

荆赞革,裴徐梨,唐 征,等. 青花菜早中熟种质资源遗传多样性 SRAP 标记分析[J]. 江苏农业科学,2014,42(1):41-43.

# 青花菜早中熟种质资源遗传多样性 SRAP 标记分析

荆赞革<sup>1</sup>,裴徐梨<sup>2</sup>,唐 征<sup>1</sup>,张小玲<sup>1</sup>,罗天宽<sup>1</sup>,刘 庆<sup>1</sup>,朱世杨<sup>1</sup>

(1. 温州科技职业学院,浙江温州 325006;2. 南京农业大学园艺学院,江苏南京 210095)

**摘要:**采用 SRAP 分子标记技术对 12 份青花菜早中熟种质资源进行遗传多样性分析。从 48 个引物组合中筛选得到 28 对多态性较好的引物组合,共检测到 312 条扩增条带,每个引物组合产生 2 至 22 个不等的条带,其中多态性片段为 227 条,多态性比例为 75.76%,揭示所选青花菜种质资源间具有较为丰富的遗传多样性。相似系数分析表明种质间遗传相似系数为 0.650 6~0.878 2,平均为 0.786 2。聚类分析结果显示熟性和来源可作为青花菜早中熟种质聚类的重要农艺性状之一。

**关键词:**青花菜;遗传多样性;SRAP;早中熟种质

**中图分类号:**S635.303 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2014)01-0041-03

青花菜(*Brassica oleracea* var. *italica*)属十字花科芸苔属甘蓝种变种,别称西兰花、绿花菜、绿菜花等,是我国重要的蔬菜作物之一。它营养全面,含有丰富的维生素 C 和抗癌物质芥子油苷,深受消费者喜爱。种质资源是作物遗传改良的基础,种质资源占有量和研究利用的深度对育种工作的成效起着至关重要的作用。因此,深入研究青花菜种质资源遗传多样性可以较好地帮助育种者了解青花菜的遗传信息、遗传结构及种质间亲缘关系,有助于对现有种质资源进行有效利用与选择,从而加速青花菜新品种选育进程。SRAP 即相关序列扩增多态性(sequence related amplified polymorphism),针对基因外显子、内含子来设计特异引物,因启动子、内含子及其间隔区长度不同而产生多态性<sup>[1]</sup>。该标记自 2001 年提出后,因其成本低、引物通用性强、多态性高、重复性好等诸多优点,在植物分子育种研究中应用广泛<sup>[2]</sup>。青花菜在我国的栽培时间较短,国内可供利用的育种材料有限,对青花菜种质资源鉴定评价等方面研究较少,因此笔者对搜集到的部分青花菜早中熟种质资源进行 SRAP 遗传多样性分析,从 DNA 水平上

揭示其部分遗传信息和亲缘关系,以期青花菜早中熟种质资源的搜集、鉴定与利用研究提供一定的理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

以本研究所保存的 12 份青花菜早中熟种质资源为试验材料,进行常规田间管理。材料编号及相关信息见表 1。

表 1 供试青花菜种质信息

编号	种质名	熟性(d)	来源
1	哈木	65~70	日本
2	高拱王	85~90	日本
3	伴侣	70~75	日本
4	绿玉	90	中国浙江
5	绿地	90~95	日本
6	绿仙子	85	中国厦门
7	竞优	90~95	韩国
8	优秀	90~95	日本
9	蓝带	60	日本
10	绿蕊	70~75	日本
11	美秀	65	中国台湾
12	美好	65~70	中国台湾

### 1.2 基因组 DNA 提取

采用改良 CTAB 法<sup>[3]</sup>提取幼嫩叶片基因组 DNA,经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测后,稀释成浓度为 15 ng/μL 的工作液,超低温冰箱保存备用。

### 1.3 SRAP 扩增和电泳检测

试验选用了 4 个正向引物和 12 个反向引物(表 2)。以基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增,反应体系(16 μL):15 ng

收稿日期:2013-06-04

基金项目:浙江省重大科技专项(编号:2010C12004);浙江省农业新品种选育重大科技专项(编号:2012C12903-3-3);浙江省自然科学基金(编号:LY12C15009);浙江省温州市科技项目(编号:N20090016)。

作者简介:荆赞革(1983—),男,河南三门峡人,博士研究生,助理研究员,研究方向为蔬菜遗传育种与生物技术。E-mail: jingzange@aliyun.com。

通信作者:唐 征,硕士,副教授,主要从事蔬菜遗传育种与生物技术研究。Tel: (0577)88431228;E-mail: tzeng05@163.com。

[7]于健东,胡军影,程显隆,等. 卷柏属植物化学成分及药理研究进展[J]. 中国药事,2007,21(9):763-767.

[8]张红伟,孙晓飞,田景奎. 卷柏属植物黄酮类成分研究概况[J]. 亚太传统医药,2007,3(10):63-65.

[9]毕跃锋,郑晓珂,社杜坡,等. 卷柏属植物化学成分与药理活性[J]. 国外医药:植物药分册,2002,17(3):97-100.

[10]王雅英,林小华,洪 璇. 金线莲外植体筛选及愈伤组织诱导研

究[J]. 亚热带植物科学,2011,40(3):41-43.

[11]王 晶,李 静,贾凌云,等. 朝鲜淫羊藿愈伤组织诱导研究[J]. 北方园艺,2013(12):106-108.

[12]刘玉冰,赵 昕,谭会娟. 荒漠植物红砂愈伤组织诱导与增殖研究[J]. 中国沙漠,2008,28(2):255-257.

[13]姜灵敏,徐有明,张冬梅,等. 红刺玫愈伤组织诱导再生体系的建立[J]. 江苏农业学报,2012,28(4):914-916.

表 2 用于青花菜遗传多样性分析的 SRAP 引物序列

引物	正向序列(5'→3')	引物	反向序列(5'→3')
Em01	TGACTCCAAACCGGATA	Me01	GACTGCGTACGAATTAAT
Em02	TGACTCCAAACCGGAGC	Me02	GACTGCGTACGAATTTGC
Em03	TGACTCCAAACCGGAAT	Me03	GACTGCGTACGAATTGAC
Em04	TGACTCCAAACCGGACC	Me04	GACTGCGTACGAATTTGA
		Me05	GACTGCGTACGAATTAAC
		Me06	GACTGCGTACGAATTGCA
		Me07	GACTGCGTACGAATTCAA
		Me08	GACTGCGTACGAATTCTG
		Me09	GACTGCGTACGAATTCGA
		Me10	GACTGCGTACGAATTCAG
		Me11	GACTGCGTACGAATTCCA
		Me12	GACTGCGTACGAATTAGC

DNA,引物各 0.25μmol/L,1.0 U *Taq* 酶,2.0 mmol/L Mg<sup>2+</sup>,1×PCR 缓冲液。反应程序:94℃ 5 min;94℃ 60 s,35℃ 60 s,72℃ 90 s,5 个循环;94℃ 60 s,50℃ 60 s,72℃ 90 s,35 个循环;72℃ 延伸 7 min 后,于 10℃ 保存。

扩增产物加入溴酚蓝后,吸取 2 μL 进行非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测。60 V 预电泳 0.5 h,120 V 稳压电泳 1.5~2.0 h。电泳结束后用 AgNO<sub>3</sub> 进行染色:0.5% 冰乙酸与 10% 乙醇混合水溶液固定 15 min;2 g/L AgNO<sub>3</sub> 水溶液银染 10 min;去离子水冲洗 3 次后,用含 12 g/L NaOH、0.6% 甲醛、

0.02 g/L Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 的显色液显色至条带清晰后拍照<sup>[4]</sup>。

1.4 数据处理

统计电泳检测结果并进行赋值,样品同一位置有电泳条带则赋值为 1,无则赋值为 0;强带和弱带均赋值为 1。根据 *F* 值大小按不加权重对群算术平均法(unweighted pair group method with arithmetic means cluster analysis,UPGMA)进行遗传聚类分析,并绘制亲缘关系树状图。

2 结果与分析

2.1 青花菜 SRAP 扩增结果

本试验从 48 个 SRAP 引物组合中,筛选出 28 个可稳定扩增、多态性较好的扩增引物组合。对 12 份早中熟青花菜种质进行扩增,28 对引物组合共检测到 312 条清晰扩增条带,其中多态性条带为 227 条,多态性为 75.76%。每对引物组合扩增的等位基因数差异较大,从 2 至 22 个不等,平均每对引物组合扩增数为 11.14 个,表明所选青花菜种质间具有较为丰富的遗传多样性。

2.2 青花菜种质间的相似系数和聚类分析

根据 SRAP 分析结果,计算出 12 个青花菜种质间的遗传相似系数(表 3)。从表 3 可以看出,绿玉(4)与绿地(5)、竞秀(7)与优秀(8)之间的遗传相似系数最大(0.878 2),绿玉(4)与美秀(11)的遗传相似系数最小(0.650 6),12 个种质间平均相似系数为 0.786 2。

表 3 12 个青花菜种质资源间的相似系数

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	1.0000											
2	0.833 3	1.000 0										
3	0.772 4	0.855 8	1.000 0									
4	0.756 4	0.782 1	0.830 1	1.000 0								
5	0.756 4	0.801 3	0.810 9	0.878 2	1.000 0							
6	0.759 6	0.766 0	0.762 8	0.817 3	0.823 7	1.000 0						
7	0.746 8	0.778 8	0.794 9	0.810 9	0.798 1	0.762 8	1.000 0					
8	0.753 2	0.766 0	0.756 4	0.804 5	0.785 3	0.775 6	0.878 2	1.000 0				
9	0.669 9	0.682 7	0.692 3	0.657 1	0.631 4	0.666 7	0.679 5	0.653 8	1.000 0			
10	0.743 6	0.769 2	0.740 4	0.685 9	0.717 9	0.721 2	0.759 6	0.746 8	0.734 0	1.000 0		
11	0.701 9	0.734 0	0.692 3	0.650 6	0.676 3	0.717 9	0.698 7	0.698 7	0.724 4	0.830 1	1.000 0	
12	0.724 4	0.717 9	0.714 7	0.673 1	0.692 3	0.721 2	0.695 5	0.695 5	0.740 4	0.826 9	0.823 7	1.000 0

采用非加权平均法(UPGMA)对本试验采用的青花菜早中熟种质资源进行 SRAP 分子标记聚类分析,构建亲缘关系树状图(图 1),在遗传相似系数 0.73 处可将供试材料分为 2 个类群。第 1 类群包括哈木、高拱王、伴侣、绿玉、绿地、绿仙子、竞优和优秀 8 个种质。其中,哈木、高拱王和伴侣来源于日本同一家种子公,聚为一个亚组,表明其具有较为相近的遗传背景。绿玉、绿地、绿仙子、竞优和优秀聚为另一亚组,虽来源不同,但都具有相近的熟性(85~95 d)。第 2 类群包括蓝带、绿蕊、美秀和美好 4 个种质。蓝带和绿蕊来源于日本,美秀和美好来源于中国台湾,4 个种质熟性都较早(60~75 d)。该聚类结果显示熟性和来源是青花菜聚类分析时重要的参考农艺性状之一。

3 讨论

种质资源主要是通过遗传标记多态性来反映其遗传多样

性。目前应用较为广泛的遗传标记主要有形态学标记、细胞学标记、同工酶标记和 DNA 分子标记等。其中形态学标记最简便易行,标记数量有限,受环境影响大,很大程度上限制了其应用。细胞学标记虽不受环境影响,但仍然存在着标记数量少的缺陷。同工酶标记具有共显性、分析快速、所需材料少等优点,但检测不到点突变和对酶蛋白电荷性质无影响的变异,会低估遗传变异<sup>[5]</sup>。用 DNA 分子标记法比较核苷酸序列的不同,是品种鉴定、遗传多样性分析的强有力工具。同其他遗传标记相比,DAN 分子标记具有巨大的优越性<sup>[6]</sup>。

作为新一代的 SRAP 分子标记技术,自 2001 年提出后,目前已在水稻<sup>[7]</sup>、玉米<sup>[8]</sup>、油菜<sup>[9]</sup>、甜菜<sup>[10]</sup>、不接球白菜<sup>[11]</sup>、西瓜<sup>[12]</sup>、马铃薯<sup>[13]</sup>、萝卜<sup>[14]</sup>、大葱<sup>[15]</sup>、黄瓜<sup>[16-17]</sup>、甜椒<sup>[18]</sup>、大豆<sup>[19]</sup>等多种作物的种质资源鉴定评价、遗传多样性、品种鉴定、遗传图谱构建<sup>[1]</sup>、重要性状标记<sup>[20]</sup>和作物起源、进化及亲缘关系分析等方面都得到了较好的应用。

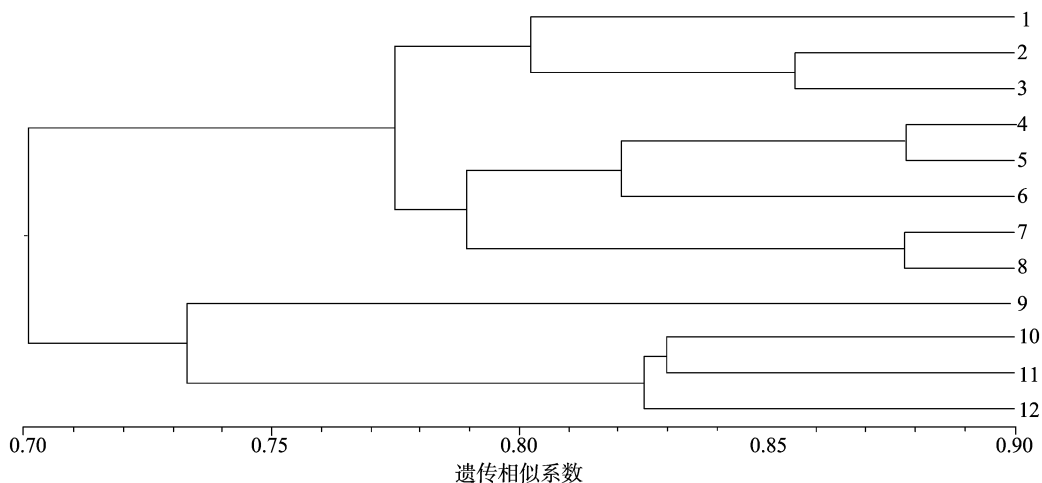


图1 12个青花菜品种建树状聚类结果

Hale 等在 2006 年已经将 SRAP 标记用于青花菜的遗传多样性分析<sup>[21]</sup>, 24 个引物组合可检测到 312 条扩增条带, 平均每个引物检测到 13 条, 其中 255 条为多态性条带, 多态率 82%; 比本试验平均每个引物检测到的条带数和多态性比例略高一些, 可能是由选用试验材料和引物组合的不同所引起。

在聚类分析过程中, 试验所用的 28 个 SRAP 引物可将 12 份青花菜早中熟种质资源分为 2 大类群。本研究结果显示, 青花菜的聚类结果与其熟性密切相关, 且同一来源的种质间具有相对相近的遗传基础, 与前人研究结果<sup>[22-23]</sup>相符, 即熟性和来源可作为青花菜聚类的重要分类农艺性状之一。

青花菜种质资源遗传多样性 SRAP 分析可为种质资源的研究提供更加准确和深入的理论依据。本研究利用 SRAP 标记技术, 对 12 份来自不同国家和地区的的青花菜早中熟种质资源在分子水平上进行遗传多样性和亲缘关系分析, 聚类分析结果可为保存这些种质制定正确策略, 同时为青花菜早中熟种质资源的遗传改良和种质利用提供一定的理论基础。

#### 参考文献:

- [1] 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* [J]. *Theor Appl Genet*, 2001, 103 (8): 455 - 461.
- [2] 柳李旺, 龚义勤, 黄浩, 等. 新型分子标记——SRAP 与 TRAP 及其应用 [J]. *遗传*, 2004, 26 (5): 777 - 781.
- [3] Liu L, Guo W, Zhu X, et al. Inheritance and fine mapping of fertility restoration for cytoplasmic male sterility in *Gossypium hirsutum* L. [J]. *Theor Appl Genet*, 2003, 106 (3): 461 - 469.
- [4] 荆赞革, 唐征, 张小玲, 等. 青花菜 SRAP - PCR 体系优化与品种分子鉴定 [J]. *生物技术通报*, 2010 (12): 122 - 125.
- [5] Fang D Q, Roose M L. Identification of closely related citrus cultivars with inter - simple sequence repeat markers [J]. *Theor Appl Genet*, 1997, 95: 408 - 417.
- [6] 李鸿雁. 扁蓿豆种质资源遗传多样性的研究 [D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2008.
- [7] 张安世, 徐九文, 辛长永, 等. 河南省水稻中晚粳新品系遗传多样性的 SRAP 分析 [J]. *中国农学通报*, 2010, 26 (2): 50 - 54.
- [8] 赵炜, 刘冠明, 王晓明, 等. 应用 SRAP 标记分析甜玉米自交系

的遗传差异 [J]. *玉米科学*, 2007, 15 (增刊): 154 - 156, 159.

- [9] 文雁成, 王汉中, 沈金雄, 等. 用 SRAP 标记分析中国甘蓝型油菜品种的遗传多样性和遗传基础 [J]. *中国农业科学*, 2006, 39 (2): 246 - 256.
- [10] 王华忠, 吴则东, 王晓武, 等. 利用 SRAP 与 SSR 标记分析不同类型甜菜的遗传多样性 [J]. *作物学报*, 2008, 34 (1): 37 - 46.
- [11] 韩建明, 侯喜林, 徐海明, 等. 不结球白菜 (*Brassica campestris* ssp. *chinensis* Makino) 种质资源 SRAP 遗传分化分析 [J]. *作物学报*, 2007, 33 (11): 1862 - 1868.
- [12] 李严, 张春庆. 西瓜杂交种遗传多态性的 SRAP 标记分析 [J]. *园艺学报*, 2005, 32 (4): 643 - 647.
- [13] 何凤发, 杨志平, 张正圣, 等. 马铃薯遗传资源多样性的 SRAP 分析 [J]. *农业生物技术学报*, 2007, 15 (6): 1001 - 1005.
- [14] 赵丽萍, 柳李旺, 龚义勤, 等. 萝卜品种指纹图谱 SRAP 与 AFLP 分析 [J]. *植物研究*, 2007, 27 (6): 687 - 693, 714.
- [15] 李慧芝, 尹燕桦, 张春庆, 等. SRAP 在葱蒜栽培品种遗传多样性研究中的适用性分析 [J]. *园艺学报*, 2007, 34 (4): 929 - 934.
- [16] 杨柳燕, 徐永阳, 徐志红, 等. 甜瓜霜霉病抗性遗传及 SRAP 分子标记 [J]. *江苏农业学报*, 2012, 28 (5): 1200 - 1202.
- [17] 张驰, 关媛, 何欢乐, 等. 利用 SRAP 分子标记对黄瓜 *G1* 基因的初步定位分析 [J]. *上海交通大学学报: 农业科学版*, 2009, 27 (4): 380 - 383.
- [18] 吴国平, 袁稳, 刘金兵, 等. 甜椒细胞质雄性不育基因的 SRAP 标记 [J]. *江苏农业学报*, 2012, 28 (5): 1114 - 1118.
- [19] 周春娥, 王芳, 周延清, 等. 大豆遗传多样性的 SRAP 分析 [J]. *江苏农业科学*, 2012, 40 (1): 40 - 42.
- [20] 雷剑, 柳俊. 一个与马铃薯青枯病抗性连锁的 SRAP 标记筛选 [J]. *中国马铃薯*, 2006, 20 (3): 150 - 153.
- [21] Hale A L, Farnham M W, Menz M A. Use of PCR - based markers for differentiating elite broccoli inbreds [J]. *J Amer Soc Hort Sci*, 2006, 131 (3): 418 - 423.
- [22] Lu X J, Liu L W, Gong Y Q, et al. Cultivar identification and genetic diversity analysis of broccoli and its related species with RAPD and ISSR markers [J]. *Scientia Horticulturae*, 2009, 122 (4): 645 - 648.
- [23] 孙德岭, 赵前程, 宋文芹, 等. 花椰菜类蔬菜自交系基因组间亲缘关系的 AFLP 分析 [J]. *园艺学报*, 2002, 29 (1): 72 - 74.