

# Analysis of Genetic Diversity with SSR Markers on Winter Barley Germplasm Resources in Tibet

Xia Meng<sup>1</sup>, Xingquan Zeng<sup>2</sup>, Qimei Wangmo<sup>2</sup>, Nima Tashi<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>College of Agriculture and Animal Husbandry, Tibet University, Linzhi Tibet

<sup>2</sup>Academy of Agriculture and Animal Husbandry, Lhasa Tibet

Email: 695775048@qq.com, \*ntashi@taaas.org

Received: Jun. 8<sup>th</sup>, 2017; accepted: Jun. 20<sup>th</sup>, 2017; published: Jun. 28<sup>th</sup>, 2017

---

## Abstract

In order to clarify the genetic diversity of the Tibetan winter barley germplasm resources, and provide bases for winter barley breeding, genetic diversity of 94 winter barley samples collected from Tibet were analyzed, based on the 32 pairs of SSR primers distributed in 7 chromosomes of barley. The results showed that, 115 polymorphic bands were detected from 32 pairs of primers totally, and in an average, every pair of primers had been amplified to be 3.6 polymorphic bands, which indicated that, the genetic basis of Tibet winter barley germplasm was wide, and multi different alleles existed, who owned a wealth of genetic diversities. Cluster analysis divided materials into six groups, and the sources of materials were independent to the related traits of SSR primer loci for study. There were no correlations between the source regions of materials and the clusters based on SSR polymorphism.

## Keywords

Tibet Winter Barley, SSR, Genetic Diversity

---

# 西藏冬青稞种质资源的SSR标记遗传多样性分析

孟霞<sup>1</sup>, 曾兴权<sup>2</sup>, 其美旺姆<sup>2</sup>, 尼玛扎西<sup>2</sup>

<sup>1</sup>西藏农牧学院, 西藏 林芝

<sup>2</sup>西藏农牧科学院, 西藏 拉萨

Email: 695775048@qq.com, \*ntashi@taaas.org

\*通讯作者。

收稿日期：2017年6月8日；录用日期：2017年6月20日；发布日期：2017年6月28日

## 摘要

为了明确西藏冬青稞种质资源的遗传多样性，并为冬青稞育种提供依据，利用分布于青稞7条染色体上的32对SSR引物对来自西藏的94份冬青稞材料的遗传多样性进行了分析。结果表明，32对引物共检测出115条多态性条带，平均每对引物扩增出3.6条多态性带，表明西藏冬青稞种质资源遗传基础较广，蕴藏着多种不同的等位基因，具有丰富的遗传多样性。聚类分析将材料分为六组，材料的来源于所研究的SSR引物位点相关性状具有独立性，基于SSR多态性的聚类与材料来源地区无相关性。

## 关键词

西藏冬青稞，SSR，遗传多样性

Copyright © 2017 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

大麦(*Hordeum vulgare* L.)是世界上古老的粮食兼饲料作物之一，具有重要的经济价值。中国近缘野生大麦是产于青藏高原及其周边地区的一年野生大麦，是我国青藏高原特有的宝贵遗传资源[1] [2] [3] [4]。研究西藏近缘野生大麦的遗传多样性不仅对于揭示栽培大麦的起源与进化问题，而且在保护大麦遗传资源，以及指导大麦育种方面都有重要的意义。

简单序列重复(simple sequence repeat, SSR)也称微卫星DNA (microsatellite DNA)，是一类由几个核苷酸(一般为1~6个)为重复单位组成的长达几十个核苷酸的串联重复序列[5]。其中重复单位数目及重复次数存在高度变异，而每个SSR两侧的序列一般是相对保守的单拷贝序列，根据两端序列的保守性，设计引物对基因组DNA进行PCR扩增，扩增产物经聚丙烯酰胺凝胶电泳分离获得扩增指纹图，分析微卫星序列多态性，从而揭示样本间的遗传多样性[4]。该标记具有多态性高、重复性好等优点，因此被作为分子标记广泛应用于遗传多样性分析、遗传图谱的构建及亲缘关系鉴定等方面[4]。

本研究从青稞7对染色体的不同位置随机选取了46对SSR引物，对94份不同的大麦品种进行遗传多样性分析，并从中筛选出能扩增出有效多态性的32对引物进行最终分析，探讨西藏近缘野生大麦的遗传多样性，为小麦相关研究提供分子水平上的理论依据。

## 2. 材料与方法

### 2.1. 材料

供试材料共94份，其中73份由西藏农牧科学院提供的，21份是林芝、昌都两地区收集的当地种植的冬青稞品种。

### 2.2. SSR引物

从Liu等(1996) [6]发表的大麦7个不同的连锁群上随机选取46对SSR引物。产生多态性带的32对

SSR 引物的名称和序列见表 1。引物由上海英俊生物技术有限公司合成。

### 2.3. 大麦基因组 DNA 的提取

每份大麦材料取幼苗叶片约 0.3 g 置于 1.5 mL 离心管中，加入液氮研磨成粉末，采用 CTAB-氯仿抽提法提取 DNA：取研磨好的样品，每管加入 600  $\mu$ L 提取缓冲液(100 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA- $\text{Na}_2$ , 100 mM NaCl, 1.5%CTAB, 2%巯基乙醇)，65 $^{\circ}$ C 水浴中温育 30~60 min，其间轻轻颠倒混匀 3~4 次，用 600  $\mu$ L 苯酚：氯仿：异戊醇(25:24:1)抽提 10 min，10,000 rpm 离心 10 min，取上清液加入等体积的氯仿：异戊醇(24:1)重复上述抽提过程，取上清液加入 2 倍体积的预冷无水乙醇沉淀 DNA，用牙签将絮状 DNA 沉淀挑出，用 75%乙醇洗涤 2 次，无离子水稀释。用紫外分光光度计测定 DNA 含量。

**Table 1.** Name and series of 32 pairs of SSR primers

**表 1.** 32 对 SSR 引物名称及序列

| 引物名称       | 正向引物                      | 反向引物                        |
|------------|---------------------------|-----------------------------|
| SCSSR02748 | GGTGCAATTTGGAAGTCTAGG     | ATAGCAAGTGCCAAGTGAGC        |
| SCSSR04163 | GAAGAAACAACCCAACCTCC      | AGGATCGTACGAAGAACAGC        |
| SCSSR08238 | CAGCAGCAGATCAAATCAGG      | TACTCTTCTCTTGGCCTTGG        |
| SCSSR10477 | AGAGCAATGAGCTCCTACCC      | GCTTACTCGCTCGTTTAGTCG       |
| GBM1204    | ATGATCCCACAACACCAACA      | TGCATGCTATCGTTCCTGTC        |
| SCSSR00334 | CAAACAGCCACTGTCTAGC       | AGGGCGAGGTAGATGACG          |
| SCSSR02236 | TTCCTGCTAGTTTGCTAATCG     | TGGCGAGGAAGTAGAAGAGG        |
| SCSSR12344 | TTCCTTCCCTCTTTCTTTC       | AATTTACTGCATATCTTGTTCATATTG |
| GBM1208    | CTACCGAGCTCCTCCTCCTC      | GGCCTCCTTCTTGTCTGTAGA       |
| Bmac0126   | TTACTCACATAAGAACATTTACACA | GTAGTTTCCCGAGTCATACTG       |
| SCSSR10559 | CATTTCCTCTCCCTTGC         | CTCACCTCTGCCGATCC           |
| SCSSR25691 | ACGAGCTGATATCCCACGAG      | TCCGAGCTTCTTATCTTTGG        |
| GBM1280    | CTTCTTCTTCTTGTGGGGCG      | AAGGGATCAGTTTGGTTCCC        |
| GBM1420    | GGATCTCCCCATTCTTCAC       | TTTCTGGTCTTTGATTCCG         |
| Bmag0023   | AACACAGACCTACGGGTC        | CATGAGATAGATCCAAGCAC        |
| GBM1221    | ACCAGCAATCCAAGTTACGG      | TGCCTTGGTCTTGGTGTGTA        |
| GBM1252    | GCACGAGGGGTATAAGTCCA      | GACGTTGAGAGCCGAGGA          |
| SCSSR14079 | AAAATAAGGTTTCTTGTCTTGG    | GAAACCCTGTGAAGTACGG         |
| SCSSR02306 | TGCCTTGTTTATGTAATATCTTGTG | GGCGTAAATAAGAGTGTCTTCAG     |
| SCSSR03907 | CTCCATCACACCATCTGTC       | GACATGGTTCCTTCTTCTTC        |
| SCSSR05939 | TCATTGGGCTCTTCTACGG       | GCAAACCGGACTAAGTATGC        |
| SCSSR09041 | CATGTCAGTGGGGTTCTAGC      | CATGTCAGTGGGGTTCTAGC        |
| SCSSR10148 | AAGCAGCAAAGCAAAGTACC      | TCATCAGCATCTGATCATCC        |
| SCSSR15334 | GGGAGCCGTAAGTAAGAACC      | CGACCTCTGAATCTCAAATCC       |
| SCSSR02093 | CGTCACGCACACATCGAC        | GATCTCTCCTCGGGCATC          |
| SCSSR05599 | TTCCATCATAACAGCAATGG      | TTCGTGCAAGGTATGTAGG         |
| SCSSR09398 | AGAGCGCAAGTTACCAAGC       | GTGCACCTCAGCGAAAGG          |
| GBM1275    | TCTTCTGCTGTGGGTCTGTC      | CACATCCAGTCGCACAACCT        |
| GBM1297    | CGCCTTATTTCATCCATCCAT     | GTTCCGGAAGGTGATCAAGA        |
| GBM1303    | TCTTTTGGAGGGGTTTCTC       | ATCATCTTACGCTTCTCCTC        |
| GBM1419    | CGTCACGCCACTCACCTC        | CTTGAAGTCGGAACCCATGT        |
| Bmac0064   | CTGCAGGTTTCAGGAAGG        | AGATGCCCGCAAAGAGTT          |

## 2.4. SSR 扩增及聚丙烯酰胺凝胶电泳

PCR 反应总体积为 10  $\mu\text{L}$ ，其中包括 1  $\mu\text{L}$  dNTPs (200  $\mu\text{mol/L}$ )，1  $\mu\text{L}$  10  $\times$  PCR Buffer (100 mmol/L Tris-HCl (pH 8.5))，1  $\mu\text{L}$   $\text{MgCl}_2$  (2.5 mmol/L)，20 ng 模板 DNA，0.5 U rTaq DNA 聚合酶，SSR 引物(2  $\mu\text{mol/L}$ ) 1  $\mu\text{L}$ ，加水至 10  $\mu\text{L}$ 。

PCR 反应程序为：94 $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min；95 $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s，56 $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s，72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 30s，共 35 个循环；最后一个循环结束后，在 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。

SSR 扩增产物用 8% 非变性聚丙烯酰胺(丙烯酰胺与甲叉双丙烯酰胺比例为 39:1)凝胶电泳分离，0.1% 硝酸银染色。

## 2.5. 数据统计分析

对筛选出的具有多态性的引物，统计相同迁移率位置上的 SSR 扩增产物，扩增条带存在时赋值为 1，否则赋值为 0。标准遗传距离(Genetic Distance, GD)计算公式为： $\text{GD} = -\ln[2N_{ij}/(N_i + N_j)]$  [7]，其中  $N_i$  和  $N_j$  分别为 i 和 j 两材料的总条带数， $N_{ij}$  为 i 和 j 两材料的共有条带数。遗传相似性聚类分析采用 UPGMA 方法(Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Mean，算术平均非加权组法)。

## 3. 结果与分析

### 3.1. SSR 分子标记多态性

本研究选取了分布于大麦 7 个染色群上的 46 对 SSR 引物对来自中国西藏的 94 份不同的冬青稞材料进行 PCR 扩增，其中 32 对能扩增出多态性 DNA 片段并且有很好的重复性，并最终用于遗传多样性分析。所用的 32 对引物共检测出 115 条多态性条带，平均每对引物扩增出 3.6 条多态性带。其中 SCSSR09398、Bmac0126、SCSSR03907、Bmac0064 这 4 对引物均检测出 6 条多态性带，为其中多态性较高的位点。SCSSR02093、SCSSR08238、GBM1252、GBM1419、SCSSR12344 等 8 对引物检测出的多态性条带数最少，均只检测出 2 条多态性条带。32 对引物分别检测出的多态性条带数目见表 2。图 1 为引物 SCSSR09398 对其中 94 份大麦材料的基因组 DNA 经 PCR 扩增后聚丙烯酰胺凝胶电泳的结果。

### 3.2. 聚类分析

为了确定 94 份大麦材料基因型间的遗传关系，利用 SSR 遗传距离矩阵按 UPGMA 方法进行了聚类分析，构建了各供试基因型的亲缘关系图(图 2)。

由图 2 可知，第一组 1 份材料，是亲本 23；第二组 4 份材料，分别是亲本 54、亲本 56、亲本 26、亲本 12。第三组包含了 87 份材料，其中 57 份是冬青稞亲本种质，30 份是收集来的冬青稞种质资源；第四组包含了来自拉萨 72 份，占该材料的 76.60%，占拉萨材料的 91.14%，林芝 12 份，昌都 3 份。第五组一份材料，是亲本 15。第六组包含了 2 份材料，分别是亲本 41 和亲本 44。

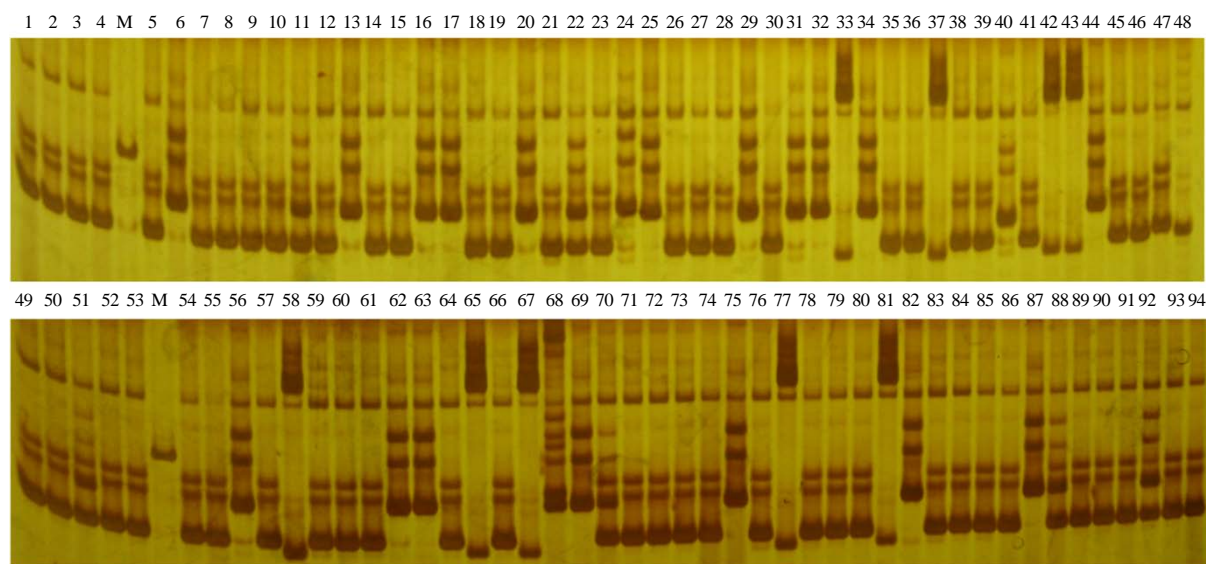
另外，在 94 份材料中，25 份育成品种全部分布在第 III 组。本实验选择的 46 对引物能较好地将供试材料区分，以上结果表明，品种来源与所研究的 SSR 引物位点相关性状具有独立性，基于 SSR 多态性的聚类与材料来源地区无相关性。

## 4. 讨论

本研究所选用的 46 对 SSR 引物中，有 14 对引物在 94 份材料中没有扩增出多态性条带，其他 32 对引物都扩增出了多态性带。表明所选标记位点存在丰富的变异，充分说明西藏冬青稞遗传基础较广，蕴藏着多种不同的等位基因，具有丰富的遗传多样性，可为冬青稞重要性状遗传特性、基因资源挖掘和品

**Table 2.** The chromosome locations of 32 pairs of SSR primers and the amplification results  
**表 2.** 32 对 SSR 引物所在染色体及其扩增结果

| 引物名称       | 检测出的多态性条带数目 | 所在染色体 | 引物名称       | 检测出的多态性条带数目 | 所在染色体 |
|------------|-------------|-------|------------|-------------|-------|
| SCSSR02748 | 3           | 1H    | GBM1252    | 2           | 4H    |
| SCSSR04163 | 4           | 1H    | SCSSR14079 | 2           | 4H    |
| SCSSR08238 | 2           | 1H    | SCSSR02306 | 3           | 5H    |
| SCSSR10477 | 7           | 1H    | SCSSR03907 | 6           | 5H    |
| GBM1204    | 3           | 1H    | SCSSR05939 | 2           | 5H    |
| SCSSR00334 | 3           | 2H    | SCSSR09041 | 5           | 5H    |
| SCSSR02236 | 4           | 2H    | SCSSR10148 | 4           | 5H    |
| SCSSR12344 | 2           | 2H    | SCSSR15334 | 5           | 5H    |
| GBM1208    | 3           | 2H    | SCSSR02093 | 2           | 6H    |
| Bmac0126   | 6           | 2H    | SCSSR05599 | 3           | 6H    |
| SCSSR10559 | 3           | 3H    | SCSSR09398 | 6           | 6H    |
| SCSSR25691 | 3           | 3H    | GBM1275    | 3           | 6H    |
| GBM1280    | 3           | 3H    | GBM1297    | 3           | 7H    |
| GBM1420    | 5           | 3H    | GBM1303    | 5           | 7H    |
| Bmag0023   | 2           | 3H    | GBM1419    | 2           | 7H    |
| GBM1221    | 3           | 4H    | Bmac0064   | 6           | 7H    |

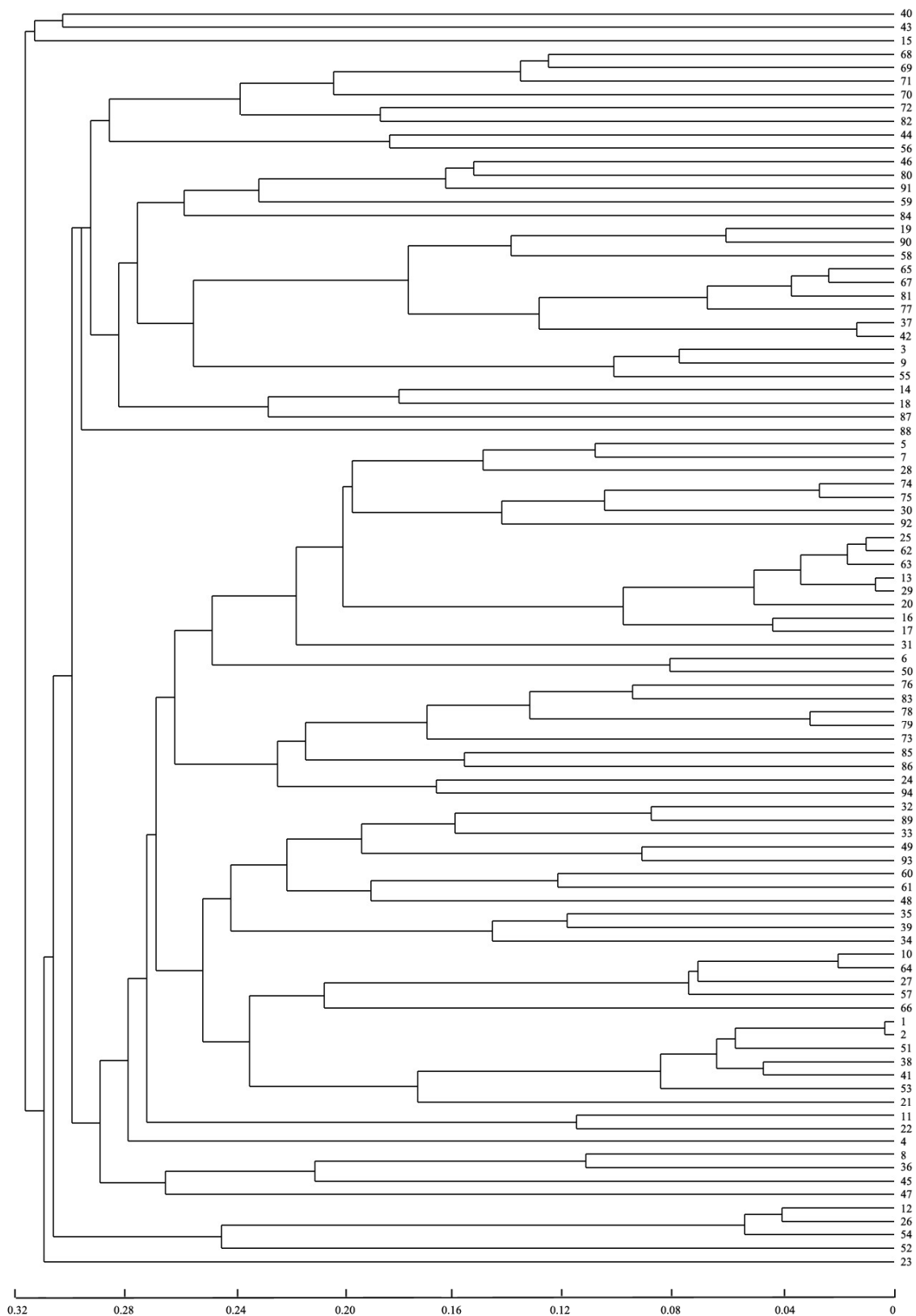


**Figure 1.** DNA amplification of SSR primer SCSSR09398 for 94 barely genomes

**图 1.** SSR 引物 SCSSR09398 对 94 份大麦基因组 DNA 的扩增结果

种选育等方面的研究提供参考。

聚类图显示了不同材料间的遗传距离，通过聚类分析将 94 份冬青稞材料分成 5 组，不同生态区参试材料 SSR 遗传多样性不同。拉萨是冬青稞遗传多样性最丰富的地区。另外育成品种全部分布在同一组群，可看出育成品种间的遗传距离较近，遗传基础较窄。说明冬青稞育种中加强亲缘关系更远的材料进行杂交组配使用，加强不同地区间资源的交换和基因交流，有利于拓宽冬青稞材料的遗传背景，以培养出变异类型更丰富的后代群体，选育新品种。



**Figure 2.** Genetic clustering diagram for the SSR marks of 94 Highland barley  
**图 2.** 94 份青稞材料 SSR 标记的遗传聚类图

## 基金项目

科技厅。

## 参考文献 (References)

- [1] 胡颂杰. 西藏农业概论[M]. 第一版. 四川: 科学技术出版社, 1995: 345-428.
- [2] 马得泉. 中国西藏大麦遗传资源[M]. 第一版. 北京: 中国农业出版社, 2002.
- [3] 张亲. 两个大麦新矮秆基因的 SSR 标记[J]. 植物遗传资源学报, 2004, 5(2): 105-109.
- [4] 冯宗云, 张义正, 张立立, 凌宏清. 应用微卫星标记研究西藏野生二棱大麦的遗传多样性及地理分化[J]. 高技术通讯, 2003, 13(10): 46-53.
- [5] Russell, J.R., Fullr, J.D., Macaulay, M., *et al.* (1997) Direct Comparison of Levels of Genetic Variation among Barley Accessions Detected by RFLPs, AFLPs, SSRs and RAPDs. *Theoretical and Applied Genetics*, **95**, 714-722.
- [6] Liu, Z.W., Biyashev, R.M. and Saghai Maroof, M.A. (1996) Development of Simple Sequence Repeat DNA Markers and Their Integration into a Barley Linkage Map. *Theoretical and Applied Genetics*, **93**, 869-876.
- [7] Nei, M. (1973) Analysis of Gene Diversity in Subdivided Populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **70**, 3321-3323.

### 期刊投稿者将享受如下服务:

1. 投稿前咨询服务 (QQ、微信、邮箱皆可)
2. 为您匹配最合适的期刊
3. 24 小时以内解答您的所有疑问
4. 友好的在线投稿界面
5. 专业的同行评审
6. 知网检索
7. 全网络覆盖式推广您的研究

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: [hjas@hanspub.org](mailto:hjas@hanspub.org)