

# 利用农艺性状和 SRAP 标记方法 初步鉴定甘薯丰收白突变体

穆国俊<sup>1</sup>, 何丽君<sup>2</sup>, 李朋飞<sup>1</sup>, 杜丽芬<sup>1</sup>, 段会军<sup>1</sup>, 崔顺立<sup>3</sup>, 孟庆荣<sup>3</sup>, 刘立峰<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>河北农业大学/河北省作物种质资源实验室, 保定 071000; <sup>2</sup>内蒙古农业大学农学院, 呼和浩特 010018;

<sup>3</sup>河北省保定市农业科学研究所, 保定 071000)

**摘要:**采用 UPGMA 法对 11 个甘薯品种(系)不同农艺性状进行聚类分析。在相似系数为 0.17 处被划分为 3 大类群, 分别包括 2、3、6 个品种。SRAP 聚类分析表明:在相似系数为 0.77 处, 第 II 类群划分为 2 个亚类:IIA 和 IIB, IIA 有 3 个品种, IIB 有 3 个品种;在相似系数为 0.75 处, 第 III 类群划分为 2 个亚类:IIIA 和 IIIB, IIIA 有 2 个品种, IIIB 有 2 个品种。丰收白野生型与突变体 M-0 在农艺性状以及 SRAP 分子标记的聚类分析中均聚为一类。对丰收白野生型及其突变体 M-0 的叶型、叶脉颜色、新生叶色、薯皮色、薯形及肉色 6 个生物学性状进行观察比较, 结果表明二者在前 5 个性状均未表现出明显差异, 只在薯色性状上表现明显差异, 即丰收白的薯肉色为白色而突变体 M-0 为粉红色。丰收白突变体 M-0 和野生型多态性条带比率为 29.49%, 有效等位基因数为 1.2085, 说明二者在遗传上差异不明显, 并且初步推断丰收白 M-0 是丰收白的薯肉色基因发生点突变的结果。

**关键词:**甘薯; 突变体; 农艺性状; SRAP 分子标记; 聚类分析

## Preliminary Identification to One Mutant of Sweet Potato Variety Fengshoubai by Agronomic Trait and SRAP Marker Analysis

MU Guo-jun<sup>1</sup>, HE Li-jun<sup>2</sup>, LI Peng-fei<sup>1</sup>, DU Li-fen<sup>1</sup>, DUAN Hui-jun<sup>1</sup>, CUI Shun-li<sup>3</sup>, MENG Qing-rong<sup>3</sup>, LIU Li-feng<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Agricultural University of Hebei / Crop Germplasm Resources Laboratory of Hebei Province, Baoding 071000;

<sup>2</sup>College of Agronomy, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018;

<sup>3</sup>Agriculture Research Institute of Baoding, Baoding 071000)

**Abstract:** Different agronomic trait cluster analysis of 11 sweet potato varieties (lines) was completed by UPGMA method. The 11 varieties were divided into three groups at the similarity coefficient of 0.17, which included 2, 3, and 6 varieties respectively. SRAP clustering analysis showed that group II was divided into two sub-groups named II A and II B at the similarity coefficient of 0.77 and the two sub-groups both included three varieties. While group III was divided into two sub-groups named III A and III B at the similarity coefficient of 0.75 and the two sub-groups both included two varieties. Fengshoubai wild-type and its mutant M-0 were clustered into one group in the cluster analysis of agronomic traits and SRAP markers. Six biological traits included leaf shape, vein color, young leaf color, root skin color, root shape, and root flesh color were observed and compared between wild type and mutant. The results showed that the two did not have significant difference among first five traits, but had significant difference on root flesh color. Fengshoubai M-0 was pink flesh color while its wild type was white. The percentage of polymorphic bands between fengshoubai mutant M-0 and its wild type was 29.49% and effective alleles were 1.2085, the above of which showed there were no obvious genetic differences. Also we preliminary deduced that the mutation was from point mutation of root flesh color gene.

**Key words:** sweet potato; mutant; agronomic traits; SRAP; cluster analysis

收稿日期: 2012-09-04      修回日期: 2012-12-10      网络出版日期: 2013-06-07

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20130607.1740.020.html>

基金项目: 河北省高等院校科学技术研究重点项目 (ZH2011209)

第一作者主要从事作物遗传育种工作。E-mail: muguojun@hebau.edu.cn

通信作者: 刘立峰, 博导, 教授, 主要从事作物遗传育种工作。E-mail: liulifeng@hebau.edu.cn

甘薯(*Ipomoea batatas* L.)是世界上重要的粮食、饲料和工业原料作物之一。我国常年种植面积在 660 万 hm<sup>2</sup>左右,总产占世界总产的 80% 以上。在我国粮食作物生产中,甘薯仅次于水稻、小麦和玉米,居第 4 位<sup>[1]</sup>。甘薯在我国分布很广,种类繁多,遗传多样性研究对培育新品种具有重要意义,但在甘薯育种工作中,由于长期对产量和抗性 etc 少数性状的人工选择以及仅用少数品种进行品种选育,造成育成品种背景相对单一、遗传基础趋于狭窄、遗传多样性下降。采用形态学、生物化学方法对品种进行识别和鉴定往往受到很大限制,难以区分亲缘关系较近的材料。分子标记是研究遗传多样性和亲缘关系的有效方法,可以不受环境、发育时期、不同器官等的限制,从基因组水平上揭示其遗传变异的程度,并且在早期就可进行新品种的鉴定。序列扩增多态性标记(SRAP, sequence-related amplified polymorphism)是 G. Li 等<sup>[2]</sup>于 2001 年开发的分子标记技术,具有简单、高效、高共显性、高重复性和易测序等优点。该技术已广泛应用于甜菜<sup>[3]</sup>、建兰<sup>[4]</sup>、菊花<sup>[5]</sup>、黄花蒿<sup>[6]</sup>、苧麻<sup>[7]</sup>、半夏属<sup>[8]</sup>等多种植物的遗传多样性及群体亲缘关系的研究中。在甘薯种质遗传多样性研究中,较多应用 ISSR<sup>[9]</sup>、SSR<sup>[10]</sup>等分子标记进行分析。采用 SRAP 标记进行相关研究的报道较少。王大一等<sup>[11]</sup>采用该标记对四川省高淀粉甘薯品种资源进行了亲缘关系方面的研究。李爱贤等<sup>[12]</sup>应用 SRAP 标记构建了甘薯分子连锁图谱。SRAP 标记在甘薯种质资源遗传多样性及分子生物学研究中具有广阔的应用前景。

表 1 甘薯形态多样性鉴定的项目及标准

Table 1 Identification items and standards of the morphological diversity of sweet potato

形态特征	记载标准
Traits	Criteria for recording
叶型	1 = 心形 (HS, heart-shaped) ; 2 = 三角形 (T, triangle) ; 3 = 尖心形 (THS, tip heart-shaped)
Leaf shape	4 = 心齿形 (HP, heart profile) ; 5 = 浅裂单缺刻 (ISSC, indentation of single shallow cleft) ; 6 = 深裂单缺刻 (ISDC, indentation of single deep cleft) ; 7 = 浅裂复缺刻 (ICSC, indentation of complex shallow cleft) ; 8 = 深裂复缺刻 (ICDC, indentation of complex deep cleft) ; 9 = 鸡爪形 (Ok, okral)
新生叶色	1 = 绿色 (G, green) ; 2 = 紫色 (P, purple) ; 3 = 绿带紫 (GP, green with purple leaf margin) ; 4 = 浓绿 (IG, invisible green)
Young leaf color	
叶脉色	1 = 绿色 (G, green) ; 2 = 紫色 (P, purple) ; 3 = 绿带紫 (GP, green with purple leaf margin) ; 4 = 浓绿 (IG, invisible green)
Vein color	
薯皮色	1 = 黄 (Y, yellow) ; 2 = 黄褐 (YC, yellow cinnamon) ; 3 = 土黄 (Oc, ochre) ; 4 = 白色 (W, white) ; 5 = 紫色 (P, purple) ; 6 = 紫红色 (PuR, purplish red)
Root skin color	
薯肉色	1 = 黄色 (Y, yellow) ; 2 = 白色 (W, white) ; 3 = 紫色 (P, purple) ; 4 = 粉红 (Pk, pink) ; 5 = 桔黄 (O, orange) ; 6 = 桔红 (C, chrysoidine)
Root flesh color	
薯形	1 = 长纺锤形 (LS, long spindle) ; 2 = 纺锤形 (S, spindle) ; 3 = 球形 (Sp, Spherical) ; 4 = 短纺锤形 (SS, short spindle) ; 5 = 圆形 (Cy, cylindraceous) ; 6 = 上膨纺锤形 (US, up expand spindle) ; 7 = 下膨纺锤形 (DS, down spindle) ; 8 = 长筒形 (LT, long tube shape) ; 9 = 长条形 (LSt, long strip)
Root shape	

甘薯是无性繁殖作物,通过自然变异或人工诱变产生的有利变异,可以通过选择及无性繁殖加以固定<sup>[13]</sup>。在甘薯上已出现的变异性状有皮色、肉色、茎长、茎粗、茎色、抗病性等,利用这些变异,目前已选育出一些优良品种(系)<sup>[14-16]</sup>。河北省作物种质资源实验室于 2008 年在河北省雄县丰收白的自然栽培群体中,筛选到 1 个薯肉色突变体 M-0,该突变体薯块肉色由野生型的白色突变为粉红色。本研究在该突变体进行农艺性状调查分析的基础上采用 SRAP 标记进行亲缘关系分析,初步推断该突变体与野生型同属一个亚类群,是点突变的结果。该结果将对冀中区域新品种的选育具有一定的参考意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

11 个甘薯品种(系)均保存于河北省作物种质资源实验室,分别为:丰收白 M-0、丰收白、徐薯 18、冀薯 14、赵县小花叶、黄皮黄肉、红肉红黄皮、紫薯王、红皮红肉、石夏薯 2 号和鸡蛋黄。其中突变体丰收白 M-0 由丰收白野生型自发突变产生。

### 1.2 试验方法

1.2.1 田间设计及观察记载 随机区组,重复 3 次,3 垄区,垄距 0.6 m,株距 0.3 m,每垄 5 株,每小区随机选择 10 株,调查记录甘薯不同生育时期的叶型、叶脉色、新生叶色、薯皮色、薯肉色、薯形 6 个农艺性状。甘薯形态多样性鉴定的项目及标准参照张允刚等<sup>[17]</sup>的方法(表 1);数据用 UPGMA 法(unweighted

pair-group method with arithmetic means)进行聚类分析,分析软件采用 NTSYSps 2.1、DIST 3.0。

**1.2.2 SRAP 分子标记分析** 参考程永强<sup>[18]</sup>的方法略有改动。在 200 对引物中筛选到多态性和重复性好的引物 16 对(表 2),对 11 份材料的 DNA 样品进行 SRAP 标记分析。根据 Marker 的分子量,统计在 50~2000 bp 范围内的且重复出现的 DNA 条带,有带记为 1,无带为 0,采用 UPGMA 法进行聚类分析,分析软件采用 NTSYSps 2.1、DIST 3.0。

表 2 SRAP 引物序列

Table 2 Sequences of SRAP primers

引物编号	正向(5'-3')		反向(5'-3')	
Primer code	Sequences of upstream		Sequences of downstream	
1	Em4	GACTGCGTACGAATTTGA	Me6	TGAGTCCAAACCGGTAA
2	Em6	GACTGCGTACGAATTGCA	Me8	TGAGTCCAAACCGGTGC
3	Em9	GACTGCGTACGAATTCGA	Me1	TGAGTCCAAACCGGATA
4	Em9	GACTGCGTACGAATTCGA	Me10	TGAGTCCAAACCGG TCT
5	Em11	GACTGCGTACGAATTCGA	Me1	TGAGTCCAAACCGGAT
6	Em10	GACTGCGTACGAATTCAG	Me1	TGAGTCCAAACCGGATA
7	Em2	GACTGCGTACGAATTGTC	Me2	TGAGTCCAAACCGGAGC
8	Em2	GACTGCGTACGAATTGTC	Me3	TGAGTCCAAACCGGAAT
9	Em2	GACTGCGTACGAATTGTC	Me4	TGAGTCCAAACCGGAC
10	Em2	GACTGCGTACGAATTGTC	Me5	TGAGTCCAAACCGGAAG
11	Em2	GACTGCGTACGAATTGTC	Me6	TGAGTCCAAACCGGTAA
12	Em2	GACTGCGTACGAATTGTC	Me7	TGAGTCCAAACCGGTCC
13	Em1	GACTGCGTACGAATTAAT	Me1	TGAGTCCAAACCGGATA
14	Em1	GACTGCGTACGAATTAAT	Me4	TGAGTCCAAACCGGACC
15	Em1	GACTGCGTACGAATTAAT	Me5	TGAGTCCAAACCGGAAG
16	Em1	GACTGCGTACGAATTAAT	Me6	TGAGTCCAAACCGGTAA

根据各分子标记的电泳迁移率及其有无,统计所有二元数据,扩增阳性记为 1,扩增阴性记为 0,强带和弱带的赋值均为 1,形成 0/1 矩阵图输入计算机。对于多态性位点,仅在重复试验中能稳定出现的差异带用于数据分析。根据 SRAP 扩增的结果,运用 Popgene version 1.31 软件计算多态性比率(*PPB*)、Nei's 基因多样性(*H*)、观测等位基因数(*Na*)、有效等位基因数(*Ne*)和 Shannon's 信息指数(*I*)。

## 2 结果与分析

### 2.1 农艺性状的调查及其聚类分析

对 11 个甘薯品种(系)不同生育时期的叶型、叶脉色、新生叶色、薯皮色、薯肉色和薯形 6 个农艺性状调查结果表明(表 3),不同品种(系)在叶形上有心形、尖心形、心齿形、鸡爪形、浅裂单缺刻和深裂单缺刻 6 种类型;新生叶色存在绿色、浓绿、绿带紫和紫色 4 种类型;叶脉色存在绿色、绿带紫和紫色 3

种类型;薯皮色存在白色、土黄、黄褐、紫色和紫红 5 种类型;薯肉色存在白色、黄色、桔黄、粉红和紫色 5 种类型;薯形存在纺锤形、长纺锤形、短纺锤形、圆筒形和上膨纺锤形 5 种类型。

表 3 形态特征统计

Table 3 Morphological characteristics reard

编号及名称	叶型	新生叶色	叶脉色	薯皮色	薯肉色
No. and name	Leaf shape	Young leaf color	Vein color	Root skin color	Root flesh color
1 丰收白	1	1	1	4	2
2 徐薯 18	3	1	1	6	2
3 冀薯 14	4	2	1	3	2
4 赵县小花叶	9	3	3	6	2
5 黄皮黄肉	5	1	1	2	1
6 红肉红黄皮	3	1	1	2	5
7 紫薯王	5	2	1	5	3
8 红皮红肉	1	1	2	6	4
9 石夏薯 2 号	6	2	3	2	1
10 鸡蛋黄	1	4	3	2	5
11 丰收白 M-0	1	1	1	4	4

根据甘薯品种(系)6 个农艺性状的记载标准,对 11 份甘薯品种(系)进行聚类分析,从聚类图(图 1)可以看出 11 个品种中,丰收白和丰收白 M-0 遗传相似系数最高,其他品种间相似系数较小。11 个甘薯品种(系)在相似系数为 0.17 处被划分为 3 大类群,第Ⅰ类群包括 2 个品种,第Ⅱ类群包括 3 个品种,第Ⅲ类群包括 6 个品种。结果表明冀中地区 11 个甘薯品种(系)的农艺性状变异较大,遗传基础复杂。

### 2.2 SRAP 标记多态性分析及其聚类分析

本试验从上海生工生物工程公司合成的 200 对随机引物中初步筛选出 45 对,对全部试验材料进行扩增,从中选出重复性好、多态性强、条带清晰稳定的 16 条引物扩增结果进行分析,部分引物的扩增结果见图 2。16 对引物共扩增出 217 条带,多态性条带为 182 条,多态性比率为 83.87%。不同引物扩增的多态性比率分布于 28.57%~100%之间。

分子标记聚类分析(图 3)表明,在相似系数为 0.73 处可将 11 个甘薯品种(系)划分为 3 大类群。第Ⅰ类群包括 1 个品种:紫薯王,第Ⅱ类群包括 6 个品种,第Ⅲ类群包括 4 个品种。在相似系数为 0.77 处,第Ⅱ类群划分为 2 个亚类:ⅡA 和ⅡB,ⅡA 有 3 个品种:赵县小花叶、黄皮黄肉、红肉红黄皮;ⅡB 有 3 个品种:红皮红肉、石夏薯 2 号、鸡蛋黄;在相似系

表 3 突变体丰收白 M-0 与野生型的多态性分析

Table 3 The polymorphic genetic diversity analysis of mutant Fengshoubai M-0 and wild-type

样本数	多态性条带	多态性百分	观测等位	有效等位	Nei's 基因多	Shannon 信息
Sample size	No. of PB	率(%) PPB	基因数 $N_a$	基因数 $N_e$	样性指数 $H$	指数 $I$
2	64	29.49	1.2949	1.2085	0.1222	0.1784

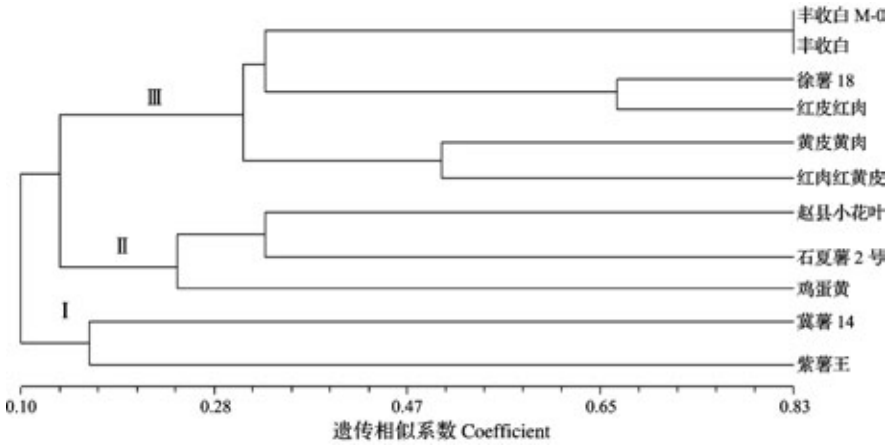
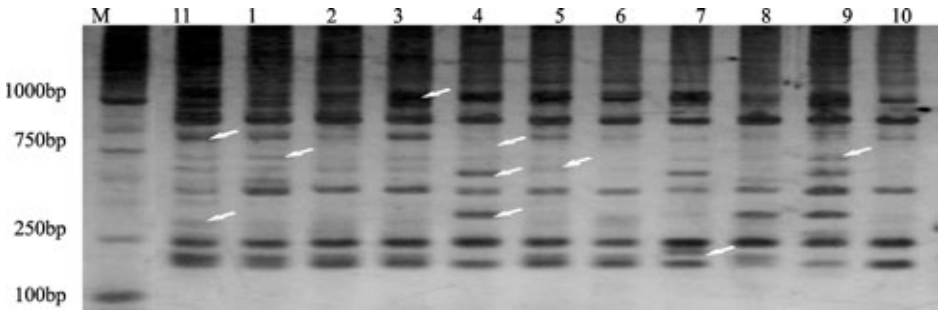


图 1 11 个甘薯品种(系)基于农艺性状的聚类图

Fig. 1 Dendrogram of 11 sweet potato varieties( lines) based on agronomic traits



1 ~ 11 泳道对应的是品种编号

Lane 1-11 indicate the varieties( lines) codes

图 2 SRAP 引物 Em4/Mm6 对 11 个品种(系)的扩增结果

Fig.2 Polymorphic bands amplified by SRAP primer Em4/Mm6

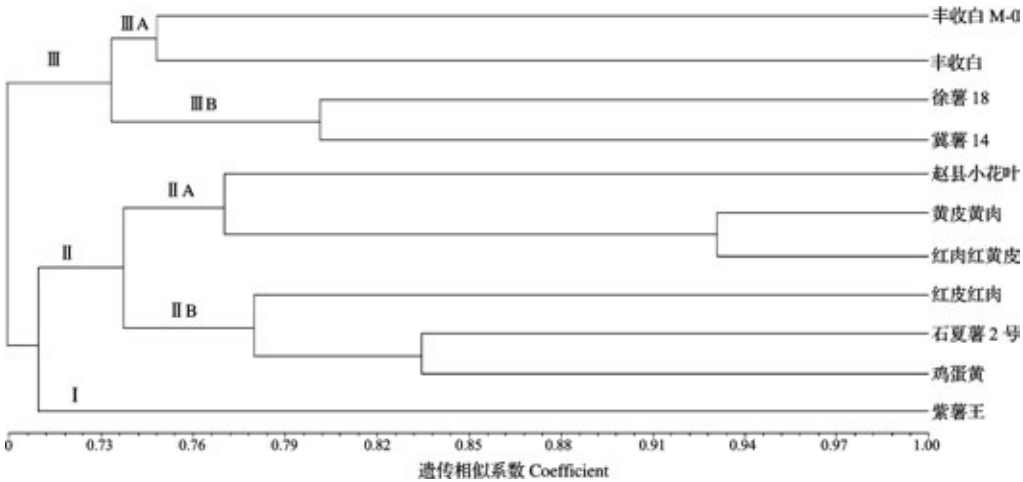


图 3 11 个甘薯品种(系)基于 SRAP 的 UPGMA 聚类分析

Fig.3 Dendrogram of 11 sweet potato varieties( lines) based on SRAP marker



数为 0.75 处,第Ⅲ类群划分为 2 个亚类:ⅢA 和ⅢB。ⅢA 有 2 个品种:丰收白和丰收白 M-0;ⅢB 有 2 个品种:徐薯 18 和冀薯 14。

### 2.3 丰收白突变体 M-0 的分子生物学初步鉴定

对丰收白野生型及其突变体 M-0 的叶型、叶脉色、新生叶色、薯皮色、薯形及肉色 6 个生物学性状进行观察比较,结果表明二者在前 5 个性状均未表现出明显差别,并且在发根缓苗习性、茎叶生长势、自然开花习性等生长特性上表现一致,只在薯色性状上表现明显差异,即丰收白的薯肉色为白色,而突变体 M-0 为粉红色(图 4)。



图 4 丰收白野生型及其突变体 M-0 的薯肉色比较

Fig. 4 Comparison of root flesh color between Fengshoubai wildtype and its mutant Fengshoubai M-0

通过分子标记多态性分析,突变体与野生型的多态性条带比率为 29.49%,有效等位基因数为 1.2085(表 3),说明二者在遗传上差异不明显,初步推断丰收白 M-0 是丰收白的薯肉色基因发生点突变的结果。

## 3 讨论

形态性状特别是遗传力较高的形态性状作为遗传标记早已被广泛应用于植物种质资源鉴定和分类研究。形态标记简单易行且快速,正如 B. A. Schaal 等<sup>[19]</sup>所述,如需在短期内了解变异而其他方法又无法开展时,形态学手段是一种有价值的选择。但是对于无性繁殖的植物来说,仅从形态学往往会过高估计<sup>[20]</sup>,通过遗传多样性的调查,可以了解个体的基因型从而确切知道基株(genet)的数目<sup>[21]</sup>,避免在实际的保护工作中导致不必要的浪费。SRAP 分子标记技术针对基因外显子里 GC 含量丰富而启动子、内含子里 AT 含量丰富的特点来设计引物进行扩增,因不同个体的内含子、启动子与间隔区长度不等而产生多态性。自 SRAP 标记建立以来,已被应用于图谱构建<sup>[22]</sup>、比较基因组学<sup>[23]</sup>和遗传多样性分析<sup>[24]</sup>等领域的研究。

遗传聚类能有效地估计亲本的遗传多样性,因

此,在亲本选配时根据亲本材料的综合表现型性状和亲缘关系,可以选用不同类群的亲缘关系较远的综合性状优良的材料组配。在亲缘关系较远的亲本材料之间杂交,由于双亲具有不同的遗传基础和优缺点,其杂交后代的遗传基础将更为丰富;由于基因重组,将会出现更多的变异类型甚至超亲的有利性状。朱崇文等<sup>[25]</sup>、王淑芳等<sup>[26]</sup>的研究结果表明,鲜薯高产品质的基本特征是茎叶生长茂盛,基部分枝多,T/R 值较小,结薯数较多,只根据亲本表现型进行亲本选配的方法虽然简单、杂交后代能够使双亲的优缺点互补,但在亲缘关系不明的情况下,容易因为近亲交配导致薯块产量等某些性状的衰退。我国甘薯育成品种 90% 以上具有南瑞茗和(或)胜利百号的血统,如果只根据上述农艺性状的表现型而选择进行相互交配,极易出现上述问题。因此根据遗传多样性的聚类分析结果进行亲本选配,能够避免因近亲交配导致的性状衰退,可望获得遗传基础丰富、变异类型多甚至超亲的杂交后代。

甘薯是一种无性繁殖作物,在繁殖或栽培过程中其分生组织芽原基体细胞内的物质常发生自然变异,产生植物芽变异。芽变可以发生在任何器官上,有些芽变产生的个体往往可观察到在不同组织上的形态特征的变异,但某些特性上的变异如产量、干率、抗性 etc 用感官不易察觉,而且大多数的芽变和原种在特征上区别甚微,在遗传上也很难区分。贺学勤等<sup>[27]</sup>应用 RAPD、ISSR 和 AFLP 标记在品种亲缘关系的鉴定中发现,应用分子标记可以有效地区分表型差别小的品种。本试验用 16 条 SRAP 分子标记鉴定丰收白野生型及其突变体 M-0 引物共扩增出 64 条,多态性比率为 29.49%,有效等位基因数为 1.2085,该结果表明 SRAP 分子标记同样可以有效地区分基因组极为相似的品种和其表型特征也极为相似的品种。

### 参考文献

- [1] 吴洁,谭文芳,严文昭,等.甘薯种质资源亲缘关系 SRAP 标记分析[J].四川大学学报,2007,44(4):878-882
- [2] 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, 103:455-461
- [3] 李博,王茂芊,王华忠. SRAP 对东北区骨干甜菜单胚品系的遗传多样性分析[J].中国甜菜,2012(2):11-14
- [4] 白坚,胡旭,周淑婷,等. 47 个建兰品种的 SRAP 遗传多样性分析[J].植物遗传资源学报,2012,13(3):376-380
- [5] 李仁伟,王晨,戴思兰,等.菊花品种表型性状与 SRAP 分子标记的关联分析[J].中国农业科学,2012,45(7):1355-1364
- [6] 陈大厦,彭锐,李隆云,等.我国黄花蒿天然群体遗传多样性的 SRAP 分析[J].中草药,2011,42(8):1591-1595

(下转 753 页)