



基于 SSR 分子标记的萝卜遗传多样性研究

李世升,张娜娜,陈亚珠,李竟才,方元平,项俊

(大别山特色资源开发湖北省协同创新中心,湖北省经济林木种质改良重点实验室,黄冈师范学院 生命科学学院,湖北 黄州 438000)

摘要:为促进萝卜种质资源保存以及萝卜品种改良,分别以白萝卜品种 734、理想大根、大将军、黄州萝卜和红萝卜品种红宝、红园、七叶红、262 和一尺红为试验材料,利用 SSR 对上述萝卜地方品种以及常规品种开展遗传多样性研究。首先对上述萝卜材料的田间性状(叶型、皮色)进行了观察,进而利用筛选得到的 9 对 SSR(微卫星 DNA,简单重复序列)引物对上述萝卜样品进行检测。结合电泳条带和 NTSYS 软件对九种萝卜的遗传多样性进行分析。结果显示 9 个品种之间被分为两大类群,类群一包括除七叶红之外的 8 个品种,且每个品种在不同的相似系数间表现出了多样性,类群二则仅包括七叶红。第一个类群内又有两个明显的分支,其中一个分支包括理想大根、724、大将军、黄州萝卜 4 种,其皮色表现为白色;另一个分支包括一尺红、红宝、262 和红园 4 种,其皮色表现为红色,与田间观察的情况一致。

关键词:聚丙烯酰胺凝胶电泳;SSR 分子标记;萝卜;遗传多样性;聚类分析

萝卜(*Raphanus sativus* L.)是十字花科萝卜属植物,其染色体数目是 18 对,在世界各地均有分布。中国具有丰富的萝卜种质资源,是萝卜的发源地之一。萝卜在世界各地广泛种植,其中小型四季萝卜主要分布在欧洲和美洲,大型萝卜主要分布在亚洲,尤其是中国、日本和韩国等^[1-2]。萝卜是一种经常出现在我国居民餐桌上的蔬菜,在我国的蔬菜市场中扮演着重要的角色,因此开展萝卜遗传多样性的研究是非常有必要的,不仅对我国萝卜市场发展以及萝卜种质资源的保存、更新、收集有一定意义,还与改善我国居民的生活水平和食品类别息息相关。

分子标记技术已经在植物研究中取得较大进展,分子标记如 SSR 等应用于蔬菜及果树等遗传多样性及遗传图谱研究较多^[3-13]。最近 SSR 标记应用于萝卜遗传多样性研究也有报道,如方平等^[11]利用 86 对 SSR 引物分析了 37 份肉质颜色不同萝卜材料间的遗传差异,共检测出 753 个基因型,这为进一步利用萝卜的 SSR 分子标记来进行其他方面的研究提供了基础。当前 NCBI 数据库中也可搜索到萝卜的 SSR。结合现有数据库资源及测序结果,拟开发新的 SSR 标记对现有萝卜种质资源的亲缘关系进行鉴定。本研究以 9 个

萝卜品种为试验材料,利用 SSR 对上述萝卜地方品种以及常规品种开展遗传多样性研究,旨在为促进萝卜种质资源保存以及萝卜品种改良奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

理想大根萝卜、734 萝卜、大将军萝卜、黄州萝卜、一尺红萝卜、七叶红萝卜、红宝萝卜、262 萝卜、红园萝卜均来自黄冈师院大别山生物资源库。

1.2 方法

1.2.1 试验设计 田间试验在黄冈师范学院实验田进行,分子生物学实验部分在湖北省经济林木种质改良重点实验室进行。田间实验主要是观察每个样品的叶型、皮色等性状,分子生物学实验部分则包括 DNA 的提取、引物的设计合成与筛选、聚类图分析等。

1.2.2 DNA 的提取 利用 TIANGEN 植物基因组试剂盒,采用试剂盒法提取 DNA。

1.2.3 引物合成及筛选 利用 MISA(Micro-Satellite)识别 SSR(简单重复序列),再利用网页版引物分析软件 Primer3.0 分析并筛选出引物,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成引物。从 125 对引物中筛选出多态性明显的引物组合,筛选之后的 9 对引物序列及 SSR 类型信息如表 1 所示。

1.2.4 PCR 扩增体系 PCR 扩增的总体系为 25 μ L:正向引物 1 μ L、反向引物 1 μ L、10 \times buffer(含

收稿日期:2018-09-20

第一作者简介:李世升(1983-),男,博士,副教授,从事作物发育与育种研究。E-mail:21581872@qq.com。

通讯作者:项俊(1963-),男,硕士,教授,从事植物资源利用研究。E-mail:xjun63@126.com。

Mg²⁺) 2.5 μL、Template 1 μL、dNTP 1 μL、TaqDNA 聚合酶 0.3 μL、ddH₂O 18.2 μL。

表 1 琼脂糖凝胶电泳初步筛选出的 SSR 标记引物序列

Table 1 Preliminary screening of SSR markers' primer sequence through agarose gel electrophoresis					
ID	引物名称 Primer	引物序列(5'→3') Sequence	引物序列(5'→3') Sequence	SSR 类型 SSR type	扩增产物大小/bp Amplified product size
1	R33	acacttcaactcacgcatccc	atgcccgctcaatgattctc	(GAT)20	201
2	R75	ggggggagttagtgggaagaa	tcgtcacaaggaaggctct	(GTG)7	250
3	R80	aggatcagtgacggagctgt	accccagaagaagtggctct	(GAA)7	231
4	R101	ctccaaaaactccaactccg	cagcccatactgctgtctca	(TGA)7	259
5	R102	ttggggagcaagaaaaagaa	agtctctcctcagcgcaac	(GAT)8	251
6	R103	aaaccagcaacggaaaattg	agccttgtgaacagaaaccg	(GAA)12	211
7	R104	ttttctcaagagtcgctcgc	ggaacgacagaatccgagac	(CTC)9	242
8	R105	tgaggatgagggtaacagcc	taattccttgccctcgttgg	(AGC)8	154
9	R106	gaggctcttcgttggtctaga	cgtcgtagcaatctcgttga	(GTG)8	219

1.2.5 PCR 扩增程序 PCR 扩增在 PCR 仪上进行,PCR 仪上的扩增程序设置如下,第一步: LID 104 ℃;第二步:94 ℃预变性4 min;第三步: 94 ℃变性 30 s;第四步:55~60 ℃退火 30 s;第五步:72 ℃延伸 30 s;第六步:从第三步到第五步重复 35 个循环;第七步:72 ℃延伸 4 min;第八步: 4 ℃保存。

1.2.6 聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)条带分析 萝卜遗传多样性 根据红萝卜和白萝卜做非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳的结果图,对所取样品的遗传多样性的进行分析,找出目标条带,然后利用软件 NTSYS-32 进行数据处理分析。

2 结果与分析

2.1 萝卜材料田间性状观察结果

红园、七叶红、一尺红、红宝、262 皮色均为红色;理想大根、大将军、734 皮色均为白色;黄州萝卜肉质根上部为青色,下部为白色;其中红园、七叶红、红宝、262、理想大根、大将军、黄州、734 叶型为花叶,只有一尺红表现为板叶。田间性状调查结果情况汇总如表 2 所示。

2.2 PAGE 条带分析结果

试验选取了 9 对引物对 9 个样品进行了聚丙烯酰胺凝胶电泳。得到的电泳结果如图 1 所示,图中显示的依次为同一引物对不同萝卜 DNAPCR 扩增后电泳条带排列结果,框选处分别是引物 R-80(左)与 R-75(右)对 9 个样品进行 PCR 扩增,进一步 PAGE 电泳后的清晰条带。

图 2 中框选处即为引物 R-105 对 9 个样品进行 PCR 扩增,其产物进行 PAGE 电泳后的清晰

条带,以 R105 为例进行电泳条带分析可以看出, R105 引物大小为 154 bp,所以其扩增产物所处的条带位置位于 Marker 的 100~250 bp 条带即为目标条带。

表 2 九种萝卜样品田间性状

Table 2 Characters of nine radish samples in the field

编号 Number	品种名称 Variety name	皮色 Skin color	叶型 Leaf type
1	红园	红皮	花叶
2	七叶红	红皮	花叶
3	一尺红	红皮	板叶
4	红宝	红皮	花叶
5	262	红皮	花叶
6	理想大根	白皮	花叶
7	大将军	白皮	花叶
8	黄州	白皮	花叶
9	734	白皮	花叶

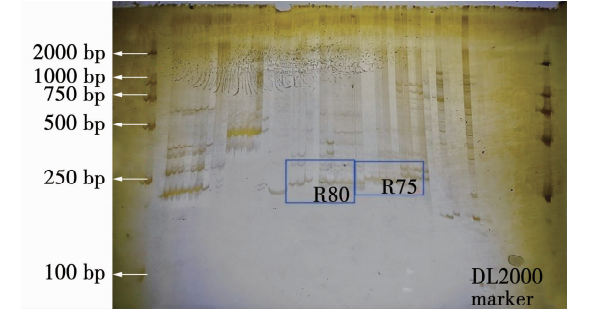


图 1 9 对 SSR 引物聚丙烯酰胺凝胶电泳结果
Fig. 1 Results of 9 pairs SSR primers by polyacrylamide gel electrophoresis

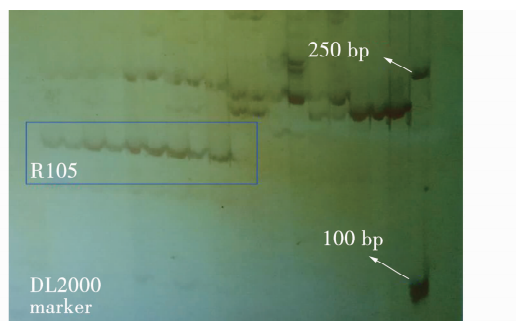


图2 引物 R105 扩增结果

Fig. 2 Amplification results of SSR primer R105 by polyacrylamide gel electrophoresis

2.3 聚类图结果分析

在 NTSYS 软件中,根据相似系数法求得品种间的遗传相似性矩阵,再对矩阵进行聚类分析,生成聚类图。其遗传聚类图如图 3 所示,图中 C1 表示理想大根, C2 表示 734, C3 表示大将军, C4 表示黄州萝卜, V5 表示一尺红, V6 表示七叶红, V7 表示红宝, V8 表示 262, V9 表示红园。从树状聚类图上可以看出,9 个萝卜品种资源为两个大类群 A 和 B, A 群由理想大根、734、大将军、黄州、一尺红、红宝、262、红园; B 群为七叶红。A 群分为 A1 和 A2 两个亚群, A1 亚群包括理想大根、734、大将军、黄州; A2 亚群包括一尺红、红宝、262、红园,在相似系数 0.60 处被区分开,两组材料性状表现出不同,具有明显的差异。在相似系数 0.67 处, A1 亚群又被分为 A11 和 A12 两个组, A11 组包括理想大根、734; A12 组为大将军、黄州。

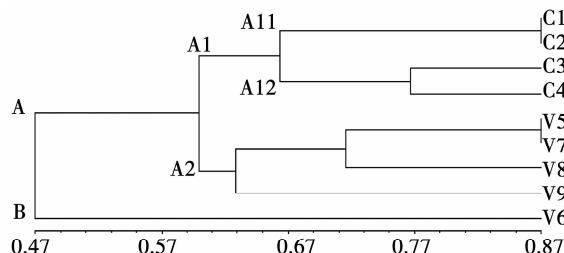


图3 基于 SSR 数据分析所得的 9 份材料之间的聚类图

Fig. 3 Cluster diagrams of 9 materials based on SSR data analysis

3 结论与讨论

本研究利用根据萝卜 SSR 标记合成的 9 对引物对红宝、红园、黄州萝卜、理想大根、734、262、大将军、一尺红、七叶红共 9 个萝卜品种进行琼脂糖凝胶电泳检测。上述 9 对扩增条带清晰稳定、多态性高的引物,将这 9 对引物对样品进行扩增,

共得到 59 条带,平均每个引物扩增出 6~7 条带,多态性条带比例为 88.1%,充分揭示了不同供试材料间的遗传多样性。

聚类结果表明 9 种样品主要分为两大类群,其中一个类群只包括七叶红,另外的一个类群包括理想大根、大将军、黄州萝卜、734、262、一尺红、红宝、红园这 8 种。聚类结果说明这两个类群间存在比较远的亲缘关系。七叶红萝卜为早熟萝卜品种 30~50 d 即可成熟,而其他萝卜均是 60~90 d 的成熟期。除此之外,七叶红在叶片数、花期等特征上均与其他萝卜不同^[13-14]。

第二大类群又有两个较大的分支,根部皮色可将两者明显区分开来,以理想大根、734、大将军、黄州萝卜皮色表现为白色;以一尺红、红宝、262、红园样品的皮色表现为红色,体现了皮色性状的差异,与田间观察记录一致。每个品种间不同的相似系数间又被分为不同的小类群,形成了萝卜品种间的多样性。

参考文献:

- [1] 郎丰庆. 萝卜的食疗和药用[J]. 山东蔬菜, 1997(2): 57-58.
- [2] 王春丽, 张雪清, 张贵生. 萝卜的研究价值及开发应用前景[J]. 长江蔬菜, 2011(10): 11-14.
- [3] 贾豪, 魏小春, 姚秋菊, 等. 辣椒 SSR 标记种质资源遗传多样性的分析[J]. 种质资源, 2017, 15(1): 353-363.
- [4] 李鸿雁, 米福贵, 李志勇, 等. 扁蓿豆遗传多样性研究初探[J]. 草业与畜牧, 2007(1): 20-23.
- [5] 石莹, 李穆, 何平, 等. SNP 技术及其在作物研究上的应用[J]. 农业科学, 2014, 4(3): 60-65.
- [6] 尹承苗, 王功帅, 李园园, 等. 连作苹果园土壤真菌的 T-RFLP 分析[J]. 生态学报, 2014(4): 837-846.
- [7] 邱洋, 李锡香, 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.
- [8] Sunar S, Yildirim N, Sengul M, et al. Genetic diversity and relationships detected by ISSR and RAPD analysis among Aethionema species growing in Eastern Anatolia (Turkey) [J]. Comptesrendus-Biologies, 2016, 339(34): 147-151.
- [9] 王庆彪, 张扬勇, 庄木, 等. 中国 50 个甘蓝代表品种 EST-SSR 指纹图谱的构建[J]. 中国农业科学, 2014(1): 111-121.
- [10] El-Esawi M A, Germaine K, Bourke P, et al. Genetic diversity and population structure of Brassica oleracea germplasm in Ireland using SSR markers[J]. Comptesrendus - Biologies, 2016, 339: 133-140.
- [11] 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, 13(2): 226-232.
- [12] 张颖. 应用 DNA 分子标记鉴定几种蔬菜作物种子纯度和真实性的探究[D]. 杭州: 浙江大学, 2008.
- [13] 徐建波, 张晓康, 李德超, 等. 夏秋萝卜品种比较试验[J]. 上海蔬菜, 2015(3): 19-20.
- [14] 李小乔. 低温处理对萝卜开花习性影响规律研究[J]. 长江蔬菜, 2014(8): 33-35.



密度对高淀粉玉米品种产量及淀粉合成相关酶活性的影响

赵 索,樊景胜,连永利,曲忠诚,徐 婷,武琳琳,董 扬
(黑龙江省农业科学院 齐齐哈尔分院,黑龙江 齐齐哈尔 161000)

摘要:为筛选出适合齐齐哈尔地区的高淀粉玉米品种最佳的栽培方案,选用高淀粉玉米品种齐市一号、绿单一号和齐齐哈尔主栽高淀粉玉米品种鑫鑫一号为试验材料,通过调节种植密度,探讨不同种植密度对高淀粉玉米产量、粗淀粉含量、ADPG 焦磷酸化酶和 UDPG 焦磷酸化酶活性的影响。结果表明:不同种植密度对高淀粉玉米产量影响显著,不同密度条件下,齐市一号产量均高于绿单一号和鑫鑫一号,齐市一号在 70 000 株·hm² 时产量最高,与 70 000 株·hm² 差异不显著,但二者均显著高于其他密度处理。而籽粒中淀粉合成酶 ADPG 焦磷酸化酶和 UDPG 焦磷酸化酶活性齐市一号显著高于其他品种,分别在 70 000 和 90 000 株·hm² 时达到最大值。籽粒中粗淀粉含量齐市一号显著高于其他品种,在 60 000 株·hm² 时达到最大值。综上所述,齐齐哈尔地区选择种植高淀粉玉米品种齐市一号,最适宜种植密度为 70 000 株·hm²。

关键词:高淀粉玉米;产量;粗淀粉含量

玉米在黑龙江省种植面积较大,是黑龙江省第一大粮食和饲料作物,而齐齐哈尔市作为黑龙江省的产粮大市,玉米在齐齐哈尔地区粮食生产中同样占有举足轻重的地位。随着经济的发展和

科学技术的进步,人们对玉米的需求已不再局限于作粮食、饲料和满足传统工业的需要,而是向众多的新领域拓展^[1]。目前,实现高产、优质、专用是现代玉米发展的趋势,同时玉米也由单纯产量向定向品质型、专用型转变^[2]。目前,黑龙江省高淀粉玉米杂交种已应用在生产上,而且产量潜力可与普通玉米相比,但不同年份和不同栽培条件下高淀粉玉米的产量波动较大,玉米的淀粉含量变动也很大,这主要是由于缺乏配套的栽培措施

收稿日期:2018-09-21

第一作者简介:赵索(1986-),女,硕士,研究实习员,从事玉米遗传育种研究。E-mail: zhaosuo_2007@126.com。

通讯作者:樊景胜(1963-),男,学士,副研究员,从事玉米遗传育种研究。E-mail: 939174738@qq.com。

Study on Genetic Diversity of Radish Based on SSR Molecular Markers

LI Shi-sheng, ZHANG Na-na, CHEN Ya-zhu, LI Jing-cai, FANG Yuan-ping, XIANG Jun

(Collaborative Innovation Center for the Characteristic Resources Exploitation of Dabie Mountains, Key Laboratories of Economic Forest Germplasm Improvement and Comprehensive Resources Utilization of Hubei Province, College of Life Science, Huanggang Normal University, Huanggang 438000, China)

Abstract: In order to promote the preservation and breed improvement of radish germplasm resources, nine varieties of radish were used as the experimental materials, which tried to study on genetic diversity the local and conventional radish varieties mentioned above using SSR. Firstly, field characters (leaf shape and skin color) of the above radish materials were observed, then, 9 pairs of SSR primers were screened to detect the above radish samples. The genetic diversity of nine radish species was analyzed by electrophoretic banding and NT-SYS software. The results showed that the nine varieties of radish were divided into two groups, group 1 includes 8 varieties except Qiyehong radish, and each variety showed diversity among different similarity coefficients, group 2 includes only Qiyehong radish. There were two distinct branches in the first group, one branch includes four radishes, Lixiangdagen radish, 734 radish, General radish, and Huangzhou radish, whose skin color is white; another branch includes four radishes, the Yichihong radish, Hongbao radish, 262 radish, and Red garden radish, whose skin color is red, which was consistent with field observations.

Keywords: polyacrylamide gel electrophoresis; SSR molecular markers; radish; genetic diversity; clustering analysis