

20份燕麦种质遗传多样性分析

官文龙, 蔺豆豆, 苏玮娟, 赵桂琴*

(甘肃农业大学草业学院, 草业生态系统教育部重点实验室, 甘肃省草业工程实验室, 中-美草地畜牧业可持续发展研究中心, 甘肃 兰州 730070)

摘要:【目的】了解20份燕麦种质间的相对亲缘关系。【方法】利用8对SSR多态性引物对20份燕麦种质进行遗传多样性分析。【结果】8对引物共扩增出44个位点, 其中多态性位点有40个, 平均每对引物扩增出5.5个位点。SSR标记位点平均多态性信息含量、平均有效等位基因数、平均香农指数、平均期望杂合度和平均观测杂合度分别为0.630 8、3.052 4、1.271 0、0.673 1和0.552 1。聚类结果表明: 20份燕麦种质的遗传相似系数变幅为0.14~1.00, 在相似系数0.59处, 可将20份材料分为7组。主成分分析结果显示前3个主成分占总变异的83.44%, 根据第一及第二主成分可将20份种质分为4个大组, 且与聚类结果基本一致。【结论】所选用引物多态性较好, 遗传多样性较高, 不同燕麦种质间遗传关系与其地理来源具有一定相关性, 研究结果可为燕麦遗传改良及分子育种提供参考。

关键词: 燕麦; 分子标记; 遗传多样性; 简单重复序列

中图分类号: S544.9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1009-5500(2024)05-0200-07

DOI: 10.13817/j.cnki.cyycp.2024.05.023



燕麦是禾本科(Gramineae)燕麦属(*Avena*)一年生草本植物, 同时也是世界第七大主要栽培作物^[1]。因其具有抗旱、抗寒、耐贫瘠等优点, 近年来在优质饲草料及杂粮生产方面获得了广泛应用^[2]。栽培燕麦主要分为带稃型(皮燕麦, *A. sativa*)和裸粒型(裸燕麦, *A. nuda*)两种^[3]。有研究表明裸燕麦起源于中国, 我国栽培品种也主要以裸燕麦为主^[4]。随着国家对生态环境治理、草原保护的重视程度不断提高及畜牧业的迅速发展, 高产优质的燕麦饲草需求量迅速增加。然而, 当前我国燕麦种质仍然存在品种混杂、精准鉴定不足等问题, 这大大限制了种质资源改良及新品种选育进程, 导致饲用燕麦生产加工及利用远远落后于其它禾本科栽培作物, 利用分子标记对不同种质进行遗传多样性分析及亲缘关系鉴定显得尤为重要。

种质资源收集、评价及创新利用是作物育种工作的主要环节, 利用分子标记技术对不同来源的种质资源进行遗传多样性及亲缘关系分析, 可有效鉴别遗传背景不同的种质资源, 为分子辅助育种提供参考^[5-6]。简单重复序列(SSR)也称微卫星或短串联重复序列, 是一种基于DNA芯片技术的分子标记, 其长度较短且在基因组中广泛分布, 这导致其具有较其它分子标记更高的多态性, 在燕麦分子标记开发及遗传多样性研究中也已获得了广泛应用^[7-8]。高秋等^[9]使用磁珠富集法开发燕麦SSR分子标记, 筛选出6对多态性较高的引物, 构建了10个国审燕麦品种的DNA指纹图谱, 为燕麦品种真伪鉴定提供了科学依据。郭红媛等^[10]通过公共数据库进行燕麦EST-SSR分子标记开发, 利用开发的40对EST-SSR引物对15个六倍体燕麦种质资源进行遗传多样性分析, 发现15个燕麦品种遗传多样性较高且基本可按种或地理来源聚类。杨帆等^[11]利用SSR分子标记分析了9份燕麦材料的遗传多样性, 并估算了材料的异交率, 证明了燕麦是以自交为主并兼有一定比例异交的自花授粉植物。

地理来源不同通常会导致材料间遗传差异较大,

收稿日期: 2023-01-04; 修回日期: 2023-03-01

基金资助: 张掖市重大技术攻关揭榜挂帅项目(ZY2022 JBGS01)

作者简介: 官文龙(1994-), 男, 内蒙古赤峰人, 博士研究生。E-mail: gongwl2019@163.com

*通信作者。E-mail: zhaogq@gsau.edu.cn

因此,本研究采用SSR分子标记对收集自国内外的20份燕麦种质资源的遗传多样性及亲缘关系进行分析,以期挖掘优异资源、加速燕麦品种改良及分子育种提供参考。

1 材料和方法

1.1 试验材料

供试材料为收集自国内外的20份燕麦种质资源(表1),均由甘肃农业大学草业学院提供。

表1 供试燕麦种质

Table 1 List of all oat germplasms used in this study

编号	种质	来源	皮裸性	编号	种质	来源	皮裸性
1	陇燕2号	甘肃	皮	11	白燕4号	吉林	裸
2	白燕11号	吉林	裸	12	太阳神	美国	皮
3	蒙燕3号	内蒙古	皮	13	牧马人	美国	皮
4	478	甘肃	皮	14	白燕18号	吉林	裸
5	MN09255	巴西	皮	15	709	甘肃	皮
6	张燕3号	河北	皮	16	燕王	美国	皮
7	张燕4号	河北	皮	17	爱沃	美国	皮
8	白燕19号	吉林	皮	18	陇燕5号	甘肃	皮
9	MN08243	巴西	皮	19	牧乐思	美国	皮
10	CN1994	美国	皮	20	陇燕4号	甘肃	皮

1.2 试验设计

试验于2021年5—6月在甘肃农业大学草业学院温室中进行,20份种质分别播种在直径10 cm的育苗杯中,每份材料3杯,每杯5株。出苗后10 d进行取样,选择生长良好的幼苗取中部半片叶片,每份材料取5株混合,采用试剂盒法(天根,北京)提取DNA,1%琼脂糖凝胶电泳检测DNA的纯度和浓度。

本试验使用的SSR引物均经过本课题组前期筛选获得(表2),所选引物均由生工生物工程(上海)有限公司合成。PCR反应体系选用25 μ L,包括2 \times SanTaq PCR Mix 12.5 μ L;正反向引物(10 μ mol \cdot L⁻¹)各1.5 μ L;模板DNA 1 μ L;ddH₂O补足总体积至25 μ L。反应条件:预变性94 $^{\circ}$ C 5 min,变性94 $^{\circ}$ C 30 s,退火55 $^{\circ}$ C 30 s,延伸72 $^{\circ}$ C 1 min,循环35次;终延伸72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR产物均采用8%的非变性聚丙烯酰胺凝胶在150 V电压下电泳40 min。电泳结束后用核酸染料泡染法染色检测,核酸染料购自生工生物工程(上海,中国),将凝胶放在聚丙烯容器中,缓慢加入染色液浸没凝胶,室温震荡30 min,捞出后在凝胶成像系统中拍照保存。

1.3 数据处理

检测结果使用凝胶成像系统拍照后人工读取电泳条带,按照条带在电泳胶同一迁移位置上的有无,有扩增条带的记为1,没有的记为0,组成(1,0)二元数列矩阵,利用DataFormater软件^[12]进行数据格式转换,采用POPGENE1.32软件计算每个SSR位点的有效等位基因数(Ne)、香农信息指数、观测杂合度及期望杂合度^[13];利用PowerMarker软件^[14]计算多态性信息含量(PIC),利用NTSYSpc 2.1软件^[15]分析遗传相似性Dice系数,采用UPGMA法进行聚类分析,根据遗传相似性数据计算遗传距离,并生成聚类图。利用GenAlex 6.503软件^[16]进行主成分分析。

2 结果与分析

2.1 引物扩增位点数量分析

应用试剂盒法进行基因组DNA提取,表1中前10份种质DNA提取电泳结果显示,条带清晰、明亮,表明DNA完整性较好(图1)。根据本课题组前期筛选结果选择10对引物对20个种质进行遗传多样性分析,10对引物均可扩增出条带,其中8对可扩增出多态性条带。故利用这8对引物对不同燕麦种质进行遗传

表2 SSR引物序列
Table 2 Primer sequences of SSR

引物名称	正向/反向	序列(5'-3')
P4	F	TGGTCAGTAAGCATCACAAT
	R	TGTGCATGCATCTGTGCATA
P11	F	AGCCTGTACATGTAATCTGGT
	R	AGCCCTGGTCTTCTACAACA
P15	F	GAGCATGCTCTGGATGGAAA
	R	CCCGTTTATGTGATTGTTAGC
P12	F	TCGCCATTAATAAGAGCGAAGG
	R	GCTGCTGTTGCGTGGTTAGTGC
P21	F	TGCATGTAATTGTTTGTGTTG
	R	CACGATCCATATACACGCAG
P38	F	AGAGCAATTACCAGTCCAATG
	R	GTCGTAGGAGAAGCGGCCCTG
AM54	F	AAACCCGTGCAAGAAACCAA
	R	TGCGGGAGGAGGGAAGAC
MAMA-2	F	TTCCCACTCCGTGTTCTCTC
	R	GATGGACGCACAAGAATCG

多样性分析(表2)。8对引物在20份燕麦种质中共扩增出44个位点,其中多态性位点有40个,占总数的90.91%。各引物扩增出的条带数1~7不等,平均每对引物扩增出5.5个位点(表3)。

2.2 SSR引物多态性分析

SSR标记位点PIC变幅为0.438 0~0.723 7,平均为0.630 8;Ne变幅为2.056 6~3.980 1,平均为3.052 4;香农指数变幅为0.849 2~1.538 1,平均为1.271 0;期望杂合度变幅为0.350 0~0.800 0,平均为0.673 1;观测杂合度变幅为0.526 9~0.767 9,平均为0.552 1(表4)。

表3 SSR引物扩增位点数量统计

Table 3 Statistics of SSR primer amplification loci

引物	扩增位点数	多态性位点数	多态性位点百分率/%
P4	7	7	100
P11	4	4	100
P15	7	7	100
P12	5	5	100
P21	6	6	100
P38	7	4	57.14
AM54	3	3	100
MAMA-2	5	4	80.00



图1 1-10号种质基因组DNA提取

Fig. 1 Genomic DNA extraction of 1-10 germplasms

2.3 20份燕麦种质聚类分析

用SSR标记扩增获得的多态性位点对供试材料进行遗传相似性分析(图2)。结果表明,20份燕麦材

表4 SSR引物多态性分析
Table 4 Polymorphism analysis of SSR primers

引物	多态性信息含量PIC	有效等位基因数(Ne)	香农指数(H')	观测杂合度	期望杂合度
P4	0.723 7	3.820 1	1.509 1	0.631 6	0.758 2
P11	0.539 6	2.395 2	1.165 0	0.350 0	0.597 4
P15	0.438 0	2.056 6	0.849 2	0.550 0	0.526 9
P12	0.554 6	2.446 5	1.173 5	0.800 0	0.606 4
P21	0.707 2	3.980 1	1.474 2	0.500 0	0.767 9
P38	0.657 1	3.098 7	1.235 0	0.631 6	0.695 6
AM54	0.718 3	3.610 0	1.538 1	0.578 9	0.742 5
MAMA-2	0.708 0	3.011 8	1.223 9	0.375 0	0.689 5

料的遗传相似系数变幅为0.14~1.00,在相似系数0.59处,可将20份燕麦材料分为7组,其中1号(陇燕2号)、6号(张燕3号)和11号(白燕4号)材料分别单独为1组(组I、组III和组VII)。组II包括3份国内材

料和1份国外材料。组IV包括6份材料,其中4份来自国内,2份来自国外(燕王和爱沃)。组V包括2份来自甘肃的材料(陇燕4号和陇燕5号)及1份来自美国的材料。组VI包括4份材料均来自国外。

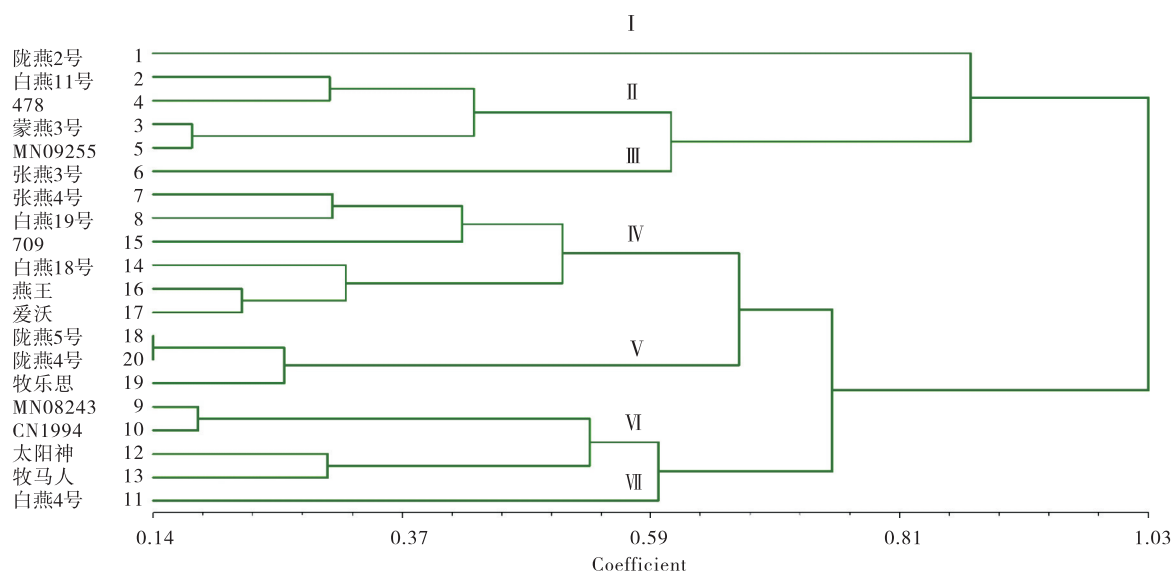


图2 20份燕麦种质聚类结果

Fig. 2 Cluster results of 20 oat germplasms

2.4 20份燕麦种质主成分分析

计算20份燕麦种质间的遗传距离并进行主成分分析(PCoA)(图3),结果显示前3个主成分分别解释了42.71%、23.10%和17.63%的变异,占总变异的83.44%。主成分分析结果与聚类结果基本一致,根据第一及第二主成分可将20份种质分为4个大组,P1包括组I的陇燕2号及组VI的两个美国种质。P2包括组II中的所有种质。P3共包括8份种质,分别来自组III(全部1份)、组IV(4份)及组V(全部3份)。P4包括5份种质,分别来自组IV(2份)、组VI(2份)及组VII

(全部1份)。

3 讨论

SSR分子标记通常为两侧较为保守的单拷贝序列,但微卫星数目可能存在整倍性变异,同一标记在不同个体中的重复序列也可能不完全相同,这为研究个体间多态性差异提供了可能^[17]。燕麦为异源六倍体作物,较大的基因组表示其可能存在丰富的均匀分布在基因组中的微卫星,这些微卫星序列可在遗传图谱构建、指纹图谱绘制、目标基因定位、种质资源鉴

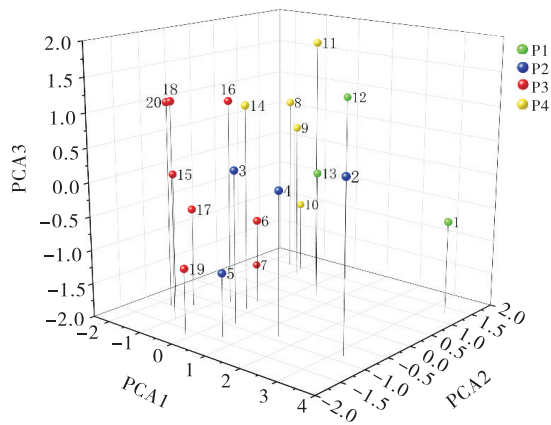


图3 20份燕麦种质主成分分析结果

Fig. 3 Principal component analysis results of 20 oat germplasm

别、分子标记辅助育种等方面发挥重要作用^[18-19]。目前有报道的燕麦 SSR 分子标记已超过 500 对, 相关研究也逐年增加。本研究在实验室前期筛选 10 对引物的基础上进行 20 份种质的遗传多样性分析, 仍发现 2 对引物扩增后未表现出多态性, 这可能是本研究选用材料与开发引物所用材料遗传背景差异较大所致。总体来说, 8 对引物均表现出多态性, 可用于后续遗传多样性分析。

本研究利用 8 对多态性 SSR 分子标记分析了来自国内外且皮裸性不同的 20 份燕麦种质的遗传多样性, 8 对引物共扩增到多态性位点 40 个, 多态性位点比例高达 90.91%, 均高于另一项在燕麦中以及老芒麦中的研究^[20-21]。白晓雷^[20]在燕麦中研究发现 SSR 标记位点多态性信息含量 (PIC) 平均为 0.755 6, 有效等位基因数平均 1.751 4, 香农指数平均 0.596 9。另一项在燕麦中的研究这几项指标平均分别为 0.485 2、0.317 9 及 0.868 0^[11]。本研究同样对这几个指标进行了分析, 结果分别为 0.630 8、3.052 4 及 1.271 0, 表明本研究选用的引物多态性较好, 可用于燕麦种质鉴别, 同时也表明本研究选择的不同燕麦种质具有丰富的遗传多样性, 可作为未来品种改良优异基因筛选的候选材料。另外本研究发现 8 对引物的平均期望杂合度 (0.673 1) 高于平均观测杂合度 (0.552 1), 通常来说, 如期望杂合度高于观测杂合度, 则表明基因特征是由遗传而非环境引起, 部分优异性状可能通过传统杂交或者分子育种手段得以稳定遗传, 在火焰兰 (*Renanthera coccinea*) 和核桃 (*Juglans regia*) 的研究中也发现了类似结果^[22-23]。

遗传关系分析在揭示不同种质遗传多样性及分子标记辅助育种方面具有重要作用, 前人对燕麦的遗传关系分析主要集中在国内或国外燕麦种质, 对皮裸燕麦及国内外燕麦种质同时进行遗传关系分析的研究还少有报道^[7, 24-25]。陇燕 2 号、张燕 3 号和白燕 4 号分别单独聚成 1 类, 表明其遗传关系与其他种质均较远或遗传背景不一致; 第 4 组包括 6 份材料, 但来自国外的燕王和爱沃聚为一个小类, 表明其亲缘关系更近; 另外, 本课题组育成的陇燕 4 号和陇燕 5 号也显示出了相对较近的亲缘关系; 第六组 4 份材料均来自国外且均为皮燕麦, 表明其遗传基础较为接近。然而, 本研究选择的 3 份裸燕麦材料并未显示出明显的聚类特征, 可能是所选择材料太少, 在分析中不具有代表性所致, 未来应充分考虑样本数量及样本收集地点对试验结果的影响。

4 结论

本研究利用 8 对多态性 SSR 引物对 20 个燕麦种质遗传多样性进行分析, 发现所选用引物多态性较好, 具有较高水平的遗传多样性, 未来可应用于燕麦分子标记辅助育种及遗传变异研究。聚类及主成分结果表明不同燕麦种质间遗传关系与其地理来源具有一定相关性, 但皮裸性未表现出明显规律, 可能由于所选材料太少所致。研究结果可为燕麦种质改良及遗传多样性研究提供重要参考。

参考文献:

- [1] Gong W, Ju Z, Chai J, et al. Physiological and transcription analyses reveal the regulatory mechanism in oat (*Avena sativa*) seedlings with different drought resistance under PEG-induced drought stress [J]. *Agronomy*, 2022, 12: 1005.
- [2] Bibi H, Hameed S, Iqbal M, et al. Evaluation of exotic oat (*Avena sativa* L.) varieties for forage and grain yield in response to different levels of nitrogen and phosphorous [J]. *PeerJ*, 2021; 9, e12112.
- [3] Pieper R, Jha R, Rossnagel B, et al. Effect of barley and oat cultivars with different carbohydrate compositions on the intestinal bacterial communities in weaned piglets [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2008, 66(3): 556-566.
- [4] 齐冰洁. 燕麦种质资源遗传多样性研究 [D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2009.

- [5] Fu YB, Chong J, Fetch T, *et al.* Microsatellite variation in *Avenasterilis* oat germplasm [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2007, 114(60): 1029–1038.
- [6] 朱杰, 季杨, 罗丹, 等. 基于SSR分子标记的象草变异分析[J]. *四川农业大学学报*, 2023, 41(1): 68–74.
- [7] He X, Bjørnstad Å. Diversity of North European oat analyzed by SSR, AFLP and DArT markers [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2012, 125(1): 57–70.
- [8] Onyšk A, Boczkowska M. M13-Tailed simple sequence repeat (SSR) markers in studies of genetic diversity and population structure of common oat germplasm [J]. *Methods in Molecular Biology*, 2017, 1536: 159–168.
- [9] 高秋, 马金星, 王芳, 等. 燕麦SSR标记开发及其在品种指纹图谱构建中的应用[J]. *分子植物育种*, 2022, 20(9): 2957–2964.
- [10] 郭红媛, 贾举庆, 张仙红, 等. 燕麦EST-SSR标记的开发和利用[J]. *植物科学学报*, 2014, 32(3): 240–250.
- [11] 杨帆, 王照兰. 基于SSR分子标记的燕麦遗传多样性分析与异交率估算[J]. *分子植物育种*, 2024, 22(7): 2223–2232.
- [12] 樊文强, 盖红梅, 孙鑫, 等. SSR数据格式转换软件Data-Formater [J]. *分子植物育种*, 2016, 14(1): 265–270.
- [13] Zhang M, Bai X J. Genetic diversity of the Arctic fox using SRAP markers [J]. *Genetics and Molecular Research*, 2013, 12(4): 6176–6183.
- [14] Liu K, Muse SV. PowerMarker: an integrated analysis environment for genetic marker analysis [J]. *Bioinformatics*, 2005, 21(9): 2128–2129.
- [15] Ribeiro DO, Silva-Mann R, Alvares-Carvalho SV, *et al.* Genetic variability in *Jatropha curcas* L. from diallel crossing [J]. *Genetics and Molecular Research*, 2017, 16(2): gmr16029651.
- [16] Peakall R, Smouse PE. GenAlEx 6. 5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research— an update [J]. *Bioinformatics*, 2012, 28(19): 2537–2539.
- [17] 卓蕾, 向成丽, 肖杰, 等. SSR标记在植物种质资源鉴定的应用进展[J]. *现代园艺*, 2021, 44(15): 9–11.
- [18] Sraphet S, Boonchanawiwat A, Thanyasiriwat T, *et al.* SSR and EST-SSR-based genetic linkage map of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2011, 122(6): 1161–1170.
- [19] 张金鹏. 遗传作图群体中SSR基因型分型软件开发及杨树SSR遗传图谱构建[D]. 南京: 南京林业大学, 2022.
- [20] 白晓雷, 刘艳春, 生国利, 等. 35份皮燕麦种质遗传多样性的SSR和SRAP分析[J]. *内蒙古农业科技*, 2015, 43(04): 6–11.
- [21] 陈云, 闫伟红, 吴昊, 等. 干旱胁迫下老芒麦遗传多样性分析[J]. *草原与草坪*, 2014, 34(2): 11–17+22.
- [22] 赵慧琪, 李栋梁, 赵慧琳, 等. 海南岛火焰兰SSR标记开发、遗传多样性与群体结构分析[J]. *分子植物育种*, 2023, 21(7): 2300–2310.
- [23] 梁燕, 韩传明, 孙超, 等. 基于SSR标记的核桃种质资源遗传多样性与遗传结构分析[J]. *北方园艺*, 2022(9): 47–54.
- [24] 朱晓兰, 刘文辉, 颜红波, 等. 燕麦品种间杂交后代SSR遗传变异分析[J]. *青海大学学报(自然科学版)*, 2016, 34(1): 22–27.
- [25] 刘欢, 赵桂琴. 燕麦抗逆性研究进展[J]. *草原与草坪*, 2007, 27(6): 63–68.

Genetic diversity analysis of 20 oat germplasms

GONG Wen-long, LIN Dou-dou, SU Wei-juan, ZHAO Gui-qin*

(College of Grassland Science, Gansu Agricultural University, Key Laboratory for Grassland Ecosystem, Ministry of Education, Grassland Engineering Laboratory of Gansu Province, Sino-U. S. Centers for Grazing Land Ecosystem Sustainability, Lanzhou 730070, China)

Abstract: [Objective] It is important to understand the relative relationship among 20 oat (*Avena sativa*) germplasms. [Method] The genetic diversity of 20 oat germplasms were analyzed by using 8 pairs of SSR polymorphic

primers. **【Result】** The results showed that 44 allele variations were amplified, of which 40 were polymorphic loci, with an average of 5.5 loci per primer pair. The average polymorphism information content (PIC), average effective number of alleles, average Shannon index, average expected heterozygosity and average observed heterozygosity were 0.630 8, 3.052 4, 1.271 0, 0.673 1 and 0.552 1, respectively. The clustering results showed that the genetic similarity coefficient of 20 oat germplasms ranged from 0.14 to 1.00 and could be divided into 7 groups at the similarity coefficient of 0.59. Principal component analysis showed that the first three principal components accounted for 83.44% of the total variation. According to the first and second principal components, 20 germplasms could be divided into four groups, which were basically consistent with the clustering results. **【Conclusion】** The selected primers had high polymorphism and genetic diversity, and the genetic relationship between different oat germplasms was partially correlated with their geographical origin. The results could provide reference for genetic improvement and molecular breeding of oat.

Key words: oat; molecular marker; genetic diversity; simple repeat sequence

(责任编辑 康宇坤)