

# 基于 SSR 分子标记的芥蓝遗传多样性分析

张德双<sup>1</sup>, 张娜<sup>1,2</sup>, 于拴仓<sup>1</sup>, 张凤兰<sup>1</sup>, 隋光磊<sup>1</sup>, 余阳俊<sup>1</sup>,  
赵岫云<sup>1</sup>, 汪维红<sup>1</sup>, 苏同兵<sup>1</sup>, 卢桂香<sup>1</sup>

(1. 北京市农林科学院 蔬菜研究中心, 北京 100097; 2. 烟台大学 生命科学学院, 山东 烟台 264005)

**摘要:** 芥蓝的研究多集中在分类、常规种资源遗传多样性等方面。随着芥蓝杂交种的问世, 杂交种的优势越来越突出, 市场效果明显, 因此, 对芥蓝自交系的遗传多样性等研究尤为重要。选取分布在甘蓝 9 条染色体上的 55 对 SSR 引物, 从中筛选出多态性好、分布均匀的 15 条 SSR 引物对 98 份芥蓝自交系进行分析, 共得到 65 个多态性带型。采用 UPGMA 方法构建了一张聚类图, 在相似系数为 0.71 时, 将 98 份芥蓝自交系初步分为 1, 2, 3, 4, 5 组。研究结果为芥蓝育种中的亲本选配、杂交种鉴定和资源保护等提供了依据。在试配芥蓝新组合时, 应选择遗传距离较远的自交系作为重点材料, 后代的杂种优势会更显著。

**关键词:** 芥蓝; SSR; 多样性

**中图分类号:** S635.03 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7091(2014)04-0140-05

## Genetic Diversity of Chinese Kale Based on SSR Markers

ZHANG De-shuang<sup>1</sup>, ZHANG Na<sup>1,2</sup>, YU Shuan-cang<sup>1</sup>, ZHANG Feng-lan<sup>1</sup>, SUI Guang-lei<sup>1</sup>,  
YU Yang-jun<sup>1</sup>, ZHAO Xiu-yun<sup>1</sup>, WANG Wei-hong<sup>1</sup>, SU Tong-bing<sup>1</sup>, LU Gui-xiang<sup>1</sup>

(1. Beijing Vegetable Research Center, Beijing 100097, China;

2. College of Life Sciences, Yantai University, Yantai 264005, China)

**Abstract:** Classification and genetic diversity of local varieties in Chinese kale were studied before. With the extending of Chinese kale hybrids, they can show higher heterosis and better benefit. Therefore study on genetic diversity of inbred lines is important now. In this research, 98 Chinese kale inbred lines were analyzed by 15 polymorphic SSR markers which were selected from 55 pairs of primers locating on 9 chromosomes of cabbage. 65 polymorphic bands were detected by these 15 pairs of primers. UPGMA method was used to determine genetic diversities of 98 Chinese kale inbred lines. They were initially clustered into I, II, III, IV, V groups with coefficient 0.71. Results can be used to breed Chinese kale including selection and match of parents, identification of hybrids and protection of resources.

**Key words:** Chinese kale; SSR markers; Genetic diversity

芥蓝 (*Brassica alboglabra* Bailey) 为十字花科芸薹属甘蓝种一年生或两年生草本植物, 原产于中国华南地区, 是我国著名的特产蔬菜之一。芥蓝栽培历史悠久, 以幼嫩的菜薹和叶片为食用器官, 肉质脆嫩清甜, 深受国内消费者喜爱, 同时也出口日本、东南亚等国家。芥蓝营养丰富, 富含硫代葡萄糖苷 (Glucosinolate), 尤其是 4-甲基硫氧丁基硫苷。特别值得关注的是, 硫苷的降解产物萝卜硫素 (Sulforaphane) 是迄今为止在蔬菜中发现的最强烈的 Phase II 酶诱

导剂, 能使致癌基因失去作用<sup>[1]</sup>, 而芥蓝的萝卜硫素含量 (804 ~ 2 786  $\mu\text{mol/kg}$ , FW) 高于其他种类的十字花科蔬菜, 如青花菜 (289 ~ 883  $\mu\text{mol/kg}$ , FW) 和紫甘蓝 (467 ~ 669  $\mu\text{mol/kg}$ , FW)。因此, 芥蓝在品质育种、萝卜硫素的提取及食品加工业等领域有着重要的研究价值<sup>[2]</sup>。

以往, 芥蓝的研究多集中在界定芥蓝的分类和起源等<sup>[3-5]</sup>, 而对芥蓝资源遗传多样性的研究又多以常规种、杂交种的植物学性状或 RAPD 等分子标

收稿日期: 2013-11-27

基金项目: 北京市农林科学院科技创新能力建设专项 (KJCX20140111)

作者简介: 张德双 (1969-), 男, 黑龙江穆棱人, 研究员, 博士, 主要从事蔬菜遗传育种及分子生物学研究。

记为主<sup>[6-9]</sup>。随着芥蓝杂交种的问世及优势的充分展现,芥蓝育种迈入了新台阶,迫切需要一种简单、快速的区分不同芥蓝自交系和鉴定芥蓝不同品种的方法,为育种者选择、选配芥蓝新品种提供依据,且更有效地保护芥蓝育种者的权益。

简单序列重复 (Simple sequence repeat, SSR) 又称微卫星 DNA (Microsatellite DNA), 在真核生物基因组中普遍存在, 一般由 1~6 个碱基组成, 多以双核苷酸 (CA)<sub>n</sub> 或 (TG)<sub>n</sub> 重复最为常见。SSR 为共显性标记, 分布于整个基因组, 数量丰富, 多态性较高。SSR 标记信息量大, 重复性好, 不同实验室间可以合作交流。因此, SSR 标记在作物种质资源遗传多样性等研究领域得到广泛应用。

本研究利用 SSR 标记技术对 98 份芥蓝自交系进行遗传多样性分析, 旨在探索有效地应用于芥蓝资源多样性研究的标记, 为芥蓝育种中亲本选配、品种鉴定等提供依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

98 份纯合的芥蓝自交系由北京市农林科学院蔬菜研究中心大白菜课题组提供。供试材料于 2012 年 8 月 23 日在大棚中育苗, 9 月 20 日定植到露地, 11 月初采集 98 份芥蓝材料顶部的幼嫩叶片。先由 CoolSafe™55-4 快速真空浓缩仪冷冻干燥, 然后储存于低温储存柜中保存, 以备提取 DNA。

### 1.2 基因组 DNA 提取

采用 CTAB 法提取基因组 DNA。

### 1.3 PCR 扩增

55 对 SSR 引物序列均来源于已发表文献<sup>[10]</sup>, 由北京鼎国生物技术有限公司合成。

20  $\mu$ L PCR 反应体系为 DNA (30 ng/ $\mu$ L) 2.0  $\mu$ L, *Taq* 酶 (5 U) 0.25  $\mu$ L, dNTP (10 mmol/L) 1.0  $\mu$ L, 上下游引物 (10.0  $\mu$ mol/L) 各 1.0  $\mu$ L, 10  $\times$  PCR Buffer 含 ( $Mg^{2+}$ ) 2  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 12.75  $\mu$ L。 *Taq* 聚合酶、dNTP、10  $\times$  Buffer 均购自 TaKaRa 公司。

PCR 扩增程序为 Touchdown PCR:

94 $^{\circ}$ C 预变性	5 min	
94 $^{\circ}$ C 变性	35 s	} 12 个循环, 每个循环降 1 $^{\circ}$ C
64 $^{\circ}$ C 退火	45 s	
72 $^{\circ}$ C 延伸	45 s	
94 $^{\circ}$ C 变性	35 s	} 22 个循环
54 $^{\circ}$ C 退火	45 s	
72 $^{\circ}$ C 延伸	45 s	
72 $^{\circ}$ C 延伸	6 min	

4  $^{\circ}$ C 保存

### 1.4 凝胶电泳及检测方法

采用 JY-SCZF 型电泳装置进行电泳, 凝胶厚度为 1.0 mm。以银染显色的方法: 凝胶板在银染液 (2 g AgNO<sub>3</sub> + 2 L 去离子水) 中浸泡 6 min 后, 去离子水清洗 2 min, 迅速将凝胶板静置放到显影液 (2 L 水 + 30~35 g NaOH + 20 mL 甲醛) 中, 当条带显现后, 取出, 再用去离子水冲洗 2 min, 平铺到干净的玻璃板上, 拍照, 保存。

### 1.5 数据分析

记录电泳图谱上清晰、易辨认的主带, 有条带记为“1”, 无条带记为“0”, 数据缺失记为“-”。扩增条带以所在染色体位置及所用引物名称命名, 如 C01-CB10258A 表示第 1 条染色体组上 CB10258 引物扩增出的条带, 记录结果生成“0”和“1”组成的矩阵。利用 NTsys\_2.10 统计分析软件, 按 Nei (1983) 计算相似系数, 采用 UPGMA 法 (Unweighted pair-group method, arithmetic average) 获得芥蓝自交系的聚类图。

## 2 结果与分析

### 2.1 DNA 质量检测

采用 0.8% 琼脂糖凝胶检测提取的 DNA 质量, 24 份样品的电泳结果如图 1。由图 1 可见, DNA 条带清晰、亮度较一致, 点样口干净, 无拖尾现象, 表明 DNA 质量较好、浓度较均一且没有降解, 可用于后续的研究。

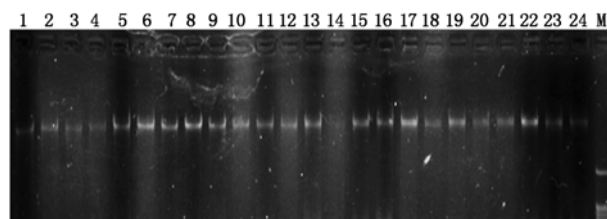


图 1 DNA 样品检测结果

Fig. 1 The eletrophoresis results of 24 DNA samples

### 2.2 引物筛选

为了减少工作量, 首先选取植物学性状多样、差异较大的 12 份芥蓝骨干自交系为小群体, 初步筛选 55 对 SSR 引物的多态性。扩增产物以 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶进行检测。图 2 为 Ni2C12、OL10D01、Na12B09、Na10G10、Na12B11 等引物电泳检测结果。以扩增条带清晰且多态性好的 SSR 引物为多态性引物, 如图 2 中 Na12B11 扩增出 3 条多态性带型, 且在多份芥蓝材料间获得多态性差异, 故可选用 Na12B11 继续对大群体进行检测。相反, 引物 Na12B09 扩增产物无差异, 因此 Na12B09 引物被淘汰。

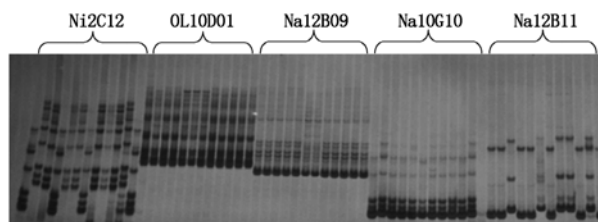


图2 引物的多态性筛选

Fig. 2 Selection of polymorphic SSR primers

按照条带清晰、多态性好等原则,从 55 对 SSR 引物中最终筛选得到 31 对引物(表 1)。由表 1 可

表 1 31 对多态性引物及所处的染色体位置

Tab. 1 Names and locations of 31 polymorphic primers

	甘蓝染色体 Chromosome								
	C01	C02	C03	C04	C05	C06	C07	C08	C09
引物	CB10258	Na14H11	CB10054	Na12G12a	CB10080	Na12A02a	Na12B11	FIT0298	CB10266
Primer	CB10374	OL09A06	FIT0348	CB10051		CB10343	Ni4B04	CB10139a	
	Ni4B10a	OL12B03	CB10253	OL10C01		OL10D03		OL12G04	
	CB10369	Ni2C12	CB10036a	OL12D02		OL10F09			
	Na12E01	Ni4D12	CB10427b						
	CB10517								

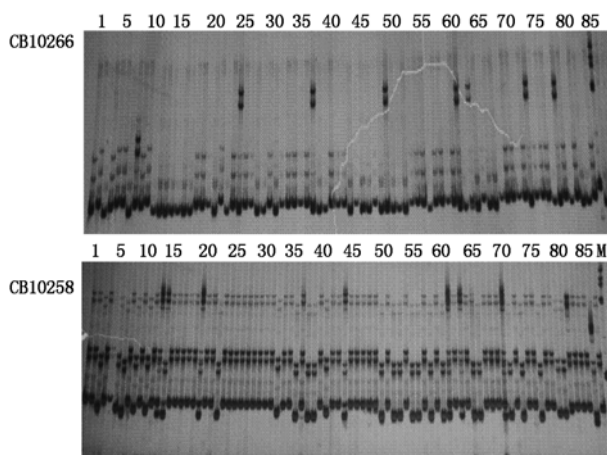


图3 CB10266 和 CB10258 电泳结果

Fig. 3 The electrophoresis results of  
CB10266 and CB10258 primers

表 2 CB10266 和 CB10258 电泳结果

Tab. 2 Electrophoresis results of CB10266 and CB10258

引物	多态性带型 Polymorphic bands				
Primer	1	2	3	4	5
CB10266	9	40	10	38	1
CB10258	9	8	59	22	0

## 2.4 98 份芥蓝自交系的聚类结果

从 31 对 SSR 引物中筛选出多态性好、在芥蓝染色体上均匀分布的 15 条 SSR 引物对 98 份芥蓝自交系进行分析,共获得 65 个多态性条带。应用 NTsys\_2.10 软件对 98 份芥蓝自交系统计结果的 0、1 矩阵进行分析,计算遗传距离,并获得聚类图(图 4)。

由图 4 可见,相似系数取 0.71,可将 98 份芥蓝

见,31 对引物分别分布在甘蓝的 9 条染色体上,每条染色体上的数量不同,如 C01 最多,有 6 对,C05 和 C09 最少,分别只有 1 对。

## 2.3 86 份自交系 PCR 扩增结果

以 31 对引物对其余 86 份芥蓝自交系进行 PCR 扩增和图谱分析。图 3 为 CB10266 和 CB10258 引物对 86 份芥蓝自交系的扩增结果。由图 3 可见,引物 CB10266 有 5 种多态性带型,引物 CB10258 有 4 种多态性带型,结果见表 2。

材料初步分为 5 组。

I 组 41 份材料,9-1③~9-44⑩,其中 6 份材料来源于日本,35 份材料为国内的资源。性状主要表现为:叶片较小,菜薹较细,抽薹较早。

II 组 6 份材料,9-11⑦~9-76⑩,其中 1 份材料来源于日本,5 份材料为国内的资源。性状主要表现为:叶片较小,菜薹较粗,菜薹上下细中间粗,呈橄榄球形。

III 组 45 份材料,9-6③~9-88⑩,其中 7 份材料来源于日本,1 份材料来自新加坡,37 份材料为国内的资源。性状主要表现为:长势较旺,叶片较大,菜薹上下等粗,呈簇形。

IV 组 5 份材料,9-2④~9-74②,其中 1 份材料来源于日本,4 份材料为国内的资源。性状主要表现为:生长势旺,叶片大,叶片皱,抽薹较晚。

V 组 1 份材料:9-55⑩,来源于日本。性状主要表现为:叶片中等大小,叶片颜色翠绿。

在芥蓝育种实践中,选择遗传距离较远、背景差异大的材料试配组合,可获得较优良的杂交后代。本研究结果可以有效地指导芥蓝育种工作,采用 I 或 II 组中的材料分别与 III 或 IV 或 V 组中的材料杂交,III 或 IV 组中的材料与 V 组中的材料杂交,杂种后代可能会存在明显的杂种优势。同时,本研究获得的分布于甘蓝 9 条染色体上的多态性 SSR 标记可为今后芥蓝资源遗传多样性、保护芥蓝资源等研究提供借鉴作用。

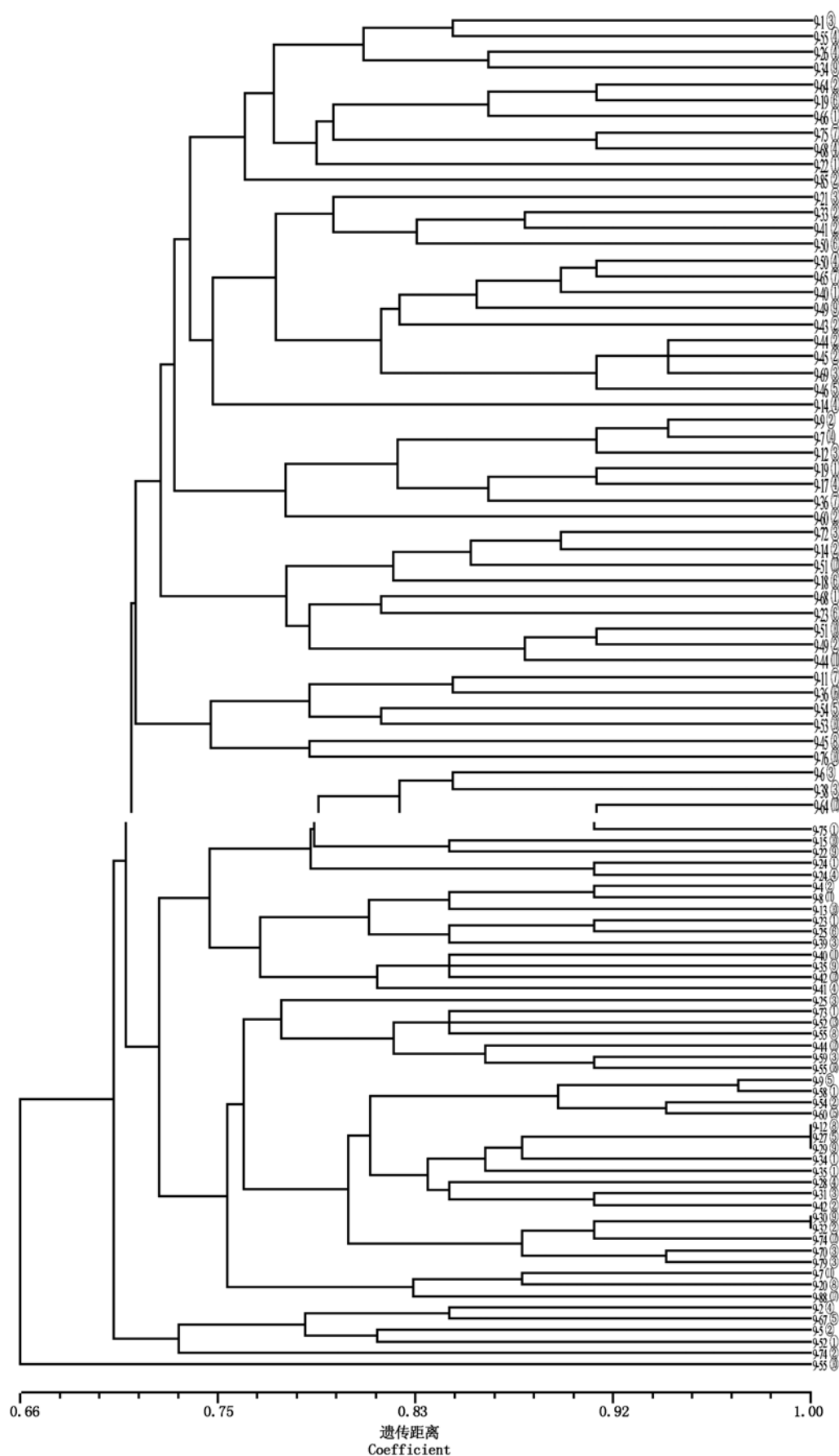


图 4 98 份芥蓝自交系的聚类图

Fig. 4 Cluster analysis of 98 Chinese kale inbred lines

### 3 讨论

#### 3.1 芥蓝 SSR 检测体系的建立与优化

3.1.1 PCR 扩增程序 退火温度直接影响 PCR 扩增的最终产物。最适退火温度的选择需要对每对 SSR 引物进行梯度筛选,但这势必影响试验进度,并且操作起来比较繁琐,因此,本试验采用了 Touchdown PCR 扩增程序,前 12 个循环的退火温度每循环依次下降,在兼顾大部分引物的退火温度前提下,使目标产物优势扩增,而这些目标产物在后 22 个循环中占有绝对优势,最大限度地避免了非特异性扩增产物的影响。在基本保证扩增结果准确的前提下,提高了试验效率,避免了筛选退火温度的繁琐工作。

3.1.2 凝胶检测方法 PCR 扩增产物的凝胶电泳、显色是影响试验结果的另一重要环节。PCR 扩增产物一般采用琼脂糖凝胶电泳与聚丙烯酰胺凝胶电泳 2 种方式进行检测。由于在琼脂糖凝胶电泳中使用 EB 或 Good View 显色,而 EB 具有强致癌性,危害性较大,且琼脂糖凝胶电泳本身分辨率不高;聚丙烯酰胺凝胶电泳方法既经济、简便、快速、灵敏,又具有分辨率高、结果可永久保存、污染相对较小等优点,适用于分子生物学中较高要求的试验。故本研究使用聚丙烯酰胺凝胶电泳,可以很清晰地区分不同带型,结果容易识别。本研究选用银染法中的强碱法,所得的凝胶质量比较好,分辨率高、背景低、条带更为清晰,且时间短、试剂消耗少,弃用了冰醋酸和无水乙醇,并降低了  $\text{AgNO}_3$  和甲醛的浓度,减少了成本,也减轻了对试验者健康的危害,明显优于传统的染色方法。

#### 3.2 聚类结果

本试验所得聚类结果达到了预期目标,可有效地指导今后的育种实践工作,为试配芥蓝新组合提供依据,既可以节省时间、减少工作量,又增强试配芥蓝组合的目的性和成功率。但由于本研究筛选到的多态性 SSR 标记不够多,导致聚类结果还不能十分准确地体现材料间的多样性,今后应加大引物筛

选工作,扩大每条染色体上的引物数量和标记种类,以获得更多的多态性标记,使结果更加准确地反映芥蓝自交系间的多态性。

目前,芥蓝分子生物学研究工作仍不够系统和完整,相信,随着更多芥蓝杂交种的涌现和人们对芥蓝品质的不断追求,应用分子生物学手段对芥蓝资源的遗传多样性等研究都将得到深入地开展,并推动芥蓝育种工作。

#### 参考文献:

- [1] Zhang Y, Kensler T W, Cho C G, *et al.* Anticarcinogenic activities of sulforaphane and structurally related synthetic norbornyl isothiocyanates [J]. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1994, 91 (8): 3147 - 3150.
- [2] 何洪巨, 陈 杭, Schnitzler W H. 中国十字花科蔬菜品种硫代葡萄糖苷组成与含量 [C] // 中国园艺学会第四届青年学术讨论会论文集, 2000: 294 - 299.
- [3] 田 源. 甘蓝类蔬菜遗传多样性及亲缘关系 RAPD、SSR 分析 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2007.
- [4] 周 禹. 芥蓝与甘蓝其他变种分类关系的研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2010.
- [5] 王冬梅, 陈 琛, 王庆彪, 等. 一个支持芥蓝起源于中国的分子证据 [J]. *中国蔬菜*, 2011 (16): 15 - 19.
- [6] 张 静, 张鲁刚. 芥蓝种质资源的多样性和聚类分析 [J]. *西北农业学报*, 2008, 17 (4): 285 - 289.
- [7] 陈文文, 刘厚诚, 陈日远, 等. 基于 RAPD 标记的芥蓝种质资源遗传多样性分析 [J]. *中国农学通报*, 2011, 27 (8): 150 - 155.
- [8] 张 静. 芥蓝种质资源多样性分析与品质评价 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2008.
- [9] 秦耀国, 杨翠芹, 曹必好, 等. 芥蓝遗传育种与生物技术研究进展 [J]. *中国农学通报*, 2009, 25 (18): 296 - 299.
- [10] Wang W, Huang S, Liu Y, *et al.* Construction and analysis of a high-density genetic linkage map in cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *capitata*) [J]. *BMC Genomics*, 2012, 13: 523.