

油莎豆 SRAP 指纹图谱构建及遗传多样性分析

赵永国, 郭瑞星, 罗丽霞

(中国农业科学院油料作物研究所, 农业部油料作物生物学与遗传育种重点实验室, 武汉 430062)

摘要: 利用 SRAP 分子标记构建了 14 份不同地理来源、表型具有差异的油莎豆品系的分子指纹图谱并进行遗传多样性分析。结果表明 100 对引物中共有多态性引物 42 对, 扩增出多态性带 328 条, 平均每对引物 7.8 条。28 对引物在 12 个品系上具有特征谱带, 除品系 4 和 14 外, 均可用 1 对引物进行鉴定; 采用引物组合法仅用 Me2/Em6 和 Me8/Em11 这 2 对引物就可将 14 份材料区分开, 并利用这 2 对引物构建了上述品系的数字指纹图谱。UPGMA 聚类分析表明, 所有参试材料间的遗传距离在 0.12~0.75 之间, 平均为 0.42, 表明我国不同地理来源的油莎豆品系遗传差异较大, 具有较为丰富的遗传多样性。

关键词: 油莎豆; SRAP 标记; 指纹图谱; 遗传多样性

Construction of DNA Fingerprinting and Analysis of Genetic Diversity with SRAP Markers for Tigernut (*Cyperus esculentus* L.)

ZHAO Yong-guo, GUO Rui-xing, LUO Li-xia

(Oil Crops Research Institute of Chinese Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Oil Crops, Ministry of Agriculture, Wuhan 430062)

Abstract: The fingerprinting and genetic diversity of 14 tigernut accessions collected from different geographical regions were investigated with SRAP molecular markers. The results showed there were 42 polymorphic primers among 100 primers, and 328 polymorphic bands were detected among the tested accessions, with an average of 7.8 bands per primer. Twelve accessions had unique bands by 28 primer pairs, which could be identified with one pair of specific primer expect No. 4 and No. 14. All 14 accessions could be distinguished by two primer combinations (Me2/Em6 and Me8/Em11) at least, and digital fingerprinting code was also established. Clustering with UPGMA method revealed that the genetic distance ranged from 0.12 to 0.75 with an average of 0.42, which indicated that there was abundant genetic diversity among all 14 accessions.

Key words: Tigernut; SRAP marker; fingerprinting; genetic diversity

我国食用油供需缺口很大, 每年从国外大量进口植物油及其原料^[1], 在保障粮食安全的前提下, 发掘适应性广、产油量高的新型油料作物具有重要意义。油莎豆 (*Tigernut*, *Cyperus esculentus* L.) 为莎草科一年生草本油料作物, 我国于 1960 年从非洲引进, 现在内蒙古、新疆、河南、江苏等 20 多个省区种植^[2]。油莎豆具有生育期短、产油量高、综合利用价值高及适应性广等优点, 已逐渐引起研究者尤其是公司等实体单位的关注, 是极具开发潜力的新型油料作物。目前, 油莎豆种子表型

主要分为大粒 (Large-oval)、圆粒 (Spherical) 和小粒 (Average-oval) 3 种形态^[3], 不同地理来源且形态相近的油莎豆种子仅靠表型难以准确鉴定, 而建立在分子水平上的指纹图谱技术可以弥补形态鉴定的局限, 分子标记技术因其快速、可靠等特点已经成为品种鉴定和遗传多样性分析的有效手段^[4]。目前, 我国油莎豆资源多从国外引进, 遗传基础不详, 本研究在前期建立的 SRAP 分子标记体系基础上, 选择不同地理来源的 14 份油莎豆品系进行指纹图谱和遗传多样性分析, 以期快速、准

确的进行油莎豆品系鉴定及遗传差异分析等提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

14 份油莎豆材料,分别收集于河南省(4 份)、河北省(3 份)、湖北省(1 份)、辽宁省(1 份)、浙江省(1 份)、江苏省(1 份)、内蒙古自治区(2 份)和新

疆维吾尔自治区(1 份)等 8 个主要种植区,具体来源、编号及块茎特征等见表 1。

1.2 DNA 提取与检测

将 14 份油莎豆催芽,出苗后 5 d 取叶片,用改良的 CTAB 法对油莎豆叶片进行 DNA 提取^[3]。用 BECKMAN DU650 紫外分光光度计测定 DNA 溶液浓度。1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量后,稀释到 25 ng/ μ L 备用。

表 1 14 份油莎豆的来源、编号及块茎特征

Table 1 Origin and tuber characteristics of 14 tigernut accessions

编号 Code	来源 Origin	块茎类型 Tuber type	块茎颜色 Color	编号 Code	来源 Origin	块茎类型 Tuber type	块茎颜色 Color
1	河南省	大粒型	褐色	8	内蒙古自治区	大粒型	褐色
2	河南省	圆型	黄色	9	辽宁省	大粒型	褐色
3	湖北省	圆型	褐色	10	浙江省	小粒型	褐色
4	河北省	大粒型	褐色	11	江苏省	小粒型	褐色
5	河南省	圆型	褐色	12	内蒙古自治区	小粒型	褐色
6	河北省	圆型	褐色	13	河南省	圆型	黄色
7	河北省	小粒型	褐色	14	新疆维吾尔自治区	圆型	黄色

1.3 SRAP-PCR 分析

根据 G. Li 等^[5]引物设计的原则,设计正向引物和反向引物各 10 条,具体见表 2,由上海生工合成。采用本课题组优化的油莎豆 SRAP-PCR 反应体系(15 μ L):DNA 模板 25 ng、Mg²⁺ 1.5 mmol/L、引物浓度 1 μ mol/L、dNTP 0.3 mmol/L 和 Taq 酶 1U。PCR 反应在 Bio-Rad 100 PCR 仪上进行。PCR 程序为:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 1 min,35 $^{\circ}$ C 1 min,72 $^{\circ}$ C 1.5 min,5 个循环;94 $^{\circ}$ C 1 min,50 $^{\circ}$ C 1 min,72 $^{\circ}$ C 1.5 min,35 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

表 2 SRAP 引物序列(5'至 3'方向)

Table 2 Sequences of SRAP primers(5'to3')

正向引物 Forward primers		反向引物 Reverse primers	
编号 Code	序列 Sequences	编号 Code	序列 Sequences
Me1	TGAGTCCAAACCGGATA	Em1	GACTGCGTACGAATTTGC
Me2	TGAGTCCAAACCGGAGC	Em2	GACTGCGTACGAATTGAC
Me3	TGAGTCCAAACCGGACC	Em3	GACTGCGTACGAATTTGA
Me4	TGAGTCCAAACCGGAAG	Em4	GACTGCGTACGAATTAAC
Me5	TGAGTCCAAACCGGTAG	Em5	GACTGCGTACGAATTGCA
Me6	TGAGTCCAAACCGGTTC	Em6	GACTGCGTACGAATTATG
Me7	TGAGTCCAAACCGGTGT	Em7	GACTGCGTACGAATTAGC
Me8	TGAGTCCAAACCGGTCA	Em8	GACTGCGTACGAATTAGC
Me9	TGAGTCCAAACCGGTAC	Em9	GACTGCGTACGAATTTAG
Me10	TGAGTCCAAACCGGTGC	Em10	GACTGCGTACGAATTTGC

PCR 产物在 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶上电泳,电泳缓冲液为 1 \times TBE。电泳时先 2000V 预电泳 30 min;PCR 产物加 10 μ L loading buffer 后沸水浴变性 5 min、于冰上冷却后上样,2000 V 电泳约 1.5 h,或二甲苯青电泳至玻板约 2/3 处停止电泳;再进行凝胶固定、银染、显影^[6-7]。

1.4 数据统计与分析

每个材料的 PCR 产物检测结果按扩增条带的有无分别记为 1 和 0。按 M. Nei 等^[8]的方法计算遗传相似系数(GS, genetic similarity)和遗传距离(GD, genetic distance): $GS = N_{ij}/(N_i + N_j)$, $GD = 1 - GS$ 。其中 N_i 和 N_j 分别为成对比较的两个材料的扩增条带数, N_{ij} 为这 2 个材料共有的条带数。利用 NTSYS pc 2.1 软件^[9]构建聚类图,聚类方法采用 UPGMA 算术平均数的非加权成组法。

2 结果与分析

2.1 SRAP 多态性分析

选择正向引物和反向引物各 10 条,通过互相配对获得 100 对 SRAP 引物组合,从中筛选出 42 对具有多态性的引物,占引物组合数的 42%。图 1 是引物组合 Me5/Em10 的 SRAP 扩增电泳图谱。42 对具有多态性的 SRAP 引物组合共检测到 405 条带,其中

多态性条带 328 条,多态性比率为 80.9%。每对引物组合产生 4~20 个多态性带,平均每对引物 7.8 条多态性条带,表明这 42 对引物在供试材料间存在较丰富的多态性,适合 DNA 分子指纹图谱的构建。

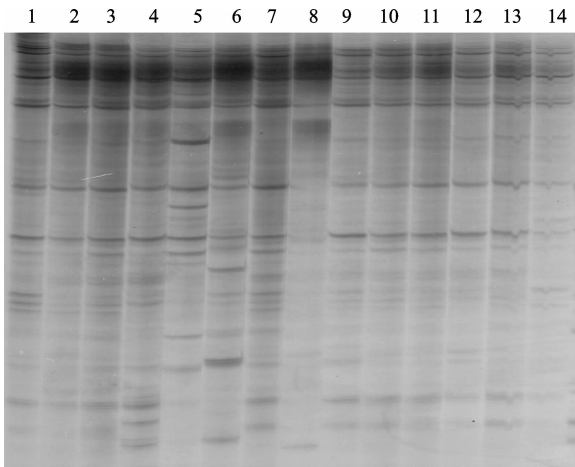


图 1 引物组合 Me5/Em10 的 SRAP 扩增电泳图谱

Fig. 1 Electrophoresis profile of SRAP products amplified with primers of Me5/Em10 for 14 selected tigernuts

2.2 指纹图谱分析

将 SRAP 多态性引物扩增结果输入 Excel 表格,PCR 扩增谱带转化成 0、1 数据进行分析。结果表明,14 个品系中有 12 个具有特征谱带,仅用 1 对特征引物就可与其他材料区分开。进一步利用引物组合法对供试材料进行鉴别,选择多态性丰富的引物进行组合,只需选择 Em2/Me6 和 Em8/Me11 这 2 对引物即可将所有 14 份油莎豆品系完全分开。为记录方便,按照潘兆娥等^[10]的方法,将这 2 对引物在 14 份材料间扩增得到的 0、1(二进制)数据转换成十进制数据,构建 SRAP 数字指纹图谱(表 3)。

表 3 14 份油莎豆品系的 SRAP 数字指纹图谱

Table 3 SRAP digital fingerprinting of 14 tigernuts

品系 Variety	Me2/Em6- Me8/Em11	品系 Variety	Me2/Em6- Me8/Em11
1	5210-51786	8	1048-16960
2	5726-51786	9	5210-35402
3	5722-35402	10	5758-35402
4	5720-51786	11	5726-125918
5	6616-49728	12	5726-16034
6	5464-49728	13	5722-59978
7	5208-51786	14	5722-51786

2.3 遗传多样性分析

参试材料间的遗传距离在 0.12~0.75 之间,平均为 0.42,其中,大粒型材料的遗传距离最大,平均为 0.49,其次为圆粒型和小粒型材料,遗传距离平

均分别为 0.35 和 0.28。各个材料间遗传距离结果表明,材料 8 与材料 9 的遗传距离最大,为 0.75,尽管二者均为大粒型材料,但其仍具有较高的遗传差异,预示着大粒型材料可能有着更为丰富的遗传变异;材料 2 与材料 3 均为圆粒型材料,其遗传距离最小,为 0.12。通过 UPGMA 分析方法,对所有参试材料进行聚类分析,构建遗传差异树状图。根据图 2 结果,可以在遗传相似系数 0.64 处将供试材料划分为 4 个类群,其中大部分材料归集于第 1 类群中(70.9%),来自于辽宁省的大粒型材料 9 和内蒙古自治区的大粒型材料 8 各自成为一类,圆粒材料 5 和 6 也成为单独的一个类群。总体而言,除了部分材料如小粒型材料 10、11 和 12 有成簇分布的现象外,其他不同收集来源、块茎表型不同的材料间均存在相互交错分布现象,无明显的规律性。此外,大粒型材料在聚类图上分布最广,表明其间遗传多样性最为广泛,与遗传距离的分析结果一致,也进一步验证了前期用 90 对引物进行分析所得到的结论^[11]。

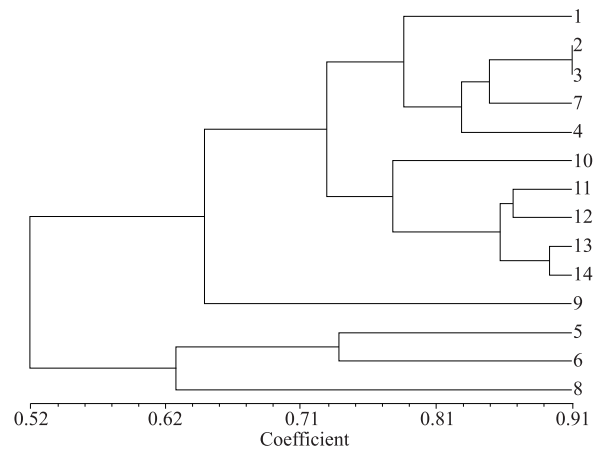


图 2 基于遗传相似系数的 UPGMA 聚类分析图

Fig. 2 UPGMA Dendrogram of 14 genotypes using SRAP markers based on the genetic similarity

3 讨论

分子标记技术已经广泛应用于作物品种的纯度鉴定与遗传多样性研究,SRAP 分子标记具有引物设计简单、产量中等及多态性好等优点,已在桃、西葫芦及油菜^[12-14]等多种作物中应用。本研究系统分析了 14 份不同地理来源的油莎豆品系的指纹图谱,除了品系 4 和 14 外,另外 12 个品系均具有特征谱带;利用引物组合法,只需要 2 对引物就可以将供试材料完全区分。因而,应用该技术可以对油莎豆品系的纯度和真实性进行快速、准确的鉴定。本研究构建的油莎豆 SRAP 指纹图谱,为油莎豆 DNA 指

纹数据库的建立奠定了基础。

利用分子标记技术对油莎豆进行多样性研究,迄今仅有少许报道。M. J. Horak 等^[15-16]采用同工酶方法研究了来自美国加利福尼亚、佛罗里达州等不同地区的油莎豆资源,认为油莎豆遗传基础狭窄。但随后 C. A. N. Okoli 等^[17]用 RAPD 分子标记技术的研究结果则表明油莎豆变异丰富,具有广泛的遗传多样性,认为这可能是由于油莎豆进行有性杂交所引起的,R. I. Tayyar 等^[18]也认为油莎豆具有较大的遗传差异。本研究供试材料间的遗传距离平均为 0.42,高于 Tayyar 等的研究结果,表明我国油莎豆种质资源具有较为丰富的遗传多样性。本文在前期研究基础上^[11],通过增加引物对数进一步研究了油莎豆遗传差异,并初步构建了数字指纹图谱,结果与前期研究的结论一致,即大粒型材料间的遗传差异最大,参试材料在聚类图谱上互相交错分布,无明显的地理规律性,表明供试材料的遗传差异与表型块茎类型及省区间分布没有明显的关系。因此,为进一步提高我国油莎豆的遗传多样性,应继续引进或创造新的种质材料,加快其种质创新与利用进程,同时加强育种单位之间的合作与交流,进一步丰富我国油莎豆种质资源的多样性。

参考文献

- [1] 王汉中. 我国食用油供给安全形势分析与对策建议[J]. 中国油料作物学报, 2007, 29(3): 347-349
- [2] 钱学射, 张卫明, 顾龚平, 等. 燃料油植物油莎豆的综合利用与栽培[J]. 中国野生植物资源, 2008, 27(3): 7-11
- [3] 赵永国, 金梦阳, 危文亮. 新型植物油莎豆 DNA 提取与 SRAP 体系优化[J]. 中国油料作物学报, 2011, 33(1): 39-43
- [4] 马二磊, 王燕, 刘莉, 等. 松花型花椰菜主要品种鉴定的分子
- 标记分析[J]. 植物遗传资源学报, 2010, 11(5): 621-624
- [5] 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
- [6] 林忠旭, 张献龙, 聂以春. 新型标记 SRAP 在棉花 F₂ 分离群体及遗传多样性评价中的适用性分析[J]. 遗传学报, 2004, 31(6): 622-626
- [7] 陆光远, 杨光圣, 傅廷栋. 应用于油菜研究的简便银染 AFLP 标记技术的构建[J]. 华中农业大学学报, 2001, 20(4): 413-415
- [8] Nei M, Li W. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1979, 76: 5269-5273
- [9] Rohlf F J. NTSYS-pc numerical taxonomy and multivariate analysis system [M]. Exeter Software, New York, USA: Exeter Software, 2001
- [10] 潘兆娥, 王希文, 孙君灵, 等. 中棉所 48 的 SSR 数字指纹图谱的构建[J]. 中国农学通报, 2010, 26(7): 31-35
- [11] 赵永国, 危文亮. 利用 SRAP 标记分析新型油料作物油莎豆遗传多样性[J]. 中国油料作物学报, 2011, 33(4): 351-355
- [12] Ahmad R, Potter D, Southwick S M. Genotyping of peach and nectarine cultivars with SSR and SRAP molecular marker[J]. J Am Soci Hort Sci, 2004, 129(2): 204-210
- [13] Ferriol M, Picó B, Nuez F. Genetic diversity of a germplasm collection of cucurbita pepo using SRAP and AFLP markers[J]. Theor Appl Genet, 2003, 107: 271-282
- [14] 李媛媛, 沈金雄, 王同华, 等. 利用 SRAP、SSR 和 AFLP 标记构建甘蓝型油菜遗传连锁图谱[J]. 中国农业科学, 2007, 40(6): 1118-1126
- [15] Horak M J, Holt J S. Isozyme variability and breeding systems in populations of yellow nutsedge (*Cyperus esculentus*) [J]. Weed Sci, 1986, 34: 538-543
- [16] Horak M J, Holt J S, Ellstrand N C. Genetic variation in yellow nutsedge[J]. Weed Sci, 1987, 35: 506-512
- [17] Okoli C A N, Shilling D G, Smith R L, et al. Genetic diversity in purple nutsedge (*Cyperus rotundus* L.) and yellow nutsedge (*Cyperus esculentus* L.) [J]. Biol Contr, 1997, 8: 111-118
- [18] Tayyar R I, Holt J S. Genetic and morphological analysis of two novel nutsedge biotypes from California[J]. Weed Sci, 2003, 51: 731-739