

研究  
简报

## 西藏主要农区青稞品种的遗传多样性分析

孟凡磊<sup>1</sup> 强小林<sup>2</sup> 余奎军<sup>1</sup> 唐亚伟<sup>2</sup> 胡银岗<sup>1,3,\*</sup>

(<sup>1</sup>西北农林科技大学农学院,陕西杨凌 712100; <sup>2</sup>西藏自治区农牧科学院青稞研究与发展中心,西藏拉萨 850032; <sup>3</sup>陕西省农业分子生物学重点实验室,陕西杨凌 712100)

**摘要:**采用内含子切接点引物(intron-splice junction primer)和长随机引物的PCR分子标记方法,对来自西藏主要农区的29个青稞育成品种和3个农家种的遗传多样性进行了分析。结果表明,选用的5个引物共扩增出稳定清晰的条带39条,其中26条(66.7%)为多态性条带。根据PCR扩增的条带建立[1,0]型数据矩阵,应用NTSYSpc2.1数据分析软件计算各品种间的遗传相似系数,并据此进行聚类分析,结果表明,西藏主要农区青稞品种间有一定的遗传差异,但总体遗传差异较小,遗传基础相对狭窄;聚类结果与各品种的实际生产利用情况较为接近,可以反映出这些青稞品种较为明显的区域特征。

**关键词:**青稞;种质资源;遗传多样性;聚类分析

## Genetic Diversity Analysis among Hulless Barley Varieties from the Major Agricultural Areas of Tibet

MENG Fan-Lei<sup>1</sup>, QIANG Xiao-Lin<sup>2</sup>, SHE Kui-Jun<sup>1</sup>, TANG Ya-Wei<sup>2</sup>, and HU Yin-Gang<sup>1,3,\*</sup>

(<sup>1</sup> College of Agriculture, Northwest Sci-Tech University of Agricultural and Forest, Yangling 712100, Shaanxi; <sup>2</sup> Hulless Barley Research and Development Center, Tibet Academy of Agriculture and Animal Husbandry Sciences, Lhasa 850032, Tibet; <sup>3</sup> Shaanxi Provincial Key Laboratory of Molecular Biology for Agriculture, Yangling 712100, Shaanxi, China)

**Abstract:** To investigate the genetic diversity among hulless barley (*Hordeum vulgare* var. *nudum* Hook. f.) varieties in the major agricultural areas of Tibet and to promote the efficient utilization of those varieties, the genetic diversity among 29 hulless barley varieties and 3 landraces from those areas were analyzed using PCR with intron-splice junction primers and long random primers. The results indicated that 39 distinct PCR bands in total were amplified using 5 primers selected, and 26 of them were polymorphic. A [1, 0] data matrix was established based on the PCR patterns, and the genetic similarity coefficients among those cultivars were calculated using Dice's index of NTSYSpc 2.1 software. Cluster analysis of the hulless barley varieties was then conducted based on the genetic similarity coefficients using UPMGA method of the same software. The result showed that there were some diversities among those hulless barley cultivars, but in general, their genetic differences were less and the genetic distances were relatively narrow; and the dendrogram obtained from cluster analysis could reflect the distribution and the geographic characteristics of those cultivars clearly.

**Keywords:** Hulless barley (*Hordeum vulgare* var. *nudum* Hook. f.); Germplasm resource; Genetic diversity; Cluster analysis

青稞(*Hordeum vulgare* var. *nudum*, 2n = 14)又称裸大麦,是一种具有几千年历史的古老栽培作物,目前主要集中分布在我国青藏高原地区、北非高原、南美安第斯高原及俄罗斯的考克萨斯等山区<sup>[1]</sup>。青稞在多数国家和地区主要用作饲料,而在我国青藏高原地区,占总人口50%以上的藏族居民

都以青稞为主食<sup>[2]</sup>。西藏全区常年青稞种植面积为21~22万hm<sup>2</sup>,占粮食作物总面积的60%以上;总产量60万t左右,占粮食总产量的61%~63%。近年来,研究证明青稞在酿酒、保健食品、再生能源等方面具有很大的开发潜力<sup>[3]</sup>。分子标记技术已成为研究作物品种遗传多样性的重要手段之

基金项目:中国科学院-西藏自治区院区合作知识创新工程试点项目(2005-09)

作者简介:孟凡磊(1982-),硕士研究生,研究方向为麦类分子遗传育种。E-mail: mengfanlei1982@yahoo.com.cn

\* 通讯作者(Corresponding author):胡银岗(1967-),副教授,博士生导师,研究方向为作物分子遗传育种。E-mail: huyingang@nwau.edu.cn

Received (收稿日期): 2006-12-30; Accepted (接受日期): 2007-05-11.

—<sup>[4-7]</sup>,但是在青稞上还少有报道。利用内含子切接点引物(intron-splice junction primer)和长随机引物的PCR分子标记技术进行遗传多样性研究,已广泛应用于野生大麦、玉米、酵母等物种,并取得了较好的结果<sup>[8-10]</sup>。本研究采用这一技术对29个青稞育成品种或品系和3个农家种的遗传多样性进行了分析,并结合聚类结果对这些品种的布局等进行了探讨,以促进其在西藏农业生产和品种改良中的合理利用。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

藏南河谷地带(主要包括日喀则、拉萨和山南3个地市)20世纪70年代以来选育的29个青稞品种或品系及2个拉萨和1个日喀则地区的地方品种(表1),由西藏农牧科学院青稞研究与发展中心提供,于2004年10月30日播于陕西杨

凌的西北农林科技大学农作一站,次年春天返青后取幼嫩叶片,液氮速冻,提取基因组DNA。

### 1.2 DNA 提取

按照Song等<sup>[8]</sup>的方法提取青稞基因组DNA。采用紫外分光光度法和琼脂糖凝胶电泳对提取的基因组DNA的质量和浓度进行检测,并根据检测结果将DNA样品的浓度调至50 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ 。

### 1.3 PCR 扩增与产物检测

采用Song等<sup>[11]</sup>设计的内含子切接点引物和长随机引物,分别为B1:5'-GAGCCCAGAACGACGCCG-3',E2:5'-GGAATTCCACGTCCA-3',E4:5'-GAATTCCAGCCTGCA-3',L1:5'-ACCAACTTCAGCCTGGTTAAG-3',R1:5'-TCCCTGGCTGACTTC ACTG-3',由上海生物工程有限公司合成。

表1 参试的西藏主要农区的青稞品种及其特性  
Table 1 Hulless barley varieties used in the experiment and their characteristics

品种 Variety	育成年代 Year released	品种类型 Variety type	产量潜力 Yield potential ( $\text{kg hm}^{-2}$ )	应用情况 Application
拉萨沟芒 LSGW	1960s	中熟,抗寒	≥1 500	农家中选出,1970年在拉萨局部种植
拉萨紫青稞 LSZQK	1960s	中熟,抗旱,耐瘠	≥1 500	农家中选出,1970年在拉萨局部种植
喜玛拉2号 XML2	1960s	中晚熟,抗旱,耐瘠	≥1 500	传统农家种,20世纪60—70年代在日喀则种植
藏青7239 ZQ7239	1970s	早中熟,耐瘠	≥3 000	1980年前后在日喀则、拉萨等地种植
藏青1号 ZQ1	1970s	晚熟,丰产	≥3 000	1980年前后在拉萨等地种植
喜玛拉4号 XML4	1970s	中熟,耐旱,耐瘠	≥2 250	20世纪70—80年代区内种植
喜玛拉6号 XML6	1970s	抗倒,多病	≥5 250	20世纪80年代在日喀则、拉萨、山南局部种植
喜玛拉8号 XML8	1970s	抗倒,多病	≥5 250	20世纪80年代在日喀则、拉萨、山南零星种植
喜玛拉9号 XML9	1970s	不详	不详	在日喀则地区零星种植
藏青21 ZQ21	1970s	中晚熟,抗旱	≥3 000	20世纪70—80年代在日喀则东部种植
喜玛拉42 XML42	1970s	不详	不详	1980年前后在日喀则地区局部种植
藏青3号 ZQ3	1985	中晚熟	≥3 000	1985年前后在山南零星种植
藏青320 ZQ320	1985	中熟,耐旱,抗病	≥4 500	育成后逐步在全区推广,应用至今
春青稞78 CQK78	1985	中熟,优质	≥4 500	不详
喜玛拉10号 XML10	1985	中晚熟,较抗倒	≥4 500	20世纪80年代在日喀则及拉萨、山南局部种植
喜玛拉15 XML15	1987	中晚熟,耐旱,耐寒	≥4 500	20世纪80年代在日喀则零星种植
喜玛拉16 XML16	1987	中晚熟,抗倒	≥6 000	不详
藏青80 ZQ80	1989	晚熟	≥6 000	20世纪90年代初在区域内高产田种植
藏青85 ZQ85	1989	晚熟	≥6 750	20世纪90年代初在拉萨等地高产田种植
山青7号 SQ7	1989	早中熟	≤4 500	20世纪80年代后期在山南局部种植
喜玛拉19 XML19	1992	中晚熟,耐旱	≥4 500	20世纪90年代中期以来在日喀则等地局部种植
藏青148 ZQ148	1992	中晚熟	≥6 000	20世纪90年代在拉萨周边大面积应用
藏青311 ZQ311	1996	中晚熟	≥6 000	正在拉萨、日喀则、山南等地推广
藏青3179 ZQ3179	1996	中早熟	≥6 000	正在拉萨、那曲等地推广
春青稞90 CQK90	1998	中熟,耐旱	≥5 250	不详
藏青25 ZQ25	1998	中熟偏晚,优质	≥6 750	正在拉萨周边推广
QB01	1998	中晚熟,抗病,抗倒	≥6 750	2000年前后在拉萨、山南、日喀则高产田种植
QB02	1998	中晚熟	6 000	不详
QB09	1998	中晚熟,耐旱较耐瘠	≥6 000	不详
QB24	1998	中熟,耐旱,耐寒	≥6 000	2000年后在拉萨周边寒旱地种植
QB16	2002	中熟,耐寒	≥6 000	不详
QB28	2002	中晚熟,优质	≥6 000	不详

PCR体系20 μL,含10×PCR buffer 2.0 μL、2.0 mmol L<sup>-1</sup>dNTPs 2.0 μL、25 mmol L<sup>-1</sup>MgCl<sub>2</sub> 1.5 μL、20 μmol L<sup>-1</sup>引物0.2 μL、5 U Taq聚合酶0.2 μL、ddH<sub>2</sub>O 13.1 μL,DNA模板1.0 μL。PCR试剂购自TaKaRa公司。反应程序为94℃预变性2 min;94℃1 min,40℃108 s,72℃2 min,5个循环;94℃1 min,58℃90 s,72℃2 min,28个循环;72℃延伸5 min;4℃保存<sup>[11]</sup>。扩增反应在MJ research PTC-200 PCR仪上进行。

扩增产物中加入6×上样缓冲液4.0 μL,进行2.0%琼脂糖凝胶电泳。电泳缓冲体系为1×TAE溶液,电压为5 V cm<sup>-1</sup>,电泳1.5 h,EB染色,利用SYNGENE GENIUS凝胶成像系统观察并照相。

#### 1.4 数据分析

按照在2次重复扩增中均能稳定扩增的条带在同一电泳迁移位置上的有无,有扩增条带记为1,没有扩增条带记为0,构建[1,0]二元数列矩阵<sup>[12]</sup>。然后利用NTSYSpc2.1数据分析软件的相似性分析模块Qualitative的Dice法计算遗传相似系数,进一步采用该软件的聚类分析模块SAHN的非加权的平均数法(UPMGA)进行聚类分析<sup>[13-15]</sup>,并构建聚类图。采用该软件的聚类分析模块Cophenetic Values计算得其相应矩阵,然后利用该软件作图模块Matrix Comparison Plot校验聚类分析结果。

## 2 结果与分析

### 2.1 PCR扩增的多态性

采用的5条内含子切接点引物和长随机引物,均能在所有青稞材料中扩增出条带,且扩增条带稳定性较好,共计扩增出39条条带,其中多态性条带26条,占总数的66.7%。各引物扩增出的多态性条带数由1~8条不等,其中引物E4扩增出的6条带均为多态性条带,引物R1扩增出的多态性条带为8条。

### 2.2 青稞品种的遗传相似性分析

从品种间遗传相似系数可以看出,喜玛拉2号、拉萨钩芒和拉萨紫青稞三者间遗传差异较大,其相似系数变幅为0.216~0.400,反映出这3个农家种来源于长期封闭的不同种植环境。其中拉萨钩芒、喜玛拉2号与其他品种或品系间的差异最大,遗传相似系数的变幅分别为0.162~0.444和0.178~0.462,表明这两个农家种在青稞育种中的利用并不充分。另一个地方品种拉萨紫青稞与育成品种或品系间的遗传相似系数的变幅为0.400~0.867,平均值为0.799,通过对相关品种的系谱分析,发现这些育成品种或品系都有或多或少的拉萨紫青稞血统<sup>[16-18]</sup>。育成品种或品系间的遗传相似性变幅在0.400~0.941,平均为0.757,表明西藏主要农区的29个品种或品系间存在一定的遗传差异,但总体上遗传差异较小。

### 2.3 青稞品种的聚类分析

对构建的西藏青稞品种的聚类图(图1)进行校验得到的

符合系数为0.932,表明构建的聚类图与获得的数据具有较高的符合度。当遗传相似系数为0.78时,29个品种分为4大类,第Ⅰ类包括藏青25等14个品种(I),第Ⅱ类包括藏青1号等5个品种(II),第Ⅲ类包括喜玛拉10号等5个品种(III),第Ⅳ类包括藏青80等在主聚类区外的8个青稞品种(IV)。

结合表1可以看出,第Ⅰ类的青稞品种可以反映藏南河谷地区青稞主要栽培品种的特征,品种间的遗传相似系数平均值为0.836。其中,除了拉萨紫青稞和喜玛拉9号外,都是在该区生产上大面积种植的主要品种,产量潜力较好,适应范围较广,是不同时期在藏南河谷的日喀则、拉萨和山南等地大面积推广的品种。这些品种又可以分为3个亚类。第Ⅰ亚类包括QB25、春青稞90、藏青320和农家种拉萨紫青稞,这三个育成品种的系谱中都间接地与农家种拉萨紫青稞有关,均表现中熟、耐旱等特性。第Ⅱ亚类包括藏青85、QB28、藏青311、喜玛拉9号,其中除喜玛拉9号情况不详外,其他3个品种都表现晚熟或中晚熟,喜肥水的特性。第Ⅲ亚类包括藏青3179、藏青7239、藏青148、QB02、QB01,这5个品种,除藏青7239是19世纪70年代选育的外,其他4个品种均为20世纪90年代末期选育的品种,而且藏青7239是这4个品种亲本的亲本<sup>[16-18]</sup>。

第Ⅱ类的5个品种藏青1号、藏青21号、藏青3号、QB09和QB24,品种间的遗传相似系数平均值为0.874。这一类品种实际上是该区的主要搭配品种,主要在该区偏高寒偏旱农区的中低产田利用,多表现中熟或中熟偏晚,藏青系列的3个品种聚为一类,其中藏青1号和藏青21是20世纪70年代到80年代在该区旱地广泛种植的品种,QB09和QB24聚为另一类,是20世纪末选育的新品种,较为耐旱、耐寒。

第Ⅲ类包括5个品种,品种间的遗传相似系数平均为0.828,其中喜玛拉6号、喜玛拉10号、喜玛拉15、喜玛拉16这4个品种是日喀则农科所20世纪70—80年代选育的,在本地区推广的同时也在其他地区局部种植,适于该区一些特殊的环境条件,QB16则是由西藏农牧科学院青稞研究与发展中心新选育的针对日喀则地区寒旱环境的品种,在全区试验后被列为该区偏高寒农区的适宜推广品种。

第Ⅳ类的8个品种间的遗传相似系数较小,其中喜玛拉2号和拉萨钩芒为2个农家种;喜玛拉4号、喜玛拉8号和喜玛拉42为20世纪70年代选育的品种;山青7号、藏青80和喜玛拉19为90年代前后选育的品种,适应范围均较小,推广种植中区域限制明显。

根据以上分析,我们可以看出,西藏主要农区青稞品种间的遗传相似系数较大,遗传距离较近,特别是广泛应用的主栽品种间的遗传距离相对较近;聚类结果与表1中各品种的实际生产利用情况较为接近,可以反映出它们较为明显的区域特征。

## 3 讨论

分子标记技术是从分子水平研究物种间、品种间和品种

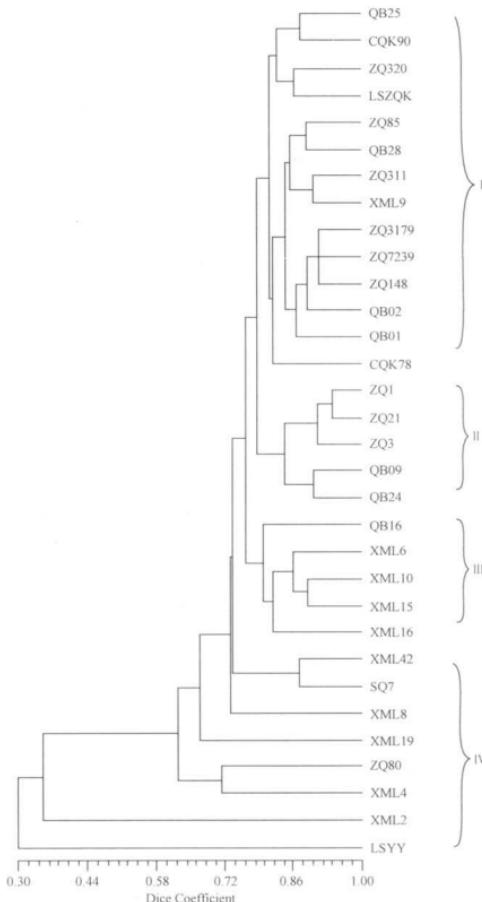


图 1 西藏主要农区青稞品种聚类图

Fig.1 Dendrogram of hulless barley from major production regions of Tibet based on PCR patterns

内遗传多样性的有效工具。Hou 等<sup>[19]</sup>对我国西部地区 44 个地点的 46 个大麦种质材料,包括 27 个品种和 19 个野生种,采用 RAPD 和 ISSR 标记进行了分析,其中涉及了来自四川的 11 个青稞材料和甘肃的 2 个青稞材料。洪棋斌等<sup>[20]</sup>应用 RAPD 标记对四川甘孜州农科所的 44 个青稞材料的遗传背景进行了分析,将其分为 3 大类,并发现聚类结果可以较好地反映这些材料的地理起源。本研究紧密结合青稞育种和生产利用的实际,对我国西藏主要农区青稞品种的遗传多样性进行研究,以服务于西藏青稞品种的选育与合理利用。

本研究采用内含子切接点引物和长随机引物的 PCR 分子标记技术对我国西藏主要农区的青稞品种的遗传多样性

进行了分析,表明西藏主要农区的青稞品种有着一定的遗传多样性,但品种间的遗传距离较近,西藏青稞育成品种的基因来源相对狭窄,提醒我们在青稞的育种中应该进一步拓宽育种的遗传资源,使育成品种的适应性更为广泛,性状更符合生产的需要。聚类结果可以较好地反映西藏主要农区品种的区域特征,对这些品种在育种和生产实践中的合理利用有一定的指导意义。

#### References

- [1] Lu L-S(卢良恕). Barley in China (中国大麦学). Beijing: China Agricultural Press, 1996. pp 4-11 (in Chinese)
- [2] Gou A-C(苟安春). Know the importance of the production of highland barley again. Barley Sci (大麦科学), 2004, (3): 6-9 (in Chinese)

- with English abstract)
- [3] Gou A-C(苟安春), Li L-L(李良). The product development of highland barley has bright prospects. *Barley Sci* (大麦科学), 2004, (4): 40-44 (in Chinese with English abstract)
- [4] Mohammadi S A, Prasanna B M. Analysis of genetic diversity in crop plants—salient statistical tools and considerations. *Crop Sci.*, 2003, 43: 1235-1248
- [5] Wang X-D(王小德), Ma J(马进), Zhang W-R(张万荣). Studies on plant biodiversity conservation and construction planning in green space of Quzhou City. *J Zhejiang Univ (Agric & Life Sci Edn)* (浙江大学学报·农业与生命科学版), 2005, 31(4): 439-444 (in Chinese with English abstract)
- [6] Khlestikina E K, Huang X Q, Quenham F J B, Chebotar S, Roder M S, Borner A. Genetic diversity in cultivated plants—loss or stability? *Theor Appl Genet.*, 2004, 108: 1466-1472
- [7] Yang H(杨华), Liu Z-C(刘壮长), Chen H-R(陈海荣), Chen L(陈亮), Luo L-J(罗利军). Genetic diversity analysis based on SSR markers of Brassica vegetable germplasm distributed in Shanghai. *J Plant Genet Resour* (遗传资源学报), 2006, 7(3): 264-269 (in Chinese with English abstract)
- [8] Song W, Langridge P. Identification and mapping polymorphism in cereals based on polymerase chain reaction. *Theor Appl Genet.*, 1991, 82: 209-216
- [9] Rafalski A, Gidzinska M, Wiñiewska I. PCR-based systems for evaluation of relationships among maize inbreds. In: Tsafaris A ed. *Genetics, Biotechnology and Breeding of Maize and Sorghum*. Royal Soc. Chem., Cambridge, UK, 1997. pp 106-111
- [10] de Barros L M, Soden A, Henschke P A, Langridge P. PCR differentiation of commercial yeast strains using intron splice site primers. *Appl Environ Microbiol.*, 1996, 62: 4514-4520
- [11] Song W, Henry R. Molecular analysis of the DNA polymorphism of wild barley (*Hordeum spontaneum*) germplasm using the polymerase chain reaction. *Genet Resour Crop Evol.*, 1995, 42: 273-280
- [12] Nei M, Li W. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 1979, 76: 5269-5273
- [13] Rohlf J F. *NTSYSpc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*. Version 2.1, Users Guide. Exeter Software, Setauket, New York, 2000
- [14] Cai J(蔡健), Lan W(兰伟), Luo R-L(罗瑞丽), Li F-T(李飞天), Wen F(闻峰). Genetic diversity detected by cluster analysis north of Anhui major wheat cultivars. *Chin Agric Sci Bull* (中国农学通报), 2006, 22(11): 143-146 (in Chinese with English abstract)
- [15] Gao J(高洁), Qi X(祁新), Wei R-H(蔚荣海), Peng H(彭辉), Wang Y-L(王玉兰). Genetic diversity of different common inbred lines resistant to *Sporisorium reilianaum*. *J Jilin Agric Univ* (吉林农业大学学报), 2006, 28(5): 490-498 (in Chinese with English abstract)
- [16] Qiang X-L(强小林). Reevaluation on the pedigree of the major varieties of the highland barley in Tibet. *Southwest China J Agric Sci* (西南农业学报), 1988, 3(1): 47-54 (in Chinese with English abstract)
- [17] Ba-Shang Y-Z(巴桑玉珍), Qiang X-L(强小林). Tibet the highland barley teaches the achievement and the experience analysis of the kind. *Tibet J Agric Sci* (西藏农业科技), 2004, 27(1): 26-36 (in Chinese)
- [18] Qiang X-L(强小林), Liu S-H(刘顺华), Luo-Bu Z-M(罗布卓玛). Characteristics of major agronomic traits in the barley landrace populations from Tibet. *Southwest China J Agric Sci* (西南农业学报), 1997, 10(1): 41-47 (in Chinese)
- [19] Hou Y C, Yan Z H, Wei Y M, Zheng Y L. Genetic diversity in barley from west China based on RAPD and ISSR analysis. *Barley Genet Newslett.*, 2005, 35: 9-22
- [20] Hong Q-B(洪棋斌), Hou L(侯磊), Luo X-Y(罗小英), Li D-M(李德谋), Xiao Y-H(肖月华), Pei Y(裴炎), Yang K-J(杨开俊), Jia C(甲错). Using RAPD for evaluating genetic background among naked barley varieties in Sichuan northwestern region. *Sci Agric Sin* (中国农业科学), 2001, 34(2): 133-138 (in Chinese with English abstract)

## 《中国农业科技导报》2008年征订启事

《中国农业科技导报》是由科学技术部主管,中国农村技术开发中心主办,中国农业科学院生物技术研究所承办的全国性、综合性学术刊物。本刊是中国科技核心期刊,以发展现代农业为导向,主要报道农业高科技领域的最新科研进展、创新成果、转化应用、农业产业化发展态势,以及政策导向和项目指南(863计划、支撑计划等)信息,是农业高新技术创新成果重要的宣传阵地。设置综述专论、研究论文、研究简报、前沿动态和信息交流等栏目。读者对象为国内外农业科研机构的研究和管理人员;相关领域的各级管理部门的管理人员;农业高技术企业的管理和研发人员;相关专业的大专院校师生。

本刊于1999年6月创刊,彩色封面,大16开本,128页,双月刊,铜版纸4色印刷,逢双月中旬出版,国内外公开发行。每册定价12.00元,全年定价72.00元。国内统一刊号:CN 11-3900/S;国际统一刊号:ISSN 1008-0864。广告经营许可证号:京西工商广字0058号。邮发代号:82-245。诚邀业内人士积极订阅《中国农业科技导报》,并欢迎咨询洽谈广告业务。

地址:北京市海淀区中关村南大街12号中国农业科学院生物技术研究所《中国农业科技导报》编辑部(邮编:100081)

联系人:蔡晶晶,孙丽萍;电话:010-62127682

E-mail:nykjdb@163.com;nkdb@caas.net.cn;网址:www.nkdb.net