zhejiang
6	阳新细叶绿 Yangxinxiyelü	湖北 Hubei	14	野菟子 Yedouzi	江西 Jiangxi
7	虎皮麻 Hupima	江西 Jiangxi	15	咸宁大叶绿 Xianningdayelü	湖北 Hubei
8	阳朔鸡骨白 Yangshuojigubai	广西 Guangxi	16	宜黄家麻 Yihuangjiama	江西 Jiangxi

1.2 基因组 DNA 提取

在国家种质长沙苧麻圃取 16 份苧麻种质植株的新发出的嫩芽, 采用改进的 CTAB 法<sup>[15]</sup>提取 DNA。用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测纯度与浓度。

1.3 PCR 体系

经正交试验优化的 RSAP-PCR 总反应体系为 25  $\mu$ L, 含 1 U *Taq* DNA 聚合酶, 0.3 mmol L<sup>-1</sup> dNTPs, 0.25  $\mu$ mmol L<sup>-1</sup> 引物, DNA 浓度 10 ng。参照杜晓华等<sup>[12]</sup>得出的 PCR 最优程序。

经正交试验优化的 SRAP-PCR 总反应体系为 25  $\mu$ L, 含 1 U *Taq* DNA 聚合酶, 0.36 mmol L<sup>-1</sup> dNTPs, 0.4  $\mu$ mmol L<sup>-1</sup> 引物, DNA 浓度 20 ng。PCR 程序为 94℃ 变性 3 min; 94℃ 45 s, 33℃ 45 s, 72℃

1 min, 5 个循环; 94℃ 45 s, 52℃ 45 s, 72℃ 1 min, 30 个循环; 72℃ 6 min, 16℃ 保存。

参照 Chen 等<sup>[6]</sup>的方法进行 SSR 引物的 PCR 扩增。

1.4 分子亲缘关系鉴定

利用上述引物, 对 16 份苧麻种质资源进行 PCR 扩增。扩增产物经 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳及张军<sup>[16]</sup>银染的方法。对扩增后清晰且易于辨认的条带, 在相同迁移位置上有带标记为“1”, 无带标记为“0”, 建立样品分子标记的 0、1 矩阵。利用 NTSYS-pc2.1 软件, 按 UPGMA 方法进行聚类分析。

1.5 田间性状亲缘关系鉴定

基于 9 个田间有序质量性状(叶面皱纹、叶色、生长整齐度、生长均匀度、绣脚、抗风性、耐旱性、

表 2 参试苎麻种质亲缘关系中表现多态性的 RSAP、SRAP、SSR 引物序列  
Table 2 Primer sequence of RSAP, SRAP, and SSR used among ramie accessions

RSAP 引物编号 RSAP-primer No.	RSAP 引物序列 SSR-primer sequences (5'-3')	SRAP 引物编号 SRAP-primer No.	SRAP 引物序列 SSR-primer sequences (5'-3')	SSR 引物编号 SSR-primer No.	SSR 引物序列 SSR-primer sequences (5'-3')	
					正向引物 Forward primer	反向引物 Reverse primer
A1(R1-R2)	R1:ATTACAACGAGTGGATCC	B1(M1-E2)	M1:TGAGTCCAAACCGGATA	C1	CGTGAAAATAGTGATATGTGTG	ACTGTAACAATCAAGAAGAAACC
A2(R1-R4)	R2:CACAGCACCCACTTTAAA	B2(M1-E3)	M2:TGAGTCCAAACCGGAGC	C2	GCCACAGCCGAGGAAGAG	TCTCATCACCACCACCTTAGG
A3(R1-R5)	R3:GACTGCGTACATGAATTC	B3(M1-E4)	M3:TGAGTCCAAACCGGAAT	C3	AGTGCGGAGATAACTGTTC	GGCTACTTTATTCTAAACCAAAC
A4(R1-R6)	R4:TATCTGGTGAGGGATATC	B4(M2-E2)	M4:TGAGTCCAAACCGGACC	C4	GAAACTATTTCACCAACAAAG	ACACACATTCCTACACACC
A5(R1-R7)	R5:TTGGGATATCGGAAGCTT	B5(M2-E5)	M5:TGAGTCCAAACCGGAAG	C5	AAGCCGAGCGTGAAGAAG	ACACACAGAAAGAACACAAGAC
A6(R2-R3)	R6:ATTCAGCACCCACGATC	B6(M2-E7)	E1:GACTGCGTACGAATTAAT	C6	GCGGAGGCTTAATTTGCTTTG	ACTCAATACATACACGGCACTAG
A7(R2-R4)	R7:ATAGTCCTGAGCGTTAA	B7(M3-E2)	E2:GACTGCGTACGAATTTGC	C7	ACCTCTACGGACCTCTTCTTC	CATAACATAACATGACACACAAGC
A8(R2-R5)	R8:ATAACTGTGTACCTGCAG	B8(M3-E3)	E3:GACTGCGTACGAATTGAC	C8	GAGCCAGAGCCAGGTTCC	ACAAAGTCTCGGTTCTTACAC
A9(R2-R6)	R9:GTACATGCATTACTGCGA	B9(M3-E5)	E4:GACTGCGTACGAATTTGA	C9	AGCCAGGTTCCAGAAGTCC	CATAATCACAAAGTCTCGGTTCC
A10(R2-R7)	R10:ATTGGACTGGTCTCTAGA	B10(M3-E6)	E5:GACTGCGTACGAATTAAC	C10	TCCCACCACGGACTACTG	AACCACCATCATCATCATCATC
A11(R2-R8)		B11(M4-E2)	E6:GACTGCGTACGAATTGCA	C11	AATAGAATGTGGAGGCGATAGAG	AAACCATAAACTCACTACCGAACC
A12(R2-R10)		B12(M4-E3)	E7:GACTGCGTACGAATTCAA	C12	CGTTCAGTCACCAGCAAGG	GAGGGAAGCAGGGAGAGC
A13(R3-R5)		B13(M4-E4)		C13	TAATCCCTCAATGGCTCTTTTC	GAGAAGGATACGAATTGACAGG
A14(R3-R6)		B14(M4-E5)		C14	TGTATAGAACTGAGTAAATGATTG	CAACTTTCTTAAACCACTTTTCG
A15(R3-R7)		B15(M4-E6)		C15	CGAGCCTTCTTCTTCTTCTGG	GCAAGCAATACGGACAGTAGG
A16(R4-R5)		B16(M5-E2)		C16	AACAATCCAGGAGTGGCAATC	ACAAGCGAAGATCGTCTCATC
				C17	AAGACGAAGTGCACGAC	CTCCTCTTCTCCACCTCCTC
				C18	GGCTCAAGTTTGCTCATAGATTC	CGGCTTCGCTTTAGGATTG
				C19	CGGTCTGTGGATACGAATGG	GACGACGACGACGATGATG
				C20	CGGATATGGTGGAGTTATGC	CAGAACGACGACGACGAC
				C21	TTCTTCCTTCCTTCCTCCTTC	TTGTGGCTGGTGATACTGAG
				C22	CTTGAGATACAGCCTTCCATTAG	CACACCTCGCTTCCTTTG
				C23	ACGAACCACAACACAGAGAG	ACGAGGGAACACCAGAGAG
				C24	GACTAGACATTTCAAATAGCCTTC	AAGAATACACCTGATGGAGATAC

抗花叶病、分株力)<sup>[17]</sup>, 利用 SAS V8.0, 按 Average Linker 方法进行聚类分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 苧麻种质间分子标记多态性

**2.1.1 RSAP 标记分析** 从 20 对 RSAP 引物中筛选出扩增结果稳定、条带清晰和有多态性的引物 16 对, 引物有效率为 80.0%。多态性位点的分子量主要分布在 100~500 bp 之间, 在供试样品中共检测到多态性位点 205 个, 其中最多的引物是 A5、A15, 有 21 个多态性位点; 最少的为 A8, 有 4 个多态性位点; 平均多态性位点数为 12.8 个。

**2.1.2 SRAP 标记分析** 从 20 对 SRAP 引物中筛选出 16 对扩增效果较好的引物组合, 引物有效率为 80.0%。以此 16 对引物组合对 16 份苧麻种质进行扩增, 多态性条带的分子量主要分布在 100~600 bp 之间。在供试样品中共检测到多态性位点 254 个, 其中最多的引物是 B6, 有 35 个多态性位点; 最少的为 B11, 有 2 个多态性位点; 平均多态性位点数为 15.8 个。

**2.1.3 SSR 标记分析** 从 37 对 SSR 引物中筛选出 24 对扩增效果较好的引物组合, 引物有效率为

64.9%。以此 24 对引物组合对 16 份苧麻种质进行扩增, 多态性条带的分子量主要分布在 100~200 bp 之间。在供试样品中共检测到多态性位点 48 个, 其中最多的引物有 3 个多态性位点, 最少的有 1 个多态性位点, 平均多态性位点数为 2.0 个。

**2.1.4 3 种分子标记系统的比较** 3 种 DNA 标记中引物的多态性效率有差异, RSAP (80.0%) 与 SRAP (80.0%) 相同, 高于 SSR (64.9%)。从引物组合检测的总位点数看, RSAP、SRAP 覆盖的位点远高于 SSR, 分别是其 4.3 倍和 5.3 倍, RSAP 是 SSR 的 0.81 倍; 平均每对引物产生的多态性位点 RSAP (12.8 个 对<sup>-1</sup>)、SRAP (15.9 个 对<sup>-1</sup>) 也高于 SSR (2.0 个 对<sup>-1</sup>), 分别是其 6.4 倍和 7.9 倍, RSAP 是 SRAP 的 0.8 倍。

### 2.2 苧麻种质遗传距离和聚类分析

**2.2.1 基于 RSAP 标记的遗传差异检测** 供试种质材料之间的遗传距离为 0.189~0.778, 平均 0.426。4 与 10 之间的遗传距离最大, 为 0.778, 表明它们之间在检测位点的 DNA 序列存在较大差异。7 和 8 之间遗传距离最小, 为 0.189, 表明它们在相应基因位点的序列差异小。

根据种质间的相似系数, 采用 NTSYS-pc2.1 软

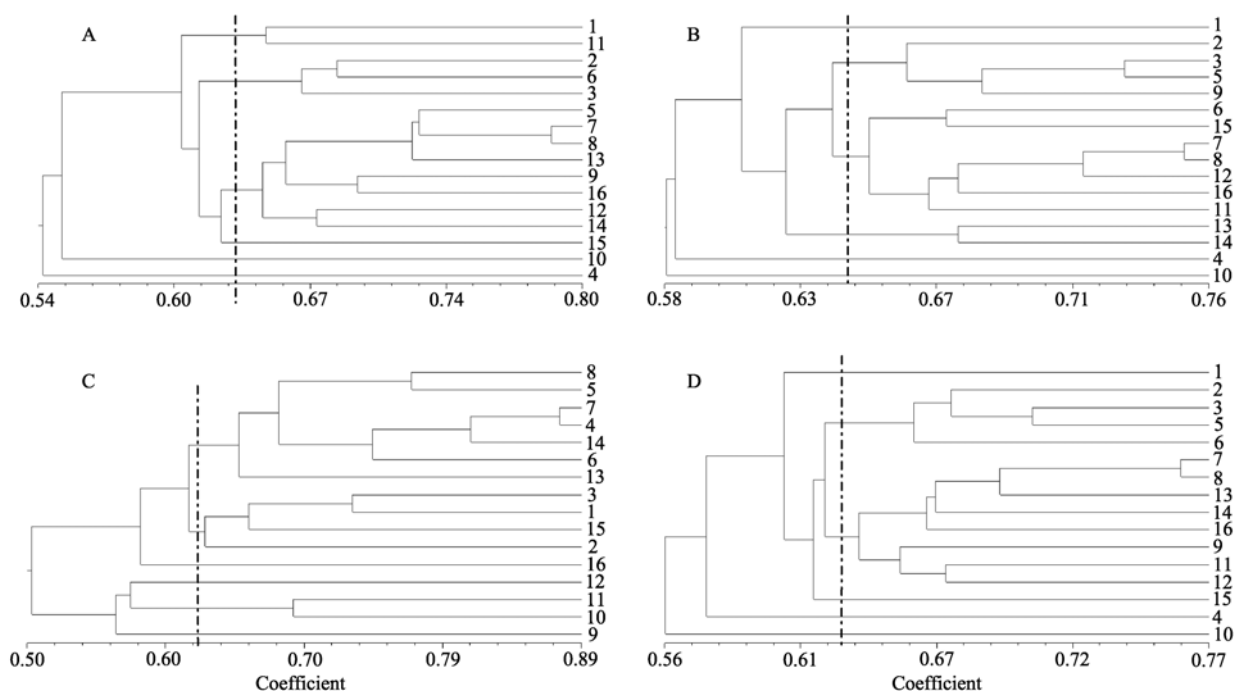


图 1 基于 RSAP(A)、SRAP(B)、SSR(C)和 RSAP+SRAP+SSR(D)的 16 个苧麻种属的聚类图  
Fig. 1 Dendrograms of 16 ramie varieties based on RSAP (A), SRAP(B), SSR(C), and RSAP+SRAP+SSR(D)  
材料编号见表 1。Codes of germplasm are listed in Table 1.

件, 按 UPGMA (unweighted pair group method using arithmetic averages) 方法聚类分析(图 1-A)。从 RSAP 标记聚类图来看, 在相似系数 0.65 时, 可将供试属种分为 6 类, 即 1、11 为一类; 2、3、6 为一类; 5、7、8、9、12、13、14、16 为一类; 15、10、4 分别单独一类。

2.2.2 基于 SRAP 标记的遗传差异检测 16 个苕麻种质平均遗传距离为 0.405。1 与 10 之间的遗传距离最大, 为 0.610。7 和 8 遗传距离最小, 为 0.230。从 SRAP 标记聚类图(图 1-B)来看, 在相似系数为 0.65 时, 可将供试属种分为 6 类, 即 2、3、5、9 为一类; 6、7、8、11、12、15、16 为一类; 13、14 为一类; 1、4、10 分别单独一类。

2.2.3 基于 SSR 标记的遗传差异检测 基于 SSR 标记, 16 个苕麻种质平均遗传距离为 0.479。16 与 12 之间的遗传距离最大, 为 0.836。4 和 7 遗传距离最小, 为 0.113。

从 SSR 标记聚类图(图 1-C)来看, 在相似系数约为 0.62 时, 可将供试属种分为 6 类, 即 4、5、6、7、8、13、14 为一类; 1、2、3、15 为一类; 10、11 为一类; 9、12、16 分别单独一类。

2.2.4 基于结合 RSAP 标记、SRAP 标记和 SSR 标记的遗传差异检测 将 RSAP 标记、SRAP 标记和 SSR 标记数据结合起来分析, 16 个苕麻种质平均遗传距离为 0.423。4 与 10 之间的遗传距离最大, 为 0.650。遗传距离最小的是 7 和 8, 为 0.236。从 3 类标记联合的聚类图(图 1-D)来看, 在相似系数约为 0.63 时, 可将供试属种分为 6 类。即 2、3、5、6 为一类; 7、8、9、11、12、13、14、16 为一类; 1、4、10、15 分别各为一类。

2.2.5 基于 RSAP 标记、SRAP 标记和 SSR 标记的遗传差异比较 基于 RSAP 标记的遗传距离与基于 SRAP 的遗传距离之间相关程度极显著, 相关系数为 0.674, 而与 SSR 标记的遗传距离呈现负相关, 相关系数为-0.022 (表 3)。

基于 SRAP 标记的遗传距离和基于 SSR 标记的遗传距离之间的相关程度较低, 为 0.029; 基于 RSAP、SRAP 和 SSR 标记联合数据的遗传距离与分别基于 RSAP 标记、SRAP 标记的遗传距离的相关系数较高, 均达到极显著水平, 分别为 0.877、0.895, 而与 SSR 标记的遗传距离的相关系数较低, 仅为 0.232 (表 3)。

从总的聚类结果来看, 基于 RSAP 标记和基于 RSAP+SRAP+SSR 联合标记的分类结果基本一致,

并且和基于 SRAP 标记的结果也基本相似, 与基于 SSR 标记的结果差异较大; 就最大遗传距离和最小遗传距离之间的苕麻种属而言, 基于 RSAP 标记、RSAP+SRAP+SSR 联合标记得出的结果一致, 都是 4 与 10 之间的遗传距离最大, 7 和 8 遗传距离最小, 与基于 SRAP 结果稍有不同, 与基于 SSR 结果差异较大。

表 3 基于不同分子标记遗传距离的相关系数  
Table 3 Correlation coefficient of genetic distance base on different molecular markers

标记 Marker	相关系数 Correlation coefficient
RSAP and SRAP	0.674**
RSAP and SSR	-0.022
SRAP and SSR	0.029
(RSAP+SRAP+SSR) and RSAP	0.877**
(RSAP+SRAP+SSR) and SRAP	0.895**
(RSAP+SRAP+SSR) and SSR	0.232

\*\* Significant at the 0.01 probability level.

2.2.6 基于田间性状的聚类分析 基于 16 个苕麻种质的 9 个田间性状, 采用 SAS V8.0 进行聚类分析(图 2)。在平均距离为 0.93 时, 可将供试属种分为 5 类, 即 2、3、5 和 6 聚为一类, 与基于 RSAP+SRAP+SSR 联合标记的聚类结果完全一致; 与基于 RSAP 标记和基于 SRAP 标记的结果类似, 而与 SSR 标记的结果不同; 7、8 和 12 聚为一类, 除了与基于 SSR 标记的结果相似之外, 与基于其他标记的结果均一致; 9、11 和 14 为一类, 与基于 RSAP+SRAP+SSR 联合标记的聚类结果完全一致, 与基于 RSAP 标记的结果相似, 与基于 SRAP 和 SSR 标记不同。15 和 16 聚为一类, 与基于 SRAP 标记的结果一致, 与基于 RSAP 标记和 RSAP+SRAP+SSR 联合标记的相似, 而与基于 SSR 的不同。1、4 和 10 为一类, 与上述 4 种基于分子标记的分类结果都不同。

### 3 讨论

#### 3.1 3 种分子标记遗传检测效率的评价

本研究选用 3 种分子标记方法对 16 份苕麻种质遗传差异检测的效率, 以 SRAP 最高, RSAP 次之, SSR 最低。从引物组合检测的总位点数看, RSAP、SRAP 覆盖的位点远高于 SSR; 平均每对引物产生的多态性 RSAP、SRAP 也远高于 SSR。以上研究结果与在辣椒<sup>[12]</sup>上的研究结果相似。Liu 等<sup>[18]</sup>和温岚等<sup>[8]</sup>分别用 SRAP 标记对苕麻 DNA 进行扩增, 每对引物

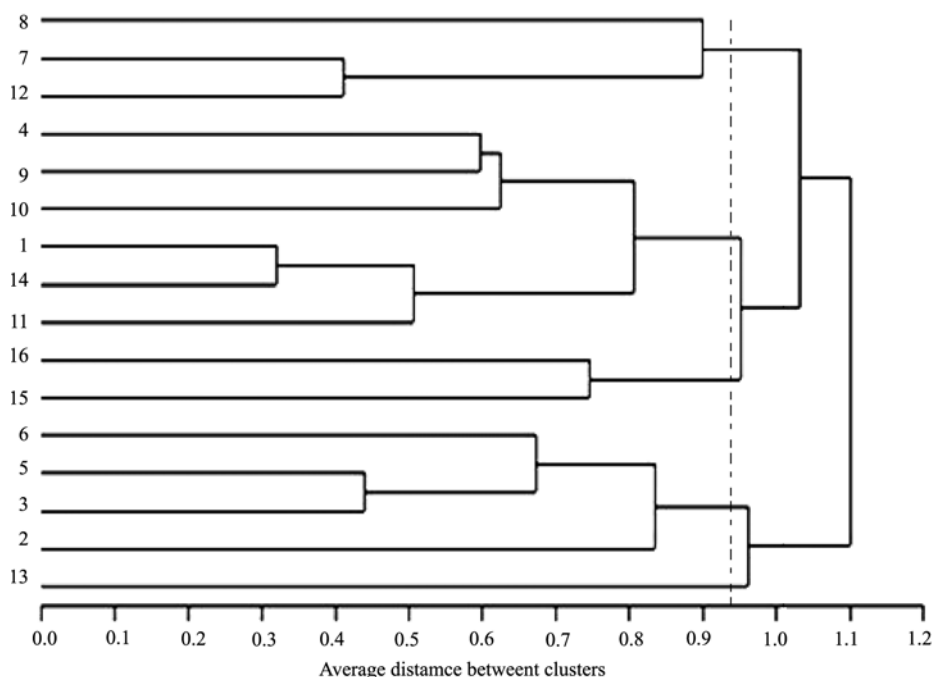


图 2 基于田间性状的 16 个苧麻种属的聚类图

Fig. 2 Dendrogram of 16 ramie varieties based on field traits

材料编号见表 1。Codes of germplasm are listed in Table 1.

产生的多态性条带分别为 10.1 条和 6.8 条, 低于我们的试验结果, 推测主要原因是本试验中用的是聚丙烯酰胺凝胶, 而他们用的是琼脂糖凝胶。SSR 标记的引物开发需要 DNA 测序, 成本较高, 到目前为止公开可用于苧麻的 SSR 标记仅有 90 对, 而 RSAP 标记和 SRAP 标记的引物开发成本较低, 本研究中合成的 10 条 RSAP 引物, 理论上可以得到 45 对引物组合, 成本优势明显。另外, 在本研究中, 利用了相同数目(16 对)的 RSAP 引物和 SRAP 引物, 使研究结果具有可比性。考虑到 SSR 引物扩增的位点较少, 我们利用了较多的 SSR 引物(24 对)。

### 3.2 基于不同分子标记的苧麻种质间遗传距离的相关性

不同分子标记技术的比较已在多种作物中进行过, 如 Du 等<sup>[19]</sup>比较了 IRAP、REMAP、SSAP 和 AFLP 分子标记技术在柿子遗传分析中的利用。基于不同分子标记的相同材料的遗传距离的相关性大小取决于这些分子标记所揭示的基因组多态性的特征<sup>[20]</sup>。Rus-Kortekas 等<sup>[21]</sup>认为, 当 2 种分子标记所揭示出的共享位点较多时, 基于这 2 种分子标记的材料间遗传距离的相关性较高; 反之则较低。本研究中采用的 SRAP 标记是针对基因组的 ORF 进行扩增, 而 SSR 则主要是检测基因组高度重复区的多态性, 二

者关联性很低; 而酶切位点广泛分布于植物基因组中, 所以 RSAP 检测的结果应该与 SRAP、SSR 检测的结果有一定程度的相关。在辣椒中的研究结果表明, SRAP 与 SSR 的遗传距离相关性较低, 而 RSAP 与 SRAP 和 SSR 的遗传距离均有较高的相关性<sup>[20]</sup>。与辣椒的研究结果相似, 本实验结果显示基于 SRAP 和 SSR 遗传距离的相关系数为 0.029, 证实了 SRAP 和 SSR 的遗传距离相关性较低的结论。但是, 与在辣椒上的研究结果不同的是, 本试验的结果显示虽然 RSAP 与 SRAP 相关性较高( $r = 0.674^{**}$ ), 但与 SSR 基本不相关( $r = -0.022$ )。这点与理论有较大出入。可能的原因是苧麻基因组比较特殊, 多态性酶切位点主要分布在编码区, 或者本试验 SSR 标记数量偏少(24 对引物, 48 个多态性位点), 揭示的多态性不够丰富。就不同标记的相关系数而言, 基于 SRAP 标记得出的结果比基于 RSAP 标记的结果更接近基于联合标记的结果, 两者都远优于 SSR 标记; 就分类结果而言, 基于 RSAP 标记和基于联合标记的分类结果基本一致, 基于 SRAP 标记的结果与基于联合标记的分类结果也基本相似, 与基于 SSR 标记的结果差异较大。表明 SRAP 标记和 RSAP 标记对于检测苧麻种质的遗传亲缘关系都具有较高的可信度。

### 3.3 基于不同分子标记和田间性状的聚类结果分析

查阅关于苧麻遗传多样性和亲缘关系的文献可见, 前人所用品种均与本研究不同。本研究表明, SRAP 标记的聚类结果与田间性状的聚类结果最接近, 其次是 RSAP 标记, 最后是 SSR 标记。这主要可能是与该研究中利用分子标记的目标扩增区域分别是编码区、全基因组和非编码区有关。3 种分子标记联合和田间性状的聚类结果显示, 2、3、5 和 6 聚为一类, 7、8 和 12 聚为另一类, 与这些品种的地理来源没有联系, Liu 等<sup>[18]</sup>利用 SRAP 标记的研究结果表明, 巴西的品种与中国的品种聚为一类, 也表明地理来源可能与苧麻的亲缘关系并不一致。陈建华等<sup>[22]</sup>的苧麻核心种质的构建研究结果也证实, 对于局部区域的种质资源, 材料间地理起源的差异并不能反映遗传上的差异, 但周建林等<sup>[23]</sup>利用 3 种微卫星标记分析苧麻品种亲缘关系, 结果与其地理分布基本吻合, 可能与所选材料与分子标记不同有关。1、4 和 10 种质在基于分子标记的聚类结果中均分别单独聚为一类, 而在基于田间性状的聚类结果中却将这 3 份种质聚为一类, 说明基于分子标记的聚类结果与基于田间性状的聚类结果有较大差别, 反映出高等植物遗传信息在表达过程中出现了很大的加工和修饰。不同分子标记之间并不相互排斥, 也无法相互取代, 不同标记间的相互补充和利用, 能更好地揭示种质之间的遗传多样性<sup>[24]</sup>。本文的研究结果也显示, 将 RSAP、SRAP 和 SSR 标记结合起来, 得出的聚类结果与基于田间性状的的结果最为接近, 反映出将多种不同分子标记数据结合起来, 相互补充, 更接近生物表征, 能更好地揭示种质之间的亲缘关系。

## 4 结论

在检测苧麻种质亲缘关系时, SRAP 标记最优, RSAP 标记稍逊, SSR 标记最差。RSAP 分子标记技术能较好地显示苧麻种属间的多态性和亲缘关系, 且开发成本低, 多态性较高, 为苧麻的研究提供了一种简单、可靠、快速、准确的分子标记技术。以 RSAP、SRAP、SSR 标记联合分析, 能更好地揭示种质之间的亲缘关系。

## References

- [1] Lu H-R(卢浩然). Cultivation of Fiber Crops in China (中国麻类作物栽培学). Beijing: China Agriculture Press, 1992

- [2] Jie Y-C(揭雨成), Zhou Q-W(周青文), Chen P-D(陈佩度). Genetic relation analysis of ramie cultivars with RAPD mark. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2002, 28(2): 254–259 (in Chinese with English abstract)
- [3] Qiu C-S(邱财生), Cheng C-H(程超华), Zhao L-L(赵立宁), Li Y-J(李育君), Zang G-G(臧巩固). Genetic relationship among *Boehmeria nivea* spp. revealed by RAPD. *Hubei Agric Sci* (湖北农业科学), 2011, 50(7): 1499–1501 (in Chinese with English abstract)
- [4] Jiang Y-B(蒋彦波), Jie Y-C(揭雨成), Zhou J-L(周建林), Xing H-C(邢虎成), She W(余玮). Isolation and characterization of microsatellites from ramie [*Boehmeria nivea* L. Gaud.]. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2007, 33(1): 158–162 (in Chinese with English abstract)
- [5] Xing X-L(邢秀龙). Development of Microsatellite Markers from Ramie and Its Application for Preliminary Study of Heterosis Forecast. MS Dissertation of Huazhong Agricultural University, 2008 (in Chinese with English abstract)
- [6] Chen J H, Luan M B, Song S F, Zou Z Z, Wang X F, Xu Y, Sun Z M. Isolation and characterization of EST-SSRs in the Ramie. *Afr J Microbiol Res*, 2011, 5: 3504–3508
- [7] Zhao Z-W(赵中伟), Xu L-L(徐玲玲), Li T-J(李同建), Liao L(廖亮), Pan Q-H(潘其辉), Lai Z-J(赖占均), Shi Q-H(石庆华). Sampling strategy of *Boehmeria nivea* population by SSR molecular markers. *J Anhui Agric Sci* (安徽农业科学), 2009, 37(19): 8901–8903 (in Chinese with English abstract)
- [8] Ding M-Z(丁明忠), Pan G-T(潘光堂), Zhang Z-H(张中华), Yang Y(杨燕), Li L-A(李立安). Genetic relation analysis of *Boehmeria nivea* cultivars or lines from Sichuan with ISSR and construction of the molecular markers linked to male sterile Geng. *J Nucl Agric Sci* (核农学报), 2008, 22(2): 183–187 (in Chinese with English abstract)
- [9] Wen L(温岚), Yu C-M(喻春明), Wang Y-Z(王延周), Chen P(陈平), Chen J-K(陈继康), Tan L-T(谭龙涛), Xiong H-P(熊和平). Application of molecular marker SRAP on analysis of genetic diversity of polyembryonic ramie seedlings. *J Hunan Agric Univ* (Nat Sci) (湖南农业大学学报·自然科学版), 2011, 37(3): 243–247 (in Chinese with English abstract)
- [10] 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. *Theor Appl Genet*, 2001, 103: 455–461
- [11] Fang X-J(方宣钧), Wu W-R(吴为人), Tang J-L(唐纪良). DNA Marker Assisted Selection in Crop Breeding (作物 DNA 标记辅助育种). Beijing: Science Press, 2001. pp 1–9 (in Chinese)

- [12] Du X-H(杜晓华), Wang D-Y(王得元), Gong Z-H(巩振辉). Development and refinement of a new marker technique restriction site amplified polymorphism (RSAP). *J Northwest A&F Univ* (Nat Sci Edn)(西北农林科技大学学报·自然科学版), 2006, 34(9): 45–49 (in Chinese with English abstract)
- [13] Du X-H(杜晓华), Wang D-Y(王得元), Gong Z-H(巩振辉). Estimation and comparison of genetic distances among elite inbred lines in hot pepper (*Capsicum annuum* L.) by RSAP and SSR. *J Northwest A&F Univ* (Nat Sci Edn)(西北农林科技大学学报·自然科学版), 2007, 35(7): 97–102 (in Chinese with English abstract)
- [14] Qiao L-X(乔利仙), Weng M-L(翁曼丽), Kong F-N(孔凡娜), Dai J-X(戴继勋), Wang B(王斌). The application of RSAP marker technique in diversity detection and germplasm identification of porphyra. *Period Ocean Univ China* (Nat Sci)(中国海洋大学学报·自然科学版), 2007, 37(6): 951–956 (in Chinese with English abstract)
- [15] Song G-L(宋国立), Cui R-X(崔荣霞), Wang K-B(王坤波), Guo L-P(郭立平), Li S-H(黎绍惠), Wang C-Y(王春英), Zhang X-D(张香娣). A rapid improved CTAB method for extraction of cotton genomic DNA. *Acta Gossypii Sin* (棉花学报), 1998, 10(5): 273–275 (in Chinese with English abstract)
- [16] Zhang J(张军), Wu Y-T(武耀廷), Guo W-Z(郭旺珍), Zhang T-Z(张天真). Fast screening of microsatellite markers in cotton with page/silver staining. *Acta Gossypii Sin* (棉花学报), 2000, 12(5): 267–269 (in Chinese with English abstract)
- [17] Luan M-B(栾明宝), Chen J-H(陈建华), Xu Y(许英), Wang X-F(王晓飞), Sun Z-M(孙志民). Method of establishing ramie core collection. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2010, 36(12): 2099–2106 (in Chinese with English abstract)
- [18] Liu L J, Peng D X, Wang B. Genetic relation analysis on ramie [*Boehmeria nivea* (L.) Gaud.] inbred lines by SRAP markers. *Agric Sci China*, 2008, 7(8): 944–949
- [19] Du X Y, Zhang Q L, Luo Z R. Comparison of four molecular markers for genetic analysis in *Diospyros* L. (Ebenaceae). *Plant Syst Evol*, 2009, 281: 171–181
- [20] Du X-H(杜晓华). Development of RSAP-a Novel DNA Marker Technique and Its Application in Pepper Genetics and Breeding. PhD Dissertation of Northwest A&F University, 2006 (in Chinese with English abstract)
- [21] Rus-Kortekaas W, Smulders M J M, Arens P, Vosman B. Direct comparison of levels of genetic variation in tomato detected by GACA-containing microsatellite probe and by random amplified polymorphic DNA. *Genome*, 1994, 37: 375–381
- [22] Chen J-H(陈建华), Luan M-B(栾明宝), Xu Y(许英), Wang X-F(王晓飞), Sun Z-M(孙志民), Zou Z-Z(邹自征), Xiong H-P(熊和平). Construction of core germplasm in ramie. *Plant Fiber Sci China* (中国麻业科学), 2011, 33(2): 59–64 (in Chinese with English abstract)
- [23] Zhou J-L(周建林), Jie Y-C(揭雨成), Jiang Y-B(蒋彦波), Hu X(胡翔), Zhang J(张健). Genetic relation analysis on ramie cultivars with microsatellite markers. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2004, 30(3): 289–292 (in Chinese with English abstract)
- [24] Ye Y-M(叶要妹). Assessment of the germplasm genetic diversity of *Zinnia elegans* inbred lines detected by RAPDs and ISSRs. *J Central South Univ For Technol* (中南林业科技大学学报), 2008, 28(4): 36–41 (in Chinese with English abstract)