

基于 SSR 的藕莲新品种(系)指纹图谱构建

孙亚林, 朱红莲, 刘正位, 匡 晶, 柯卫东* (武汉市农业科学院蔬菜研究所, 湖北武汉 430207)

摘要 [目的]利用 SSR 分子标记构建藕莲品种(系)鉴定的 DNA 指纹图谱,为藕莲品种鉴定和新品种选育提供技术支持。[方法]利用 SSR 标记对 9 个莲藕新品种(系)进行鉴定,统计条带并进行遗传多样性分析,选择核心引物,建立 DNA 指纹图谱。[结果]从 45 对引物中筛选到 9 对多态性引物,对 9 个品种(系)扩增得到条带,共扩增出 52 条带,其中差异条带 32 条,多态性比率为 61.54%,扩增片段大小为 100~400 bp。选出 4 对 SSR 核心引物构建 9 个藕莲品种(系)的 DNA 指纹图谱。[结论]藕莲品种遗传多样性水平较低,4 对引物组合所构建的 DNA 指纹图谱可用于藕莲品种鉴定。

关键词 藕莲;遗传多样性;指纹图谱;SSR 标记

中图分类号 S645.1 **文献标识码** A

文章编号 0517-6611(2020)04-0096-04

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2020.04.028

开放科学(资源服务)标识码(OSID): 

Construction of Fingerprint Map for Root Lotus Varieties(Lines) by SSR
SUN Ya-lin, ZHU Hong-lian, LIU Zheng-wei et al (Institute of Vegetable, Wuhan Academy of Agricultural Sciences, Wuhan, Hubei 430207)

Abstract [Objective] With the aim to identify root lotus varieties, SSR molecular markers were used to get its DNA fingerprint map. [Method] SSR primers were screened out, the PCR and polyacrylamide gel electrophoresis were carried out for the 9 root lotus varieties, genetic diversity analysis were performed, and the core primers were selected to set up an identified fingerprint system. [Result] 9 pairs of primer with clear band and high polymorphism were selected from 45 pairs of primer. A total of 52 bands were amplified from root lotus varieties, 32 bands among them were polymorphic, the percentage of polymorphism band (PPB) was 61.54%. Four core primers were selected out to set up fingerprint of 9 root lotus varieties. [Conclusion] The genetic diversity of root lotus varieties was low, DNA fingerprint map constructed by 4 pairs of primer combinations can be used in the identification of root lotus varieties.

Key words Root lotus; Genetic diversity; Fingerprint map; SSR markers

莲(*Nelumbo nucifera* Gaertn.)为莲科莲属多年生大型水生草本植物,根据莲的用途,可将莲分为 3 个类型,即藕莲、子莲、花莲,以采收肥大的地下根状茎为目的的称为藕莲,藕莲在我国栽培面积最大,是我国特色的水生经济作物。随着藕莲新品种的日益增多,加强品种识别与鉴定,确保品种的真实性和纯度,优化种植区域品种合理布局,提高生产效率具有重要意义。在生产过程中,品种鉴别主要靠植株高矮、花期、花色、藕的熟性、节间形状等来判断^[1],由于受到不同产区气候、土壤、光照等影响,因此鉴定起来比较困难。品种鉴定不详不利于莲藕新品种的推广,阻碍了莲产业的健康发展。

SSR 是一种基于 PCR 的分子标记,具有操作简单、丰富多态性、重演性高且呈共显性遗传而被广泛用于遗传图谱构建、遗传多样性分析与种质鉴定等方面^[2]。该研究拟通过对我国主要推广的藕莲品种(系)进行鉴定,构建藕莲品种(系)的指纹图谱,为藕莲种苗认证和 DUS 测试过程中近似品种的鉴定提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料 试验所有材料为我国主要推广的 9 个藕莲新品种(系):鄂莲 5 号、鄂莲 6 号、鄂莲 7 号、鄂莲 8 号、鄂莲 9 号、鄂莲 10 号、新 5 号、544 莲、小白胖,均来自国家种质武汉水生蔬菜资源圃,品种(系)详细信息见表 1。

表 1 供试藕莲品种(系)信息
Table 1 Information of root lotus varieties (lines)

序号 No.	品种 (系) Variety (line)	选育年份 Breeding year	熟性 Maturity	株高 Height cm	主藕节数 Node number of leader rhizome 节	主藕长 Length of leader rhizome cm	主藕粗 Diameter of leader rhizome cm	整藕质量 Weight of whole rhizome kg	主藕节间形状 Internode shape of leader rhizome	表皮 颜色 Epidermis color	食用 Edible perfor- mance
1	鄂莲 5 号	2003	早中熟	160~180	5~6	80~100	7.0~8.0	3.0~4.0	筒形	黄白色	炒食、煨汤
2	鄂莲 6 号	2008	早中熟	160~180	6~7	90~110	8.0	3.5~4.0	筒形	白色	凉拌、炒食
3	鄂莲 7 号	2009	早熟	110~130	6~7	70~80	8.0	2.5	短圆筒形	黄白色	凉拌、炒食
4	鄂莲 8 号	2012	晚熟	180~200	5~6	90~100	8.0~8.5	3.0~4.0	筒形	白色	煨汤
5	鄂莲 9 号	2015	早中熟	160~170	5~7	90~110	8.5	4.5~5.0	筒形	黄白色	凉拌、炒食、煨汤
6	鄂莲 10 号	2016	早熟	110~130	6~7	70~80	8.0	2.5	短圆筒形	黄白色	凉拌、炒食
7	新 5 号	2017	中晚熟	160~180	5~7	80~100	8.0	3.0~4.0	筒形	黄白色	炒食、煨汤
8	544 莲	2018	早中熟	160~170	5~7	90~110	8.5	4.5~5.0	筒形	黄白色	炒食、煨汤
9	小白胖	2018	早熟	120~140	5~6	70~80	8.0	2.5	筒形	白色	凉拌、炒食

基金项目 国家特色蔬菜产业技术体系(CARS-24-A-02, CARS-24-A-12)。

作者简介 孙亚林(1983—),男,湖北石首人,高级农艺师,硕士,从事水生蔬菜种质资源与育种研究。*通信作者,研究员,从事水生蔬菜种质资源与育种研究。

收稿日期 2019-07-18

1.2 基因组 DNA 提取 各材料分别取幼叶 1 g,采用 CTAB 法提取各材料的 DNA,利用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测所提取 DNA 质量,并用分光光度计检测 DNA 的浓度和纯度, -20℃ 低温下保存待用。

1.3 PCR 扩增与电泳检测 采用公开发表的 45 对 SSR 引物^[3-6],引物由上海生工合成(表 2),PCR 反应体系:2×*Taq* mixture 5 μL,DNA 模板 1 μL,引物(上下游)1 μL,ddH₂O 3 μL,共 10 μL。PCR 扩增程序为 94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 变性 30 s,56 ℃ 退火 40 s,72 ℃ 延伸 40 s,35 个循环;72 ℃ 延伸 5 min,4 ℃ 保存。PCR 产物用 6%变性 PAGE 检测,0.5×TBE 电泳缓冲液,恒功率 60 W,电泳 1.5 h,电泳完毕采用银染显色,观察并照相记录。

表 2 供试引物序列
Table 2 The primer sequence used in this study

引物 Primer	上游引物(5'—3') Forward primer	下游引物(5'—3') Reverse primer
NnSSR01	CACCGAATCGCTTTCTCTC	GGTAAGTGGCCCAATGTTA
NnSSR04	TCTGCGGAATCTTCCAGTT	GATCAGTCTCCATCGGAAGC
NnSSR05	GGCCATAGGGATTTCAAACT	GTACTCCTTTGCTGCATTCC
NnSSR06	CCAAACCTTCCAACAGATTG	GGAAGTGGATTTAGCAAGCA
NnSSR07	GGCCACCTATACCATGAAAA	TGTTGTGCCTTATGGACTTG
NnSSR08	AGATCGAGAAATGAGGGAAG	AGAAGAGGAGGAAGAGAGCA
NnSSR09	CCCACCTACTCCATTTTGAC	TTTGTGCTCAGTTTGAGTCC
NnSSR10	CACATATCCTCTGCGGACTT	AATTGGAGAAAAGAGGCGAGT
NnSSR11	GCAATGGCTGTCTATGTCCA	TACTTGCAGTTGCAGCCAAG
NnSSR12	CCCCTGCAAGCATCAAATAA	GCTGCAAGTGTCAAAACAAA
NnSSR13	CTCTGCCGACTTGACAAACT	GGGTTTTTGCAGGCATTAGAT
NnSSR15	CTGGAATCTGGATTATGCTC	TCCAGTGAACAGTCTTTTGC
NnSSR16	AAGTACAGTGGGTGCTGGAC	AGGTCAATCAACTGCCACAG
NnSSR18	CCCGAGGCTGAGATAACACT	CCTAAGGGCTAGGCCACTAC
NnSSR20	GGAAATCGATGCTGGAGATG	TCCAACACCGAACTATCCAA
Nelumbo-06	GCATTCCCTTTATCCCACTC	GGAGCCCATTGTCACCTACG
Nelumbo-13	CGGCTAGAAACCCTAGATTTCTATA	ACACTCTTCAGTTCAGTCTTCACCT
Nelumbo-15	TCCTTGGGGGTTGAGACTTAGA	CAAGCAATGAACACGAGGAAAC
Nelumbo-17	GTGGCAAATCCTTAAAGCTA	TCTGTTTTAGAAGCAATGTG
Nelumbo-18	TTGGGGATTTCCTAACTGGT	TCATTGTCTCAAACTGGC
Nelumbo-24	ACTTCTTCAGCTCCACTGTCC	GTAGTGCTAGCAAGAGGACGC
Nelumbo-27	TAAGCTAAGATAGGAATCCAAC TAG	AAAAGGATAGGAGATTAGTAGGTGA
Nelumbo-32	ATAATGGATTTTGGAGGTCTTG	CTCTTCTTCATTCTTTGGTIT
Nelumbo-34	TGGTTGGCACTGTAATCTTC	CTGTTTCGACTCTAGGCTTC
Nsh02	GGTATCATTTGGTTGCAGCAAT	GGGTATAAACGGAAGGCCTCT
NS005	AACTGCTATGGCCACAATTAG	AATCTATTTATACAAGCATAATGGGTT
NS010	TTGTAACCGCCGGAGACAAA	CTCTATATCTCAGTCTCCGGCA
NS012	GAGCTATTCGTCATTTCAGAGAG	AAGTCCTCTCCGCTGTAAT
NS020	GCTGTGAAGAGGAAGGTGTTG	ACAGATTGAACCACTCCAACAG
NS034	AAAGCCAAGACATCCTCGAG	CGATTCCGACCTGATCGTGT
NS037b	GTCGCTCAAGATTGAACATACACT	CTTGCCATGTAAGCAATTTAGTCC
NS049	GTAGCAGTTGTGGTTTCAGTAAC	ACACAGTTCATCAGTATTCTTCGTA
NS050	CTGCCCTCCTGAAATAGATGAAA	GGCGGTGAATCATTTAGCAGAA
NS186	CTGCTACTCTTTCCAAACTGAG	GTGAAGAGACAATGGCCTAC
NS207	ACATATAGGCTAGTAGAGGTTCA	ATGAAAATATCCTGTTTCTACCC
NS260	AGGCATGTTTAATGTAGCATCAAAT	TTATTGTGGCAAGATCATTCCTC
NS262	AGCCCCGTGTTTTTGTCTCATA	AAACTATAACAGGGGCTTCAAC
NS264	GCCTAGATATGGTTAAGACTTAAGA	GTATCTACCTAGATACTATGAAATGG
NS292	GTACTATTAAGGAATTGTGCAATG	AACTCTATAGCCAAAGGAATAGAAA
NS294	CCACAAC TACAATTTCAAAG AATATAC	TCAATTTTTTGCTTTTCGACCACCA
NS295	CTGATTTC TGAGAACCTTGTTG	AAGTAGGTGGTAAGACTGTTT
PR02	CGGATTTGTATCCCACTACTGC	AGCAGTCATGTCCTTGAGGT
PR05	GTTACAGGAAAAATCCGTTCC	GAGCATCAATTGAGCATTTT
PR09	CTTAGATCCGAGACCAGTGA	CTGGTGCTTCACTCAACAATG
PR11	CCTTCCCGGAAACAGATGTA	ACCACCGAACCCCTCTTT

1.4 数据分析 只统计清晰、再现性强的条带。扩增产物按同一位点条带有或无分别赋值,有带记为 1,无带记为 0;统计扩增产物的总条带数和多态性条带数,计算多态性条带比率(PPB)和多态性信息量(PIC), $PIC=1-\sum f_i^2$,其中 f_i 为*i*位点的等位基因频率^[7],采用 NTSYS-pc version 2.10 软件计算 Jaccard 相似指数,按照 UPGMA 法进行聚类。统计各引物的多态性位点比例;选择多态性最高的引物组合构建藕莲品种的 DNA 指纹图谱。

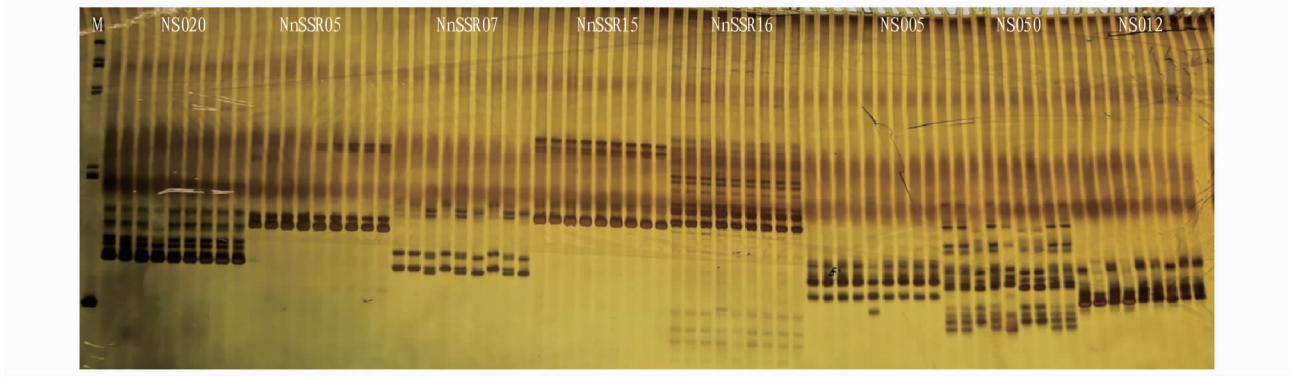
2 结果与分析

2.1 品种遗传多样性分析 从 45 对 SSR 引物中,筛选到 9 对多态性好、带型清晰的引物用于藕莲品种鉴定。9 对引物共扩增出 52 条带,其中差异条带 32 条,多态性比率为 61.54%,扩增片段大小为 100~400 bp。平均每个引物组合扩增的多态性条带 3.56 条,最多的为 10 条。多态性信息量

(PIC)变化幅度较大,最低 0.198,NnSSR07 引物的 PIC 最高, 果见图 1。
为 0.642(表 3)。部分引物在 9 个藕莲品种(系)中的扩增结

表 3 9 对多态性 SSR 引物的扩增信息
Table 3 Information of amplified products by 9 SSR primers

引物 Primer	条带数 Number of bands	多态性位点数 Number of poly- morphic bands	多态性基因比率 The percentage of polymorphic loci//%	多态性信息量(PIC) Polymorphism information content
NnSSR07	7	7	100.00	0.642
NS050	11	10	90.91	0.617
NS012	4	2	50.00	0.593
Nelumbo-13	8	6	75.00	0.494
NnSSR01	3	1	33.33	0.198
NnSSR05	5	3	60.00	0.593
NS005	4	1	25.00	0.198
NS020	6	1	16.67	0.198
Nelumbo-18	4	1	25.00	0.494
合计 Total	52	32		



注:M;DL2000 Marker

图 1 部分引物扩增结果
Fig.1 Partial primer amplification result

2.2 品种聚类分析 根据 9 对引物组合的扩增结果对 9 个藕莲品种(系)进行聚类分析(图 2),Jaccard 相似系数为 0.573~0.972,平均相似系数为 0.768。利用非加权组平均法(UPGMA)对供试材料进行聚类分析,在相似系数 0.580 处可以将藕莲品种(系)分为 2 个类群,第一类群为 544 莲和小白

胖莲。第二类群为鄂莲 5 号、6 号、7 号、8 号、9 号、10 号和新 5 号,在相似系数为 0.620 处可以将其分为 2 个亚组,第一亚组为鄂莲 5 号、6 号、8 号;第二亚组为鄂莲 7 号、9 号、10 号和新 5 号。

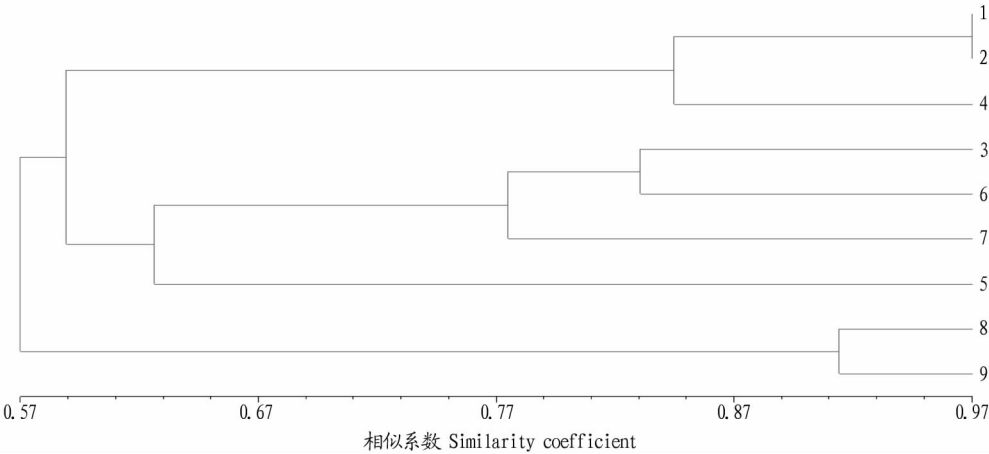


图 2 9 个藕莲品种(系)的 UPGMA 聚类树
Fig.2 UPGMA clustering tree of genetic diversity of 9 root lotus varieties (lines)

聚类分析结果表明选用的 9 对引物能较好地反映 9 份藕莲品种(系)的亲缘关系,在相似系数 0.580 附近将 9 份藕

莲品种(系)分成 2 个类群,遗传多样性相对较低,品种之间的亲缘关系与亲本来源有关,部分品种亲缘关系较为接近,说明部分品种的亲本来源较为狭窄。

2.3 指纹图谱构建 根据每个品种(系)DNA 扩增图谱中 SSR 标记的特异性条带的有无,由 1 和 0 形成的有序数字串构成某个品种(系)的特征指纹图谱。表 4 列出了 9 份藕莲品种(系)的指纹图谱。从扩增出的 32 条特征条带中选择了 25 条谱带将供试 9 份藕莲品种(系)完全区分开,这 25 条带是 NnSSR07、NS050、NS012、Nelumbo-13 这 4 对引物扩增得到的。

表 4 9 个藕莲品种(系)特征指纹图谱

Table 4 Fingerprint of 9 root lotus varieties (lines)

序号 No.	品种(系) Variety (line)	数字指纹图谱 Numbered fingerprints
1	鄂莲 5 号	10010101011101111101101101
2	鄂莲 6 号	10010101011101111101101100
3	鄂莲 7 号	011111101110111101010110111
4	鄂莲 8 号	10010101011101111001001100
5	鄂莲 9 号	01111111010100111010101111
6	鄂莲 10 号	010010101010111101010110111
7	新 5 号	100101001010111101010110101
8	544 莲	011111110111011111010010111
9	小白胖	01001011011101111010010111

3 小结与讨论

3.1 主要莲藕品种的代表性 藕莲在我国栽培历史悠久,我国是藕莲的主要生产国和消费国。截至 2016 年,我国莲栽培面积为 40 万 hm²,产量为 1 210.4 万 t^[8],藕莲是我国特色水生蔬菜,在蔬菜周年供应中占据重要地位。我国藕莲品种选育开始于 20 世纪 80 年代,经过 30 多年的发展,新品种选育取得显著成绩,截至 2018 年,我国选育藕莲新品种达 14 个,目前市场上推广的藕莲品种绝大部分为鄂莲系列,与传统品种相比,新品种产量提高了 30%~50%,极大地促进了我国莲产业的发展^[9]。

该试验中所选用的 9 个藕莲品种(系)均为武汉市农业科学院蔬菜研究所选育,这些品种中栽培面积最大的是鄂莲 5 号,产量最高的品种是鄂莲 9 号,熟性最早的是鄂莲 10 号,该试验所选的 9 个品种(系)涵盖了不同节型(长节、中节、短节)、不同熟性(早、中、晚熟)及不同熟食口感(脆、中、粉),这些品种在我国不同产区均有种植,具有广泛的代表性。

3.2 SSR 标记在品种鉴定中的应用 SSR 也称微卫星序列,因其具有等位变异高、共显性遗传、稳定性好、操作简便快速等优点,成为目前植物分子指纹图谱研究中应用最多的遗传标记,已经成功运用于棉花^[10]、玉米^[11]、烟草^[12]、梨^[13]、甘

薯^[14]等植物的指纹图谱构建。在莲研究领域,SSR 技术已运用于遗传多样性分析和指纹图谱构建,薛建华等^[15]利用 17 对 SSR 引物作为 72 个花莲品种的 DNA 指纹鉴定条码,结果表明最少 8 对引物组合可完全区分开 68 个品种,有 4 个品种组内全部 17 对引物均不能区分。2008 年,全志武等^[16]利用 SSR 引物对 10 个藕莲品种进行了图谱构建,用 4 对 SSR 引物可以区分 10 个藕莲品种。为满足生产与社会多元化的需求,一批优质高产的藕莲新品种被选育并推广,也有一批老品种被淘汰,原有 SSR 指纹图谱已无法对现有品种进行有效鉴定。不同引物的有限组合可以大大提高引物的鉴别能力,该研究利用筛选出 9 对 SSR 引物组合对 9 个藕莲品种(系)进行了遗传多样性分析,并构建了品种的指纹图谱。随着品种数量的进一步增加,这些引物组合的鉴别能力可能会逐渐降低,因此需要筛选更多的多态性好的引物对,用于不断选育出的藕莲新品种的 SSR 指纹库的构建。

参考文献

[1] 王其超,张行言.中国荷花品种图志[M].北京:中国林业出版社,2005.

[2] 郭瑞星,刘小红,蔡延昭,等.植物 SSR 标记的发展及其在遗传育种中的应用[J].玉米科学,2005,13(2):8-11.

[3] HU J H,PAN L,LIU H G,et al.Comparative analysis of genetic diversity in sacred lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) using AFLP and SSR markers[J].Molecular biology reports,2012,39(4):3637-3647.

[4] TIAN H L,CHEN X Q,WANG J X,et al.Development and characterization of microsatellite loci for lotus (*Nelumbo nucifera*) [J].Conservation genetics,2008,9(5):1385-1388.

[5] KUBO N,HIRAI M,KANEKO A,et al.Development and characterization of simple sequence repeat (SSR) markers in the water lotus (*Nelumbo nucifera*) [J].Aquatic botany,2009,90(2):191-194.

[6] PAN L,QUAN Z W,LI S M,et al.Isolation and characterization of microsatellite markers in the sacred lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) [J].Molecular ecology notes,2007,7(6):1054-1056.

[7] NEI M.Analysis of gene diversity in subdivided populations[J].Proceedings of the national academy of sciences,1973,70(12):3321-3323.

[8] 吴曼,宗义湘,赵帮宏,等.中国水生蔬菜产业发展现状、存在问题及发展思路[J].长江蔬菜,2019(2):35-41.

[9] 柯卫东,黄新芳,李建洪,等.我国水生蔬菜科研与生产发展概况[J].长江蔬菜,2015(14):33-37.

[10] 匡猛,杨伟华,许红霞,等.中国棉花主栽品种 DNA 指纹图谱构建及 SSR 标记遗传多样性分析[J].中国农业科学,2011,44(1):20-27.

[11] 张瑞平,周联东,王文洁,等.玉米杂交种新科 891 及其亲本 SSR 指纹图谱的构建[J].中国种业,2019(5):74-76.

[12] 张铭真,邢雪霞,李晓辉,等.烟草种质资源遗传多样性与群体结构分析[J].中国烟草科学,2016,37(4):42-47.

[13] 薛华柏,赵瑞娟,王磊,等.梨品种 SSR 特征指纹图谱与分子身份证构建[J].中国南方果树,2018,47(S1):42-49,97.

[14] 高闰飞,苏在兴,后猛,等.73 份紫心甘薯品种 SSR 标记指纹图谱构建[J].江苏师范大学学报(自然科学版),2019,37(1):15-19.

[15] 薛建华,姜莉,马晓林,等.莲品种 DNA 指纹图谱的构建[J].生物多样性,2016,24(1):3-11.

[16] 全志武,王静,潘磊,等.10 个藕莲品种 SSR 指纹图谱的构建与品种鉴别[J].中国蔬菜,2008(3):15-17.