

王书珍,黄兴学,王斌才,等.生菜 SSR 遗传多样性及其与营养品质性状的关联分析[J].江苏农业科学,2018,46(24):161-164.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.24.043

生菜 SSR 遗传多样性及其与营养品质性状的关联分析

王书珍¹,黄兴学²,王斌才²,张霖¹,周国林²,汪爱华²

(1. 经济林木种质改良与资源综合利用湖北省重点实验室/黄冈师范学院生命科学学院,湖北黄冈 438000;

2. 武汉市农业科学技术研究院蔬菜科学研究所,湖北武汉 430065)

摘要:为研究生菜自然群体中蛋白质、硝酸盐、可溶性糖、纤维素含量的变化,采用 80 个 SSR 标记对 51 份生菜品系的基因型进行检测。其中 12 个多态性 SSR 标记共检测到 62 个等位基因,平均每个位点 5.167 个,扩增等位基因最多的是标记 LswSS10。观察杂合度 H_o 、期望杂合度 H_e 、多态性信息含量(PIC)变化范围分别为 0.00~0.273、0.545~0.842、0.428~0.803,平均值分别为 0.106、0.687、0.614。关联分析并未发现与蛋白质和硝酸盐含量关联的标记,最终筛选得到 2 个与可溶性糖含量关联的 SSR 标记(r 为 -0.214 和 -0.260),3 个与纤维素含量相关的 SSR 标记(r 为 -0.366~-0.261),这为后续关联基因的克隆和生菜营养品质改良奠定了基础。

关键词:生菜;营养品质性状;SSR 标记;关联分析;遗传改良

中图分类号: S636.203 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)24-0161-03

生菜(*Lactuca sativa* L.)($2n=18$)是菊科莴苣属 1~2 年生草本植物,原产地中海沿岸,现为全世界范围广泛种植食用的低糖、低脂类叶用类蔬菜,因能够分解亚硝酸胺等致癌物质被称为“抗癌蔬菜”,其根据叶片的长势分为结球生菜、半结球生菜、散叶生菜等多种类型^[1-2]。生菜富含蛋白质、维生素、矿物质、有机酸、核黄素、膳食纤维等活性成分,具有较高的营养和经济价值^[3]。近年来,随着生活水平的提高,人们对蔬菜、水果以及农作物等的品质要求不断提高,对生菜的品质要求也是逐渐提高^[4]。

品质性状是数量性状或数量-质量性状,其受多基因控制,且其表型极易受到周围环境的影响^[4]。控制品质性状的基因常为隐性基因,传统的品质检测繁琐且费用较高,因此农作物的品质改良工作进展缓慢。然而,寻找与品质性状紧密连锁的分子标记并用于分子标记辅助育种中,将大大提高品质性状的遗传改良效率。微卫星(simple sequence repeat, SSR)分子标记,是基因组中 1~6 个核苷酸多次串联重复组成的序列,数量丰富、共显性遗传、多态性高,已经广泛应用于遗传多样性、关联分析、基因定位、遗传连锁图谱构建、物种进化等研究中^[5-6]。

本研究选用 51 份生菜资源构建自然群体,采用 SSR 标记分析其遗传多样性,并结合关联分析,挖掘蛋白质、硝酸盐、可溶性糖、硝酸盐含量等营养品质性状的优异等位变异,为生菜品质性状遗传改良育种奠定分子基础,也为分子标记辅助育种提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

从国家生菜种质资源库中挑选 51 份表型差异较大的资源,分别于 2015、2016 年秋季种植在武汉市蔬菜科学研究所的试验基地(114°20'E,30°37'N),种植 2 季,常规日常管理和病虫害防治,

定植株行距为 25 cm,各品种种植 30~50 株。

1.2 营养品质性状测定

每个品种选取长势一致且健康的植株 5 株,在同一位置采摘叶片,低温保存后迅速进行营养品质的测定,各试验重复 3 次。蛋白质含量的测定采用微量凯氏定氮法^[7];采用硝酸盐试粉法测定新鲜叶片组织中的硝酸盐含量^[8]。采用蒽酮法测定生菜嫩叶的可溶性糖含量^[9]。利用近红外光谱技术测定生菜叶片纤维素的含量^[10]。

1.3 基因组 DNA 提取及 PCR 扩增

每个品种随机选 5 株,每株采集 3 张健康嫩叶,硅胶干燥并自封袋封存。采用改良的 CTAB 法提取基因组 DNA,稀释到 100 ng/ μ L^[11]。依据 NCBI 数据库的生菜 EST 序列信息,设计合成 80 对 SSR 引物。PCR 反应体系(15 μ L):1 μ L 的基因组 DNA(100 ng/ μ L),20 mmol/L 正反向引物各 0.15 μ L,7.5 μ L 的 2 \times Taq PCR Mastermix,灭菌的去离子水补足体积。PCR 扩增程序:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 40 s,最适退火温度下退火 40 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 50 s,35 个扩增循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。采用 6% 的变性聚丙烯酰胺凝胶检测 PCR 扩增产物,依据 20 bp DNA marker 的电泳谱带,统计不同个体相应位点上等位基因的大小。

1.4 数据统计与分析

根据电泳图谱构建“0/1”二元矩阵:同一电泳位置上有带记为“1”,无带记为“0”。对蛋白质、硝酸盐、可溶性糖、纤维素含量的测定数据进行方差分析和聚类分析,统计各性状的平均值、变异系数、重复力(R)大小^[12]。使用 Arlequin 3.1

收稿日期:2017-08-24

基金项目:湖北省自然科学基金(编号:2015CFC816);大别山特色资源开发湖北省协同创新中心团队项目(编号:2015TD07)。

作者简介:王书珍(1984—),女,河南郑州人,副教授,主要从事植物遗传学研究。E-mail:381355814@qq.com。

通信作者:汪爱华,高级园艺师,主要从事叶类蔬菜品种筛选和种质改良研究。E-mail:wangaihualt@163.com。

软件统计等位基因数(N_a)、期望杂合度(H_E)、观察杂合度(H_o)等多样性参数^[11,13]。利用 PICCalc 0.6 软件计算各标记的多态性信息(PIC)含量。采用 NTSYS-PC(version 2.2)软件计算遗传相似系数,根据遗传距离构建聚类图^[14]。根据遗传距离矩阵分析 SSR 标记位点与形态性状的相关性^[12]。

2 结果与分析

2.1 生菜营养品质性状分析

本研究所选的 51 份生菜资源变异较大,方差分析表明,4 个营养品质性状在不同的生菜资源间均达到极显著水平。生菜叶片蛋白质平均含量高达 10.914 mg/g,硝酸盐平均含量为 1.016 mg/g,可溶性糖平均含量为 2.286%,而纤维素平均

含量为 0.019%(表 1)。蛋白质含量的变化幅度最大,为 2.211~35.423 mg/g,极差高达 33.213 mg/g。4 个营养品质性状的变异系数(CV)在 0.124%~0.624%间变化,其中蛋白质含量的变异系数最大,最小的是纤维素含量。4 个品质性状的重复力(R)变化范围为 0.865~0.973,重复力最低的是纤维素含量,最高的是蛋白质含量(表 1)。

依据 4 个营养品质性状构建的聚类分析图,51 份生菜资源被分为两大类,LS1、LS2、LS23 等 3 份生菜构成第 1 类,其余的 48 份被聚为第 2 类(图 1)。在遗传距离 3.73 处,第二大类又被分为 2 个小类,分别包括 LS3、LS11 等在内的 21 份资源和包括 LS4、LS17 等在内的 27 份资源。营养品质性状类似的生菜品种被聚到一起,研究发现聚类结果与地理起源并不一致。

表 1 各品种间品质性状变异情况

营养品质性状	平均值	最大值	最小值	标准差	极差	变异系数(%)	重复力
蛋白质含量(mg/g)	10.914	35.423	2.211	6.811	33.213	0.624	0.973
硝酸盐含量(mg/g)	1.016	3.718	0.228	0.628	3.490	0.618	0.924
可溶性糖含量(%)	2.286	5.020	0.920	0.990	4.100	0.435	0.913
纤维素含量(%)	0.019	0.024	0.013	0.002	0.010	0.124	0.865

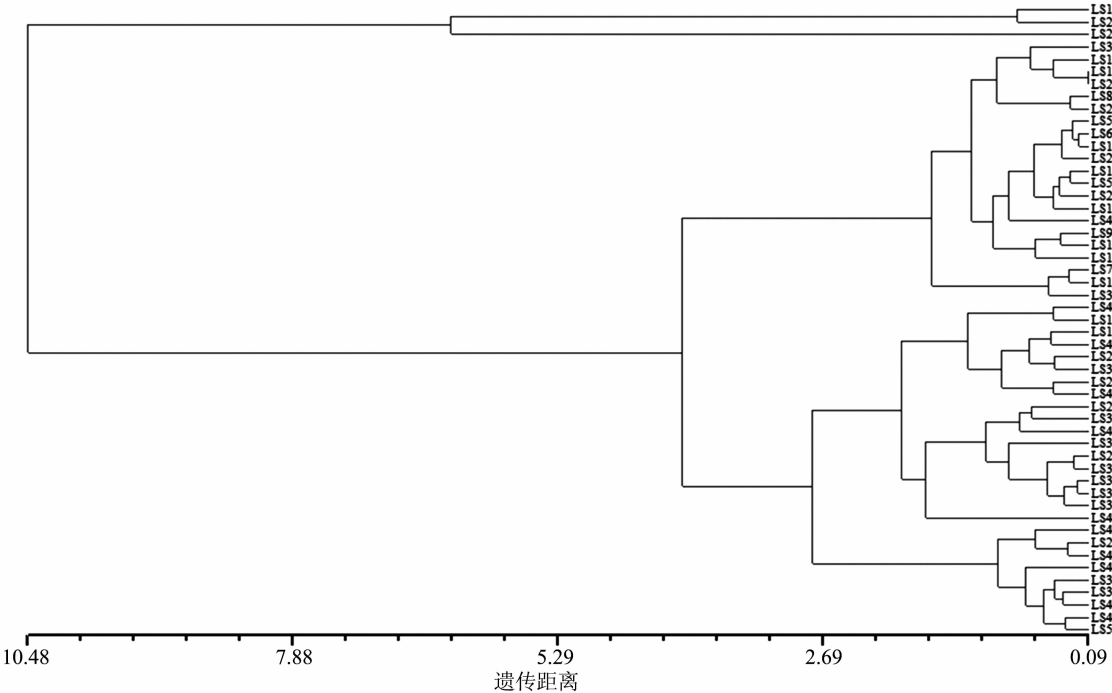


图 1 4 个表型性状聚类结果

2.2 SSR 标记的多态性分析

在所设计合成的 80 个 EST-SSR 标记中有 34 个能够特异性扩增出目的大小的 DNA 片段,且重复性强;12 个以 (AG)_n 或者 (CT)_n 为重复基序的标记在 51 份生菜资源中是多态的。多态性 SSR 标记的退火温度为 53~58℃,微卫星基序重复次数介于 24~27 次之间。12 个标记共扩增出等位基因类型 62 种,片段大小为 124~237 bp。每个标记检测到的等位基因数为 3~9 个,平均为 5.167 个。标记 LswSS10 检测到的等位基因数最多,为 9 个,其次是 LswSS6,检测到 8 个等位基因位点。LswSS1、LswSS9、LswSS11 等 3 个 SSR 标记扩增效率最低,仅扩增出 3 个等位基因(表 2)。

观察杂合度(H_o)和期望杂合度(H_E)的变化范围分别为

0.00~0.273 和 0.545~0.842,平均值分别为 0.106 和 0.687(表 2)。12 个标记间的连锁不平衡度并未达到极显著水平,并且 12 个位点处均出现 H_o 小于 H_E 的情况,即杂合子严重缺失。LswSS4、LswSS5、LswSS7、LswSS8 等 4 个位点的 H_o 均为 0,即此 4 个位点在检测的生菜资源中均是纯合位点。多态性信息含量(PIC)值变化范围为 0.428~0.803,平均为 0.614。除了 LswSS11 标记,其余 11 个位点的 PIC 值均大于或等于 0.500,即生菜资源内存在丰富的遗传多样性。

2.3 营养品质性状与 SSR 标记关联分析

将 4 个营养品质性状的距离矩阵与 SSR 标记的距离矩阵进行相关性分析,拟合方程为 $y=0.4648x+1.322$,二者的相关系数为 -0.028 41,相关性并不显著。为了分析每个标

表 2 12 个 SSR 多态性标记信息

位点	正向引物 (5'→3')	反向引物 (5'→3')	退火温度 (℃)	重复基序	N_a (个)	H_o	H_E	PIC
LswSS1	CCTCCATAACCAAAACCTCA	ACTTCTTTTCGACATGCTTCT	54	(AG) ₂₅	3	0.273	0.604	0.518
LswSS2	CAGTTTAGCTTCTCTCTCCC	TTTGACACAACAATCCTCCA	56	(CT) ₂₆	4	0.091	0.593	0.515
LswSS3	CAGTTTAGCTTCTCTCTCCC	TTTGACACAACAATCCTCCA	55	(GA) ₂₄	5	0.120	0.749	0.691
LswSS4	CATTCTCATTGCGTGTTC	TCTCCTATCACCGATTTTGC	53	(TC) ₂₅	5	0.000	0.663	0.581
LswSS5	GGGAGATACTACCTCATCA	TCTTAACCTCTTCAGTTGCC	57	(AG) ₂₅	4	0.000	0.635	0.547
LswSS6	CCTCCATAACCAAAACCTCA	ACTTCTTTTCGACATGCTTCT	55	(CT) ₂₄	8	0.250	0.808	0.775
LswSS7	AGACAGATCTCAAACAACCC	CCCATACCTTTTCACTCCAA	54	(AG) ₂₆	4	0.000	0.636	0.550
LswSS8	AACCAAAACCTCAACTCACT	GGCTTCATTCACTTCTTTTCG	56	(CT) ₂₇	7	0.000	0.808	0.767
LswSS9	CCTCCATAACCAAAACCTCA	ACTTCTTTTCGACATGCTTCT	55	(AG) ₂₅	3	0.111	0.621	0.500
LswSS10	TACATCTGGACTTTGTGTGG	TGCAGGATTTCTTTGCCTAT	58	(CT) ₂₅	9	0.125	0.842	0.803
LswSS11	CAGATCAAGCGGTAATAA	TATCAAGACCCTAAGCGAAC	56	(AG) ₂₄	3	0.080	0.545	0.428
LswSS12	GCCACTTTATAAGCCCTAC	ATGGATTGGCATGATGACTT	57	(CT) ₂₆	7	0.227	0.736	0.690
平均值	—	—			5.167	0.106	0.687	0.614
标准差	—	—			1.993	0.096	0.094	0.120

记位点对 4 个营养品质性状的贡献率,将 4 个营养品质性状数据进行聚类,12 个 SSR 扩增带谱也分别聚类,再将蛋白质、硝酸盐、可溶性糖和纤维素含量等 4 个性状的距离矩阵与单个 SSR 标记聚类的距离矩阵进行相关性分析。在进行的两两相关分析中,并未找到与蛋白质含量和硝酸盐含量性状关联的 SSR 分子标记。LswSS1 和 LswSS11 两个标记与生菜叶片可溶性糖含量显著相关,相关系数分别为 -0.214 和 -0.260(表 3)。与纤维素含量相关的 SSR 标记有 3 个,分别为 LswSS1($r = -0.366$)、LswSS3($r = -0.208$)以及 LswSS12($r = -0.261$)。然而,包括 LswSS2、LswSS4、LswSS5、LswSS6、LswSS7、LswSS8、LswSS9、LswSS10 等在内的 8 个 SSR 标记与四个营养品质性状的相关性都不显著。

表 3 与品质性状相关联的 SSR 标记信息

性状	相关的 EST - SSR 引物	相关引物 数(个)	单个引物最 大相关系数
蛋白质含量	—	—	—
硝酸盐含量	—	—	—
可溶性糖含量	LswSS1、LswSS11	2	-0.260
纤维素含量	LswSS1、LswSS3、LswSS12	3	-0.366

3 讨论与结论

关联分析(association analysis)是利用基因或者标记间的连锁不平衡(linkage disequilibrium, LD)关系,对表型性状与基因或标记位点间的相关性进行分析,从而鉴定与表型变异相关的基因位点^[15]。关联分析采用的是自然群体,研究周期短,且可以同时分析同一位点上的多个等位基因,自然群体在长期进化过程中积累了大量的重组信息,做出来的关联图谱精确度也比较高^[16]。于志远等利用关联分析方法检测到 11 个与大豆蛋白质含量极显著关联的 SSR 标记,解释率为 2.65%~9.08%^[17]。冯英娜等筛选到与茄子农艺相关性状显著相关($P < 0.05$)的 SSR 标记 17 个^[18]。严孜等采用关联分析法检测出与花生品质性状关联的 SSR 位点 4 个,总等位变异位点 40 个^[19]。

生菜叶片的营养品质性状属于连续变异的数量性状,是基因和环境共同作用的结果,其遗传基础复杂,目前由于很难找到表现型和基因型之间的对应关系,因此品质性状机理和

遗传改良等研究十分困难。本研究将 51 份生菜资源种植在条件一致的苗圃地,采用完全随机区组设计,最大程度上消除了环境因素引起的个体表型差异。本研究共检测到的 12 个多态性位点均出现观察杂合度显著低于期望杂合度的现象,可能的原因是在生菜长期选育过程中,部分位点出现了极大的纯合化。最后利用关联分析法筛选出 2 个与生菜叶片可溶性糖含量相关的 SSR 标记,3 个与纤维素含量相关的 SSR 标记,并且 LswSS1 标记与 2 个营养品质性状均相关。

本研究筛选到的营养品质性状关联的 SSR 标记对于后期克隆生菜营养品质性状相关目的基因意义重大,本研究结果也为生菜品质性状的遗传改良和新品种选育奠定了基础。然而,关联位点与性状间关系及作用机理和方式尚不清楚,而进行全基因组的关联分析则能找出更多与品质性状关联的分子标记,后续仍需更加深入的研究。

参考文献:

[1] Jamie P, Saltveit M E. Postharvest changes in broccoli and lettuce during storage in argon, helium, and nitrogen at atmospheres containing 2% oxygen[J]. Postharvest Biology and Technology, 2002, 26(1): 113 - 116.

[2] Sun J, Chu Y F, Wu X, et al. Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50(25): 7449 - 7454.

[3] 左晓峰, 张锐钰, 单 龙, 等. 人小肠三叶因子(*hITF*)基因在生菜中的整合与表达[J]. 植物学报, 2001, 43(10): 1047 - 1051.

[4] 耿友玲, 徐 强, 陈银根, 等. 作物品质性状的分子遗传改良[J]. 分子植物育种, 2008, 6(4): 749 - 759.

[5] Gutierrez - Flores C, Leon J D, Luz L D L, et al. Microsatellite genetic diversity and mating systems in the columnar cactus *Pachycereus pringlei* (Cactaceae)[J]. Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics, 2016, 22: 1 - 10.

[6] Niu J S, Wang B Q, Wang Y H, et al. Chromosome location and microsatellite markers linked to a powdery mildew resistance gene in wheat line ‘Lankao 90(6)’[J]. Plant Breeding, 2010, 127(4): 346 - 349.

[7] 李学梅, 李宗义, 单广福, 等. 金针菇蛋白质及氨基酸含量的测定与分析[J]. 中国食用菌, 1999(6): 20 - 22.

李小义,张效平,赵 凤,等. 鲟鱼肠道微生物多样性的研究[J]. 江苏农业科学,2018,46(24):164-167.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.24.044

鲟鱼肠道微生物多样性的研究

李小义,张效平,赵 凤,孔 杰,赵 飞,周 洲,王艳艳

(贵州省农业科学院水产研究所,贵州贵阳 550025)

摘要:从贵州省水产研究所惠水试验基地采集杂交鲟鱼、养殖水体及饲料等样品,对鲟鱼前肠、中肠及后肠肠道微生物、养殖水体及饲料等样品微生物 DNA 进行提取扩增,结合宏基因组学测序技术和生物信息学分析等手段,对鲟鱼肠道微生物多样性进行分析。结果表明,在门水平上,变形菌门(Proteobacteria)在前肠、中肠、后肠及水样等样品为主要优势菌群,丰度分别为 75.0%、57.4%、66.0%、50.8%。饲料样品中蓝细菌(Cyanobacteria)丰度最高,为 59.5%。属水平分析,前肠样品组 G6 中,假单胞菌属(*Pseudomonas*)丰度最高,为 23.18%,其次为气单胞菌属(*Aeromonas*, 7.23%)、不动杆菌属(*Acinetobacter*, 3.73%)、黄杆菌属(*Flavobacterium*, 2.47%)、unidentified Marinilabiaceae(2.43%)、*Sedimenticola*(2.20%)。中肠样品组 G7 中,以 unidentified Marinilabiaceae(4.22%)、*Sedimenticola*(3.13%)、地杆菌属(*Geobacter*, 2.60%)、假单胞菌属(*Pseudomonas*, 2.37%)、不动杆菌属(*Acinetobacter*, 1.74%)、气单胞菌属(*Aeromonas*, 1.40%)为主。后肠样品组 G8 中,主要包括气单胞菌属(*Aeromonas*, 0.52%)、假单胞菌属(*Pseudomonas*, 0.47%)、不动杆菌属(*Acinetobacter*, 0.13%)、*Sedimenticola*(0.07%)、unidentified Marinilabiaceae(0.06%)、unidentified Chloroplast(0.03%)。前肠、中肠肠道微生物类型及丰度差异不大,后肠细菌和前、中肠内细菌差异明显。

关键词:肠道微生物;鲟鱼;高通量;多样性

中图分类号: S917.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)24-0164-04

肠道微生物是人体及动物肠道的正常组成部分,对宿主的营养和健康有重要影响。研究表明,肠道微生物可参与宿主的营养物质消化吸收、能量代谢、过敏、自身免疫疾病等多方面调节过程^[1-3],对宿主的年龄亦有指示作用^[4]。近年来,

肠道微生物与水产动物的联系受到了越来越多的关注。Kan 等将金鱼暴露于 0~100 μg/L 的五氯苯酚中,对金鱼肠道微生物变化进行了分析,结果表明,拟杆菌属丰度与五氯苯酚浓度呈正相关,拟杆菌门、拟杆菌属及厚壁菌门/拟杆菌门之比对金鱼在五氯苯酚环境中的体质量和肝质量均有重要影响^[5]。Rolig 等对斑马鱼肠神经系统进行缺失突变处理,结果发现肠道发炎个体中促炎性细菌菌群较多,而在同样做缺失突变的肠道正常个体中具有抗炎作用的细菌菌群较多,研究表明肠道微生物对斑马鱼肠道健康具有重要作用^[6]。此外,动物体肠道始终处于动态变化,摄食方式和肠道微生物种类、数量及占例均有影响,动物体内肠道菌群结构合理有助于加快宿主的生长和改善肉质^[7]。唐杨等在凡纳滨对虾饲料中添加蜡芽孢杆菌,试验组凡纳滨对虾生长速度比空白组平

收稿日期:2017-07-28

基金项目:贵州省科学技术基金(编号:黔科合 J 字 LKN[2013]11 号);贵州省农业科学院项目(编号:黔农科院院专项[2014]012 号);国家自然科学基金(编号:31660746);贵州省特色水产产业技术体系项目(编号:GZCYTX2013)。

作者简介:李小义(1988—),女,贵州贵阳人,硕士,助理研究员,从事水产养殖研究。E-mail:lxwy2012@yeah.net。

通信作者:王艳艳,硕士,助理研究员,从事水产养殖研究。E-mail:wangyy19870117@163.com。

[8]杜应琼,王富华,李乃坚,等. 新鲜蔬菜硝酸盐含量测定的改进试粉法[J]. 园艺学报,2005,32(1):49-53.

[9]位 杰,吴翠云,蒋 媛,等. 蒽酮法测定红枣可溶性糖含量条件的优化[J]. 食品科学,2014,35(24):136-140.

[10]张 帆,王 倩,马智宏,等. 西瓜可溶性糖和纤维素含量的近红外光谱测定[J]. 食品科学,2007,28(1):258-261.

[11]Wang S Z, Pan L, Hu K, et al. Development and characterization of polymorphic microsatellite markers in *Momordica charantia* (Cucurbitaceae)[J]. American Journal of Botany, 2010, 97(8): E75-E78.

[12]左力辉,张文林,邱 彤,等. 新疆野苹果叶形性状变异及其与 SSR 标记关联分析[J]. 园艺学报,2015,42(4):759-768.

[13]Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis[J]. Evolutionary Bioinformatics Online, 2005, 1:47-50.

[14]Hu J H, Pan L, Liu H G, et al. Comparative analysis of genetic diversity in sacred lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) using AFLP and SSR markers[J]. Molecular Biology Reports, 2012, 39(4): 3637-3647.

[15]Mackay I, Powell W. Methods for linkage disequilibrium mapping in crops[J]. Trends in Plant Science, 2007, 12(2):57-63.

[16]Jorde L B. Linkage disequilibrium and the search for complex disease gene[J]. Genome Research, 2000, 10:1435-1444.

[17]于志远,王伟威,魏 嵘,等. 利用关联分析方法挖掘自然群体中大豆油分和蛋白质含量相关 SSR 标记[J]. 大豆科学, 2015, 34(6):977-981.

[18]冯英娜,柳李旺,刘卫东,等. 茄子 SSR 遗传多样性及其农艺性状的关联分析[J]. 江苏农业学报, 2014, 30(4):839-847.

[19]严 玫,韩锁义,董文召,等. 中国主要花生品种品质性状关联分析[J]. 植物遗传资源学报, 2013, 14(6):1064-1071.