

利用 SSR 分析红菜苔的遗传多样性

周晓波¹, 白占兵¹, 丁茁萋¹, 吴艺飞¹, 王晓武²

(¹ 湖南省蔬菜研究所, 长沙 410125; ² 中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081)

摘要: 红菜苔是我国独有的蔬菜资源, 深受消费者喜爱。利用 63 对 SSR 引物检测来自全国的 45 份红菜苔种质资源的遗传多样性, 63 对引物扩增出 124 条带, 平均每条引物扩增出近 2 条带, 扩增产物片段大小都在 150 ~ 300bp 之间, 相似系数在 0.56 ~ 0.89 之间。结果表明, 红菜苔具有丰富的遗传多样性, 本研究为菜苔资源的利用和育种提供了分子生物学依据。

关键词: 红菜苔; 种质资源; SSR; 遗传多样性

Genetic Diversity of Tsai-tai Germplasm Revealed by SSR Markers

ZHOU Xiao-bo¹, BAI Zhan-bing¹, DING Zhuo-yi¹, WU Yi-fei¹, WANG Xiao-wu²

(¹ Hunan Vegetable Research Institute, Changsha, 410125; ² Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081)

Abstract: Tsai-tai is a vegetable resources of our unique, loved by consumers. SSR methods were applied to detect genetic diversity of 45 Tsai-tai germplasm from China, provided biological foundation for the utilization and seed breeding of the Tsai-tai germplasm. 124 bands were amplified with 63 SSR primers. The amplified DNA fragments size were 150 – 300bp. Similarity coefficients between 0.56 – 0.89. The results show there were abundant genetic diversity in the Tsai-tai germplasm of China. This provides the basis for molecular biology research for the Tsai-tai resource utilization and breeding.

Key words: Tsai-tai; Germplasm; SSR; Genetic diversity

红菜苔 (*Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* var. *perperera* Hort.) 别名紫菜苔、红油菜苔, 是十字花科芸苔属芸苔种白菜亚种的变种, 一二年生草本植物, 是原产中国的特产蔬菜, 长沙、武汉、成都都是 3 个原产中心^[1]。红菜苔以柔软的花苔供食, 品质脆嫩、营养丰富, 维生素 C 含量比大白菜、小白菜、塌菜等都高。近年来, 红菜苔被作为优质高档菜引种到全国各地栽种。目前, 国内对红菜苔的研究主要集中在传统的品种选育^[2] 和雄性不育的利用^[3-7] 等, 也有红菜苔原生殖体^[8]、精细细胞的分离及其保存^[9-10] 的研究, 李亭亭等^[11] 对油菜与红菜苔杂交后代遗传变化时行了分析, 章艳^[12] 对紫菜苔色素提取工艺进行了研究; 在分子生物学上, 除漆小泉等^[10] 在 1992

年利用 RAPD 对紫菜苔自交系染色体 DNA 进行了研究, 李焰焰等^[13] 对紫菜苔快速碱化因子基因 *Bc-MF14p* 表达进行了研究, 白占兵等^[14] 对紫菜苔提取 DNA 的方法进行了简化处理外, 未见其他分子生物学报道。由于杂交种的推广, 大量优异的菜苔种质资源丢失或面临丢失, 因此, 进行种质资源抢救性收集、保护、研究势在必行。湖南蔬菜研究所吴朝林老师经过 20 多年红菜苔种质资源的研究, 奠定了红菜苔的研究基础, 但是自 2008 年吴先生去世, 大多数资源来历不明。为此将吴老师收集于全国各地的 45 份红菜苔资源于 2008 年 11 月种植于湖南省蔬菜研究所试验田, 同年 12 月在中国农业科学院蔬菜花卉研究所十字花科分子遗传课题组开始 SSR 分

收稿日期: 2011-11-14 修回日期: 2012-03-02

基金项目: 湖南省自然科学基金项目“SSR 分子标记研究紫菜苔的分类与亲缘关系”(2008JJ3035)

作者简介: 周晓波, 助研, 从事十字花科育种及分子标记研究。E-mail: nkyzxb@yahoo.com.cn

通信作者: 丁拙萋, 博士, 副研, 从事红菜苔遗传育种。

子标记研究。通过对 45 份红菜苔资源进行遗传多样性分析,为这些材料的利用提供一定的理论基础,为红菜苔资源研究和育种提供分子生物学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

45 份红菜苔材料全部来自于湖南省蔬菜研究所,编号分别为 1、2、……45(表 1)。

1.2 试验方法

1.2.1 DNA 的提取 参照白占兵等^[14]对紫菜苔 DNA 的提取方法。

1.2.2 DNA 浓度和纯度的测定 用微量紫外分光光度计(ND-1000)检测所提取 DNA 的浓度,然后稀释到 60 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 备用。

1.2.3 PCR 扩增检测 以 45 份材料的 DNA 为模板(引物见表 2)进行 PCR 扩增,反应体系总体积为 15 μl ,内含 1 \times buffer, 125 $\mu\text{mol/L}$ dNTPs, 0.375 U *Taq* 酶, 0.4 $\mu\text{mol/L}$ 引物, DNA 40ng。RAPD 扩增程序: 94 $^{\circ}\text{C}$ 5min 预变性; 35 个热循环,每个热循环包括 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1min, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1min 30s; 结束循环后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10min。扩增完成后 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳(160V, 2h), 银染, 在灯箱上观察并拍照。

表 1 供试资源资料

Table 1 Resource for the test

序号 No.	代号或名称 Code or name	序号 No.	代号或名称 Code or name	序号 No.	代号或名称 Code or name
1	24-N3	16	32-34	31	4-N5
2	28-N6	17	长沙迟 204-51	32	紫苔 3 号父本
3	2005-9-1-3	18	25-S3	33	5-S17
4	H1-A	19	06-03-03-1	34	12-S3
5	26-N1	20	长沙迟 101B	35	11-N10
6	28-N7	21	23-S7	36	24-N9
7	23-S10	22	11-N11	37	5-S18
8	13-N11	23	12-S1	38	1-S14
9	2005-25	24	24-N7	39	11-N14
10	长沙迟-12	25	23-S3	40	4-N14
11	2002-20	26	23-S6	41	11-N9
12	紫苔 2 号母本	27	紫苔 1 号母本	42	1-S9
13	紫苔 1 号父本	28	油绿 80 天	43	1-S11
14	2002-29	29	5-S12	44	24-N1
15	2005-15	30	23-S2	45	1-S10

表 2 供试引物序列

Table 2 The sequences of SSR primers

编号 No.	SSR 引物 SSR primers	前导链 Forward	滞后链 Reverse
1	KBRH143D22	GATGTGATACTTTGGCGACGG	TGAAGGATAATATGGCTCTTGGCC
2	E120	ATCATAACCCTCAGGTTTGACATC	ACATCAAGCTCCTCTCTGGGTA
3	E138	TGCTATCACAGTAGGGATTGCTT	CACTCCGACTCCTCCTAGTCC
4	E039	CTTGAGTGCTCAGGTCAAAGC	GAACCCTTACCCCCAAGACTAC
5	ENA17	CAGTTATTTTCGCTCGTCT	TATTTGTGCTCTGTTATTGGA
6	ENA2	GATGGTGATGGTGATAGGTC	GAAGAGAAGGAGTCAGAGATG
7	ENA28	GGAGTCCGAGCGTTATGAAT	CTTCATCGACCCACCTTGT
8	KBRH138G23	TTTGACATCGTCAATGCTA	TTGGGCTGGTCTGAAGATA
9	KBRH139B23	ATCTCATGGTTGGTTCACCG	ATTTCCAAAACACACACCGCA
10	KBRH143F19	GCATGCAAGCTTGGAAGTAT	CAGTCACGCTTTCTGACGAAAA
11	KBRH143H15	TCTGCATCAAAATGCTAAAATGA	TGATCTTTTAGAAACAAAGATCGAG
12	KBRH143K20	CAAATGTCTCAAGACACATAAACCA	CTAAAGCAGCAATTGGGTGTTTC
13	KBRH043E02 (STS)	ATGCAAGCTTCATGGTGTCA	CATCAGCAAAATTTCAATTTGTGT
14	KBRH048O11 (STS)	GCCTTACCTGGCTTCAGCA	TCATTTGGCGCATACTTCCA
15	ENA6	CTCGTCTTCTTACCTACAAC	CTGACATCTTTCTCACCCAC
16	EJU3	CCTCTTTTAATTCAAAACAAGAAATCA	TTGGGACAATGGCAGTGATA
17	EJU4	CACCTTATCATCTCTCTATCCC	CCTCTGTTTCTCTCTTGTG
18	EJU5	GGCAGGTACATGGAGGATTC	TGTTGGTTCGAGCTGTTTCAG

续表

编号 No.	SSR 引物 SSR primers	前导链 Forward	滞后链 Reverse
19	ENA18	TTAAAATGAAACCCACCCGA	TGTTGGGCAACATCCATTTA
20	ENA23	GCTGTGCCAGTTCCTCTTTC	TCATTCCAAAATGGCCTTACC
21	ENA25	ACACCCTCCTTCTCCTCTC	GCTTTGTGAGTATCTTCGTC
22	ENA4	ACTTCTCTTTATTCACTTCCCA	GAGGGTGGTTGGTTCATT
23	E129	AGATGGTAAAAGAGCACAAGCC	TTCAAGCTACCGATCCAACCTG
24	BMRS026	CCTATCCTCGGACTAATCAGAA	GTGCTTGATGAGTTTACATTTG
25	BMRS - 040	TGGGATTTGCATGTTCTGACT	CCGATACACAACCAGCCAACCTC
26	BRMS - 005	ACCTCCTGCAGATTGCTGTC	GCTGACCTTTCTTACCGCTC
27	BRMS - 006	TGCTGGCTTGAGATTAGTTC	ACTCGAAGCCTAATGAAAAG
28	BRMS - 027	GCAGGCGTTGCCTTTATGTA	TCCFTTGGTCGGTCACTCCTT
29	BRMS - 029	AACAAATGACACACACCACACT	ATTGAAAATCTTAAACCGTGAAG
30	BRMS - 034	GATCAAATAACGAACGGAGAGA	GAGCCAAGAAAAGACCTAAGAT
31	BRMS - 036	CATGGCAAGGGTAACAAACAT	GGTCCATTCTTTTTGCATCTG
32	BRMS - 042 - 2	TGGGAATTGGATAAGAATTCAA	GGATCAGTTATCTGCACCACAA
33	BRMS - 043	GCGATGTTTTTCTTCAGTGTG	TTAATCCCTACCCACAATTTCC
34	BRMS - 051	GGCCAAGCCACTACTGCTCAGA	GCGGAGAGTGAGGGAGTTATGG
35	BRMS - 056	GATCAAGGCTACGGAGAGAGAG	CCTGACGCTAGAGTAATCGACT
36	BRMS - 058	GCAGACAAGAAATTCGCCCATGTC	GACATTGGCGAAAGTCTTGAACCTG
37	BRMS - 124	GAGACGAGTCTTTTCTTGGCAGTTG	CGACGAGAACCAACACATAACAACC
38	BRMS - 144	CCATCTGTTGAGAGCTTCTTCTTC	AAGTTCATTTGCTCCGATGC
39	BRMS - 296	CATCCTAATGTTGCTGAGAAAGAGG	TATATGAAACCGATGAAGCTCCTTT
40	BRMS - 303	ACTCAACAACCGAACAAGAAAAACA	CGGTAGAGAACAGAGGAAGCCTAAG
41	BRMS - 324	AACITTAACCGAAACCGAGATAGGTG	AATCTCGAAATTCATCGACTTCCCTC
42	Na10B11	TTTAAACAACAACCGTCACGC	CTCCTCCTCCATCAATCTGC
43	Na12A08	AACACTTGCAACTTCAATTTCC'	CATTGGTTGGTGAATTGACAG
44	Na12E02	TTGAAGTACTTGGAGTAATTTGAGG	CAGCAGCCACAACCTTACG
45	OII1B05	TGCGGACGTTGTTTTGTTT	ACCATCTTCTCGACCCTG
46	OII1H02	TCTTCAGGGTTTCCAACGAC	AGGCTCCTCATTGTATCCC
47	FLC1	TTCCCAAGCTTGCTGGTACT	GAGATTTCCCTCGCTTGATG
48	FLC2	GCGCCAATTATAAATTTGATTTTC	TCCTCCTGAACCTGGTCTTG
49	FLC3	CAGTGAAGTTCAACCGCAGTA	CATGAGTGAACATAAAAACAGTGAAA
50	FITO 035	AAAGTCGTGGGAAGTATCGT	AGGTGTAAGGATGGTGTAGT
51	FITO 036	GGATTGCCTGAGTTTATTTCTT	TCTGGAGTAGATGCTTTGGT
52	FITO 045	ATGGCTGTAGAAAACACATTGA	CTGACAACACGAGCATCTTAC
53	FITO 063	GTTTCAGTTCACAGATTCCTAA	TTTCTCTTCTTCTCTCTTC
54	BC105	CGTCCGTAGCGCTATTTTTTCAGA	ACGTTGTGATCGCCAGTTC
55	BC107	GACGCCTCAATTGCTTACTT	AGGGAATGAGGATGGTCTG
56	BC113	ATACAATCTTCTGACTCTACAG	AGCATCAACGCCAACCTTATCC
57	BC48	CTGGTGATGGAGACGCTATTA	ACTGTCCAAAACCGCCTCTC
58	BRMS - 057 - 2	CCCGCACCTTCTTCTTCTCATTTTC	TGTCGCCGGAGCTCTCTTTATTGTG
59	BC38	TCGTTGCGTTTGAATGTT	CTCTGGAAGCGGTTAC
60	BC51	GGTGGTGGGCTGGGAGTA	CGTCGATCGATTCTAACCCTAGA
61	Ra2G09F	ACAGCAAGGATGTGTGACC	GATGAGCCTCTGGTTCAAGC
62	BRMS - 163	CTCTTCTTCTCGATGTTATTTTCAG	CACGTGCCATTCCAATAAGC
63	BRMS - 196	CAGAAGTGGAGGTAGTAAAACCAA	ATCTTCTCATTTCTCATTGCTAC

2 结果与分析

2.1 引物筛选

利用 3 份遗传多样性较大的材料(7 号来自于湖南湘潭,30 号来自于武汉,15 号来自于四川)进行引物筛选,在 253 对 SSR 引物筛选出 63 对多态性较好的 SSR 引物(表 2),对 45 份红菜苔资源进行遗传多样性分析。SSR 引物由北京鼎国生物有限公司合成,引物序列来源于 NCBI。

2.2 45 份红菜苔资源的 SSR 扩增结果

2.2.1 红菜苔基因组 DNA 的多态性分析 用 8% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳分离扩增结果,63 对 SSR 引物能在 45 份红菜苔资源间扩增出 124 条清晰条带,平均每条引物扩增出近 2 条带,扩增产物片段大小在 150 ~ 300bp 之间。

2.2.2 红菜苔种质资源的多样性分析 用 NYTST-pc2.0^[15] 软件对 SSR 扩增的结果进行聚类分析(图 1),45 份红菜苔相似系数在 0.56 ~ 0.89 之间。当

相似系数在 0.71 处,45 份红菜苔资源可分为 4 类:Ⅰ类包括 3 份资源,分别为 4 号、10 号、17 号,均来自于长沙,处于最基础的地位,遗传差异明显区别于其他资源;Ⅱ类包括 2 份资源,分别是 9 号和 40 号,处于次基础地位;Ⅲ类包括 20 份资源,包括 3、5、6、7、8、11、13、14、20、21、23、28、32、34、35、38、41、42、44、45 号,紫苔 1 号父本(13 号)、紫苔 3 号父本(32 号)在此类;Ⅳ类有 20 份资源分别是 1、2、12、15、16、18、19、22、24、25、26、27、29、30、31、33、36、37、39、43 号,紫苔 1 号母本(27 号)、紫苔 2 号母本(12 号)在此类。由上可知,母本经过人类定向选择,进化的较快,遗传多样性较差,聚集在Ⅳ类中;父本一般在遗传多样性丰富的材料中选择,因此,一般品种父本比母本更原始,这个结论还有待于进一步验证。Ⅰ类和Ⅱ类的 5 份资源遗传多样性最丰富,虽然没有直接用在育种配组中,但是在对材料观察中发现,其抗性较强,是以后育种的间接材料。

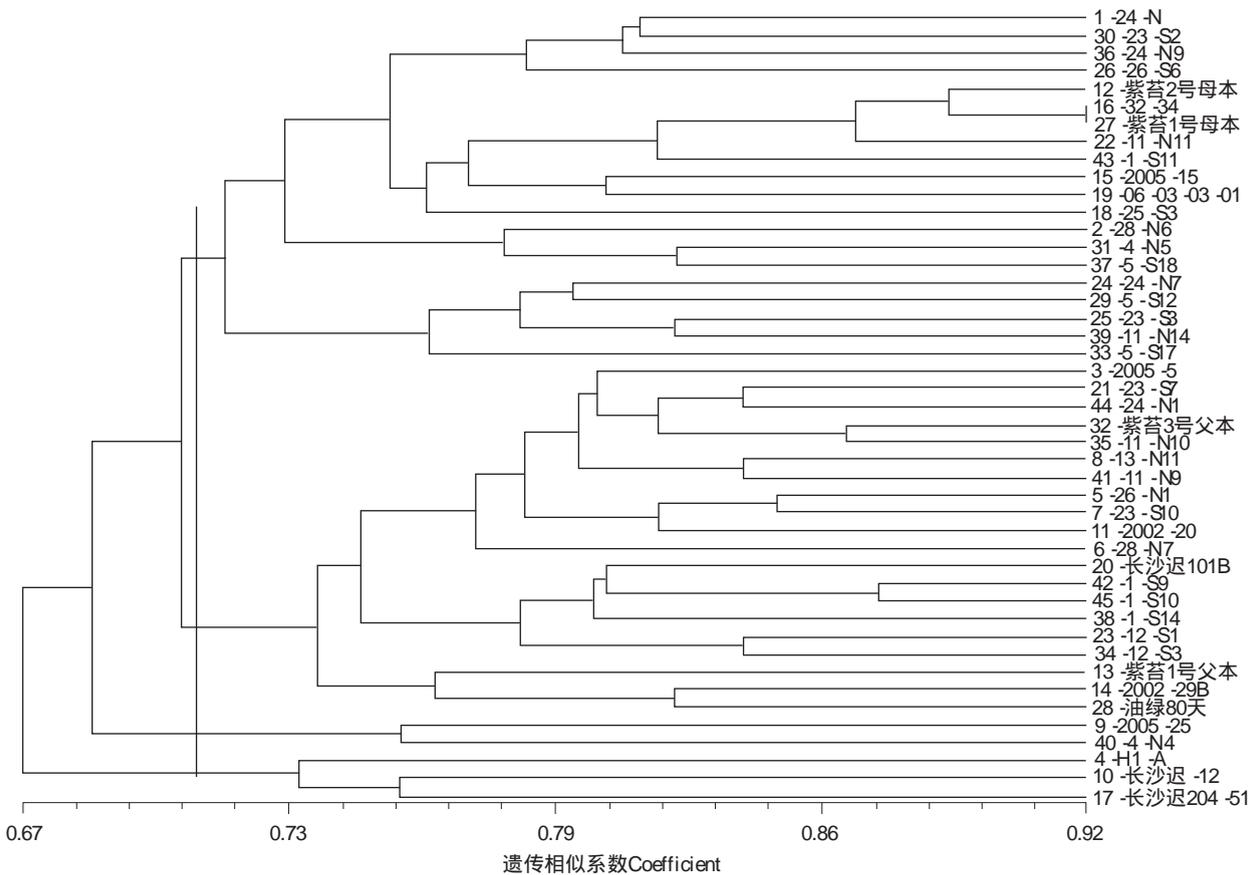


图 1 利用 SSR 标记对 45 份红菜苔的聚类分析

Fig. 1 Clustering analysis of 45 Tsai-tai germplasm using SSR markers

2.2.3 红菜苔起源分析 红菜苔是我国独有的蔬菜资源,因其区域性强,属稀有蔬菜品种,主要

在湖南、湖北、四川等南方地区栽培。吴朝林等^[1]通过对全国各地的红菜苔资源研究,认为红菜苔

在我国有湖南、湖北、四川3个分化中心。本研究通过聚类分析发现10号长沙迟-12和17号长沙迟204-51聚在I类,且均来自于长沙,最原始,因此认为湖南有可能是最先形成的分化中心,这一结论还有待于进一步研究。1号处在聚类图的最上端,说明是最新生成的,是定向选择相对较新的分离材料;相似系数在0.67时,I类中4号、10号、17号与其他资源较早地分开,处于聚类图的最基础地位,说明45份资源中,这3份资源最原始,遗传多样性最丰富,值得认真研究(图1)。

3 讨论

品种间遗传关系研究和遗传多样性分析对于分析作物育种具有十分重要的意义^[16]。本研究从253对SSR引物中筛选出63对差异性引物,表明红菜苔在分子水平上具有较丰富的遗传多样性。45份红菜苔种质间的遗传相似系数变化范围在0.56~0.89,遗传相似性较低,遗传多样性较高。分析其原因,首先,每个物种的起源地遗传多样性最丰富,红菜苔起源于我国长沙流域。其次,人类对红菜苔定向选择的时间较晚,多样性丢失少,目前大多数地方仍以自交种为主。第三,红菜苔在长期的进化过程中,为了适应不同的生态环境,而分化出不同的种质。

在育种配组中,父本在遗传多样性相对丰富的材料类中选择,母本从遗传多样性相对狭窄的材料类中选择,则成功率大些。在聚类中发现一些品种的父本聚集在较基础的位置,遗传多样性较丰富;母本材料遗传多样性相对狭窄,这与一般配组的原则(父本遗传多样性丰富一般抗病、本商品性好驯化时间长—多样性狭窄的原则)相吻合,由于本试验材料较少,这个结论有待于用更多的材料亲本进行遗传多样性分析验证。

吴朝林老师经过20多年的潜心研究发现,长沙、武汉、成都是红菜苔的3个原产中心^[1],本研究发现45份资源,长沙、湘潭等湖南地区的资源处在聚类的最基础位置,遗传多样性最丰富,因此认为湖南中心可能是最早形成的,但这个结论有待于进一步确实。

参考文献

- [1] 吴朝林,陈文超.中国紫菜苔地方品种初步研究[J].作物品种资源,1997(3):7-9
- [2] 吴朝林.紫菜苔新品种五彩苔二号的选育[J].长沙蔬菜,2006(6):48-49
- [3] 向长萍,晏儒来,李锡香,等.紫菜苔雄性不育系的选育和应用[J].中国蔬菜,2000(5):28-30
- [4] 宋秋瑾,许明,司龙亨,等.紫菜苔细胞核雄性不育系数性状配合力分析[J].中国农学通报,2006,22(1):343-345
- [5] 黄邦全,李薇,居超民,等.Ogura雄性不育细胞质导入紫菜苔及杂种优势利用初报[J].种子,1999(3):57
- [6] 许明,白明义,魏毓棠.不同发育期紫菜苔细胞质雄性不育系及保持系植株体内物质代谢的差异[J].沈阳农业大学学报,2008,39(2):152-155
- [7] 王学芳,李殿荣,张彦锋,等.紫菜苔胞质雄性不育系2A及其杂交种的选育[J].西北农业学报,2008,17(3):250-253
- [8] 李仕琼,杨弘远,周嫦.甘蓝型油菜和紫菜苔花粉原生质体的大量分离[J].植物学报,1992,34(5):339-345
- [9] 莫永胜,杨弘远.紫菜苔精细胞的大量分离和生活力保存[J].植物学报:英文版,1991,33(9):649-657
- [10] 漆小泉,朱德蔚,沈镛,等.大白菜和紫菜苔自交系染色体组DNA的RAPD分析[J].园艺学报,1995,22(3):256-262
- [11] 李亭亭,徐跃进,万正杰,等.甘蓝型油菜与红菜苔的杂种及其后代遗传变异分析[J].植物科学学报,2011,29(2):189-193
- [12] 章艳.紫菜苔色素的提取工艺研究[J].农产品加工,2011,5:50-52
- [13] 李焰焰,曹家树.紫菜苔快速碱化因子基因*BcMFL1p*的序列与表达分析[J].核农学报,2008,22(1):41-44
- [14] 白占兵,丁苗萸,李雪峰,等.紫菜苔总DNA的快速提取与SSR分子标记鉴定[J].中国农学通报,2009,25(14):63-66
- [15] Rchlf F J. NTSYS-pc: Numerical taxonomy and multivariate analysis system, Version2.0[M]. Exeter Software, Setauket, New York, USA, 1998
- [16] 张天真.作物育种学总论[M].北京:中国农业出版社,2003:23-35