

不同类型芥菜变种遗传差异的 SSR 分子标记检测

陈发波,方平*,姚启伦,李先艳,陈小红
(长江师范学院 生命科学与技术学院,重庆 涪陵 408100)

摘要: 为了解不同类型芥菜变种间的遗传多样性,利用 66 对 SSR 引物对 16 份芥菜变种进行检测。结果表明,共扩出 602 个条带,多态性条带占 92.5%,多态信息量(PIC)变幅为 0.56~0.97,平均值为 0.91。遗传相似系数为 0.41~0.75,平均值为 0.60,当相似系数为 0.61 时,可将供试材料分成 4 类。薹芥和抱子芥均单独为一类,第 3 类包括笋子芥、小叶芥和叶瘤芥,第 4 类包括白花芥、宽柄芥、长柄芥、大叶芥、凤尾芥、分蘖芥、卷心芥、茎瘤芥、花叶芥、结球芥和大头芥。表明 16 个芥菜变种间存在一定的遗传多样性。通过主成分分析也将供试材料分成 4 大类群,2 种聚类分析结果基本一致,都说明来自相同省份的绝大部分材料聚在一起,呈现出一定的地域性分布规律,但聚类结果与芥菜形态没有必然联系。

关键词: 芥菜; 遗传多样性; SSR 分子标记; 聚类分析; 主成分分析

中图分类号: S637 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2014)11-0097-07

Study on Genetic Diversity of Different Mustard Varieties(*Brassica juncea*) Using SSR Markers

CHEN Fa-bo, FANG Ping*, YAO Qi-lun, LI Xian-yan, CHEN Xiao-hong
(Department of Life Sciences, Yangtze Normal University, Fuling 408100, China)

Abstract: In order to understand the genetic diversity of different mustard varieties, the genetic diversity of 16 mustard varieties was studied using 66 pairs of SSR markers in *Brassica*. The results showed that a total of 602 alleles were detected, with 92.5% polymorphism; the polymorphism information content (PIC) of SSR marker varied from 0.56 to 0.97 with an average of 0.91; the genetic similarity coefficient ranged from 0.41 to 0.75 with an average of 0.60, when the genetic similarity coefficient was 0.61, the 16 mustard varieties were divided into four clusters. *B. juncea* var. *utilis* Li and *B. juncea* var. *gemmifera* Lee et Li belonged to cluster 1 and cluster 2, respectively. *B. juncea* var. *carassicaulis* Chen et Yang, *B. juncea* var. *foliosa* Bailey, and *B. juncea* var. *strumata* Tsen et Lee belonged to cluster 3. While *B. juncea* var. *leucanthus* Chen et Yang, *B. juncea* var. *latipa* Li, *B. juncea* var. *longepetiolata* Yang et Chen, *B. juncea* var. *rugosa* Bailey, *B. juncea* var. *linearifolia* Sun, *B. juncea* var. *multiceps* Tsen et Lee, *B. juncea* var. *involuta* Yang et Chen, *B. juncea* var. *tumida* Tsen et Lee, *B. juncea* var. *multisecta* Bailey, *B. juncea* var. *capitata* Hort, and *B. juncea* var. *megarrhiza* Tsen et Lee belonged to cluster 4. The results indicated that extensive genetic diversity existed among the 16 mustard varieties. Clustering analysis and principal component analysis both separated the 16 mustard varieties into four clusters, which was not fully in agreement with the taxonomic classification based on different edible organs of vegetable mustards, showing that the mustard varieties with the same source tended to be

收稿日期:2014-05-20

基金项目:教育部春晖计划项目(Z2011143);重庆市教委科技计划项目(KJ121304);重庆市涪陵区科委计划项目(FLKJ, 2012ABB1085)

作者简介:陈发波(1981-),男,四川冕宁人,副教授,博士,主要从事作物遗传育种研究。E-mail:chenfabo963@126.com

*通讯作者:方平(1965-),男,重庆石柱人,副教授,本科,主要从事作物遗传育种研究。E-mail:chenfabo963@aliyun.com

clustered into one subgroup, presenting a certain regional distribution rules, but there was no relationship between the clustering results and the mustard morphology.

Key words: mustard; genetic diversity; SSR marker; clustering analysis; principal component analysis

芥菜 (*Brassica juncea*) 是十字花科芸薹属植物, $2n=AABB=36$ 。中国是芥菜类蔬菜种质资源最丰富的国家, 拥有 1 000 多份各具特色的芥菜品种^[1]。芥菜在我国各省均有栽培, 特别是南方, 芥菜成为当地的特色资源和支柱型产业, 对增加当地农民的经济收入有着重大的作用。目前, 在芥菜的起源进化、分类、核型特征、生理特性和遗传多样性等方面已有一些研究报道。周源等^[2]对不同类型芥菜的同工酶进行分析, 认为芥菜可能起源于中国西北地区, 并认为芥菜是黑芥和白菜的后代。陈材林等^[3]对芥菜的分布及变异的调查结果表明, 芥菜起源地是中国西北地区, 中国是芥菜的原生起源中心或起源中心之一。孟秋峰等^[4]将 17 个芥菜变种划分为叶用芥菜、茎用芥菜、根用芥菜、薹用芥菜和籽用芥菜 5 个类群。童南奎^[5]和孟秋峰等^[6]还对芥菜进行了花粉核型研究, 结果发现不同变种的染色体数目稳定一致, 但是花粉形状随品种不同而异。寇士伟等^[7]和郭零等^[8]探讨了重金属离子对芥菜生长的影响。陈学群等^[9]和童南奎等^[10]比较了芥菜酯

酶同工酶的差异。任锡亮等^[11]、宋学林等^[12]、孟秋峰等^[13]还从遗传育种方面进行了研究, 认为芥菜主要育种目标是抗病虫、丰产、优质与成熟期、抗逆力与适应性等性状。曹必好等^[14]利用 RAPD 技术, 检测到与红叶芥菜相关的分子标记。在芥菜分子标记遗传多样性研究方面, 乔爱民等^[15]和 Fu 等^[16]利用 RAPD 技术、Qi 等利用 ITS 序列标记^[17]和 AFLP 标记^[18]、宋明等^[19]利用 RAPD 和 ISSR 标记对芥菜不同变种间的遗传变异进行了研究。但利用 SSR 分子标记检测不同类型芥菜变种间遗传差异的研究报道较少。因此, 利用 SSR 分子标记技术检测 16 个芥菜变种间的遗传多样性, 探讨 16 个芥菜变种间的亲缘关系, 以期对芥菜分类、品种鉴定、新品种的选育和遗传改良提供依据。

1 材料和方法

1.1 供试材料

供试材料为来自全国各地的具有代表性的 16 个芥菜变种, 材料编号、名称和收集地见表 1。

表 1 材料名称及来源

编号	材料名称	拉丁名	材料来源	编号	材料名称	拉丁名	材料来源
1	白花芥	<i>B. juncea</i> var. <i>leucanthus</i> Chen et Yang	陕西汉中	9	卷心芥	<i>B. juncea</i> var. <i>involuta</i> Yang et Chen	重庆垫江
2	宽柄芥	<i>B. juncea</i> var. <i>latipa</i> Li	四川自贡	10	花叶芥	<i>B. juncea</i> var. <i>multisecta</i> Bailey	浙江陇右
3	抱子芥	<i>B. juncea</i> var. <i>gemmifera</i> Lee et Li	四川雅安	11	茎瘤芥	<i>B. juncea</i> var. <i>tumida</i> Tsen et Lee	重庆涪陵
4	长柄芥	<i>B. juncea</i> var. <i>longepetiolata</i> Yang et Chen	重庆梁平	12	结球芥	<i>B. juncea</i> var. <i>capitata</i> Hort	广东潮州
5	大头芥	<i>B. juncea</i> var. <i>megarrhiza</i> Tsen et Lee	湖南常德	13	薹芥	<i>B. juncea</i> var. <i>utilis</i> Li	贵州贵阳
6	大叶芥	<i>B. juncea</i> var. <i>rugosa</i> Bailey	江西抚州	14	笋子芥	<i>B. juncea</i> var. <i>carassicaulis</i> Chen et Yang	四川雅安
7	分蘖芥	<i>B. juncea</i> var. <i>multiceps</i> Tsen et Lee	江苏南京	15	小叶芥	<i>B. juncea</i> var. <i>foliosa</i> Bailey	四川美姑
8	凤尾芥	<i>B. juncea</i> var. <i>linearifolia</i> Sun	四川西昌	16	叶瘤芥	<i>B. juncea</i> var. <i>strumata</i> Tsen et Lee	四川泸县

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取与检测 分别取 16 个芥菜变种的典型植株各 30 株, 于苗期取幼嫩叶片, 等量混合, 采用 $2\times$ CTAB 法提取 DNA^[16]。用 1% 琼脂糖凝胶检测 DNA 的完整性及纯度。

1.2.2 PCR 扩增 根据芸薹作物网 (<http://www.brassica.info>) 公布的十字花科共同引物合成 81 对引物, 随机选取 3 份芥菜材料 DNA 作模板, 从 81 对引物中筛选扩增条带清晰、多态性好的引物, 再利用筛选出的引物对 16 份材料进行 PCR 扩增。

采用天根公司提供的 Master Mix PCR 混合酶, 其中混有 Mg^{2+} 、*Taq* 酶和 dNTPS, 添加上、下游引物和 DNA, 利用梯度 PCR 仪筛选引物适合退火温度。最终获得适合于芥菜 SSR 分析的 $10\ \mu\text{L}$ 体系, 即 ddH_2O $2\ \mu\text{L}$, PCR Master Mix $5\ \mu\text{L}$, 上、下游引物各 $1\ \mu\text{L}$, DNA $1\ \mu\text{L}$, 另加 $20\ \mu\text{L}$ 液体石蜡覆盖。PCR 扩增反应程序为: $95\ ^\circ\text{C}$ 预变性 5 min, 1 个循环; 进行 10 个循环的 PCR 扩增 [$95\ ^\circ\text{C}$ 变性 40 s, $62\ ^\circ\text{C}$ 退火 30 s (实际退火温度随引物而变化), $72\ ^\circ\text{C}$ 延伸 1 min, 每个循环降 $1\ ^\circ\text{C}$]; 然后再进行 30 个循

环的 PCR 扩增[95 °C 变性 40 s, 52 °C 退火 40 s (实际退火温度随引物而变化), 72 °C 延伸 1 min]; 72 °C 再延伸 5 min; 最后于 12 °C 下保存。

1.2.3 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测 PCR 扩增在 Thermo Hybrid PCR 仪上进行。PCR 扩增产物用浓度为 6% 的变性聚丙烯酰胺凝胶, 75 W、50 °C 电泳 1 h 后银染。

1.3 统计与分析

根据聚丙烯酰胺凝胶电泳结果, 统计清晰、多态性好的条带, 建立 0~1 数据库, 在相同迁移位置上有带的记为 1, 无带的记为 0, 缺项记为 9, 根据原始数据矩阵进行主成分分析。计算等位基因数、多态信息量 (PIC), $PIC = 1 - \sum f_i^2$, f 为第 i 个基因型的频率; 计算遗传相似系数 (GS), $GS = 2N_{ij} / (N_i + N_j)$, 其中 N_i 代表第 i 个品种的扩增条带数目, N_j 代表第 j 个品种的扩增条带数目, N_{ij} 代表第 i, j 个品种间共有的条带数目, 并运用 UPGMA 方法进行聚类分析。所有数据统计在 Excel 和 NTSYSpc 2.1 软件中进行。

2 结果与分析

2.1 SSR 分子标记扩增结果统计

从 81 对引物中筛选出扩增条带清晰、具明显多态性的引物 66 对 (表 2), 对 16 个芥菜变种进行 PCR 扩增。结果表明, 共检测到 602 个扩增条带, 每对引物扩增条带数都在 3~14, 平均值为 9.12。其中, 多态性条带有 557 条, 占 92.5%, 每对引物多态性条带在 2~13, 平均值为 8.44。其中引物 SSROL13-D02 检测到扩增条带数最多, 为 14, 它与引物 SSRa2-H10 多态性条带数最多, 均为 13。平均多态性信息量为 0.91, 变幅为 0.56~0.97, 其中引物 SSRNi4-A02、SSRNi4-D08、SSRNa12-G11、SSRNa14-C12、FITO152、FITO160、SSRra2-H09、SSRra2-H10、SSRra2-H04、SSRra3-E04、SSRra3-E07、SSRNa12-D03 和 SSRNa12-B12 多态性信息量最大, 为 0.97, 引物 SSRNa14-G06 多态性信息量最低, 为 0.56。以上分析表明, SSR 分子标记能够有效检测不同芥菜变种间的遗传差异。

表 2 引物名称及碱基序列

序号	引物名称	碱基序列	扩增条带数	多态性条带数	SSR 多态信息量
1	SSROL12-B12	GACAAACAGCTCCATCAACG/CACGAACACAATCGGTCAAC	5	5	0.89
2	SSROL13-D02	TTCTCCACACCAAGCAACAC/TACAGGCTTGGTCGTTTTCC	14	13	0.96
3	SSRra2-D01	ACGATGCGATCGATAAATCC/CACAACATAACACGTGCGCC	11	8	0.96
4	SSROL10-A02	ATGAAAACCAATCCAGTGCC/GATAGCAGATGGAAGAGCCG	10	9	0.93
5	SSROL10-B02	CACGAACGCGAGAGAGAGAG/TGCATAAGCTCGAAGAGACG	8	7	0.94
6	SSROL10-B07	AATCAAGAAGCTGGACCACG/ACCCTGAAACCACTGTCACC	10	9	0.96
7	SSRra2-G08	ATGTCCGGATAACCGAATCC/GAAGCTTTTTCAATTTTAAAGTTCTCTC	8	7	0.88
8	SSRra2-F11	TGAAACTAGGGTTTCCAGCC/CTTACCATGGTTTTGTCCC	13	11	0.92
9	SSRra2-G02	GGGTTATTTACGCAACTCG/ACACAGGCGGGTTACATAGC	10	7	0.92
10	SSRra2-B07	TTTAACTGCTGCAGGTCGC/GGGCAAATGTGATAAATCCG	8	8	0.96
11	SSRo12-D03	TCCATGTTTCATGTTGGAGG/TTCTCTCCGGCTTCACTTTC	6	5	0.71
12	SSRNi4-G04	GAGGCGGTGGACTAACC/TTACACCCATCCAAACTCC	10	10	0.96
13	SSRra2-C12	CTTGAGTGTGTGTATGTGTGC/GCACGCTACCCGTTACCAC	9	9	0.96
14	SSROL12-B05	GGAAAGCGAAGAGTGACGAC/ATTGGGTAAAGCTGTGCTCG	9	7	0.96
15	SSRNa14-G06	AAACGGCTTGCAATTGTTCTC/GGCTTGCTTGATCCAGTCTC	3	2	0.56
16	SSRNi2-B02	CGTGCAATTATACGAAAGC/CCTCATGCTCTCCAAAGACC	13	11	0.96
17	SSRNi2-D06	GGGGAAGAGAGAGAGAGAGAG/ATTTGTAGCCCTAGTGGCCC	11	9	0.86
18	SSRNi3-F01	AGCCGCTAAAGAGAAGGTCC/CGCTTTCAAGCTCTCTCCC	10	10	0.96
19	SSRNi4-A02	AGGACCACTGGGATACAAGC/ATTTGGAGCTGCGTACTTCG	11	9	0.97
20	SSRNi4-D08	AGAGATGCTAAAGTGGATCACC/CGGGATTTGAAGACCTGC	9	9	0.97
21	SSRNi4-D09	AAAGGACAAAGAGGAAGGGC/TTGAAATCAAATGAGAGTGACG	6	6	0.83
22	SSRNa12-F09	TTGCACACATACCAGATGCC/ACTCGAAGAGAAGATAAGGTC	7	7	0.85
23	SSRNa12-F12	CGTTCTCACCTCCGATAAGC/TCCGATGTAGAATCAGCAGC	8	8	0.92
24	SSRNa12-G11	TCAACAAAATCTAACCAGTAAAGC/TTCTTGCTTGAATCATCC	11	11	0.97

续表 2 引物名称及碱基序列

序号	引物名称	碱基序列	扩增条带数	多态性条带数	SSR 多态信息量
25	SSRNa12-H04	TTTATCGTCTTTCCCTCCC/ACAAGGAACTAGAGAGAGAGAG	9	8	0.87
26	SSRNa14-C06	GCATACACTTGGGTCGTTTG/CTTCCAATTCAGCATCGTCC	5	4	0.66
27	SSRNa14-C12	CACATTTTGGTTCAATTCGG/TACGACGCTGGTTTCGATTC	11	11	0.97
28	SSRNa14-E11	TCATCCTTCTCACACAAAATC/CCTCGAAATAGCTCCAACCC	10	10	0.96
29	BRMS-020	AACAAGAGAAGGAGAGCCACCG/CGCTTATAAAATGGCAGTCGCA	8	8	0.93
30	MRMS-025	TGAAAACAAGCGCTACATGTGG/CAAGCAAGCATGACAAGCAACA	13	10	0.95
31	FIT0081	AACTAACTCGGGAAAACAACC/GAATGTCCGTCAGAATACC	11	11	0.93
32	SSRNi4-G08	ATTTGACGGACTCCTCTTGC/CACTTGGTAACTCTATGGATGCC	3	3	0.68
33	SSR0L10-B04	ATCTTCTCCACGTTTCATGC/CGAATCTGAAGTTCTGACCC	11	10	0.96
34	FITO081	AACTAACTCGGGAAAACAACC/GAATGTCCGTCAGAATACC	7	7	0.94
35	FITO100	GATGAGAGAAGGAAACCCTAA/ACAGCAGGAGAAGAGAGAGAA	11	10	0.96
36	FITO0109	CTGACGAAATACCGACGA/CAAATCAACCCAAGAGGAC	7	7	0.87
37	FITO152	AGAGGCAGGTGGATTCT/AGTGTCTGGTAGTCAGAGCC	12	12	0.97
38	FITO154	GGCACTACTAAGACATAAGCAA/ATAGCAAGACCCTCTCTGAA	9	7	0.85
39	FITO160	ATTATCTTCTTCTTGGGTT/TCATCCTTCTCCTCACTATCT	11	10	0.97
40	SSRRa2-G10	GAGACTCTCTCTCTCTCTCT/AATACGTGTGTGCCACCAAA	10	10	0.89
41	FITO197	ACCTTCTCCTTCTGGTGATT/CAACACACAACCCTTCAACT	8	8	0.95
42	SSRRa2-H09	TATGTGCGCCTGTTAGTGTG/ACATCGTTTAGCATGCTCCC	12	12	0.97
43	SSRRa2-H10	GCGCGTGTAGGCTACGTC/CGGCCGCGGCAACTG	13	13	0.97
44	SSRRa2-H04	GAAGACAAGAGATCATGGGAGG/TGAAATCGGTTTGATTCTTCG	10	10	0.97
45	SSRRa3-D04	AAAAGGACCTACCAATTTTCGTG/CGACCCAACTGAGCCATAC	10	10	0.91
46	SSRRa3-E04	CTTTGGGGTGTATTTCGGTTC/ACAAACTCGGTTTCTCCCG	9	9	0.97
47	SSRRa3-E07	GGTGGCATCTTGTGTGTGC/TATTATATACACATCACCGTTGACC	10	9	0.97
48	SSRRa3-E05	TTCTCATGCTCCAACCACAG/GTTTCTTCCAAGCCAAGCTG	6	6	0.74
49	SSRRa3-F07	GGTGGCATCTTGTGTGTGC/TATTATATACACATCACCGTTGACC	8	8	0.89
50	SSRNa12-D03	GGTAAGCCAAAACCCTTCC/GAAACCGGTAACAAAGTCGG	12	11	0.97
51	BN9A	GAGCCATCCCTAGCAAACAAG/CGTGGAAGCAAGTGAGATGAT	9	8	0.96
52	SSRNa12-C07	ACTCAACCCACAAACCTG/AGTTCCCGGATCCGATTAG	8	8	0.96
53	SSRNa12-C12	ACCTCGGGTTAAAGATAACAG/CTTCATCCAAAGTTTCTCTCTCTC	12	10	0.96
54	BN6A2	CTTTGTGTGGACTTTTGAAGTTTA/CGCAGCTTTTGGCCACCTG	6	6	0.87
55	SSRNa12-D10	GCCCTCAAAAAGAGAGTTGC/TTGATGTGGGTGAGGCTAGG	11	10	0.96
56	SSRNa12-D07	GAATCCAACGGATCAGAAGC/GCGTTCCAGAGACTCTCTCC	8	7	0.87
57	SSRNa12-E03	TTCGTTTCCCTTACTTTCG/CTCAGTTTCTGCAATCCACG	4	2	0.70
58	SSRNa12-E11	GATCACTTTCACGGTTTTCG/CAATATTGGGCATTTCTCAACC	6	6	0.73
59	SSRNa12-F03	GGCGACATAGATTTGAACCG/TCCACTTCTCTCTCTTCCCC	9	9	0.96
60	SSRNa10-B10	GTCGGGTTTGAGTGAGTTGG/CATCGCAGATCCTTCTCTCC	9	9	0.93
61	SSRNa10-B02	CGCGTTGTAACCTCAAGACC/TTTTCTAAATCATCCACTGTATCC	9	9	0.92
62	SSRNa10-E08	TCGGGGTTTGTGTGAGG/GAGGAGGATGCTAAGAGTGAGC	9	9	0.85
63	SSRNa12-C08	GTTTGGTTCAGAGGCAGAGG/CTATCGTGCAGAAGAAGGG	7	5	0.77
64	SSRNa10-C03	ATCGTTGCCATTAGGAGTGG/ACCAAATTAACCTCTTTGC	8	7	0.94
65	SSRNa12-B12	CGTGGACTAACGTTCCCC/CAAGGTTTCTGCAAGCTGTGGC	11	11	0.97
66	SSRNa12-B09	ACGGAAGATCAAACAGCTCC/TGAGCGACCCATTCTTTAGG	10	10	0.95

2.2 遗传相似系数分析

从表 3 可以看出,芥菜 16 个变种材料间的遗传相似系数变幅为 0.41~0.75,平均值为 0.60,其中大叶芥和凤尾芥的遗传相似系数最大,为 0.75,表明它们之间亲缘关系最近。宽柄芥和薹芥的遗传相似系数最小,为 0.41,表明它们的亲

缘关系较远。对 16 个芥菜变种间 120 个遗传相似系数的分布情况进行统计,从图 1 可以看出,多数遗传相似系数都小于 0.70,遗传相似系数在 0.60~0.70 分布最多,有 71 个,占 59.17%。以上分析表明,芥菜 16 个变种材料间的遗传多样性较丰富。

表 3 不同类型芥菜变种间的遗传相似系数

材料编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1	1.00															
2	0.67	1.00														
3	0.58	0.57	1.00													
4	0.62	0.60	0.57	1.00												
5	0.62	0.62	0.59	0.62	1.00											
6	0.64	0.65	0.59	0.68	0.63	1.00										
7	0.66	0.66	0.58	0.66	0.62	0.72	1.00									
8	0.64	0.65	0.56	0.65	0.66	0.75	0.66	1.00								
9	0.64	0.66	0.58	0.64	0.63	0.66	0.69	0.69	1.00							
10	0.66	0.60	0.56	0.61	0.65	0.68	0.66	0.69	0.62	1.00						
11	0.61	0.62	0.54	0.67	0.63	0.66	0.67	0.69	0.70	0.64	1.00					
12	0.61	0.64	0.52	0.60	0.61	0.67	0.63	0.70	0.64	0.61	0.64	1.00				
13	0.49	0.41	0.50	0.46	0.46	0.48	0.49	0.47	0.46	0.48	0.47	0.46	1.00			
14	0.63	0.59	0.58	0.62	0.60	0.62	0.63	0.61	0.61	0.62	0.63	0.60	0.50	1.00		
15	0.59	0.57	0.56	0.61	0.57	0.63	0.64	0.63	0.61	0.60	0.63	0.58	0.49	0.67	1.00	
16	0.60	0.57	0.52	0.56	0.56	0.57	0.57	0.57	0.57	0.59	0.59	0.56	0.50	0.64	0.64	1.00

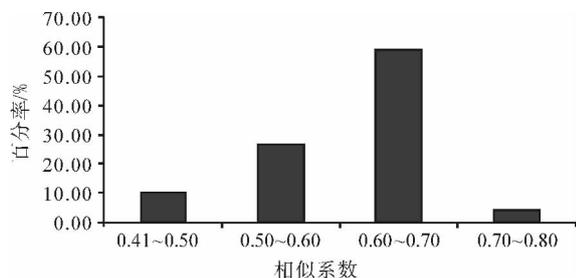


图 1 16 个芥菜变种间的遗传相似系数分布

2.3 聚类分析

基于遗传相似系数,利用 UPGMA 法对供试材

料进行聚类分析(图 2),当相似系数为 0.61 时,可将供试材料分成 4 类。第 1 类包括 1 份材料,即薹芥,占参试材料的 6.25%;第 2 类也包括 1 份材料,即抱子芥,占参试材料的 6.25%;笋子芥、小叶芥和叶瘤芥 3 份材料为第 3 类;白花芥、宽柄芥、长柄芥、大叶芥、凤尾芥、分蘖芥、卷心芥、茎瘤芥、花叶芥、结球芥和大头芥 11 份材料被归为第 4 类,占参试材料的 68.75%,还可以将第 4 类分为 5 个亚类。表明,供试材料间存在一定的遗传多样性,聚类结果与芥菜形态没有必然联系。

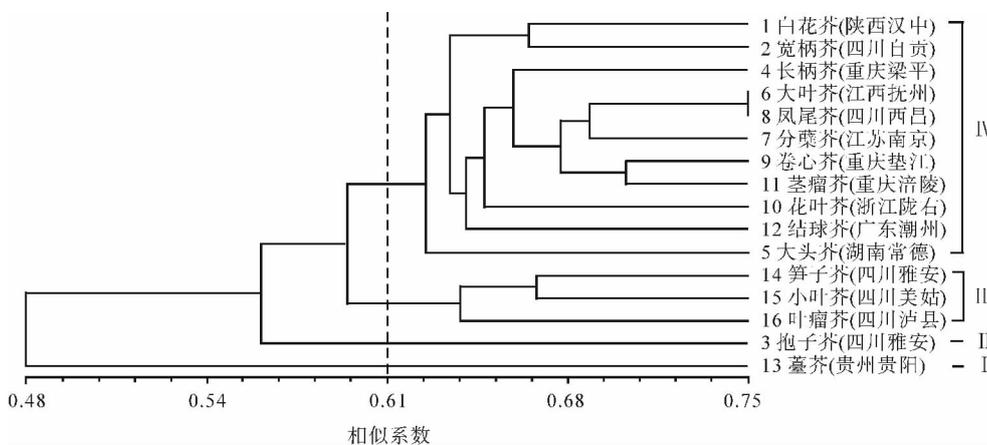


图 2 芥菜 16 个变种聚类分析

2.4 主成分分析

从表 4 可以看出,前 3 个主成分能解释的遗传变异分别为 63.04%、4.61%和 3.45%,利用 3 个主成分

对芥菜 16 个变种做前 3 个主成分的三维分布图(图 3),位置靠近的表示亲缘关系较近,反之亲缘关系较远。将位置靠近的材料归为一类,可将 16 个芥菜变种分为 4 类,第 1 类为薹芥;第 2 类为抱子芥;第 3 类

有 11 份材料,包括白花芥、宽柄芥、长柄芥、大叶芥、分蘖芥、凤尾芥、卷心芥、结球芥、花叶芥、茎瘤芥、大头芥;第 4 类包括笋子芥、小叶芥和叶瘤芥。结果同样表明,聚类结果与芥菜形态特征没有必然联系,且同一地区的大部分材料都能聚在一起。

表 4 基于主成分分析的特征向量值

编号	特征向量值	贡献率/%	累积贡献率/%
1	10.09	63.04	63.04
2	0.74	4.61	67.64
3	0.55	3.45	71.09
4	0.51	3.17	74.26
5	0.47	2.92	77.18
6	0.44	2.72	79.90
7	0.40	2.52	82.42
8	0.39	2.45	84.87
9	0.36	2.28	87.15
10	0.35	2.18	89.33
11	0.33	2.09	91.42
12	0.31	1.94	93.36
13	0.29	1.84	95.19
14	0.29	1.80	96.99
15	0.26	1.65	98.64
16	0.22	1.36	100.00

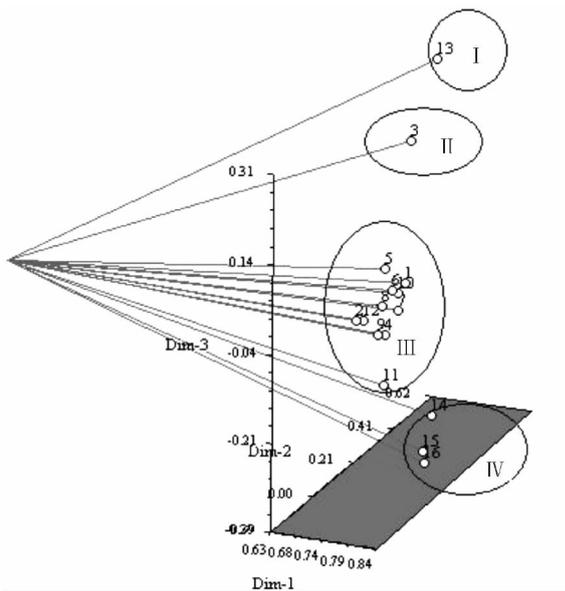


图 3 主成分分析的三维散点图

3 结论与讨论

3.1 不同类型芥菜变种的遗传多样性评价

遗传多样性指数是反映材料遗传变异的重要指标,遗传多样性丰富,说明种质类型多样,遗传差异较大,在品种选育及改良中有更多可选择和利用的基因^[18-20]。因此了解作物种质资源的遗传多样性及

其变化趋势,有助于确定育种目标,制定育种策略,扩大种质资源及对种质资源进行较好的利用。本研究结果表明,共扩出 602 条清晰谱带,其中多态性条带比率为 92.5%,16 个芥菜变种间的遗传相似系数为 0.41~0.75,平均值为 0.60,说明不同芥菜变种间存在一定的遗传多样性。乔爱民等利用 27 个 RAPD 引物对芥菜 16 个变种的遗传变异进行研究,共扩出 336 条 DNA 带,多态性带占 81.85%,16 个变种间的平均遗传距离为 7.34^[15]。Fu 等利用 16 个 RAPD 引物对 9 个芥菜变种进行分析,共扩出 111 个条带,多态性条带占 91%^[16]。Qi 等利用 40 对 AFLP 引物对中国芥菜 16 个变种的亲缘关系进行了分析,共扩出 296 条带,多态性条带占 21.1%,遗传相似系数在 0.63~0.88^[18]。宋明等利用 RAPD 和 ISSR 分子标记的方法对 28 份芥菜材料的遗传多样性进行分析,结果表明,基于 RAPD 分析时,28 份材料之间的遗传相似系数在 0.55~0.96,平均为 0.72,基于 ISSR 标记分析时,28 份材料之间的遗传相似系数在 0.57~0.96,平均为 0.74^[19]。这些研究结果与本研究的结论都表明中国芥菜不同变种之间存在一定的遗传多样性,因此,在今后的育种中应加大不同芥菜品种之间的杂交育种,创造新的芥菜种质资源。

3.2 关于芥菜分类的探讨

物种的分类研究是物种种质资源研究的基础性工作,一直以来,很多学者都对芥菜分类进行了研究。传统的分类方法主要根据形态特征,将芥菜分为根芥、茎芥、叶芥和薹芥四大类,大头芥、笋子芥、茎瘤芥、抱子芥、大叶芥、小叶芥、白花芥、花叶芥、长柄芥、凤尾芥、叶瘤芥、宽柄芥、卷心芥、结球芥、分蘖芥和薹芥 16 个变种^[1]。乔爱民等利用 RAPD 技术把芥菜的 16 个变种划归为 A、B、C 3 个组,其中 A 组有 7 个变种,B 组有 8 个变种,C 组有 1 个变种^[15]。Fu 等^[16]利用 RAPD 将芥菜 9 个变种分为 3 类,其中大头芥和薹芥分别为一类,其他 6 个变种为一类。Qi 等^[18]利用 AFLP 将 16 个变种分为 2 个类群,其中茎瘤芥单独为一类,其余 15 个变种为一类。宋明等^[19]利用 RAPD 和 ISSR 标记可将 28 份芥菜种质划分为三大类,3 个类群。第 I 类群包括 15 份种质,其基本特征表现为根部膨大和分蘖;第 II 类群包括 9 份种质,全部属于叶用芥菜;第 III 类群包括 4 份种质,全部属于茎瘤芥。本研究中可将供试材料分成 4 类。薹芥和抱子芥分别单独为一类,笋子芥、小叶芥和叶瘤芥为一类,白花芥、宽柄芥、长柄芥、大叶芥、凤尾芥、分蘖芥、卷心芥、茎瘤芥、花叶

芥、结球芥和大头芥为第 4 类。可以看出,利用分子标记进行的分类跟传统的形态学分类存在较大差异,并且采用不同的分子标记进行分类的结果存在差异。导致对芥菜分类不相吻合的原因可能是:(1)分类的依据不同,传统分类方法是按某一形态特征进行分类,而分子标记是通过检测基因型来进行,所以会出现同一物种分类现象不同的情况;(2)在传统分类时,可能出现了处于两类分类标准之间的某一特征,分类界限不明显,结果出现分类不准确;(3)一种分子标记只检测了物种的部分基因,不同分子标记之间可能出现分类结果的差异;(4)多数研究只采用了芥菜 16 个变种各 1 份或几份材料,样品的代表性不足。

通过聚类分析和主成分分析,将供试材料分成 4 类,不过第 3 类包括笋子芥、小叶芥、叶瘤芥,都来自四川;来自重庆的长柄芥、卷心芥、茎瘤芥都归为第 4 类。还可以看出,来自贵州的品种为第 1 类,来自四川的大部分品种都在第 3 类,来自重庆的品种都在第 4 类,聚类分析结果与地理来源有一定的关系,即来自同一地方的品种趋于聚在一类。造成这一现象的原因可能是不同芥菜变种之间可以自由授粉,同一地区之间不同类型芥菜可以具有系统的遗传背景。因此,在育种中可以加强不同地区之间芥菜材料的相互引种,以扩增本地区芥菜种质的遗传基础。

参考文献:

- [1] 刘佩瑛. 中国芥菜[M]. 北京:中国农业出版社,1996:47.
- [2] 周源,陈学群,周光凡,等. 栽培芥菜、野生芥菜及其基本祖种的同工酶分析[J]. 西南农业学报,1990,3(4):42-46.
- [3] 陈材林,周源,周光凡,等. 中国的芥菜起源探讨[J]. 西南农业学报,1992,5(3):6-10.
- [4] 孟秋峰,王毓洪,皇甫伟国,等. 芥菜类蔬菜植物学性状鉴定及聚类分析[J]. 浙江农业科学,2006(3):254-257.
- [5] 童南奎. 菜用芥菜不同变种的核型及染色体行为观察[J]. 西南农业大学学报,1991,13(3):321-324.
- [6] 孟秋峰,汪炳良,皇甫伟国,等. 芥菜花粉形态特征及分类初探[J]. 浙江大学学报:农业与生命科学版,2006,32(1):65-70.
- [7] 寇士伟,倪高风,马岚婷,等. Cd-Pb-Cu 复合污染对芥菜生长及生理特性的影响[J]. 环境科学研究,2011,24(3):281-286.
- [8] 郭零,侯明. 钒胁迫对芥菜生理特性的影响[J]. 桂林理工大学学报,2010,30(4):617-620.
- [9] 陈学群,周光凡,周源,等. 芥菜酯酶同工酶分析[J]. 西南农业学报,1993,6(3):40-46.
- [10] 童南奎,陈世儒. 芥菜及其原始亲本种的酸性磷酸酶同工酶分析[J]. 园艺学报,1990,17(4):293-298.
- [11] 任锡亮,王毓洪,赵天荣,等. 芥菜品种资源对芜菁花叶病毒的抗病性鉴定研究[J]. 宁波农业科技,2007(4):2-3.
- [12] 宋学林,方伟良. 大叶包心芥丰产栽培技术[J]. 上海蔬菜,2010(4):32.
- [13] 孟秋峰,王毓洪,任锡亮,等. 加工型茎用芥菜适应性研究[J]. 宁波农业科技,2010(1):15-17.
- [14] 曹必好,雷建军,宋洪元,等. 芥菜的红叶 RAPD 标记筛选研究[J]. 农业生物技术学报,2001,9(3):238-242.
- [15] 乔爱民,刘佩英,雷建军. 芥菜 16 个变种的 RAPD 研究[J]. 植物学报,1998,40(10):915-921.
- [16] Fu J, Zhang M F, Qi X H. Genetic diversity of traditional Chinese mustard crops *Brassica juncea* as revealed by phenotypic differences and RAPD markers [J]. Genetic Resources and Crop Evolution, 2006, 53: 1513-1519.
- [17] Qi X H, Zhang M F, Yang J H. Molecular phylogeny of Chinese vegetable mustard (*Brassica juncea*) based on the internal transcribed spacers (ITS) of nuclear ribosomal DNA [J]. Genetic Resources and Crop Evolution, 2007, 54: 1709-1716.
- [18] Qi X H, Yang J H, Zhang M F. AFLP-based genetic diversity assessment among Chinese vegetable mustards [*Brassica juncea* (L.) Czern.] [J]. Genetic Resources and Crop Evolution, 2008, 55: 705-711.
- [19] 宋明,刘婷,汤清林. 芥菜种质资源遗传多样性的 RAPD 和 ISSR 分析[J]. 园艺学报,2009,36(6):835-842.
- [20] 肖亮,蒋建雄,易自力,等. 五节芒种质资源的表型多样性分析[J]. 湖南农业大学学报:自然科学版,2013,39(2):150-154.