

doi:10.11937/bfyy.20173155

## 生菜资源表型性状变异及其与 SSR 标记的关联分析

王书珍<sup>1</sup>, 王斌才<sup>2</sup>, 黄兴学<sup>2</sup>, 李志良<sup>1</sup>, 周国林<sup>2</sup>, 汪爱华<sup>2</sup>

(1. 经济林木种质改良与资源综合利用湖北省重点实验室, 黄冈师范学院 生命科学学院, 湖北 黄冈 438000;

2. 武汉市农业科学技术研究院 蔬菜科学研究所, 湖北 武汉 430065)

**摘要:**从世界范围内搜集的 300 多份生菜资源中筛选 30 份优质资源作为研究对象, 调查 12 个表型性状变异, 并进行 SSR 分子标记分析, 探究表型性状与 SSR 标记之间的相关关系, 以为生菜分子标记辅助育种提供参考依据。结果表明: 调查的 30 份资源表型性状均存在极显著差异, 平均变异系数最大的为株幅(40.256%)。12 个表型性状将 30 份生菜资源分成两大类, 30 份资源的遗传距离变化范围为 0.083~0.667。14 个多态性 EST-SSR 标记在 30 份生菜资源中扩增的条带数为 3~8,  $H_o$  和  $H_e$  的平均值分别为 0.156 和 0.680, PIC 值变化范围为 0.466~0.771。同样, 14 个标记将 30 份资源分成两大类, 30 份资源间的遗传距离为 0.032~2.629, 表型性状聚类结果与 SSR 标记聚类结果不相关。以单一性状聚类结果与 SSR 标记聚类结果进行相关性分析, 大部分标记均与表型性状有相关性, 且大部分引物组合表现为累积效应。

**关键词:**生菜; 表型性状; SSR 标记; 关联分析; 种质改良

**中图分类号:**S 636.202.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2018)05-0001-06

生菜(*Lactuca sativa* L.)属菊科莴苣属一二年生草本, 别名叶用莴苣, 包括散叶生菜、半结球生菜、结球生菜等, 是世界范围内广泛种植食用的低糖、低脂类蔬菜。生菜营养价值极高, 富含多种维生素、矿物质、有机酸、核黄素等活性成分, 以及具有减肥功效的膳食纤维, 能够分解食物中亚硝

胺等致癌物质而被誉为“抗癌蔬菜”<sup>[1-2]</sup>。随着对生菜保健功能认识的深入, 人们对其品质的要求逐渐提高, 尤其是表型性状。

表型性状多为数量性状且受多基因互作影响, 且形态学特征与分子标记具有紧密联系<sup>[3-4]</sup>。EST-SSR (expressed sequence tags-simple sequence repeat) 是从功能基因内开发的标记, 具有重复性强、共显性等特点, 能够缩小目标性状相关联的分子标记的筛选范围, 在动植物的遗传多样性检测、QTL 和目标基因定位、遗传连锁图的构建、杂种优势的预测、分子标记辅助育种 (molecular marker assisted selection, MAS) 等领域作用重大<sup>[5-6]</sup>。该研究以 30 份生菜资源为研究对象, 将叶形、株型等数据与 SSR 分子标记进行关联分析, 以期筛选与表型性状紧密关联的标记位点, 为相关基因的克隆和分析做铺垫, 也为生菜的种质改良提供参考依据。

**第一作者简介:**王书珍(1984-), 女, 博士, 副教授, 现主要从事植物遗传学等研究工作。E-mail: wangshuzhen04@163.com.

**责任作者:**汪爱华(1979-), 女, 博士, 高级农艺师, 现主要从事叶类蔬菜品种筛选和种质改良等研究工作。E-mail: wangaihualt@163.com.

**基金项目:**湖北省自然科学基金资助项目(2015CFC816); 国家大宗蔬菜产业技术体系试验站资助项目(CARS-23-G-26); 大别山特色资源开发湖北省协同创新中心团队资助项目(2015TD07)。

**收稿日期:**2017-10-30

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

武汉市蔬菜科学技术研究所 2010 年开始从世界各地引入 300 份生菜资源,在前期温室栽培及田间试验的研究基础上,将形态及培育周期差异明显的 30 份资源作为研究对象。在试验基地(东经 114°20′,北纬 30°37′)种植两季,定植株行距为 20 cm×25 cm,每个品种种植 50~70 株,常规日常管理。2016 年秋季,每个品种随机选 3~5 株健康叶片,放入硅胶中干燥,自封袋封存后于 -70 °C 保存并用于 SSR 标记分析。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 表型形状的调查

30 份生菜资源(标号 W1~W30),除去病害植株,选取长势一致的植株,每个品种选取 10 株,连续 3 个种植期田间观察叶色、叶型、叶形、叶缘、叶边、结球与否、株型、长势。测量株高、株幅,统计叶片数,测定最大叶面积,每份资源统计 10 个

个体的平均值。

#### 1.2.2 基因组 DNA 提取及 PCR 扩增

采用改良的 CTAB 法提取生菜基因组 DNA,1%琼脂糖凝胶电泳检测完整度,经紫外分光光度计测定 DNA 的浓度,并将 DNA 浓度稀释至 100 ng·μg<sup>-1</sup>,于 -20 °C 保存备用<sup>[7]</sup>。引物是前期基于 NCBI 数据库登陆的生菜 EST 序列设计合成的,挑选其中 100 对进行扩增,经凝胶电泳分析后,最终筛选出 14 对多态性高、谱带清晰、重复性好的 EST-SSR 引物进行试验(表 1)。

采用 10 μL 的 PCR 反应体系进行扩增,体系含 5 μL 的 2×Taq PCR Master mix,100 ng 基因组 DNA,20 mmol·L<sup>-1</sup>正反向引物 0.1 μL,灭菌去离子水补足剩余体积。PCR 扩增程序为 94 °C 预变性 5 min,35 个扩增循环(94 °C 变性 30 s,最适退火温度下退火 40 s,72 °C 延伸 40 s),最后增加一个 7 min 的 72 °C 延伸阶段。PCR 扩增产物采用 6%的变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测,统计不同个体的基因型。

表 1 多态性引物信息

Table 1 Information of polymorphic primers

位点 Loci	正向引物(5′-3′) Forward primer(5′-3′)	反向引物(5′-3′) Reverse primer(5′-3′)	退火温度(T <sub>m</sub> ) Annealing temperature	重复基序 Repeat motif	等位 基因 Na	观察杂 合度 H <sub>O</sub>	期望杂 合度 H <sub>E</sub>	多态性信息 含量 PIC
LS-01	ACAAAACCCCTGATAGAA	GGAACCATTC AAGGACC	55	(TC)24	3	0.360	0.638	0.554
LS-02	CTCCATAACCAAAACCTC	TTCTTTTCGACATGCTTCT	58	(AG)25	4	0.083	0.590	0.508
LS-03	TGGCAGAAGATGGAGTA	CATCATCATCACACCA	54	(ATC)18	4	0.111	0.704	0.630
LS-04	CCATAACCAAAACCTCA	CTTCTTTTCGACATGCTT	54	(TC)23	6	0.000	0.691	0.639
LS-05	TGCTGATGATACCTGTGA	CCACTACTTGTCCCTTT	56	(TC)22	5	0.000	0.636	0.553
LS-06	TCTAGGACTGGCTCTAC	TGATGAAGCTACACGAA	55	(CT)23	5	0.000	0.760	0.705
LS-07	CTCCATAACCAAAACCT	ACTTCTTTTCGACATGCT	54	(CT)24	3	0.000	0.574	0.466
LS-08	GCACTCCACATTACCACC	GAAGCCGCTGTTTCCATC	56	(GA)21	8	0.233	0.775	0.737
LS-09	AACCAAAACCTCAACTC	CTTCATTCACCTCTTTCG	53	(TC)25	8	0.200	0.815	0.771
LS-10	TTGTCTCGTCTCGACCA	GTTCTGAAGTAGCCATG	55	(AG)23	4	0.043	0.625	0.546
LS-11	CCTCCATAACCAAAACCT	TTCTTTTCGACATGCTTCT	55	(TC)23	4	0.680	0.644	0.565
LS-12	ACAGATCTCAAACAACC	CCCATAACCTTTTCACTC	57	(GAT)15	7	0.036	0.795	0.750
LS-13	GGGAGATACTACCTCA	TAACCTCTTCAGTTGCC	54	(CT)22	3	0.222	0.601	0.489
LS-14	TACATCTGGACTTTGTG	AGGATTTCTTTGCCTAT	55	(AG)21	3	0.115	0.604	0.491
平均值 Mean	—	—			4.933	0.156	0.680	0.600
标准差 Standard deviation	—	—			1.769	0.178	0.079	0.101

#### 1.2.3 SSR 标记与品质性状的关联分析

对 12 个表型性状进行方差分析和聚类分析,计算各性状的平均值、变异系数及重复力(R)<sup>[3]</sup>。

根据电泳图谱条带的有无建立“0/1”二元矩阵:有带为 1,无带为 0。采用并用 Arlquin 软件计算遗传多样性和连锁不平衡。利用 PICCalc 0.6 软件

计算每个标记的多态性信息含量。采用 NTSYS 2.21 软件计算距离系数,聚类分析并建立聚类树状图。根据遗传距离矩阵分析 SSR 标记位点与形态性状的相关性。

2 结果与分析

2.1 生菜表型性状变异分析和聚类分析

方差分析表明,12 个表型性状在 30 份生菜

资源间差异达到极显著水平,表明生菜表型变异大,遗传多样性丰富。株高、株幅、叶片数、最大叶等 4 个表型性状的变异系数(CV)在 20.991%~40.256%,变异最大的为株幅,最小的为叶片数。这 4 个性状的重复力(R)均比较高,变化范围为 0.818~0.997,其中重复力最低的是叶片数,最高的是株幅(表 2)。

表 2 各品种间表型性状变异

Table 2 Variation of phenotypic traits among different varieties

编号 Number	表型性状 Traits	平均值 Mean value	最大值 Maximum value	最小值 Minimum value	标准差 Standard deviation	变异系数(CV) Coefficient of variation/%	重复力 Repeatability
1	株高/cm	15.083	28	7	4.127	27.362	0.986
2	株幅/cm <sup>2</sup>	761.330	1 560	289	306.480	40.256	0.997
3	叶片数	22.433	33	14	4.709	20.991	0.818
4	最大叶面积/cm <sup>2</sup>	209.267	324	72	74.853	35.769	0.962

叶色多为深绿、绿色、浅绿,其次还有翠绿、暗绿、绿白、深紫红色;叶型多为扇形、长圆形、近圆形,其次为圆形、长扇形、狼耳尖形叶;叶形多为皱缩、微皱、较光滑、特皱缩,其次还有近全缘、近光滑、较皱缩。22 份生菜资源的叶缘为全缘,其余 8 份为近全缘。10 份为半结球资源,18 份不结

球,2 份为结球。叶边有折叠、波浪折叠、稀锯齿波浪、稀波浪、密尖刺波浪折叠、微波浪、锯齿波浪、尖刺状、钝齿状、钝尖状波浪折叠等类型。株型 6 份为散状,19 份为紧凑型,5 份为较紧凑型。10 份资源长势中等,13 份长势旺盛,3 份特旺盛,4 份长势较弱。

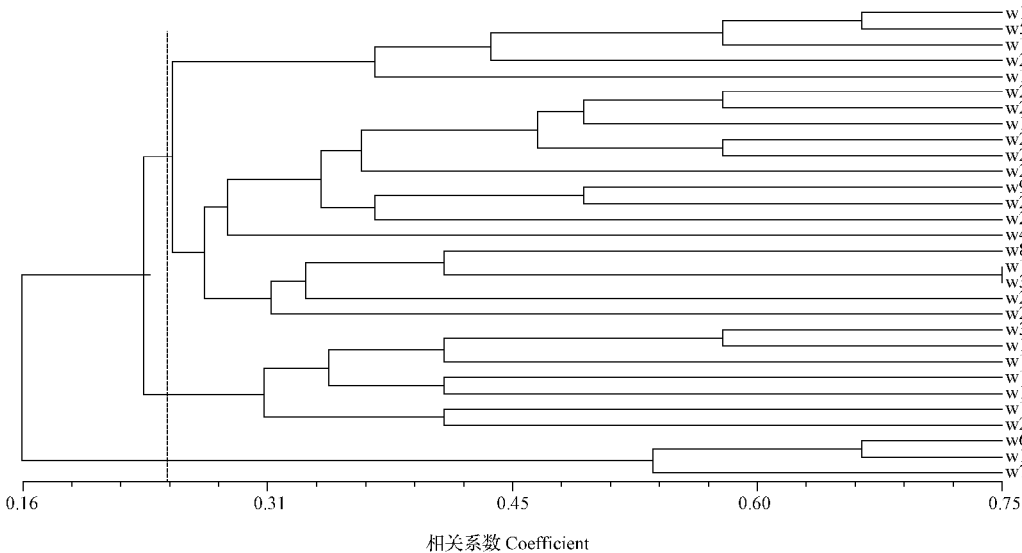


图 1 12 个表型性状聚类结果

Fig. 1 Clustering results of 12 phenotypic traits

30 份生菜资源被分为两大类,w1、w5、w18 等 27 份生菜被分到第一类中,第二类仅仅包括

w6、w7、w11 等 3 份资源(图 1)。在相关系数为 0.25 处,第一类的 27 份资源被分为 2 类,分别包

括 20 份和 7 份资源。表型性状相似的资源被聚到一起,聚类结果与地理起源并不完全一致。

## 2.2 SSR 引物多态性分析

在所设计合成的 100 个 EST-SSR 标记中,14 个标记是多态性的,扩增条带数为 3~8,平均每个位点为 4.933(表 1)。引物 LS0-08 和 LS-09 扩增的等位基因最多,均为 8 个等位基因。LS-01、LS-07、LS-13、LS-14 标记扩增的等位基因最少,仅为 3 个。观察杂合度( $H_o$ )和期望杂合度( $H_e$ )

的变化范围分别为 0.000~0.680 和 0.574~0.815,平均值分别为 0.156 和 0.680。多态性信息含量 PIC 值变化范围为 0.466~0.771,平均为 0.600,PIC 值最高的是 LS-09 位点,最低的是 LS-07 位点。14 个标记将 30 份资源分成两大类,第一大类仅包括 w1 和 w12 等 2 份资源,其余的 28 份被聚成第二大类。在相关系数 1.43 处,第二大类又被分为 2 类,分别包括 23 份和 5 份生菜资源(图 2)。

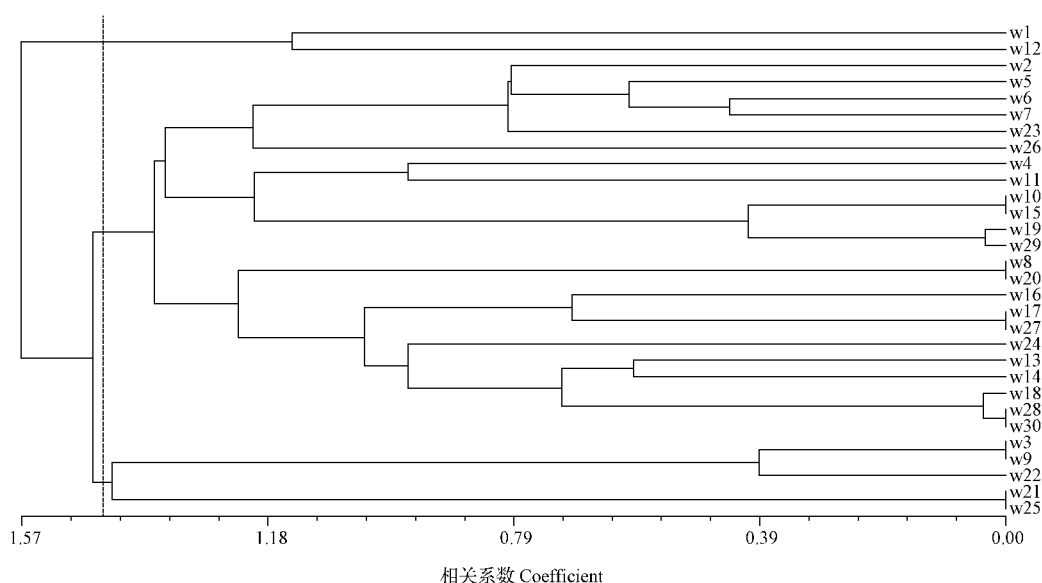


图 2 生菜资源 SSR 标记的聚类结果

Fig. 2 Clustering results based on SSR markers

## 2.3 表型性状与 SSR 标记关联分析

将表型性状的距离矩阵与 SSR 分子标记聚类的距离矩阵进行相关性分析,得到拟合方程  $y = 1.3105x + 0.2609$ ,二者的相关系数为 0.04227,即相关性不显著,14 个微卫星位点反映的差异与各材料的表型性状无相关性。将每个表型性状进行聚类,每对引物也进行单独聚类,再将每个表型性状距离矩阵与每对 SSR 引物聚类的距离矩阵进行相关性分析。在进行的 420 个两两相关分析中,各表型性状与 SSR 引物达到极显著相关( $P < 0.01$ )水平的引物数在 1~5 对,相关系数范围为 -0.428~0.289。LS-13 标记与叶色的相关系数最大,达到 -0.428。

与叶形和株高性状达到显著相关水平的引物最多,均为 5 对,分别是 LS-01、LS-02、LS-04、LS-

08、LS-13 和 LS-03、LS-05、LS-06、LS-07、LS-10(表 3)。仅发现 1 个 EST-SSR 标记分别与叶色(LS-13)、结球(LS-01)、叶片数(LS-05)等表型性状显著相关。LS-01 引物与叶型、叶形、叶缘、叶边、结球等 5 个表型性状相关,同样 LS-09 引物也与叶缘、叶边、株型、株幅、最大叶面积等 5 个性状相关联。然而,LS-11、LS-12、LS-14 等 3 个引物与 12 个表型性状均无相关性。

## 3 讨论与结论

连锁不平衡(linkage disequilibrium, LD)是不同基因座位上等位基因的非随机组合,关联分析以连锁不平衡为基础,无须构建作图群体,鉴定群体内目标性状与遗传标记或候选基因关系的分析方法<sup>[8]</sup>。关联分析已经广泛用于水稻、玉米、大

表 3 单一叶形性状与各引物的相关性分析  
Table 3 Correlation analysis between single leaf shape traits and primer pairs

表型性状 Traits	相关的 EST-SSR 引物 Related EST-SSR primer pairs	相关引物数 Number of primers	单个引物最大相关系数 Maximum correlation coefficient of single primer
叶色 Leaf color	LS-13	1	−0.428
叶型 Leaf type	LS-01、LS-03	2	0.289
叶形 Leaf shape	LS-01、LS-02、LS-04、LS-08、LS-13	5	−0.241
叶缘 Leaf margin	LS-01、LS-06、LS-09	3	−0.280
叶边 Limb	LS-01、LS-03、LS-09、LS-10	4	−0.216
结球 Heading	LS-01	1	0.243
株型 Plant type	LS-09、LS-10	2	−0.264
长势 Growth	LS-02、LS-06	2	−0.250
株高 Height	LS-03、LS-05、LS-06、LS-07、LS-10	5	0.271
株幅 Scope	LS-02、LS-06、LS-09	3	−0.248
叶片数 Number of leaves	LS-05	1	0.270
最大叶面积 The biggest leaf area	LS-09、LS-10	2	0.267

麦、鸭、猪等经济物种性状基因的定位研究<sup>[9-13]</sup>。例如,赖勇等<sup>[14]</sup>采用连锁不平衡分析在大麦中找到了与株高、穗长、芒长、穗粒数等表型性状紧密联系的 SSR 位点。然而,对于生菜品质性状与分子标记的关联分析尚鲜见报道。

植物数量形状受环境影响较大,表型性状难以准确测量其遗传变异。根据叶色、叶型、叶形、叶缘、叶边、结球与否、株型、长势、株高、株幅、叶片数、最大叶面积的分类,从生菜种质库中抽取表型性状差异显著的 30 份生菜资源作为参考材料,种植在环境条件一致的苗圃地,且采用完全随机区组设计,最大程度地消除了环境因素造成的个体表型差异。所选生菜资源的表型性状存在丰富的遗传多样性,其中株高、株幅、叶片数、最大叶面积等 4 个表型性状的变异系数为 20.991%~40.256%,且各性状在不同功能材料间存在极显著差异,4 个性状的重复力(R)均大于 0.800,即此 4 个性状中遗传因素占主导地位。14 个位点的等位基因数平均为 4.933,PIC 值变化范围较大(0.466~0.771),即所检测的生菜资源遗传变异比较丰富。

刘超<sup>[15]</sup>采用 35 个 SSR 标记与 44 个表型性状的关联研究中,相关系数达到 0.729 5,即极显著相关性。该研究中,叶形和株高 2 个性状均与 LS-03 点紧密关联,且表现为累积效应,表明该性状受多基因共同作用。叶色性状与 LS-13 标记的

相关系数达到−0.428,因此开发更多的额标记进行范围的基因组扫描和表型性状关联分析仍需进行。该研究对于生菜表型性状目的基因的克隆,以及生菜种质资源的育种和品质性状改良意义重大。然而,关联位点与性状间关系及作用机理和方式尚不清楚,需后续的深入研究。

参考文献

[1] JAMIE P, SALTVEIT M E. Postharvest changes in broccoli and lettuce during storage in argon, helium, and nitrogen at mo-spheres containing 2% oxygen[J]. Postharvest Biology and Tech-nology, 2002, 26(1): 113-116.

[2] SUN J, CHU Y F, WU X, et al. Antioxidant and antiprolif-erative activities of common fruits[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50(25): 7449-7454.

[3] 左力辉, 张文林, 邱彤, 等. 新疆野苹果叶形性状变异及其与 SSR 标记关联分析[J]. 园艺学报, 2015, 42(4): 759-768.

[4] LIU C, GE Y, WANG D J, et al. Morphological and molecu-lar diversity in a germplasm collection of seed pumpkin[J]. Scien-tia Horticulturae, 2013, 154: 8-16.

[5] EL-RODENEY W, KIMURA M, HIRAKAWA H, et al. De-velopment of EST-SSR markers and construction of a linkage map in faba bean (*Vicia faba*) [J]. Breeding Science, 2014, 64(3): 252.

[6] CUBRY P, PUJADE-RENAUD V, GARCIA D, et al. De-velopment and characterization of a new set of 164 polymorphic EST-SSR markers for diversity and breeding studies in rubber tree (*Hevea brasiliensis* Müll. Arg.) [J]. Plant Breeding, 2014, 133(3): 419-426.

[7] WANG S Z, PAN L, HU K, et al. Development and charac-terization of polymorphic microsatellite markers in *Momordica*

- charantia (Cucurbitaceae)[J]. American Journal of Botany, 2010, 97(8):e75.
- [8] KRAAKMAN A T, NIKS R E, van den BERG P M, et al. Linkage disequilibrium mapping of yield and yield stability in modern spring barley cultivars[J]. Genetics, 2004, 168(1): 435-446.
- [9] ZHAO K Y, TUNG C W, EIZENGA G C, et al. Genome-wide association mapping reveals a rich genetic architecture of complex traits in *Oryza sativa* [J]. Nature Communication, 2011 (2):467.
- [10] FLINT-GARCIA S A, THUILLET A, YU J, et al. Maize association population: A high resolution platform for QTL dissection[J]. Plant J, 2005, 44: 1054-1064.
- [11] MACCAFERRI M, SANGUINETI M C, ENRICO N, et al. Population structure and long-range linkage disequilibrium in a durum wheat elite collection[J]. Mol Breed, 2005(15): 271-289.
- [12] 方梅霞, 李莹, 徐海平, 等. GHRL 及其受体 GHSR 基因多态性与鸭生长及屠体性状的关联性[J]. 畜牧兽医学报, 2011, 42(1): 18-24.
- [13] 覃立立, 蔡更元, 张豪, 等. 猪骨和皮脂性状相关 ESTs 的 SNPs 筛查与关联分析[J]. 中国农业科学, 2011, 44(16): 3403-3412.
- [14] 赖勇, 王鹏喜, 范贵强, 等. 大麦 SSR 标记遗传多样性及其与农艺性状关联分析[J]. 中国农业科学, 2013, 46(2): 233-242.
- [15] 刘超. 籽用南瓜种质资源遗传多样性研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2012.

## Association Analysis Between Microsatellite Loci and Phenotypic Traits in *Lactuca sativa* L.

WANG Shuzhen<sup>1</sup>, WANG Bincui<sup>2</sup>, HUANG Xingxue<sup>2</sup>, LI Zhiliang<sup>1</sup>, ZHOU Guolin<sup>2</sup>, WANG Aihua<sup>2</sup>

(1. Hubei Key Laboratory of Economic Forest Germplasm Improvement and Resources Comprehensive Utilization/College of Life Science, Huanggang Normal University, Huanggang, Hubei 438000; 2. Wuhan Vegetable Research Institute, Wuhan Academy of Agricultural Science & Technology, Wuhan, Hubei 430065)

**Abstract:** Among 300 lettuce germplasms collected worldwide, 30 samples were selected as materials for the survey of phenotypic variation. And 12 traits were surveyed, SSR molecular marker analysis was conducted. Association analysis between microsatellite loci and phenotypic traits were performed to provide the theoretical basis for molecular marker assisted breeding of lettuce. The results showed that significant differences existed in phenotypic traits, and the remarkable one was strain amplitude (40.256%). These phenotypic traits divided the 30 lettuce resources into two categories, with the genetic distance ranging between 0.083 and 0.667. Furthermore, each polymorphic EST-SSR marker amplified 3—8 alleles, and the mean  $H_O$  and  $H_E$  were 0.156 and 0.680, respectively. PIC value varied from 0.466 to 0.771. Similarly, the 14 SSR markers divided 30 resources into two categories, and genetic distance ranged from 0.032 to 2.629. The clustering results of phenotypic traits were not related to that of SSR markers. The correlation analysis between single trait and SSR marker showed that most markers were correlated with phenotypic traits. In particular, most marker combinations showed cumulative effects.

**Keywords:** *Lactuca sativa* L.; trait; SSR marker; association analysis; germplasm improvement