

doi:10.11937/bfyy.20170802

五十八份菊芋种质资源遗传多样性 SRAP 分析

薛志忠^{1,2}, 杨雅华^{1,2}, 李海山^{2,3}, 张国新^{1,2}, 刘淑君^{1,2}

(1. 河北省农林科学院 滨海农业研究所, 河北 曹妃甸 063299; 2. 河北省盐碱地绿化工程技术研究中心, 河北 曹妃甸 063299; 3. 河北省农林科学院, 河北 石家庄 050031)

摘要:以 58 份菊芋种质资源为试材, 利用 SRAP 分子标记技术对其进行遗传多样性研究, 为选育耐盐新品种提供参考依据。结果表明: 从 110 对引物中筛选出 16 对多态性好的引物, 共扩增出 123 条条带, 其中多态性条带 90 条, 多态性比率为 72.7%。利用 NTSYS 软件统计分析出菊芋资源间遗传距离为 0.01~0.52。应用 UPGMA 聚类可将 58 份菊芋资源划分为三大类群, 第一大类群分为 4 个亚类群。表明利用 SRAP 技术更能充分揭示菊芋资源间的遗传差异, 可作为种质鉴定依据。

关键词:菊芋; SRAP; 遗传多样性; 聚类分析

中图分类号:S 632.903.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)21-0031-06

我国盐碱地资源丰富, 种植耐盐植物是盐碱地改良与利用的最佳途径。菊芋(*Helianthus tuberosus* L.) 属菊科向日葵属多年生草本植物, 俗称洋姜、鬼子姜, 生态适应性强, 具有耐寒、耐旱、耐贫瘠、耐盐碱等特点, 适宜在非耕边际土地、盐碱荒地上种植。地下块茎既可以食用, 又可以作为医药、保健食品、生物质能源(乙醇、柴油)的原材料。地上叶和茎秆可用作动物饲料, 还可带走土壤中盐分, 具有改良盐土的作用。因此, 菊芋在盐碱地区具有很高的推广应用价值。菊芋长期处于野生和半野生状态, 受生态环境、气候条件的影响, 变异广泛, 种质资源丰富。20 世纪 90 年代早期, 可用于育种的种质资源就达 150 多份^[1]。但目前耐盐品种相对较少, 主要有“南芋 1 号”“南芋 9 号”“定芋 1 号”“廊芋 8 号”等品种。如何更有效地挖掘利用菊芋种质资源, 进行遗传多样性分

析, 拓宽遗传基础, 对培育耐盐品种尤为重要。

SRAP 标记具有简便高效、产率高、共显性高、重复性好、易测序、便于克隆目标片段的特点, 目前已广泛应用于各种作物的品种鉴定、遗传图谱构建和遗传多样性分析等方面的研究^[2-4]。在菊芋上, 国内仅有青海农林科学院菊芋研发中心利用该技术对 30 份菊芋资源进行了遗传多样性分析的研究^[5]。

该研究以适宜河北滨海地区种植的 58 份菊芋种质资源为试验材料, 利用 SRAP 技术进行遗传多样性分析, 研究其亲缘关系, 旨在为构建适宜滨海地区种植的菊芋种质资源库、选育耐盐新品种提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

于 2012—2014 年从江苏、山东、黑龙江、吉林、辽宁、青海、内蒙、北京、河北沧州、秦皇岛、唐山等地收集菊芋种质资源 120 份, 其中紫色品种 27 份, 红色品种 22 份, 白色(黄皮)品种 71 份。经多年生态适应性试验, 共筛选出适宜滨海地区种植的菊芋资源 58 份(表 1)。

第一作者简介:薛志忠(1983-), 男, 河北抚宁人, 硕士, 助理研究员, 现主要从事植物生理及分子生物学等研究工作。E-mail:nksxzz@163.com.

基金项目:河北省自然科学基金资助项目(C2013301065); 河北省科技支撑计划资助项目(152776122D)。

收稿日期:2017-04-17

表 1 58 份菊芋品种资源
Table 1 58 Jerusalem artichoke resources

SRAP 编号	品种编号	引种地	表皮颜色	茎块形状
SRAP code	Cultivar code	Origin	Skin color	Tuber shape
P1	DQ11	黑龙江省农业科学院	白色	不规则瘤状
P2	JY3	吉林省农业科学院	白色	不规则瘤状
P3	HBV6	唐山市	白色	不规则瘤状
P4	BY1	滨海所	白色	不规则瘤状
P5	DQ29	黑龙江省农业科学院	红色	不规则瘤状
P6	DQ1	黑龙江省农业科学院	白色	不规则瘤状
P7	MY2	内蒙古农业科学院	白色	不规则瘤状
P8	DQ4	黑龙江省农业科学院	白色	不规则瘤状
P9	DQ6	黑龙江省农业科学院	红色	球状
P10	HBV9	曹妃甸区	白色	不规则瘤状
P11	LY8	廊坊市农业科学院	白色	不规则瘤状
P12	HBV15	河北黄骅	白色	不规则瘤状
P13	NY1	南京农业大学	白色	不规则瘤状
P14	MY1	内蒙古农业科学院	白色	不规则瘤状
P15	HLV1	黑龙江	紫色	不规则瘤状
P16	MY3	内蒙古农业科学院	红色	不规则瘤状
P17	LY2	廊坊市农业科学院	红色	球状
P18	HBV2	秦皇岛抚宁	红色	不规则瘤状
P19	MY4	内蒙古农科院	红色	不规则瘤状
P20	DQ12	黑龙江省农业科学院	紫色	纺锤状
P21	JY2	吉林省农业科学院	紫色	纺锤状
P22	DQ24	黑龙江省农业科学院	红色	不规则瘤状
P23	HLV3	黑龙江	紫色	纺锤状
P24	LY6	廊坊市农业科学院	白色	不规则瘤状
P25	HLV5	黑龙江	紫色	纺锤状
P26	LY4	廊坊市农业科学院	白色	不规则瘤状
P27	ZKY4	中科院地理所	紫色	不规则瘤状
P28	ZKY2	中科院地理所	紫色	不规则瘤状
P29	QHY3	青海省农业科学院	白色	不规则瘤状
P30	JY1	吉林省农业科学院	白色	不规则瘤状
P31	JY4	吉林省农业科学院	紫色	纺锤状
P32	QHY4	青海省农业科学院	白色	不规则瘤状
P33	ZKY3	中科院地理所	紫色	纺锤状
P34	NY2	南京农业大学	白色	不规则瘤状
P35	ZKY1	中科院地理所	紫色	不规则瘤状
P36	QHY2	青海省农业科学院	红色	不规则瘤状
P37	QHY1	青海省农业科学院	紫色	纺锤状
P38	JSY1	江苏徐州	红色	不规则瘤状
P39	JSSQ	江苏宿迁	白色	不规则瘤状
P40	HBV12	河北保定	白色	不规则瘤状
P41	SDY1	山东滨州	白色	不规则瘤状
P42	HBV13	河北冀州	白色	不规则瘤状
P43	HBV14	河北衡水	白色	不规则瘤状
P44	SHY1	上海	白色	不规则瘤状
P45	QHY5	青海省农业科学院	红色	不规则瘤状
P46	JXY1	江西宜春	红色	不规则瘤状
P47	LVN2	辽宁朝阳	红色	球状
P48	LVN4	辽宁丹东	白色	不规则瘤状
P49	SCY2	四川资阳	白色	不规则瘤状
P50	BJY1	北京	白色	不规则瘤状
P51	SCY1	四川成都	白色	不规则瘤状
P52	ZKY6	中科院地理所	红色	不规则瘤状
P53	ZKY8	中科院地理所	白色	不规则瘤状
P54	SDY3	山东烟台	红色	不规则瘤状
P55	LVN1	辽宁朝阳	紫色	纺锤状
P56	ZJY1	浙江衢州	白色	不规则瘤状
P57	SDY2	山东潍坊	白色	不规则瘤状
P58	HBV7	唐山唐海	白色	不规则瘤状

1.2 试验方法

1.2.1 菊芋 DNA 提取与检测

采用康为世纪公司的植物基因组 DNA 提取试剂盒(CW0553A)提取菊芋叶片 DNA 后,在 1.0%琼脂糖凝胶上电泳 60 min($5 \text{ V} \cdot \text{min}^{-1}$),EB 染色后观察;利用美国 Thermo 公司 ND-200C 型超微量紫外分光光度计测定样本 DNA 在 230、260、280 nm 的吸光度值,计算 DNA 的浓度和纯度,并将其浓度调整为 $100 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$,于一 20°C 保存备用。

1.2.2 菊芋 SRAP 反应体系

SRAP-PCR 反应体系为 $20.0 \mu\text{L}$,其中 $10 \times$ buffer $2.0 \mu\text{L}$, $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ MgCl}_2$ $2.0 \mu\text{L}$, $2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ dNTP $2.0 \mu\text{L}$, $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 正反引物各 $0.6 \mu\text{L}$, $100 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ DNA 模板 $0.8 \mu\text{L}$, $5 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ Taq 酶 $0.3 \mu\text{L}$,其余为 ddH_2O 。

具体程序为 94°C 预变性 5 min; 94°C 变性 1 min, 35°C 退火 1 min, 72°C 延伸 1 min, 进行 5 个循环; 94°C 变性 1 min, 50°C 退火 1 min, 72°C 延伸 1 min 进行 35 个循环; 72°C 延伸 10 min。

扩增反应结束后,每管加入 $4 \mu\text{L}$ $6 \times$ loading buffer 震荡混匀,取 $20 \mu\text{L}$ 用 2%琼脂糖凝胶(EB 染色)在 $1 \times$ TAE 缓冲液中电泳, 120 V 恒压 40 min,于凝胶成像仪上检测。

1.2.3 引物筛选及 PCR 扩增

利用 P10、P18 和 P21 号样本 DNA,应用优化后的 SRAP-PCR 反应体系对 SRAP 引物进行 PCR 扩增,扩增产物用 2.0%的琼脂糖凝胶电泳分离,EB 染色后在凝胶成像系统下观察、拍照,筛选出多态性好的 SRAP 引物组合。

用优化好的反应体系和筛选出的引物对所有的供试材料进行扩增,扩增产物用 6%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分离检测。

1.3 数据分析

根据 0,1 矩阵建立 58 份菊芋资源的 DNA 指纹图谱。利用 NTSYS-pc2.1e 统计分析软件计算不同材料间的遗传相似系数(Gs)。根据 G_s 值按非加权平均距离(UPGMA)进行遗传相似性聚类分析,并绘制聚类分析图。

表 2

SRAP 所用引物序列^[6]

Table 2

Primers sequence used in SRAP analysis^[6]

引物名称 Primer	正向序列(5'-3') Forward sequence	引物名称 Primer	反向序列(5'-3') Reverse sequence
Me1	TGAGTCCAAACCGGATA	Em1	GACTGCGTACGAATTATT
Me2	TGAGTCCAAACCGGAGC	Em2	GACTGCGTACGAATTGTC
Me3'	TGAGTCCAAACCGGAAT	Em3	GACTGCGTACGAATTGAC
Me4	TGAGTCCAAACCGGACC	Em4	GACTGCGTACGAATTGTA
Me5	TGAGTCCAAACCGGAAG	Em5	GACTGCGTACGAATTAAC
Me6	TGAGTCCAAACCGGTAA	Em6	GACTGCGTACGAATTGCA
Me7	TGAGTCCAAACCGGTCC	Em7	GACTGCGTACGAATTCAA
Me8	TGAGTCCAAACCGGTGC	Em8	GACTGCGTACGAATTCTG
Me9	TGAGTCCAAACCGGTAG	Em9	GACTGCGTACGAATTGGA
Me10	TGAGTCCAAACCGGTGT	Em10	GACTGCGTACGAATTGAG
		EM11	GACTGCGTACGAATTCCA

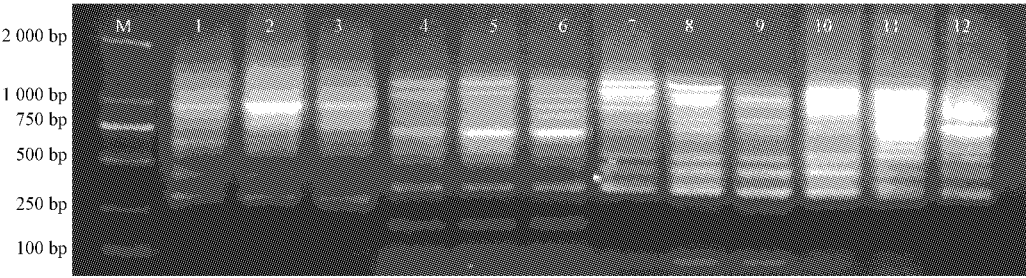
2 结果与分析

2.1 菊芋 DNA 提取

从 1.0%琼脂糖凝胶水平电泳结果可知,试剂盒法提取的菊芋基因组 DNA 纯度高,含杂质少、RNA 降解完全、质量高。测得的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值均在 1.8~1.9,也说明无杂质和蛋白质污染。虽然有的样本提取的 DNA 量比较少,但可以通过适当加大提取样品量的方式予以解决。

2.2 SRAP 引物筛选

引物筛选是 SRAP 的一个重要环节,合适的引物才能保证试验的准确性。该试验选取了 P10、P18、P21 号样本进行引物筛选。经过初筛和复筛,从 110 对引物中筛选出扩增条带丰富、清晰、稳定的 16 对引物组合。筛选出的引物组合为: M2-E8、M2-E10、M2-E12、M3-E4、M3-E6、M3-E8、M3-E10、M3-E12、M5-E1、M5-E3、M5-E4、M5-E7、M6-E3、M7-E8、M9-E5、M9-E6。



注:M, DNA 分子量标准,DL 2 000;1~12 泳道为选取 p10、p18 和 p21 号样本进行引物筛选的结果,其中 1~3、4~6、7~9、10~12 引物组合分别为 M2-E8、M2-E10、M2-E12、M3-E4。

Note:M, DNA Marker DL 2 000;1-3, Primer is M2-E8 and DNA are P10, P18 and P21;4-6, Primer is M2-E10 and DNA are P10, P18 and P21;7-9, Primer is M2-E12 and DNA are P10, P18 and P21;10-12, Primer is M3-E4 and DNA are P10, P18 and P21.

图 1 部分 SRAP 引物筛选结果

Fig. 1 Results of SRAP primers screening

2.3 SRAP 多态性分析

利用筛选得到的 16 对扩增稳定且多态性丰富的引物组合,对 58 份菊芋资源进行 SRAP 分析。由图 2 可知,16 对引物组合共扩增出 123 条

带,其中多态性条带 90 条,多态率 72.7%。单个引物组合扩增的条带为 3~15 条,平均 7.7 条。扩增产物长度以 50~500 bp 的扩增片段居多。扩增条带数最多的引物为 me3-em10,达到 15 条,

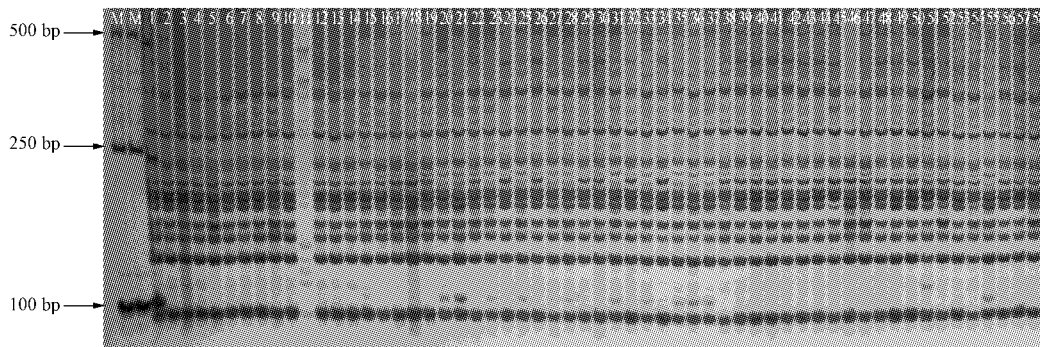


图2 SRAP引物组合 me5-em3 对菊芋资源基因组 DNA 扩增的带型

Fig. 2 SRAP profiles of Jerusalem artichoke resources using a pair of primers me5-em3

表3 不同引物扩增统计结果

Table 3 Statistic of SRAP amplification result

引物组合 Primer	扩增总带数 Total bands	多态性条带数 Polymorphic bands	多态性位点百分率 Polymorphic rate/%
me5-em3	11	3	27.27
me6-em3	6	4	66.67
me3-em4	9	6	66.67
me2-em10	5	1	20.00
me2-em8	5	3	60.00
me2-em12	7	2	28.57
me5-em1	7	5	71.43
me5-em7	8	8	100.00
me3-em6	11	6	54.55
me7-em8	8	8	100.00
me9-em6	3	3	100.00
me9-em5	5	4	80.00
me5-em4	7	6	85.71
me3-em12	8	8	100.00
me3-em10	15	15	100.00
me3-em8	8	8	100.00
总计 Total	123	90	
平均值 Average	7.7	5.6	72.70

引物组合 me9-em6 的扩增条带数最少,为 3 条。多态性百分率最高的是 me5-em7, me7-em8, me9-em6, me3-em8, me3-em10 和 me3-em12, 达到 100.00%, me2-em10 最低,为 20.00%。

2.4 聚类分析

利用 123 条谱带建立遗传相似矩阵,经聚类分析构建亲缘关系树状图,由图 3 可知,58 份菊芋资源的遗传距离分布在 0.01~0.52,平均为 0.23,说明不同菊芋资源之间存在较高的遗传多样性。遗传距离最大的为 LY8 与 ZKY8,为 0.52;遗传距离最小的为 HBY6 与 BY1, DQ1、

DQ4 与 NY1, LY6 与 SHY1, JSSQ 与 LNY4, SCY1 与 SCY2,均为 0.01,可能是由于不同地区之间的相互引种,导致该试验种质资源的重复。

在相似系数为 0.67 处分割,可以把 58 份菊芋资源分成三大类群。第一大类包括 54 个品种;第二大类包括 JY3、QHY2 和 SDY1;第三大类仅包括 LY8。在相似系数为 0.87 处,可以将第一大类分为 A、B、C、D 共 4 个亚类。第一亚类包括 DQ11、HBY6、BY1、DQ1、MY2、DQ4、HBY9、HBY15、NY1、MY1、LY6、LY4、QHY3、JY1、QHY4、NY2、JSSQ、HBY12、HBY13、HBY14、SHY1、LNY4、SCY2、BJY1、SCY1、ZKY8、ZJY1、和 SDY2 共 28 个品种,均为白皮不规则瘤状品种。第二亚类包括 DQ29、DQ6、MY3、LY2、HBY2、MY4、DQ24、JSY1、QHY5、JXY1、LNY2、ZKY6、SDY3 和 HBY7 共 14 个品种,均为红皮品种;其中 DQ29、LY2 和 LNY2 为球状,其它均为不规则瘤状。第三亚类仅包括 HLY1,为紫色不规则瘤状。第四亚类包括 DQ12、JY2、HLY3、HLY5、ZKY4、ZKY2、JY4、ZKY3、ZKY1、QHY1 和 LNY1 共 11 个品种,均为紫色品种;其中 ZKY4、ZKY2 和 ZKY1 为不规则瘤状,其它品种为纺锤状。

3 结论与讨论

菊芋资源从传统形态学上划分,一般按照块茎颜色、形状来作为划分标准^[7]。按照块茎颜色一般分为紫色、红色、白色三大类,按照块茎性状一般分为纺锤状、瘤状、棒状、球状四大类。

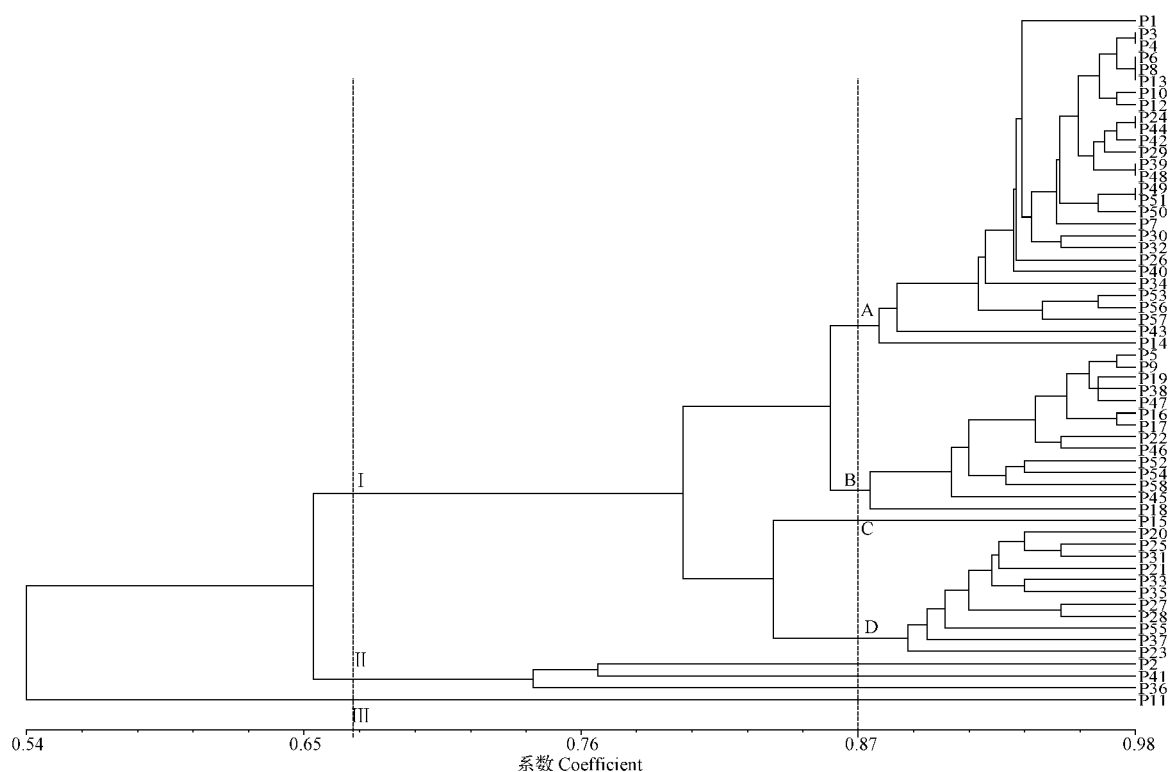


图 3 58 份菊芋种质资源亲缘关系聚类分析

Fig. 3 Cluster analysis of 58 Jerusalem artichoke varieties determined from SRAP

该试验采用 SRAP 分子标记将 58 份菊芋资源分成三大类群。其中第一大类共分为 4 个亚类,第一亚类包括 28 份材料,均为白皮品种;第二亚类包括 14 份材料,均为红皮品种;第三亚类包括 1 份材料,为紫色品种;第四亚类包括 11 份材料,均为紫色品种;且第三、第四亚类又可以聚为一类,这表明块茎颜色可作为菊芋初步分类的表型指标。这与前人^[5,8]的研究结果一致。同时发现作为第二大类的 JY3(白皮)、QHY2(红皮)、SDY1(白皮)和第三大类的 LY8(白皮)未能按照块茎颜色进行分类,推断可能是国外引进资源,具体情况有待进一步验证。总之,不能仅仅依靠块茎颜色进行简单划分,应采用颜色性状与分子标记相结合的办法。

该试验对 58 份菊芋资源的亲缘关系进行 SRAP 分子标记研究,结果表明,该标记在菊芋资源亲缘关系鉴定方面有较高的分辨能力,能够为菊芋资源的分类提供依据,同时为后续更多菊芋资源的遗传多样性的研究奠定基础。同时,结合 58 份资源农艺性状调查结果,推断紫色资源倾向

于野生化,适宜筛选高抗、耐盐、适宜盐碱地生态改良品种;白色、红色资源可能经过人工驯化,适宜筛选高产主栽品种^[8]。

参考文献

- [1] 陈军. 体外诱变与组织培养在菊芋种质创新中的应用研究[D]. 武汉:华中农业大学,2009:4-5.
- [2] 刘丹丹,逯晓萍,张瑞霞,等. 高丹草种质资源 SRAP 指纹图谱构建及遗传多样性分析[J]. 华北农学报,2012,27(2):72-76.
- [3] 陶爱芬,祁建民,粟建光,等. 黄麻种质资源遗传多样性的 SRAP 分析[J]. 植物科学学报,2012,30(2):178-187.
- [4] 许先松,刘志钦,林晓丹,等. 基于形态及 SRAP 标记的辣椒资源遗传多样性及亲缘关系比较[J]. 福建农林大学学报(自然科学版),2011(1):48-53.
- [5] 马胜超,韩睿,任鹏鸿,等. 三十份菊芋资源亲缘关系的 SRAP 分析[J]. 浙江农业学报,2014(5):1212-1217.
- [6] WANGSOMNUK P P, SUDARAT K, SANUN J. Assessing genetic structure and relatedness of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) germplasm with RAPD, ISSR and SRAP markers[J]. American Journal of Plant Sciences, 2011, 2: 753-764.
- [7] 孙雪梅,李莉. 菊芋种质资源性状初步研究[J]. 青海农林科技,2011(3):48-52.

[8] KOU Y, ZENG J, LIU J, et al. Germplasm diversity and differentiation of *Helianthus tuberosus* L. revealed by AFLP

marker and phenotypic traits[J]. Journal of Agricultural Science, 2014, 152: 779-789.

Genetic Diversity of Fifty-eight Jerusalem Artichoke Germplasm Resources Revealed by Sequence Related Amplified Polymorphism(SRAP)

XUE Zhizhong^{1,2}, YANG Yahua^{1,2}, LI Haishan^{2,3}, ZHANG Guoxin^{1,2}, LIU Shujun^{1,2}

(1. Coastal Agriculture Institute, Hebei Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Caofeidian, Hebei 063299; 2. Hebei Engineering Research Center for Saline-alkali Land Greening, Caofeidian, Hebei 063299; 3. Hebei Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Shijiazhuang, Hebei 050031)

Abstract: Fifty-eight accessions of Jerusalem artichoke were used as materials, SRAP marker was used to analyze genetic diversities, in order to supply references for breeding salt-tolerant new variety. The results showed that 16 primers selected from 110 SRAP-primer were used for amplification and 123 DNA bands were obtained, including 90 polymorphic bands. The percent of polymorphic was 72.7%. The genetic distance indexes of 58 cultivars based on the SRAP data varied from 0.01 to 0.52. Cluster analysis with UPGMA method showed that the 58 resources tested could be divided into three groups. The first group could be divided into four sub groups. The results showed that The SRAP could fully reveal genetic differences for Jerusalem artichoke resources, and could be used in Jerusalem artichoke germplasms identification.

Keywords: Jerusalem artichoke(*Helianthus tuberosus* L.); SRAP; genetic diversity; cluster analysis

欢迎订阅 2018 年《果树学报》

《果树学报》是中国农业科学院郑州果树研究所主办的国家级学术期刊,分别被有关权威期刊评价机构评为中国精品科技期刊、中国农林水产类权威学术期刊、中文园艺学核心期刊、中国科技核心期刊,已被中国科学引文数据库(核心库)、美国化学文摘(CA)、英国 CABI 等 20 余种国内外重要数据库收录。2016 年 10 月《中国科技期刊引证报告》(核心版)中本刊总被引频次 2 781,影响因子为 1.157;12 月中国科学文献计量评价研究中心(中国知网)中本刊复合影响因子为 1.603,期刊综合影响因子为 1.292,基础研究类影响因子为 1.178。已成为国内外有影响的学术期刊之一。《果树学报》着重选发密切结合我国果树科研、教学、生产实际,反映学科学术水平和发展动向的优秀稿件,及时报道重大科研成果、阶段性成果和科研进展情况。栏目设置有种质资源·遗传育种·分子生物学、栽培·生理·生态、植物保护·果品质量与安全、贮藏·加工、专论与综述、技术与方法、新品种选育报告等。读者对象为果树学科的科研人员、高等农业院校师生及基层果树管理技术人员。月刊,每期 128 页码,定价 20 元,全年 12 期共 240 元。邮发代号:36-93,国际代号 BM/1107。欢迎投稿,欢迎订阅。

编辑部地址:河南省郑州市航海东路南 中国农业科学院郑州果树研究所

邮 编:450009

电 话:0371-63387308

E-mail: guoshuxuebao@caas.cn 网 址: www.fruitsci.cn

在 线 投 稿: http://gskk.cbpt.cnki.net

