

杨 峰,冉茂林,李晓梅,等. 不同抽薹性萝卜遗传多样性的 SSR 分子标记分析[J]. 江苏农业科学,2019,47(4):123-127 .
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.04.030

不同抽薹性萝卜遗传多样性的 SSR 分子标记分析

杨 峰^{1,2},冉茂林^{1,2},李晓梅^{1,2},陈 琳¹,雍小平¹,冉 科¹

(1. 四川省农业科学院水稻高粱研究所,四川德阳 618000; 2. 蔬菜种质与品种创新四川省重点实验室,四川成都 610066)

摘要:为了加强对耐抽薹萝卜种质资源的研究,加快耐抽薹萝卜育种进程,从 206 对 SSR 分子标记引物中筛选出 21 对,用于 57 份不同抽薹性萝卜材料进行遗传多样性分析。结果表明,PCR 共扩增出 102 条条带,平均 4.86 条,每对引物 2~9 条带,其中具有多态性的为 95 条,多态性条带百分率为 93.14%。POPGENE 分析结果表明,平均观测等位基因数为 2.967 4,平均有效等位基因数为 2.419 1,有效等位基因比例为 81.52%;平均 Nei 基因多样性指数为 0.355 5,平均 Shannon 多态性指数为 0.528 9。UPGMA 法聚类结果把供试萝卜材料分为 3 个类群,5 个亚类:第 I 类为来源于德国的极耐抽薹材料,第 II 类为来源于韩国和日本的耐抽薹材料,第 III 类为来源于我国的材料,其中第 3 亚类共有 45 份,占材料总数的 78.95%,第 4 亚类为 5 份极易抽薹材料,第 5 亚类仅有 1 份。各材料间平均遗传相似系数为 0.638 1,变幅范围 0.347 8~0.934 8,>0.7 的仅 22.87%,遗传差异较大。不同抽薹性萝卜材料所表现出的丰富多样性,对萝卜种质资源管理和耐抽薹品种选育具有重要意义。

关键词:萝卜;抽薹;SSR 标记;遗传多样性

中图分类号: S631.103 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)04-0123-05

萝卜(*Raphanus sativus* L.)在世界各地均有种植,其中欧美国家主要栽培小型四季萝卜,亚洲国家则主要栽培大型萝卜^[1]。萝卜是我国重要的十字花科蔬菜作物,年种植面积在 120 万 hm² 左右,位居全国各类蔬菜种植面积第 3 位,在蔬菜生产和供应上起到了重要作用^[2]。在生产上,萝卜比较容易发生“未熟抽薹”或“先期抽薹”现象,即萝卜肉质根在未完全膨大时就抽薹,从而降低或失去商品价值,造成经济损失。我国拥有众多萝卜种质资源,但开始耐抽薹品种选育的研究较晚,导致日本和韩国的耐抽薹品种大量进入国内,占据主要市场。因此,加强对耐抽薹萝卜种质资源的研究,不断培育新的种质资源,是加快耐抽薹萝卜育种进程的重要途径。

简单序列重复(simple sequence repeat,SSR)通常又称为微卫星或者 STMS(sequence-tagged microsatellites),是基于 PCR 的分子标记,普遍分布于真核生物基因组中,具有信息含量高、稳定性好、多态性高、操作和分析简单等优点,现被广泛用于蔬菜种质资源遗传多样性分析^[3]及种质资源鉴定^[4]等研究。近几年以萝卜为材料利用 SSR 标记进行的研究,主要包括图谱构建^[5-7]、基因组学^[8]、转录组学^[9]、表观遗传学^[10]、纯度鉴定^[11-12]、育性鉴定^[13]和肉质根色^[14]等方面。本研究对 57 份不同抽薹性萝卜材料进行 SSR 分析,旨在从分子水平上研究各材料遗传背景和亲缘关系,为选育耐抽薹

萝卜品种提供理论依据,以期实现分子标记辅助育种。

1 材料与方法

1.1 材料

供试 57 份不同抽薹性萝卜材料,均由四川省农业科学院水稻高粱研究所萝卜课题组提供。材料来源及其抽薹特性详见表 1。分子标记所需的 SSR 引物由四川成都擎科梓熙生物技术有限公司合成,Taq 酶和 dNTP 购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取 2018 年 2 月 26 日,在蔬菜种质与品种创新四川省重点实验室进行萝卜穴盘育苗,待幼苗长至 3 张真叶时采嫩叶,用天根生化科技(北京)有限公司生产的高效植物基因组 DNA 提取试剂盒提取基因组 DNA,微量分光光度计(NanoDrop 2000)检测 DNA 浓度和质量,将 DNA 浓度调至 10 ng/μL,-20℃冰箱(海尔医用低温保存箱)保存备用。

1.2.2 PCR 扩增及检测 用 Veriti Thermal Cycler PCR 仪(Applied Biosystems 公司)进行扩增。SSR-PCR 反应采用 15 μL 体系,包括 1.5 μL 10×PCR buffer(Mg²⁺),1.0 μL 2.5 mmol/L dNTP,0.2 μL 5 U/μL Taq 酶,50 ng/μL 上、下游引物各 0.5 μL,2.0 μL DNA 模板,加 ddH₂O 至 15 μL。扩增程序:94℃预变性 5 min;94℃变性 40 s,55~62℃(不同 SSR 引物设不同退火温度)退火 45 s,72℃延伸 90 s,35 个循环;72℃延伸 10 min,4℃保存。扩增产物经 10% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳银染检测。

1.2.3 数据统计分析 将银染结果进行统计,清晰且可重复条带记为“1”,不重复且在同一位置上的弱带或无条带记为“0”,建立数据库。统计 PCR 扩增产物的条带总数和多态性条带数,计算多态性条带百分率 $P = i/j \times 100\%$,其中 i 为多态性条带数, j 为扩增总条带数。用 POPGENE 1.32 统计观测

收稿日期:2018-07-09

基金项目:四川省科技创新苗子工程资助项目(编号:2017078);四川省“十三五”财政创新能力提升工程项目(编号:2016ZYPZ-036);蔬菜种质与品种创新四川省重点实验室开放课题。

作者简介:杨 峰(1987—),男,四川成都人,硕士,助理研究员,主要从事蔬菜生物技术与育种研究。Tel:(0838)2539263;E-mail:yfeng1987@126.com。

通信作者:冉茂林,硕士,研究员,主要从事十字花科作物育种研究。Tel:(0838)2539263;E-mail:ran633@sohu.com。

等位基因数(N_a)、有效等位基因数(N_e)、Nei 基因多样性指数(H)及 Shannon 多样性信息指数(I)^[15]。利用 NTSYS pc - 2.10e 分析数据,按非加权组平均法(UPGMA)进行聚类分析^[16]。

表 1 材料来源及抽薹特性

编号	名称	来源	抽薹性	编号	名称	来源	抽薹性
1	黑萝卜	德国	极耐	30	地黄缨	河南	中
2	辣萝卜	德国	极耐	31	开鑫寒剑	河南	易
3	樱桃萝卜	德国	极耐	32	民权红	河南	易
4	高山韩国	韩国	耐	33	汉青一号	湖北	易
5	白雪公主	日本	耐	34	夏抗 40	湖北	易
6	时大根	日本	极耐	35	武汉夏白玉	南京	易
7	一点红	重庆	易	36	内蒙红圆	内蒙古	耐
8	红心萝卜	重庆	易	37	短叶十三	广东	易
9	酒罐萝卜	重庆	易	38	藏萝卜 1 号	西藏	极耐
10	白雪球	重庆	易	39	沙窝萝卜	天津	耐
11	极品晚春	重庆	中	40	热萝卜	福建	易
12	春不老	重庆	易	41	桂阳萝卜	福建	易
13	太空翠玉	重庆	极易	42	心里美	北京	中
14	白地球	重庆	极易	43	白圆花萝卜	浙江	中
15	早雪 50	重庆	极易	44	C60223	自育	极耐
16	60 早	重庆	极易	45	C61396	自育	易
17	翘头青	河北	中	46	C61319	自育	易
18	满身红	四川	易	47	C61530	自育	易
19	北川红萝卜	四川	易	48	C61525	自育	易
20	半头胭脂红	四川	易	49	C61258	自育	易
21	北川白圆花	四川	易	50	C61524	自育	易
22	郫县小黄叶	四川	易	51	C61486	自育	易
23	洪雅金沙	四川	极易	52	C61490	自育	易
24	青冠 107	山东	耐	53	C60131	自育	易
25	潍县青	山东	中	54	C60104	自育	易
26	夏青玉	山东	易	55	C60293	自育	易
27	华丰热抗	山东	易	56	C60841	自育	易
28	丰光一代	山西	中	57	C61202	自育	易
29	沙罐大青头	山西	极易				

2 结果与分析

2.1 SSR 引物多样性分析

搜索萝卜基因组数据库(<http://marker.kazusa.or.jp/Daikon/>及<http://bioinfo.bti.cornell.edu/cgi-bin/radish/>)中公布的与抽薹开花相关的 SSR 引物序列信息,合成了 206 对,并从中筛选出 21 对扩增条带清晰、多态性明显较好的引物。分别对 57 份材料进行 PCR 扩增,21 对 SSR 引物的扩增结果如表 2 所示,共扩增出 102 条条带,每对引物扩增出 2 ~ 9 条条带,平均 4.86 条,其中具有多态性的 95 条,多态性条带百分率为 93.14%。表明本研究中筛选到的 SSR 引物多态性良好,有较显著的检出效率,可用于后续的遗传多样性分析。

2.2 遗传多样性分析

通过 POPGENE 1.32 软件分析,得到表 3 结果,57 份供试材料的平均观测等位基因数为 2.967 4,平均有效等位基因数为 2.419 1,有效等位基因比例为 81.52%。统计分析表明,平均 Nei 基因多样性指数为 0.355 5,平均 Shannon 多态性指数为 0.528 9,均反映出供试材料较高的遗传多样性。

2.3 聚类分析

应用 Masatoshi 等的统计分析方法^[17],计算遗传相似系

数(GS),共获得 1 596 个两两不同材料间的遗传相似系数(表 4),变幅为 0.347 8 ~ 0.934 8,平均遗传相似系数为 0.638 1,>0.7 的仅占 22.87%,其中 18 和 19 号材料间遗传相似系数最大,为 0.934 8,说明二者间亲缘关系最近;2 和 18、31 号间的遗传相似系数最小,为 0.347 8,说明它们之间的亲缘关系最远。由此可知,57 份材料的遗传背景丰富,可作为育种资源。

根据遗传相似系数采用 UPGMA 法进行聚类分析,结果如图 1 所示。以 0.57 为阈值可以把 57 份材料分为三大类群:第Ⅰ类包括 1、2、3 号材料,共 3 份,均为来源于德国的极耐抽薹材料,占有极耐抽薹材料的 50%;第Ⅱ类为 4、5、6 号材料,共 3 份,来源于韩国和日本;第Ⅲ类为其他 51 份材料,均来源于我国。进一步分析可以把第Ⅲ类分为 3 个亚类(第 3、4、5 亚类):第 3 亚类共有 45 份,占有供试材料的 78.95%;第 4 亚类共有 5 份,均为极易抽薹材料,占有极易抽薹材料的 83.33%;第 5 亚类仅有 42 号材料。

3 讨论与结论

遗传多样性是生物所携带的遗传信息的总和,对分析重要性状和辅助育种具有重要意义。本研究中,SSR 引物及遗传多样性结果说明,供试材料间遗传相似程度较低,不同抽薹

表 2 各引物序列及扩增结果

编号	引物名称	上游引物 (5'→3')	下游引物 (5'→3')	扩增总带数 (条)	多态性带数 (条)	多态性条带百分率 (%)
1	RS001	CAGATCCGAGGGAGTTTGAA	TTCTCTCATCCTCGGTTTCC	3	3	100.00
2	RS005	ACTTCCCCGGACCTTAAAGA	GCATCGCAAAGAACAGACAA	6	6	100.00
3	RS007	GTGGCCGAGTAGATGCTTGT	TGGCAATAGCTTTTCCTTGCT	5	5	100.00
4	RS014	CGAAGTTTGCGTTTTCGATT	AGTGTCTTGCAAGCTCGGAT	4	4	100.00
5	RS015	GCTCTTTCTAGCCCCAGGAT	CCGATGGTCATGGGTAGTTT	6	5	83.33
6	RS018	ACAACCAACCCAGAAAGCAA	CTTCCCTTCCCATTTTGAT	5	5	100.00
7	RS020	GAAGGGCAACAGAAATAGCA	TTGCGGTGAACAAAGATCAA	6	6	100.00
8	RS033	ACCTCCTCCTCTTGACGA	CTCTCTCTTCTTCCGCGCA	7	6	85.71
9	RS034	TCCGGGGAGAAAAAGATTT	CGATGACTGAGTGGCTTTCA	3	3	100.00
10	RS037	TTGGTTATTTCAGGGTTGTCG	AACGAGAGCAACCTCAGCAT	3	3	100.00
11	RS047	AAATCAAGATCCATCGCCAC	ACAGCCGTCTCAAGGAATTG	5	5	100.00
12	RS055	GGCTCAAACGTTTGGATGT	GAGGGAGGAAGAAGAACGCT	2	2	100.00
13	RS058	CTGGCTTTGCTTCTTCTTGG	CAGCAGCTCCTTACCTTGCT	9	7	77.78
14	RS068	AGTAAGCAGGAGGAGGAGCC	TGATCCCTGAGAGGTATCCG	8	7	87.50
15	RS077	ACAACCAACCCAGAAAGCAA	CTTCCCTTCCCATTTTGAT	4	4	100.00
16	RS087	GGAGCGTGTAGGGATTGAAA	ATCCCTTGAGAAGCTGGAAT	3	3	100.00
17	RS089	CAATTTTGAGTTGCACACGG	TGGGAACCAGAGATTTCTGTC	4	4	100.00
18	RS092	GAGCCACTTCAAAGCGAAC	CGGATACCTCTCAGGGATGA	7	6	85.71
19	RS094	GGTTACTGGCTCCAAAGCAC	CGATTGAAAAGAGAGGGTGGA	5	5	100.00
20	RS095	CGATATGGACATTCGACGACG	TCGTTTCGTGAAAGGGAAC	4	3	75.00
21	RS097	GCTTCTCCATGCTCGATTTC	TGGCTTTGTAATTTGCGTG	3	3	100.00
平均				4.86	4.52	93.14
合计				102	95	

表 3 57 份不同抽薹性萝卜材料遗传多样性指数

位点	样本	观测等位 基因数	有效等位 基因数	Nei 基因多 样性指数	Shannon 多样性 信息指数
平均	57	2.967 4	2.419 1	0.355 5	0.528 9
标准差		0.147 4	0.303 4	0.134 9	0.166 8

性萝卜间遗传差异较大,遗传关系较远,这与 Wang 等利用 EST-SSR 标记进行遗传多样性分析所得结果中引物多态性 89.3%、平均多态信息含量(PIC)值 0.39^[18]相似。同时聚类分析结果中,本研究分类出的第Ⅲ大类与其研究分类得到的第Ⅰ大类较为相似,但其余分类结果差异较大。方平等对肉质色不同萝卜遗传多样性的分析结果中,平均 N_a 、 N_e 、 J 、 GS 值分别为 8.7、5.162 7、1.76、0.85^[19],本研究结果与其差异较大。不同结果的产生,可能与材料来源的丰富程度尤其是野生型材料的多少有关。由于研究目的性状的不同,所选用的分子标记差异较大,对遗传多样性结果的影响较大。

抽薹性状为数量性状,受外界环境影响大,在十字花科蔬菜中的相关研究较多。陈文辉等利用 2 种分子标记分析耐抽薹大白菜的遗传多样性,其中 SRAP 标记的平均多态性条带和比率均比 ISSR 标记高,平均 GS 值较小而 GS 变幅较大,来源日本、韩国和我国山东的品种各聚为一类,反映出耐抽薹大白菜间存在一定的地域差异^[20]。高颖等利用 57 个 SSR 和 InDel 标记对大白菜抽薹开花时间进行关联分析,将 80 份自交系及 110 份 F_1 材料分为 3 个亚群体,发现 13 个标记的 17 个位点与抽薹时间和开花时间相关^[21]。在耐抽薹萝卜研究上,柳李旺等将甲基化敏感扩增多态性技术(MSAP)应用于萝卜抽薹机理研究中,证明了 DNA 甲基化水平的变化影响萝卜抽薹开花,揭示了甲基化水平降低有利于抽薹开花相关基因的表^[22]。刘哲等对萝卜抽薹相关 SRAP 分子标记进行

筛选与分析,获得 116 对多态性引物组合,多态性 40.3%,多态性条带范围为 0~5,得到 1 个与萝卜晚抽薹基因紧密连锁的标记,遗传距离为 5.7 cM^[23]。本研究中,来源于德国的极耐抽薹萝卜材料分在第Ⅰ大类,日本的极耐抽薹材料时大根在第Ⅱ大类,第Ⅲ大类中则包括了极耐抽薹的藏萝卜 1 号 and 自育的 C60223,三类间的亲缘关系较远。其中,日本的时大根与黑萝卜、藏萝卜 1 号 and C60223 间的 GS 值分别为 0.46、0.50、0.43,遗传差异大,可作为耐抽薹杂交亲本材料加以利用。同时,本研究的聚类结果可将大部分地理来源相近的材料聚为一类,但与抽薹性状之间仍存在差别。例如,第 4 亚类将来源于我国的极易抽薹萝卜材料聚为了一类,但第 3 亚类中却不能较好地地区别开抽薹性不同的材料。这可能是由于 SSR 标记体现的是种质材料间分子水平上的差异,而表型性状差异是环境与基因互作的结果。

不同抽薹性萝卜材料所表现出的丰富多样性,对萝卜种质资源管理和耐抽薹品种选育具有重要意义。本研究结果能在一定程度上反映出不同抽薹性萝卜材料间的亲缘关系,后续选择遗传相似度低、亲缘关系远的材料作为亲本应用于育种,以提高后代遗传重组率,增强杂种优势。同时,应注意多种分子标记的结合,以期获得更可靠的聚类结果。

参考文献:

[1] 方智远. 中国蔬菜育种学[M]. 北京:中国农业出版社, 2017:703.
[2] 汪隆植,何启伟. 中国萝卜[M]. 北京:科学技术文献出版社, 2005:1314.
[3] 唐荣华,张君诚,吴为人. SSR 分子标记的开发技术研究进展[J]. 西南农业学报,2002,15(4):106-109.

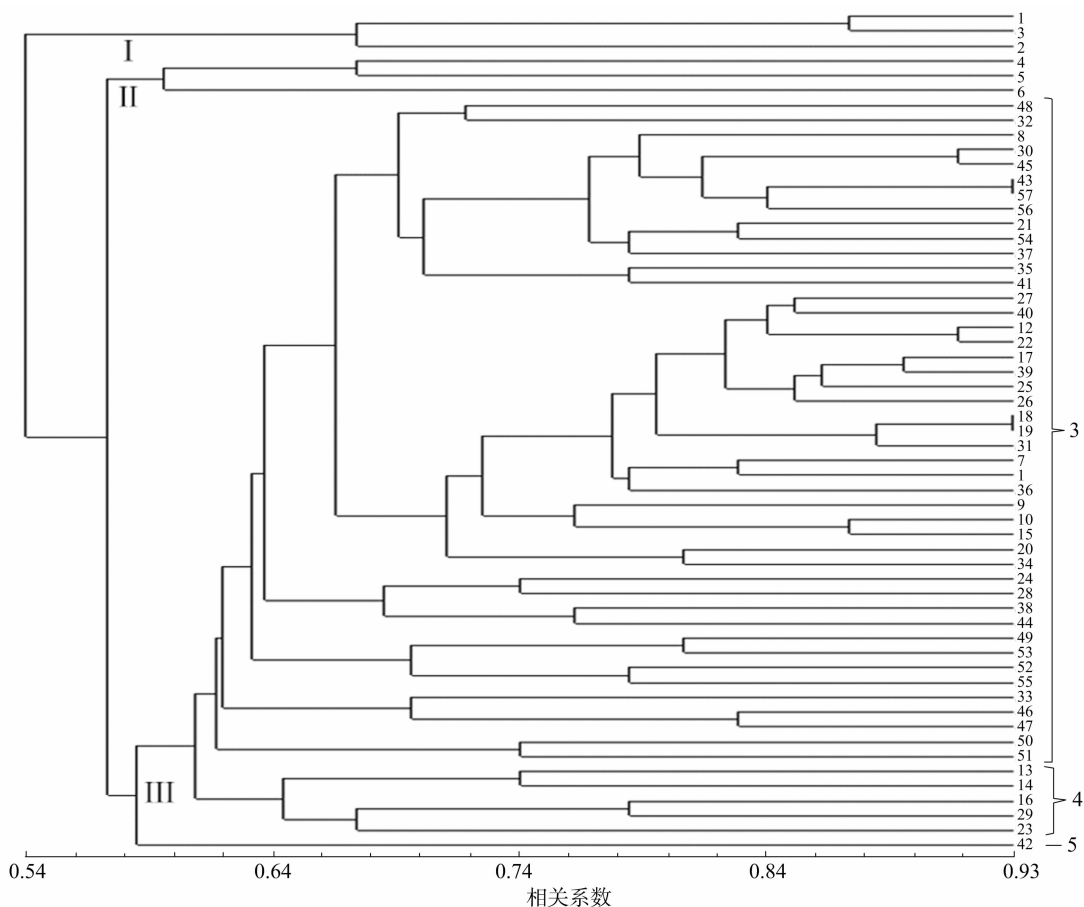


图1 基于 SSR 标记的遗传相似系数聚类图

- [4] 王晓武, 杜永臣. 蔬菜作物分子育种研究现状与趋势[J]. 中国农业科技导报, 2007, 9(2): 14-18.
- [5] 邱杨, 李锡香, 李清霞, 等. 利用 SSR 标记构建萝卜种质资源分子身份证[J]. 植物遗传资源学报, 2014, 15(3): 648-654.
- [6] 王庆彪, 张丽, 郑鹏婧, 等. 秋红萝卜 SSR 指纹图谱构建及其应用[J]. 分子植物育种, 2015, 13(8): 1794-1801.
- [7] Masato T, Keita S, Nakao K, et al. Construction of a molecular linkage map of radish (*Raphanus sativus* L.), based on AFLP and *Brassica* - SSR markers[J]. Breeding Science, 2005, 55(1): 107-111.
- [8] Ryoichi N, Tomoko H, Naoko M, et al. Development of genomic and EST - SSR markers in radish (*Raphanus sativus* L.) [J]. Breeding Science, 2011, 61(4): 413-419.
- [9] Zhai L L, Xu L, Wang Y, et al. Novel and useful genic - SSR markers from de novo transcriptome sequencing of radish (*Raphanus sativus* L.) [J]. Molecular Breeding, 2014, 33(3): 611-624.
- [10] Zhai L L, Liu L W, Zhu X W, et al. Development, characterization and application of novel expressed sequence tag - simple sequence repeat (EST - SSR) markers in radish (*Raphanus sativus* L.) [J]. African Journal of Biotechnology, 2013, 12(9): 921-935.
- [11] 李竟才, 李世升, 张娜娜, 等. 白萝卜纯度鉴定的 SSR 分子标记筛选与鉴定[J]. 分子植物育种, 2018, 16(8): 2525-2532.
- [12] 张小康, 朱运峰, 陈玉霞, 等. SSR 分子标记技术在汉青一号萝卜种子纯度鉴定中的应用[J]. 湖北农业科学, 2016, 55(19): 5069-5071.
- [13] 韩晓雨. 萝卜雄性不育系及其保持系的生理生化分析和 SSR 标记研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2012.
- [14] 付卫民, 王淑芬, 何启伟, 等. 心里美萝卜肉质根内花青素相关基因的 EST - SSR 标记筛选[C]// 中国园艺学会十字花科蔬菜分会第十届学术研讨会论文集. 北京: 中国园艺学会, 2012: 5.
- [15] Francis C Y, Rong C Y, Boyle T. POPGENE version 1.32, Microsoft windows - based freeware for population genetic analysis [M]. Edmonton; University of Alberta, 1999: 45-68.
- [16] Rohlf F. NTSYS - pc Version 2.1. Numerical taxonomy system and multivariate analysis system [M]. New York; Exeter Software, 2002: 57-66.
- [17] Masatoshi N. Molecular evolutionary genetics [M]. New York: Columbia University Press, 1989: 150-154.
- [18] Wang Q B, Zhang L, Zheng P J. Genetic diversity and evolutionary relationship analyses within and among *Raphanus* species using EST - SSR markers[J]. Molecular Breeding, 2015, 35: 62.
- [19] 方平, 陈发波, 姚启伦, 等. 肉质色不同萝卜遗传多样性的 SSR 分子标记分析[J]. 植物遗传资源学报, 2012, 12(2): 226-232.
- [20] 陈文辉, 方淑桂, 曾小玲, 等. 利用 ISSR 和 SRAP 标记分析耐抽薹大白菜的遗传多样性[J]. 热带作物学报, 2011, 32(10): 1858-1863.
- [21] 高颖, 罗双霞, 王彦华, 等. 大白菜抽薹开花时间与 SSR 和 InDel 标记的关联分析[J]. 园艺学报, 2012, 39(6): 1081-1089.
- [22] 柳李旺, 宋贤勇, 龚义勤, 等. 萝卜 MSAP 体系优化与抽薹过程中 MSAP 分析[J]. 江苏农业科学, 2006(6): 203-206.
- [23] 刘哲, 许园园, 苏小俊. 萝卜抽薹相关 SRAP 分子标记筛选与分析[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(8): 74-76.

