

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2013.01425

芝麻耐旱性的鉴定方法及关联分析

黎冬华¹ 刘文萍² 张艳欣¹ 王林海¹ 危文亮¹ 高媛¹ 丁霞¹
王蕾¹ 张秀荣^{1,*}

¹ 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; ² 山西省农业科学院经济作物研究所, 山西汾阳 032230

摘要: 为了解芝麻的耐旱性及获得与芝麻耐旱性相关的分子标记, 在发芽期, 采用不同浓度 PEG 6000 处理不同来源不同种皮颜色的 10 份芝麻品种, 测定其形态特征和生理特征及各指标的差异显著性。结果表明, 模拟芝麻干旱处理的最佳 PEG6000 浓度为 15%; 综合各项指标的主成分分析、最优回归方程分析及相关性分析表明, 相对成苗率可以作为芝麻发芽期耐旱性鉴定的关键指标; 利用上述方法对 216 份核心种质资源群体进行耐旱性鉴定, 相对成苗率耐旱系数值位于 12.15%~93.52%, 平均为 60.74%, 变异系数为 25.22, 变异丰富且呈正态分布; 资源群体的耐旱性指标值与 608 个多态性标记位点的关联分析, 获得与芝麻发芽期耐旱性有显著关联的标记 30 个($P<0.05$), 解释率在 1.99%~4.96%之间, 平均 2.84%。试验表明, 相对成苗率是最适且最方便的耐旱性鉴定指标, 适用于芝麻资源的耐旱性鉴定。

关键词: 芝麻; 发芽期; PEG 6000; 耐旱鉴定; 关联分析

Identification Method of Drought Tolerance and Association Mapping for Sesame (*Sesamum indicum* L.)

LI Dong-Hua¹, LIU Wen-Ping², ZHANG Yan-Xin¹, WANG Lin-Hai¹, WEI Wen-Liang¹, GAO Yuan¹, DING Xia¹, WANG Lei¹, and ZHANG Xiu-Rong^{1,*}

¹ Oil Crops Research Institute of Chinese Academy of Agricultural Sciences / Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Oil Crops, Ministry of Agriculture, Wuhan 430062, China; ² Industrial Crop Institute, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Fenyang 032230, China

Abstract: This research aims at understanding the drought tolerance of sesame germplasm and getting related molecular markers. Ten sesame varieties with different seed coat colors from separate origins were treated with PEG6000 with different concentrations, and the relative shoot length, relative fresh weight, relative seedling rate and the relative vigor index of the ten sesame varieties were investigated and analyses. The result showed 15% PEG6000 was proper for testing sesame drought tolerance. A comprehensive analysis based on principal component, regression equation and correlation showed that the relative seedling rate could be used as a key indicator to identify drought tolerance of sesame at germination stage. Using the method above, drought tolerance of 216 core collections during germination period was studied, the drought tolerance coefficients of sprout percentage were from 12.15% to 93.52%, the average was 60.74%, the coefficient of variation was 25.22, sprout abundant variation and accordant with normal distribution; together with marker screening, 30 loci were significantly ($P<0.05$) associated with sesame drought tolerance at germination stage, explaining the phenotypic variation from 1.99% to 4.96%, with an average of 2.84%. So the relative seedling rate is the most suitable and most convenient drought tolerance index, which is suitable for drought tolerance identification of sesame resources.

Keywords: Sesame; Germination; PEG 6000; Drought tolerance identification; Association mapping

芝麻(*Sesamum indicum* L.)是我国重要的特色油料作物, 栽培历史悠久, 在全国范围内都有种植^[1]。我国芝麻受旱问题比较复杂, 江淮流域主产区在播种出苗期、苗期和盛花期存在季节性干旱, 西北、

本研究由国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目(2011CB109304-2)和国家现代农业产业技术体系建设专项(CARS-15)资助。

* 通讯作者(Corresponding author): 张秀荣, E-mail: zhangxr@oilcrops.cn, Tel: 027-86811836

第一作者联系方式: E-mail: ldh360681@163.com, Tel: 027-86832099

Received(收稿日期): 2012-12-31; Accepted(接受日期): 2013-04-22; Published online(网络出版日期): 2013-05-20.

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20130520.1157.003.html>

华北、华南等地区多数年份发生地域性干旱,播种出苗期尤为严重,影响苗齐、苗壮和开花结蒴,均造成产量降低^[2]。

国内外对玉米、水稻、大豆、小麦、花生、油菜等^[3-8]作物的耐旱性都进行了系统深入的研究。利用 PEG6000 模拟干旱条件鉴定耐旱资源的方法,在其他作物中已经得到深入的研究和应用。由于不同作物对水分的敏感程度不同,用于鉴定的最佳 PEG6000 浓度、处理方法也不同^[9-13],浓度一般在 10%~20%,处理方法有种子萌动浸泡若干小时^[14]、芽期和苗期胁迫若干天等^[15-16]。胁迫处理后测定的指标分为形态指标和生理指标^[17-19],前者有芽长、根长、鲜重、成苗率、发芽率、株高等,后者主要包括质膜透性、各种保护性酶活(POD/SOD/CAT 等)、脯氨酸含量、MDA 含量、可溶性糖含量、根系活力、叶绿素含量、光合效率等。PEG6000 模拟的耐旱鉴定并无某个或某些公认的指标,前人研究一般都经综合分析获得综合指标^[20]。植物耐旱性属于数量性状,受多基因控制,借助分子标记技术,采用适当的统计学方法可以确定控制耐旱性状的相关基因在染色体上的位置及其效应^[21];通过连锁分子标记,可实现耐旱性的分子标记辅助选择^[22]。我国芝麻耐旱性研究报道较少^[23-24],且耐旱资源的鉴定工作还处于空白。

本研究拟采用不同浓度 PEG6000 胁迫发芽芝麻种子,通过表型和生理生化指标分析,旨在建立一种鉴定芝麻耐旱性的方法,并对芝麻核心种质群体进行耐旱性鉴定,以期发掘耐旱种质,获得关联的分子标记,为芝麻耐旱性研究和改良提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

10 份来源不同、种皮颜色不同的材料[河南郑州芝麻(ZZM0627)、河南上蔡芝麻(ZZM0624)、安徽阜南芝麻(ZZM1086)、木镇白(ZZM3495)、霸王鞭(ZZM1968)、长果黄(ZZM2458)、湖北崇阳芝麻(ZZM2631)、湖北江陵芝麻(ZZM1232)、湖南临湘芝麻(ZZM3938)和千层塔(ZZM2820)]和 216 份核心种质资源(河南 21 份、安徽 44 份、江苏 2 份、陕西 50 份、四川 21 份、湖北 56 份、湖南 3 份、江西 19 份)均由国家芝麻种质资源中期库(中国农业科学院油料作物研究所,湖北武汉)提供,在武汉能正常生长发育。PEG6000 (化学纯,平均分子量 6000)由上海市国药集团化学试剂有限公司生产。

1.2 试验方法

用蒸馏水配制浓度为 5%、10%、15%、20%、25% 和 30% 的 PEG6000 溶液,根据 Michel 和 Kaufmann^[25]于 1973 年报道公式, $\Psi_s = -(1.18 \times 10^{-2})C - (1.18 \times 10^{-4})C^2 + (2.67 \times 10^{-4})CT + (8.39 \times 10^{-7})C^2T$ 。其中 Ψ_s 为渗透能力,单位为 bars; C 为 PEG-6000 溶液浓度,单位为 $\text{g kg}^{-1} \text{H}_2\text{O}$; T 为 PEG-6000 溶液所处的环境温度,单位为 $^{\circ}\text{C}$,本实验所选的 6 种 PEG 浓度在 28°C 条件下所具有的渗透能力分别为 -0.45、-1.38、-2.78、-4.65、-6.99 和 -9.80 bars。

参考国家标准 GB/T3543.4-1995,用直径为 9 cm 的培养皿铺上 2 层滤纸,每皿摆 50 粒芝麻种子,分别加 6 种浓度 PEG-6000 溶液 10 mL,对照加蒸馏水 10 mL,于 28°C 黑暗培养箱中发芽,5 d 后调查发芽率(期间添加相应浓度 PEG-6000,保证渗透势不变),每皿随机选取 10 株生长正常幼苗测定其芽长、根长、鲜重等指标,并统计正常苗数,取 0.5 g 幼苗用于酶活测定、0.1 g 幼苗用于丙二醛和可溶性糖测定、0.1 g 幼苗用于脯氨酸测定及 0.5 g 幼苗用于相对电导率测定。试验设置重复 3 次。

相对根长(%)=(处理苗平均根长/对照平均根长) $\times 100$

相对芽长(%)=(处理苗平均芽长/对照平均芽长) $\times 100$

相对鲜重(%)=(处理苗平均单苗鲜重/对照平均单苗鲜重) $\times 100$

相对成苗率(%)=(处理平均成苗率/对照平均成苗率) $\times 100$

简易活力指数=处理平均成苗率 \times 处理平均芽长

相对活力指数(%)=(处理平均成苗率 \times 处理平均芽长)/(对照平均成苗率 \times 对照平均芽长) $\times 100$

单位电导率($\text{mS cm}^{-1} \text{g}^{-1}$)=电导率/苗鲜重

用 NBT 光化还原法^[26]测超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性、用分光光度法^[26]测过氧化氢酶(catalase, CAT)活性、用愈创木酚法^[26]测过氧化物酶(peroxidase, POD)活性、用酸性茚三酮比色法^[27]测游离脯氨酸(proline, Pro)含量、用硫代巴比妥酸法^[28]测丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量。参照 Leul 和 Zhou^[29]的方法用 DDS-12A 型电导仪测定电导率。

1.3 耐旱胁迫能力的综合评价

单项指标耐旱系数 α (%) = 处理区测定值/对照区测定值 $\times 100\%$ (1)

用 SAS9.1 软件完成主成分分析、聚类分析、逐

步回归分析及相关性分析。

1.4 DNA 提取及分子标记分析

取幼嫩的芝麻叶片按照吕海霞等^[30]方法提取基因组 DNA，用 RNaseA 消化除去 RNA，0.6% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 完整性，采用紫外分光核酸测定仪测定 DNA 质量和浓度，并将样品 DNA 稀释至 20 ng μL⁻¹，-20℃ 保存备用。从芝麻遗传连锁图谱上每隔 10 cM 均匀选取 20 对 SSR 标记、43 对 SRAP 标记及 16 对 AFLP 组合，对供试群体 DNA 进行扩增，SSR 和 SRAP 标记采用的 PCR 反应体系及扩增程序参照文献^[31]，AFLP 标记采用的 PCR 反应体系及扩增程序参照文献^[32]，PCR 扩增产物经 6% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳分离^[33]和银染显影^[30]。

1.5 统计分析

1.5.1 遗传多样性、连锁不平衡、群体结构分析及方差分析 使用 POPGENE1.32 软件^[34]计算群体的遗传多样性指数(Shannon’s Information Index)。使用 Edward Buckler Lab 开发的软件包 TASSEL^[35]进行标记位点间连锁不平衡(LD)分析。应用 Structure 2.2 软件^[36]估测样本群体结构，对 216 份核心种质群体进行基于数学模型的类群划分，并计算各材料相应的 *Q* 值。具体分析过程是，先设定群体数目(*K*)为 2~10，并假定位点都是独立的，利用获得的所有多态性标记进行分析，将 MCMC (markov chain monte carlo)开始时的不作数迭代(length of burn-in period)设为 100 000 次，再将不作数迭代后的 MCMC 设为 100 000 次，每个假定 *K* 值计算 5 次，然后依据似然值最大原则选取一个合适的 *K* 值，并绘出基于模型的群体遗传结构图。分子标记间位点间连锁不平衡分析及资源群体结构分析参照张艳欣等^[37]。使用 DPS 7.05 软件^[38]进行群体耐旱系数方差分析。

1.5.2 性状-标记关联分析 分别使用 TASSEL^[35]软件的 GLM (general linear model)程序，以各材料

Q 值作为协变量，去除稀有等位变异后，将供试群体相对成苗率耐旱系数分别与标记变异进行回归分析。

2 结果与分析

2.1 不同浓度 PEG6000 胁迫对种子发芽的影响

28℃ 黑暗萌动 5 d 后，对照、5% PEG、10% PEG 和 15% PEG 胁迫下种子都能正常萌动，10% PEG 浓度开始对芽生长有明显抑制作用；20% 以上浓度对萌动具有很强的抑制作用，只能形成较短的根，不能形成正常芽，25% 和 30% 处理的则完全不萌动。因此，我们只要对 5%、10% 和 15% PEG 浓度处理的芝麻苗进行统计及分析，即可确定最佳 PEG 用于耐旱鉴定的浓度。

2.2 不同浓度 PEG 之间测定指标的差异显著性分析

由表 1 可以发现，15% 浓度下除根长外其他所有指标与对照间差异显著，与 5% 浓度下除 MDA 含量外的所有指标间差异显著，与 10% 浓度下的大部分指标差异显著；而 5% 和 10% 浓度下大部分指标虽与对照间有显著差异，但二者之间大部分指标差异不显著。因此以 15%PEG 作为芝麻芽期耐旱鉴定的最佳胁迫处理浓度。

2.3 15% PEG 胁迫下各测定指标间相关性分析

因根长与对照间无显著差异，我们仅求出 10 份材料 10 个与对照间有显著差异的单项指标耐旱系数(表 2)。由表 2 可见，各材料经处理后芽长、鲜重、成苗率、活力指数以及电导率比对照都明显下降($\alpha<100\%$)，而 SOD 活性、CAT 活性、脯氨酸含量及 MDA 含量比对照明显增加($\alpha>100\%$)，POD 活性比对照既有上升又有下降，各指标的变化幅度也不同，从相关系数矩阵(表 3)可看出，各单项指标间还存在一定的相关性，说明芝麻发芽期耐旱性是一个综合性状，用某个单项指标去评价芝麻芽期的耐旱性可能存在片面性。

表 1 不同 PEG 浓度下各项指标的差异分析
Table 1 Difference between indices at different PEG concentrations

指标 Index	芽长 SL (cm)	根长 RL (cm)	鲜重 FW (g)	成苗率 SP (%)	简易 活力指数 SVI	SOD (U g ⁻¹ min ⁻¹)	CAT (U g ⁻¹ min ⁻¹)	POD (U g ⁻¹ min ⁻¹)	脯氨酸 Pro (μg g ⁻¹ FW)	MDA (μmol g ⁻¹ FW)	电导率 EC (mS cm ⁻¹ g ⁻¹)
对照 CK	4.84 a	5.31 ab	0.43 a	80.07 a	387.18 a	785.54 c	55.78 c	274.70 a	719.88 c	3.93E-04 b	23.37 a
5% PEG	3.93 b	5.04 b	0.34 b	70.32 b	276.16 b	1049.18 b	69.09 b	243.59 ab	971.76 b	4.93E-04 a	18.12 b
10% PEG	3.82 b	5.62 a	0.35 b	70.07 b	266.13 b	1208.40 a	73.88 ab	217.63 b	1029.50 b	5.10E-04 a	15.43 bc
15% PEG	2.65 c	5.86 a	0.28 c	51.80 c	139.71 c	1217.51 a	76.76 a	218.56 b	1442.19 a	5.26E-04 a	13.74 c

显著性比对各指标不同浓度 PEG 间为准(纵向)。显著水准 $\alpha=0.05$ 。

Significance level $\alpha=0.05$. SL: sprout length; RL: root length; FW: fresh weight; SP: sprout percentage; SVI: simple vitality index; EC: electric conductivity.

表 2 各单项指标的耐旱系数
Table 2 Drought tolerance coefficients (%) of single index

材料 Variety	芽长 SL	鲜重 FW	成苗率 SP	活力指数 VI	SOD	CAT	POD	脯氨酸 Pro	MDA	电导率 EC
ZZM0627	58.26	68.32	70.49	40.52	197.02	164.41	66.13	140.56	109.39	21.91
ZZM0624	62.23	75.98	69.64	43.15	197.36	86.43	48.99	231.40	146.15	41.02
ZZM1086	45.74	64.98	46.15	21.17	155.77	166.84	116.58	194.23	177.57	57.16
ZZM3495	61.38	64.91	70.59	43.66	121.36	133.64	58.54	230.74	149.27	64.13
ZZM1968	56.15	63.37	84.87	47.62	156.83	122.06	62.32	231.66	104.95	69.74
ZZM2458	48.63	63.31	69.84	33.99	144.25	185.96	60.46	199.65	129.18	42.97
ZZM2631	54.82	73.54	52.25	28.95	124.57	164.54	143.23	142.77	148.44	92.94
ZZM1232	54.43	70.90	50.00	27.43	148.69	145.58	44.26	100.69	146.97	70.96
ZZM3938	49.62	56.05	49.19	24.52	126.20	111.45	214.81	308.45	133.32	91.75
ZZM2820	56.81	61.80	84.30	47.87	200.13	120.68	65.07	295.83	116.09	89.86

ZZM0627: 河南郑州芝麻; ZZM0624: 河南上蔡芝麻; ZZM1086: 安徽阜南芝麻; ZZM3495: 木镇白; ZZM1968: 霸王鞭; ZZM2458: 长果黄; ZZM2631: 湖北崇阳芝麻; ZZM1232: 湖北江陵芝麻; ZZM3938: 湖南临湘芝麻; ZZM2820: 千层塔。

ZZM0627: Henan Zhengzhou sesame; ZZM0624: Henan Shangcai sesame; ZZM1086: Anhui Funan sesame; ZZM3495: Muzhenbai; ZZM1968: Bawangbian; ZZM2458: Changguohuang; ZZM2631: Hubei Chongyang sesame; ZZM1232: Hubei Jiangling sesame; ZZM3938: Hunan Linxiang sesame; ZZM2820: Qiancengta. SL: sprout length; FW: fresh weight; SP: sprout percentage; VI: vitality index; EC: electric conductivity.

表 3 各测定指标的相关系数矩阵
Table 3 Correlation coefficient between single indexes

指标 Index	芽长 SL	鲜重 FW	成苗率 SP	活力指数 VI	SOD	CAT	POD	脯氨酸 Pro	MDA	电导率 EC	D 值 D value
芽长 SL	1.000										
鲜重 FW	0.479	1.000									
成苗率 SP	0.548	-0.111	1.000								
活力指数 VI	0.762	0.062	0.957	1.000							
SOD	0.360	0.248	0.505	0.509	1.000						
CAT	-0.534	0.001	-0.279	-0.417	-0.278	1.000					
POD	-0.516	-0.432	-0.587	-0.620	-0.489	-0.024	1.000				
脯氨酸 Pro	-0.002	-0.661	0.359	0.303	0.068	-0.596	0.335	1.000			
MDA	-0.312	0.288	-0.741	-0.657	-0.383	0.149	0.212	-0.220	1.000		
电导率 EC	-0.180	-0.322	-0.196	-0.196	-0.463	-0.241	0.535	0.358	0.087	1.000	
D 值 D-value	0.758	-0.212	0.806	0.903	0.467	-0.709	-0.127	0.636	-0.576	0.006	1.000

SL: sprout length; FW: fresh weight; SP: sprout percentage; VI: vitality index; EC: electric conductivity.

2.4 15% PEG 胁迫下 10 份材料测定指标的主成分分析

利用 SAS 9.1 软件对 10 个单项指标的耐旱系数进行主成分分析(表 4)。前 4 个综合指标的贡献率分别为 0.413、0.256、0.134 和 0.080, 其累积贡献率达到 88.3%。从而把原来 10 项指标转换为 4 个新的各自独立的综合指标, 代表了原来 10 项指标的 88.3% 的信息, 根据贡献率大小可知各综合指标的相对重要性。从各综合指标系数大小可以看出, 第 1 主成分主要包括相对成苗率、活力指数和 POD; 第 2 主成分主要包括相对鲜重和脯氨酸; 第 3 主成分主要包括相对芽长、相对鲜重和 CAT; 第 4 主成分主要

包括 SOD 和电导率。

2.5 耐旱性综合评价

2.5.1 隶属函数分析及权重的确定 每一个材料各综合指标的隶属函数值用公式(2)求得^[39]。

$$\mu(x_j) = \frac{X_j - X_{\min}}{X_{\max} - X_{\min}}, \quad j=1, 2, \dots, n \quad (2)$$

式中, X_j 表示第 j 个综合指标; X_{\min} 表示第 j 个综合指标的最小值; X_{\max} 表示第 j 个综合指标的最大值。

$$W_j = p_j / \sum_{j=1}^n p_j \quad j=1, 2, \dots, n \quad (3)$$

式中, W_j 表示第 j 个综合指标在所有综合指标中的重要程度; p_j 为各材料第 j 个综合指标的贡献率。

表 4 各综合指标的系数及贡献率
Table 4 Coefficients and contribution (C) of comprehensive indexes [CI(x)]

指标 Index	芽长 SL	鲜重 FW	成苗率 SP	活力指数 VI	SOD	CAT	POD	脯氨酸 Pro	MDA	电导率 EC	贡献率 C
CI(1)	0.382	0.098	0.444	0.471	0.341	-0.213	-0.348	0.088	-0.320	-0.182	0.413
CI(2)	-0.078	-0.492	0.149	0.102	-0.100	-0.309	0.326	0.563	-0.207	0.385	0.256
CI(3)	0.424	0.435	-0.219	-0.009	-0.063	-0.574	0.092	0.059	0.387	0.295	0.134
CI(4)	0.254	0.059	0.171	0.206	-0.643	0.269	-0.110	-0.303	-0.231	0.466	0.080

SL: sprout length; FW: fresh weight; SP: sprout percentage; VI: vitality index; EC: electric conductivity; C: contribution

表 5 各材料综合指标值、权重、 $\mu(x)$ 值和 D 值
Table 5 Value of each variety's comprehensive index [CI(x)], index weight (IW), $\mu(x)$, and D

材料 Variety	CI(1)	CI(2)	CI(3)	CI(4)	$\mu(1)$	$\mu(2)$	$\mu(3)$	$\mu(4)$	D 值
ZZM0627	0.839	-1.005	-1.121	-0.521	0.884	0.038	0.187	0.315	0.481
ZZM0624	1.136	-0.545	1.706	-1.386	1.000	0.189	1.000	0.012	0.675
ZZM1086	-1.417	-0.506	-0.289	-1.420	0.000	0.201	0.426	0.000	0.123
ZZM3495	0.330	0.149	0.614	1.153	0.684	0.415	0.686	0.900	0.626
ZZM1968	0.959	0.729	-0.508	0.830	0.931	0.604	0.363	0.787	0.737
ZZM2458	-0.222	-0.347	-1.770	0.137	0.468	0.253	0.000	0.545	0.342
ZZM2631	-0.963	-0.505	0.814	1.438	0.178	0.201	0.743	1.000	0.345
ZZM1232	-0.495	-1.123	0.481	0.553	0.361	0.000	0.648	0.690	0.330
ZZM3938	-1.252	1.945	0.246	-0.584	0.065	1.000	0.580	0.293	0.435
ZZM2820	1.085	1.209	-0.172	-0.201	0.980	0.760	0.460	0.427	0.787
权重 Weight					0.468	0.290	0.152	0.090	

ZZM0627: 河南郑州芝麻; ZZM0624: 河南上蔡芝麻; ZZM1086: 安徽阜南芝麻; ZZM3495: 木镇白; ZZM1968: 霸王鞭; ZZM2458: 长果黄; ZZM2631: 湖北崇阳芝麻; ZZM1232: 湖北江陵芝麻; ZZM3938: 湖南临湘芝麻; ZZM2820: 千层塔。

ZZM0627: Henan Zhengzhou sesame; ZZM0624: Henan Shangcai sesame; ZZM1086: Anhui Funan sesame; ZZM3495: Muzhenbai; ZZM1968: Bawangbian; ZZM2458: Changguohuang; ZZM2631: Hubei Chongyang sesame; ZZM1232: Hubei Jiangling sesame; ZZM3938: Hunan Linxiang sesame; ZZM2820: Qiancengta.

根据各综合指标的指标系数及各单项指标的抗旱系数, 求出每个材料的4个综合指标得分值(表5)。根据公式(2)求得每个材料所有综合指标的隶属函数值(表 5), 再根据各综合指标贡献率大小, 由公式(3)计算出各综合指标的权重。经计算, 4 个综合指标的权重分别为 0.468、0.290、0.152 和 0.090 (表 5)。

2.5.2 综合评价 用公式(4)计算各材料的综合耐旱能力^[38]。

$$D = \sum_{j=1}^n \left[\mu(\chi_j) \cdot W_j \right] \quad j=1, 2, \dots, n \quad (4)$$

式中, D 为各材料在 15%PEG 胁迫下用综合指标评价所得的耐旱性综合评价值。根据各材料的 D 值(表 5)可对 10 个材料耐旱性进行强弱排序, 其中 10 号材料 D 值最大, 表明该材料最耐旱。用最大距离法对 D 值进行聚类分析(图 1), 可将 10 个芝麻材料划分为 3 类, I 类包括安徽阜南芝麻(ZZM1086), 属于不耐旱类型, II 类包括河南郑州芝麻(ZZM0627)、湖北崇阳

芝麻(ZZM2631)、湖南临湘芝麻(ZZM3938)、湖北江陵芝麻 (ZZM1232)、长果黄, 属中度耐旱类型 (ZZM2458), III 类包括河南上蔡芝麻(ZZM0624)、霸王鞭 (ZZM1968)、千层塔 (ZZM2820) 和木镇白 (ZZM3495), 属耐旱类型。

2.5.2 耐旱性鉴定最佳指标的确定 把耐旱性综合评价价值(D 值)作因变量, 把各单项指标的耐旱系数(α 值)作自变量建立最优回归方程, 即 $D=(498.24+13.08X_1-3.63X_2)\times 10^{-3}$ (方程 1)。

式中 X_1 、 X_2 分别代表以活力指数、CAT 酶活为指标的耐旱系数。方程决定系数 $R^2=0.9725$, $F=123.96$, 方程极显著, 其中以活力指数为指标的耐旱系数的 $R^2=0.7310$, 而以 CAT 酶活力为指标的耐旱系数 $R^2=0.2415$, 所以由方程可知, 在 10 个单项指标中, 上述 2 个指标对耐旱性有显著影响, 同时还可以发现以活力指数为指标的耐旱系数在决定耐旱性方面起着最重要的作用, 结合相关性分析(表 3), 相

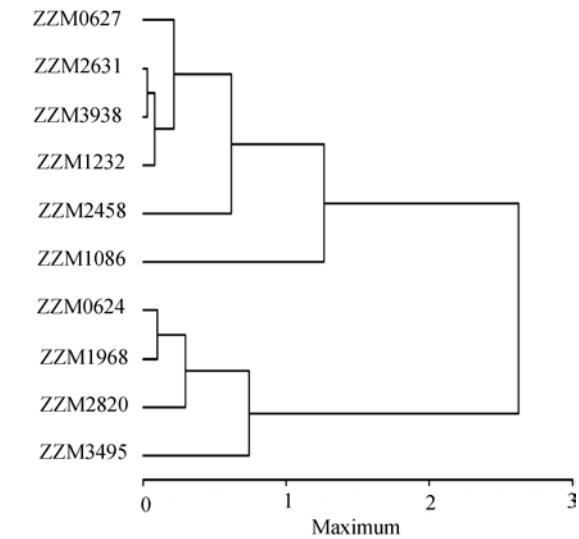


图 1 D 值最大距离法聚类图

Fig. 1 Maximum distance between clusters using *D*-value
ZZM0627: 河南郑州芝麻; ZZM0624: 河南上蔡芝麻; ZZM1086: 安徽阜南芝麻; ZZM3495: 木镇白; ZZM1968: 霸王鞭; ZZM2458: 长果黄; ZZM2631: 湖北崇阳芝麻; ZZM1232: 湖北江陵芝麻; ZZM3938: 湖南临湘芝麻; ZZM2820: 千层塔。
ZZM0627: Henan Zhengzhou sesame; ZZM0624: Henan Shangcai sesame; ZZM1086: Anhui Funan sesame; ZZM3495: Muzhenbai, ZZM1968: Bawangbian; ZZM2458: Changguohuang; ZZM2631: Hubei Chongyang sesame; ZZM1232: Hubei Jiangling sesame; ZZM3938: Hunan Linxiang sesame; ZZM2820: Qiancengta.

对成苗率与活力指数的相关系数为 0.957, 达到极显著正相关水平, 相对成苗率与 *D* 值相关系数为 0.806, 也达到极显著正相关水平。因此, 在大量材料 PEG6000 介导的耐旱性鉴定中, 可以用相对成苗率耐旱系数这一较为可靠且易于操作的指标进行评价。

2.6 核心种质群体耐旱性分子标记关联分析

利用 20 对 SSR 引物、43 对 SRAP 引物及 16 对 AFLP 引物, 对 216 份资源群体进行扩增, 共统计出 608 条多态性条带, 每引物扩增的多态性条带数分别为 3.95、8.58 和 10.00。对资源群体 15% PEG 鉴定结果表明, 相对成苗率耐旱系数值位于 12.15%~93.52%, 平均为 60.74%, 变异系数为 25.22。对群体成苗率耐旱系数进行正态分析可见, 根据国标 GB4882-85, 当样本含量 $n>50$ 时, 用 *D* 检验, 由于 $D>0.05$, 所以供试材料相对成苗率耐旱系数符合正态分布(表 6), 且在各个耐旱等级均有分布, 耐旱性变异较丰富(图 2)。供试群体的耐旱性表现适合做耐旱性关联分析。如表 7 所示, 利用 GLM(Q)模型共检测到 30 个标记与供试群体耐旱系数显著关联 ($P<0.05$), 表型变异解释率为 1.99%~4.96%, 总解释

率 85.30%, 平均 2.84%。

表 6 核心种质群体成苗率耐旱系数的正态性检验
Table 6 Normality test on drought tolerance coefficient of the shoot percent in core collection

检验 Test	统计量 Statistic	P 值 P value
Shapiro-Wilk	W 0.986151	Pr < W 0.0335
Kolmogorov-Smirnov	D 0.057632	Pr > D 0.0798
Cramer-von Mises	W-Sq 0.091655	Pr > W-Sq 0.1467
Anderson-Darling	A-Sq 0.705615	Pr > A-Sq 0.0681

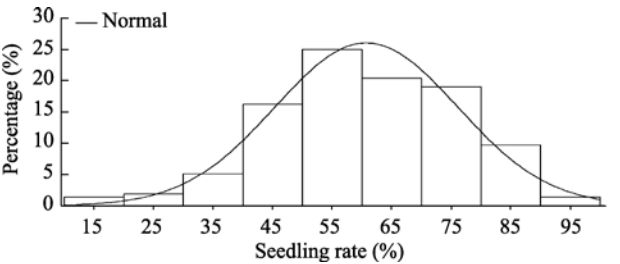


图 2 核心种质群体成苗率耐旱系数正态分布图

Fig. 2 Map of normality for drought tolerance coefficient of the shoot percentage in core collection

3 讨论

我国芝麻耐旱相关研究十分薄弱, 本研究建立了芝麻芽期耐旱性鉴定方法, 尚属首次。大豆、棉花、油菜等作物早期开展的相关研究报道较多, 本研究在芝麻上确定的最佳 PEG 浓度为 15%和最佳耐旱性评价指标为相对成苗率, 与其他作物报道相似^[8,15,40]。在其他作物上利用 PEG 模拟干旱鉴定耐旱性的研究取得可喜结果, 郭雪松和唐章林^[41]鉴定了 42 个油菜品种(系)的耐旱性, 发现耐旱性较好的品种(系)占 23.8%, 李凤海^[42]对玉米抗旱性的遗传特性研究发现, 玉米抗旱性指数受 2 对主基因+多基因控制, 贾东升等^[43]研究发现在 20% PEG 模拟干旱的条件下转基因小麦中有 4 个抗旱相关基因表达显著增强。本研究建立的芝麻发芽期耐旱性鉴定方法具有较高的应用价值和前景。

诸多研究报道表明作物耐旱性是一个由多基因控制的复杂的数量性状^[44-46], 由于芝麻耐旱性数量性状特征以及不同材料在旱害胁迫下对某一具体指标的反应不尽相同, 因而可用各指标综合评价的方法来全面准确掌握不同材料的耐旱性。本研究把主成分分析及隶属函数等综合评价方法^[38]应用于芝麻发芽期耐旱性研究, 将原来个数较多的单个指标转换成新的个数较少且彼此独立的综合指标, 然后通过各级运算得到各材料耐旱性的综合评价值(*D* 值),

表 7 与芝麻耐旱性显著相关($P<0.05$)的标记位点和表型变异解释率(R^2)

Table 7 Marker loci associated with drought tolerance ($P<0.05$) and explanation of phenotypic variation (R^2)

标记 Marker	P 值 P-value	解释率 R^2
AFLP		
E6M15-5	0.0041	0.0381
E6M15-6	0.0128	0.0287
E6M12-7	0.0134	0.0288
E5M15-10	0.0195	0.0255
E5M15-11	0.0195	0.0255
E7M10-5	0.0266	0.0231
E5M11-9	0.0367	0.0206
SRAP		
M15E14-6	0.0011	0.0496
M8E5-6	0.0029	0.0418
M10E16-1	0.0054	0.0363
M20E16-1	0.0059	0.0352
M15E14-5	0.0061	0.0353
M20E16-5	0.0196	0.0254
M13E11-2	0.0238	0.0243
M8E17-1	0.0266	0.0235
M15E14-3	0.0277	0.0229
M15E18-4	0.0326	0.0215
M16E15-1	0.0373	0.0203
M15E15-4	0.0392	0.0199
M18E1-2	0.0412	0.0199
SSR		
SSI223-1	0.0021	0.0438
SSR002-3	0.0080	0.0332
SSR002-4	0.0131	0.0291
SSI281-3	0.0140	0.0284
SSI281-4	0.0140	0.0284
SSR012-2	0.0149	0.0278
SSI200-1	0.0161	0.0273
SSI200-2	0.0228	0.0244
SSI281-2	0.0229	0.0244
SSI204-7	0.0412	0.0200
变异解释率	总和 Total of all loci	0.8530
Explanation of Variation	平均值 Average per locus	0.0284

利用 D 值能更准确地评价各材料的耐旱能力。以 D 值为因变量，建立最优回归方程，再结合相关性分析筛选出对耐旱性有显著影响的指标(相对成苗率)，利用该指标可在相同的胁迫条件下准确鉴定其他材料的耐旱性。

我国芝麻旱害问题比较复杂，近年，旱害频发

且逐年加重，造成减产，常年发生旱害地区主要为东北、陕西、山西和江西等华南秋播地区，严重干旱主要发生在播种出苗和生长前期，影响苗齐、苗壮，造成减产 13%~26%^[47]。发掘耐旱种质是开展耐旱育种的基础，本研究鉴定出相对成苗率 85% 的高耐旱种质资源 7 份，来源于湖北(2 份)、安徽(2 份)、河南(1 份)、江西(1 份)和陕西(1 份)，其中 6 份为白色种皮，含油量 52.54%~57.64%，将为我国芝麻耐旱品种改良提供关键亲本，为耐旱机理、遗传分析、功能基因等深入研究提供核心材料。

传统作物耐旱性的遗产改良周期长、可预见性差且效率不高，需要合适的田间耐旱性鉴定的环境。而分子标记和合适的统计方法，关联与耐旱相关性状紧密连锁的标记，为芝麻耐旱育种提供了新的途径，有助于实现耐旱性的分子设计育种。本研究获得的 30 个与耐旱有显著关联的分子标记中，解释率较高的 2 个 SRAP 标记为 M15E14-6 (4.96%)、M8E5-6 (4.18%)和 1 个 SSR 标记为 SSI223-1 (4.38%)，这些标记对进一步开展芝麻耐旱性基因定位、功能标记开发等分子生物学相关研究奠定重要基础。

4 结论

确定了 15% PEG6000 为芝麻发芽期耐旱鉴定的最适宜浓度，相对成苗率耐旱系数可作为最佳评价指标。芝麻核心种质群体 216 份材料的耐旱性变异较丰富，符合正态分布，共检测到 30 个分子标记与核心种质群体的耐旱指标显著关联，对表型变异解释率为 1.99%~4.96%，总解释率 85.30%，平均 2.84%，其中有 2 个 SRAP 标记和 1 个 SSR 标记解释率在 4% 以上。

References

[1] Yang M(杨湄), Huang F-H(黄凤洪). Situation, problem, development trend and suggestion of sesame industry in China. *China Oils Fats* (中国油脂), 2009, 34(1): 7–12 (in Chinese with English abstract)

[2] Wang L-H(王林海), Zhang Y-X(张艳欣), Wei W-L(危文亮), Zhang X-R(张秀荣). Investment of waterlogging and drought effect on the sesame production in China. *Chin Agric Sci Bull* (中国农学通报), 2011, 27(28): 301–306 (in Chinese with English abstract)

[3] Nemeth M, Janda T, Horvath E, Paldi E, Szalai G. Exogenous salicylic acid increases polyamine content but may decrease drought tolerance in maize. *Plant Sci*, 2002, 162: 569–574

[4] Fu B Y, Xiong J H, Zhu L H, Zhao X Q, Xu H X, Gao Y M, Li Y S, Xu J L, Li Z K. Identification of functional candidate genes for

- drought tolerance in rice. *Mol Genet Genom*, 2007, 278: 599–609
- [5] Li C-D(李灿东), Jiang H-W(蒋洪蔚), Guo T(郭泰), Wang Z-X(王志新), Wu X-H(吴秀红), Zheng W(郑伟), Chen Q-S(陈庆山), Hu G-H(胡国华). QTL identification of plant height and analysis of genotype to soybean in selection population. *Soybean Sci* (大豆科学), 2011, 30(1): 15–19 (in Chinese with English abstract)
- [6] Pakniyat H, Tavakol E. RAPD markers associated with drought tolerance in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Pak J Biol Sci*, 2007, 10: 3237–3239
- [7] He H-Y(贺鸿雁), Sun C-H(孙存华), Du W(杜伟), Li Y(李扬). Effects of PEG6000 osmotic stress on osmolytes of peanut seedling. *Chin J Oil Crop Sci* (中国油料作物学报), 2006, 28(1): 76–78 (in Chinese with English abstract)
- [8] Li Z(李震), Yang C-J(杨春杰), Zhang X-K(张学昆), Zou C-S(邹崇顺), Cheng Y(程勇), Zheng P-Y(郑普英), Li G-Y(李桂英). Evaluation of drought tolerance in rapeseed (*Brassica napus* L.) during germination under PEG6000 stress. *Chin J Oil Crop Sci* (中国油料作物学报), 2008, 30(4): 438–442 (in Chinese with English abstract)
- [9] Chazen O, Hartung W, Neumann P M. The different effects of PEG 6000 and NaCl on leaf development are associated with differential inhibition of root water transport. *Plant Cell Environ*, 1995, 18: 727–735
- [10] Dhanda S S, Sethi G S, Behl R K. Indices of drought tolerance in wheat genotypes at early stages of plant growth. *J Agron Crop Sci*, 2004, 190: 6–12
- [11] Ma X-L(马向丽), Bi Y-F(毕玉芬), Huang M(黄梅), Liu Q(刘倩), Fan M(樊梅). Effects of GA₃ and PEG on germination of *Setaria sphacelata* seeds. *Chin J Trop Crops* (热带作物学报), 2009, 30(10): 1479–1483 (in Chinese with English abstract)
- [12] Zhang Y(张燕), Fang L(方力), Li T-F(李天飞), Wu Y-C(吴业池), Feng Y-X(冯永新). Effects of seed soaking in PEG on seed vigor and protective enzyme activities of tobacco seedlings. *J Yunnan Agric Univ* (云南农业大学学报), 2004, 19(1): 36–40 (in Chinese with English abstract)
- [13] Zhang X-Y(张雪妍), Liu C-L(刘传亮), Wang J-J(王俊娟), Li F-G(李付广), Ye W-W(叶武威). Evaluation to the drought tolerance of cotton by PEG water-stress. *Cotton Sci* (棉花学报), 2007, 19(3): 205–209 (in Chinese with English abstract)
- [14] Yuan Y(袁媛), Li N(李娜), Shao A-J(邵爱娟), Li H(李化), Huang L-Q(黄璐琦). Effect of PEG6000 on seed germination and seedling growth of *Scutellaria baicalensis*. *Chin Traditional Herbal Drugs* (中草药), 2008, 39(2): 269–272 (in Chinese with English abstract)
- [15] Zhang C-N(张晨妮), Zhou Q-P(周青平), Yan H-B(颜红波), Liu W-H(刘文辉). Effects of PEG on drought resistance of *Elymus sibiricus* germplasm at germination stage. *Pratac Sci* (草业科学), 2010, 27(1): 119–123 (in Chinese with English abstract)
- [16] Chen J-W(陈郡雯), Wu W(吴卫), Zheng Y-L(郑有良), Hou K(侯凯), Xu Y-W(徐应文), Zai J-Y(翟娟园). Drought resistance of *Angelica dahurica* during seedling stage under polyethylene glycol (PEG-6000)-simulated drought stress. *China J Chin Materia Medica* (中国中药杂志), 2010, 35(2): 149–153 (in Chinese with English abstract)
- [17] Ahmad S, Ahmad R, Ashraf M Y, Ashraf M, Waraich E A. Sunflower (*Helianthus annuus* L.) response to drought stress at germination and seedling growth stages. *Pak J Bot*, 2009, 41: 647–654
- [18] Li W-R(李文晓), Zhang S-Q(张岁岐), Shan L(山仑), Zhang T(张彤), Shan Y(山颖). Effect of water stress mimicked by PEG-6000 and rehydration on eco-physiological characteristics of leaf and stem in alfalfa seedlings. *Acta Agric Boreali-occidentis Sin* (西北农业学报), 2008, 17(6): 247–252 (in Chinese with English abstract)
- [19] Dai G-X(戴高兴), Peng K-Q(彭克勤), Xiao L-T(萧浪涛), Deng G-F(邓国富). Effect of drought stress simulated by PEG on malonaldehyde, proline contents and superoxide dismutase activity in low potassium tolerant rice seedlings. *Chin J Rice Sci* (中国水稻科学), 2006, 20(5): 557–559 (in Chinese with English abstract)
- [20] Xu G-F(许桂芳), Zhang C-Y(张朝阳), Xiang Z-X(向佐湘). Comprehensive evaluation of drought resistance of four *Lysimachia* species by using subordinate function. *Acta Agric Zhejiangensis* (浙江农业学报), 2009, 21(1): 59–62 (in Chinese with English abstract)
- [21] Sari-Gorla M, Krajewski P, Fonzo N D, Villa M, Frova C. Genetic analysis of drought tolerance in maize by molecular markers. II. Plant height and flowering. *Theor Appl Genet*, 1999, 99: 289–295
- [22] Bolanos J, Edmeades G O. The importance of the anthesis-silking interval in breeding for drought tolerance in tropical maize. *Field Crop Res*, 1996, 48: 65–80
- [23] Wang X-L(王晓玲). Effect of water stress on proline content of sesame florescence. *Anhui Agric Sci Bull* (安徽农学通报), 2007, 13(20): 66–67 (in Chinese with English abstract)
- [24] Chen P(陈培), Wang Q(汪强), Zhao L(赵莉), Tian D-F(田东风). Effect of water stress on seed germination characteristics of sesame (*Sesamum indicum* L.). *Seed* (种子), 2012, 31(4): 83–85 (in Chinese with English abstract)
- [25] Michel B E, Kaufmann M R. The osmotic potential of Polyethylene Glycol 6000. *Plant Physiol*, 1973, 51: 914–916
- [26] Li Z-G(李忠光), Li J-H(李江鸿), Du C-K(杜朝昆), Huang H-D(黄号栋), Gong M(龚明). Simultaneous measurement of five antioxidant enzyme activities using a single extraction system. *J Yunnan Norm Univ* (云南师范大学学报), 2002, 22(6): 44–48 (in Chinese with English abstract)
- [27] Zhang D-Z(张殿忠), Wang P-H(汪沛洪), Zhao H-X(赵会贤). Determination of the content of free proline in wheat leaves. *Plant Physiol Commun* (植物生理学通报), 1990, (4): 62–65 (in Chinese with English abstract)
- [28] Zhao S-J(赵世杰), Xu Z-C(许长成), Zou Q(邹琦), Meng Q-W(孟庆伟). Improvements of method for measurement of malondialdehyde in plant tissues. *Plant Physiol Commun* (植物生理学通报), 1991, 30(3): 207–210 (in Chinese with English abstract)

- stract)
- [29] Leul M, Zhou W J. Alleviation of waterlogging damage in winter rape by uniconazole application: effects on enzyme activity, lipid peroxidation, and membrane integrity. *J Plant Growth Regul*, 1999, 18: 9–14
- [30] Lü H-X(吕海霞), Zhang Y-X(张艳欣), Wang L-H(王林海), Zhang X-Y(张晓燕), Zhang X-R(张秀荣). Methods for efficient extraction of sesame genomic DNA and rapid sliver staining of PAGE. *Chin Agric Sci Bull* (中国农学通报), 2010, 26(15): 75–77 (in Chinese with English abstract)
- [31] Zhang Y X, Zhang X R, Hua W, Wang L H, Che Z. Analysis of genetic diversity among indigenous landraces from sesame (*Sesamum indicum* L.) core collection in China as revealed by SRAP and SSR markers. *Genes & Genom*, 2010, 32: 207–215
- [32] Sun J(孙建), Tu Y-Q(涂玉琴), Zhang X-R(张秀荣). DNA fingerprint analysis in space-induced sesame mutant lines. *Sci Agric Sin* (中国农业科学), 2007, 40(12): 2696–2701 (in Chinese with English abstract)
- [33] Zhang Y-X(张艳欣), Zhang X-R(张秀荣), Che Z(车卓), Wang L-H(王林海). Genetic diversity analysis of core collection of white coat sesame seed (*Sesamum indicum* L.) in China using SRAP markers. *Chin J Oil Crop Sci* (中国油料作物学报), 2010, 32(1): 46–52 (in Chinese with English abstract)
- [34] Yeh F C, Boyle T J B. Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits. *Belgian J Bot*, 1997, 129: 157
- [35] Bradbury P J, Zhang Z, Kroon D E, Casstevens T M, Ramdoss Y, Buckler E S. TASSEL: Software for association mapping of complex traits in diverse samples. *Bioinformatics*, 2007, 23: 2633–2635
- [36] Pritchard J K, Wen W. Documentation for STRUCTURE Software: Version 2.2. Chicago: The University of Chicago Press, 2007
- [37] Zhang Y-X(张艳欣), Wang L-H(王林海), Li D-H(黎冬华), Wei W-L(危文亮), Gao Y(高媛), Zhang X-R(张秀荣). Association mapping of sesame (*Sesamum indicum* L.) resistance to *Macrophomina phaseolina* and identification of resistant accessions. *Sci Agric Sin* (中国农业科学), 2012, 45(13): 2580–2591 (in Chinese with English abstract)
- [38] Tang Q-Y(唐启义), Feng M-G(冯明光). Practical Statistics and Computer Processing Platform (实用统计分析及其计算机处理平台). Beijing: Science Press, 2007 (in Chinese)
- [39] Zhou G-S(周广生), Mei F-Z(梅方竹), Zhou Z-Q(周竹青), Zhu X-T(朱旭彤). Comprehensive evaluation and forecast on physiological indices of waterlogging resistance of different wheat varieties. *Sci Agric Sin* (中国农业科学), 2003, 36(11): 1378–1382 (in Chinese with English abstract)
- [40] Yang Y-P(杨剑平), Chen X-Z(陈学珍), Wang W-P(王文平), Li Y(李杨). The establishment of the simulated system of drought for soybean in laboratory. *Chin Agric Sci Bull* (中国农学通报), 2003, 19(3): 65–68 (in Chinese with English abstract)
- [41] Guo X-S(郭雪松), Tang Z-L(唐章林). Evaluation of drought tolerance of 42 rapeseed genotypes in different PEG concentration treatments. *J Southwest Univ* (西南大学学报), 2009, 31(10): 1–7 (in Chinese with English abstract)
- [42] Li F-H(李凤海). Selection of Drought Resistance Index and Genetic Research of Maize Breeding (玉米抗旱性指标的筛选及其遗传特性研究). Shenyang: Shenyang Agricultural University Press, 2011 (in Chinese)
- [43] Jia D-S(贾东升), Mao X-G(毛新国), Jing R-L(景蕊莲), Zhang X-K(张晓科), Chang X-P(昌小平). Cloning and expression of transcription factor *TaMyb2s* in wheat. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2008, 34(8): 1323–1329 (in Chinese with English abstract)
- [44] Pelleschi S, Rocher J P, Prioul J L. Effect of water restriction on carbohydrate metabolism and photosynthesis in mature maize leaves. *Plant Cell Environ*, 1997, 20: 493–503
- [45] Kishor P B K, Hong Z, Miao G H. Overexpression of Δ -pyrroline-S-carboxylate synthetase increase proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. *Plant Physiol*, 1995, 108: 1387–1394
- [46] Pilon-Smits E A H, Ebskamp M J M, Paul M J. Improved performance of transgenic fructan-accumulating tobacco under drought stress. *Plant Physiol*, 1995, 107: 125–130
- [47] Wang L-H(王林海), Zhang Y-X(张艳欣), Wei W-L(危文亮), Zhang X-R(张秀荣). Investment of waterlogging and drought effect on the sesame production in China. *Chin Agric Sci Bull* (中国农学通报), 2011, 27(28): 301–306 (in Chinese with English abstract)